(19)日本国特許庁(JP)　(12)公開特許公報(A)　(11)特許出願公開番号
特開2005-46146
(P2005-46146A)
(43)公開日　平成17年2月24日(2005.2.24)

(51)Int.Cl.[7]	F I		テーマコード（参考）
C12N 15/09	C12N 15/00	ZNAA	2G045
A61K 31/7088	A61K 31/7088		4B024
A61K 38/00	A61K 39/395	D	4B063
A61K 39/395	A61K 39/395	N	4B064
A61K 45/00	A61K 45/00		4B065

審査請求 未請求　請求項の数 80　ＯＬ　（全 200 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2004-212340(P2004-212340)
(22)出願日　平成16年7月20日(2004.7.20)
(62)分割の表示　特願2000-584912(P2000-584912)の分割
原出願日　平成11年11月30日(1999.11.30)
(31)優先権主張番号　PCT/US98/25108
(32)優先日　平成10年12月1日(1998.12.1)
(33)優先権主張国　米国(US)
(31)優先権主張番号　60/112,850
(32)優先日　平成10年12月16日(1998.12.16)
(33)優先権主張国　米国(US)
(31)優先権主張番号　60/115,554
(32)優先日　平成11年1月12日(1999.1.12)
(33)優先権主張国　米国(US)

(71)出願人　596168317
ジェネンテック・インコーポレーテッド
ＧＥＮＥＮＴＥＣＨ，ＩＮＣ．
アメリカ合衆国カリフォルニア・９４０８０－４９９０・サウス・サン・フランシスコ・ディーエヌエー・ウェイ・１
(74)代理人　100109726
弁理士　園田　吉隆
(74)代理人　100101199
弁理士　小林　義教
(72)発明者　アシュケナジ，アヴィ，ジェー．
アメリカ合衆国　カリフォルニア　９４４０２，サン　マテオ，テリー　タウン　ストリート　１４５６

最終頁に続く

(54)【発明の名称】血管形成及び心臓血管新生の促進又は阻害

(57)【要約】　（修正有）

【課題】哺乳動物における血管新生及び／又は心臓血管形成を刺激又は阻害するための製薬組成物、その使用方法などを開示する。
【解決手段】製薬組成物は、これらの用途の一又は複数について同定されたポリペプチド又はそれに対するアンタゴニストに基づく。該組成物により疾患が診断、予防又は治療される。疾患は、創傷等の外傷、種々の癌、及びアテローム性硬化症及び心臓肥大を含む血管疾患を含む。本発明は新規なポリペプチド及びこれらのポリペプチドをコードする核酸分子に係っており、これらの核酸配列を含むベクター及び宿主細胞、異種ポリペプチドに融合した本発明のポリペプチドを含むキメラ分子、本発明のポリペプチドに結合する抗体、及び本発明のポリペプチドを製造する。
【選択図】なし

【特許請求の範囲】
【請求項１】
配列番号：９，配列番号：１４，配列番号：１６，配列番号：２１，配列番号：２６，配列番号：３１，配列番号：３６，配列番号：４１，配列番号：４６，配列番号：５１，配列番号：５６，配列番号：６２，配列番号：６７，配列番号：７０，配列番号：７７，配列番号：８５，配列番号：９０，配列番号：９８，配列番号：１０７，配列番号：１１２，配列番号：１１７，配列番号：１２７，配列番号：１３２，配列番号：１３７，配列番号：１４３，配列番号：１４８，配列番号：１５３，配列番号：１５５，配列番号：１６０，配列番号：１６２，配列番号：１７０，配列番号：１８１，配列番号：１８３，配列番号：１９１，配列番号：１９３，配列番号：１９５，配列番号：１９７，配列番号：１９９，配列番号：２０１，配列番号：２０３，配列番号：２０５，配列番号：２１４，配列番号：２１８，配列番号：２２０，配列番号：２２２，又は配列番号：２２７に示されるポリペプチド、又はそのアゴニスト又はアンタゴニストを、製薬的に許容される担体と混合して含んでなる組成物。
【請求項２】
前記ポリペプチド、又は前記そのアゴニスト又はアンタゴニストの治療的有効量を含む請求項１に記載の組成物。
【請求項３】
アゴニストが、配列番号：９，配列番号：１４，配列番号：１６，配列番号：２１，配列番号：２６，配列番号：３１，配列番号：３６，配列番号：４１，配列番号：４６，配列番号：５１，配列番号：５６，配列番号：６２，配列番号：６７，配列番号：７０，配列番号：７７，配列番号：８５，配列番号：９０，配列番号：９８，配列番号：１０７，配列番号：１１２，配列番号：１１７，配列番号：１２７，配列番号：１３２，配列番号：１３７，配列番号：１４３，配列番号：１４８，配列番号：１５３，配列番号：１５５，配列番号：１６０，配列番号：１６２，配列番号：１７０，配列番号：１８１，配列番号：１８３，配列番号：１９１，配列番号：１９３，配列番号：１９５，配列番号：１９７，配列番号：１９９，配列番号：２０１，配列番号：２０３，配列番号：２０５，配列番号：２１４，配列番号：２１８，配列番号：２２０，配列番号：２２２，又は配列番号：２２７に示されるポリペプチドに対する抗体である請求項１に記載の組成物。
【請求項４】
アンタゴニストが、配列番号：９，配列番号：１４，配列番号：１６，配列番号：２１，配列番号：２６，配列番号：３１，配列番号：３６，配列番号：４１，配列番号：４６，配列番号：５１，配列番号：５６，配列番号：６２，配列番号：６７，配列番号：７０，配列番号：７７，配列番号：８５，配列番号：９０，配列番号：９８，配列番号：１０７，配列番号：１１２，配列番号：１１７，配列番号：１２７，配列番号：１３２，配列番号：１３７，配列番号：１４３，配列番号：１４８，配列番号：１５３，配列番号：１５５，配列番号：１６０，配列番号：１６２，配列番号：１７０，配列番号：１８１，配列番号：１８３，配列番号：１９１，配列番号：１９３，配列番号：１９５，配列番号：１９７，配列番号：１９９，配列番号：２０１，配列番号：２０３，配列番号：２０５，配列番号：２１４，配列番号：２１８，配列番号：２２０，配列番号：２２２，又は配列番号：２２７に示されるポリペプチドに対する抗体である請求項１に記載の組成物。
【請求項５】
心臓血管、内皮、血管形成又はアンギオスタチック(angiostatic)薬をさらに含む請求項１に記載の組成物。
【請求項６】
配列番号：９，配列番号：１４，配列番号：１６，配列番号：２１，配列番号：２６，配列番号：３１，配列番号：３６，配列番号：４１，配列番号：４６，配列番号：５１，配列番号：５６，配列番号：６２，配列番号：６７，配列番号：７０，配列番号：７７，配列番号：８５，配列番号：９０，配列番号：９８，配列番号：１０７，配列番号：１１２，配列番号：１１７，配列番号：１２７，配列番号：１３２，配列番号：１３７，配列番

号：１４３，配列番号：１４８，配列番号：１５３，配列番号：１５５，配列番号：１６０，配列番号：１６２，配列番号：１７０，配列番号：１８１，配列番号：１８３，配列番号：１９１，配列番号：１９３，配列番号：１９５，配列番号：１９７，配列番号：１９９，配列番号：２０１，配列番号：２０３，配列番号：２０５，配列番号：２１４，配列番号：２１８，配列番号：２２０，配列番号：２２２，又は配列番号：２２７に示されるポリペプチド、又はそのアゴニスト又はアンタゴニストを、製薬的に許容される担体と混合することを含んでなる請求項１に記載の組成物の製造方法。

【請求項７】

（１）（ａ）配列番号：９，配列番号：１４，配列番号：１６，配列番号：２１，配列番号：２６，配列番号：３１，配列番号：３６，配列番号：４１，配列番号：４６，配列番号：５１，配列番号：５６，配列番号：６２，配列番号：６７，配列番号：７０，配列番号：７７，配列番号：８５，配列番号：９０，配列番号：９８，配列番号：１０７，配列番号：１１２，配列番号：１１７，配列番号：１２７，配列番号：１３２，配列番号：１３７，配列番号：１４３，配列番号：１４８，配列番号：１５３，配列番号：１５５，配列番号：１６０，配列番号：１６２，配列番号：１７０，配列番号：１８１，配列番号：１８３，配列番号：１９１，配列番号：１９３，配列番号：１９５，配列番号：１９７，配列番号：１９９，配列番号：２０１，配列番号：２０３，配列番号：２０５，配列番号：２１４，配列番号：２１８，配列番号：２２０，配列番号：２２２，又は配列番号：２２７に示されているポリペプチド、（ｂ）配列番号：９，配列番号：１４，配列番号：１６，配列番号：２１，配列番号：２６，配列番号：３１，配列番号：３６，配列番号：４１，配列番号：４６，配列番号：５１，配列番号：５６，配列番号：６２，配列番号：６７，配列番号：７０，配列番号：７７，配列番号：８５，配列番号：９０，配列番号：９８，配列番号：１０７，配列番号：１１２，配列番号：１１７，配列番号：１２７，配列番号：１３２，配列番号：１３７，配列番号：１４３，配列番号：１４８，配列番号：１５３，配列番号：１５５，配列番号：１６０，配列番号：１６２，配列番号：１７０，配列番号：１８１，配列番号：１８３，配列番号：１９１，配列番号：１９３，配列番号：１９５，配列番号：１９７，配列番号：１９９，配列番号：２０１，配列番号：２０３，配列番号：２０５，配列番号：２１４，配列番号：２１８，配列番号：２２０，配列番号：２２２，又は配列番号：２２７に示されているポリペプチドのアゴニスト、又は（ｃ）配列番号：９，配列番号：１４，配列番号：１６，配列番号：２１，配列番号：２６，配列番号：３１，配列番号：３６，配列番号：４１，配列番号：４６，配列番号：５１，配列番号：５６，配列番号：６２，配列番号：６７，配列番号：７０，配列番号：７７，配列番号：８５，配列番号：９０，配列番号：９８，配列番号：１０７，配列番号：１１２，配列番号：１１７，配列番号：１２７，配列番号：１３２，配列番号：１３７，配列番号：１４３，配列番号：１４８，配列番号：１５３，配列番号：１５５，配列番号：１６０，配列番号：１６２，配列番号：１７０，配列番号：１８１，配列番号：１８３，配列番号：１９１，配列番号：１９３，配列番号：１９５，配列番号：１９７，配列番号：１９９，配列番号：２０１，配列番号：２０３，配列番号：２０５，配列番号：２１４，配列番号：２１８，配列番号：２２０，配列番号：２２２，又は配列番号：２２７に示されるポリペプチドを製薬的に許容される担体と混合して含む組成物；

（２）前記組成物を収容する容器；及び

（３）前記組成物の心臓血管、内皮、及び血管形成疾患の治療における使用を表示する、前記容器に貼付されたラベル、又は前記容器に収納された包装挿入物

を含んでなる製造物品。

【請求項８】

前記アゴニストが、配列番号：９，配列番号：１４，配列番号：１６，配列番号：２１，配列番号：２６，配列番号：３１，配列番号：３６，配列番号：４１，配列番号：４６，配列番号：５１，配列番号：５６，配列番号：６２，配列番号：６７，配列番号：７０，配列番号：７７，配列番号：８５，配列番号：９０，配列番号：９８，配列番号：１０７，配列番号：１１２，配列番号：１１７，配列番号：１２７，配列番号：１３２，配列番

号：１３７，配列番号：１４３，配列番号：１４８，配列番号：１５３，配列番号：１５５，配列番号：１６０，配列番号：１６２，配列番号：１７０，配列番号：１８１，配列番号：１８３，配列番号：１９１，配列番号：１９３，配列番号：１９５，配列番号：１９７，配列番号：１９９，配列番号：２０１，配列番号：２０３，配列番号：２０５，配列番号：２１４，配列番号：２１８，配列番号：２２０，配列番号：２２２，又は配列番号：２２７に示されるポリペプチドに対する抗体である請求項７に記載の製造物品。

【請求項９】

前記アンタゴニストが、配列番号：９，配列番号：１４，配列番号：１６，配列番号：２１，配列番号：２６，配列番号：３１，配列番号：３６，配列番号：４１，配列番号：４６，配列番号：５１，配列番号：５６，配列番号：６２，配列番号：６７，配列番号：７０，配列番号：７７，配列番号：８５，配列番号：９０，配列番号：９８，配列番号：１０７，配列番号：１１２，配列番号：１１７，配列番号：１２７，配列番号：１３２，配列番号：１３７，配列番号：１４３，配列番号：１４８，配列番号：１５３，配列番号：１５５，配列番号：１６０，配列番号：１６２，配列番号：１７０，配列番号：１８１，配列番号：１８３，配列番号：１９１，配列番号：１９３，配列番号：１９５，配列番号：１９７，配列番号：１９９，配列番号：２０１，配列番号：２０３，配列番号：２０５，配列番号：２１４，配列番号：２１８，配列番号：２２０，配列番号：２２２，又は配列番号：２２７に示されるポリペプチドに対する抗体である請求項７に記載の製造物品。

【請求項１０】

前記組成物が、前記製薬的に許容される担体と混合された、前記ポリペプチド又はそのアゴニスト又はアンタゴニストの治療的有効量を含む請求項７に記載の製造物品。

【請求項１１】

配列番号：９，配列番号：１４，配列番号：１６，配列番号：２１，配列番号：２６，配列番号：３１，配列番号：３６，配列番号：４１，配列番号：４６，配列番号：５１，配列番号：５６，配列番号：６２，配列番号：６７，配列番号：７０，配列番号：７７，配列番号：８５，配列番号：９０，配列番号：９８，配列番号：１０７，配列番号：１１２，配列番号：１１７，配列番号：１２７，配列番号：１３２，配列番号：１３７，配列番号：１４３，配列番号：１４８，配列番号：１５３，配列番号：１５５，配列番号：１６０，配列番号：１６２，配列番号：１７０，配列番号：１８１，配列番号：１８３，配列番号：１９１，配列番号：１９３，配列番号：１９５，配列番号：１９７，配列番号：１９９，配列番号：２０１，配列番号：２０３，配列番号：２０５，配列番号：２１４，配列番号：２１８，配列番号：２２０，配列番号：２２２，又は配列番号：２２７に示されるポリペプチドのアゴニストを同定する方法において：

（ａ）細胞及びスクリーニングすべき試験化合物を、配列番号：９，配列番号：１４，配列番号：１６，配列番号：２１，配列番号：２６，配列番号：３１，配列番号：３６，配列番号：４１，配列番号：４６，配列番号：５１，配列番号：５６，配列番号：６２，配列番号：６７，配列番号：７０，配列番号：７７，配列番号：８５，配列番号：９０，配列番号：９８，配列番号：１０７，配列番号：１１２，配列番号：１１７，配列番号：１２７，配列番号：１３２，配列番号：１３７，配列番号：１４３，配列番号：１４８，配列番号：１５３，配列番号：１５５，配列番号：１６０，配列番号：１６２，配列番号：１７０，配列番号：１８１，配列番号：１８３，配列番号：１９１，配列番号：１９３，配列番号：１９５，配列番号：１９７，配列番号：１９９，配列番号：２０１，配列番号：２０３，配列番号：２０５，配列番号：２１４，配列番号：２１８，配列番号：２２０，配列番号：２２２，又は配列番号：２２７に示されるポリペプチドによって通常誘発される細胞性反応の誘発に適した条件下で接触させ；そして

（ｂ）前記細胞性反応の誘発を測定して、試験化合物が有効なアゴニストであるか否かを決定することを含んでなり、前記細胞性反応の誘発が前記試験化合物が有効なアゴニストであることを示す方法。

【請求項１２】

前記配列番号：９，配列番号：１４，配列番号：１６，配列番号：２１，配列番号：２６

，配列番号：３１，配列番号：３６，配列番号：４１，配列番号：４６，配列番号：５１，配列番号：５６，配列番号：６２，配列番号：６７，配列番号：７０，配列番号：７７，配列番号：８５，配列番号：９０，配列番号：９８，配列番号：１０７，配列番号：１１２，配列番号：１１７，配列番号：１２７，配列番号：１３２，配列番号：１３７，配列番号：１４３，配列番号：１４８，配列番号：１５３，配列番号：１５５，配列番号：１６０，配列番号：１６２，配列番号：１７０，配列番号：１８１，配列番号：１８３，配列番号：１９１，配列番号：１９３，配列番号：１９５，配列番号：１９７，配列番号：１９９，配列番号：２０１，配列番号：２０３，配列番号：２０５，配列番号：２１４，配列番号：２１８，配列番号：２２０，配列番号：２２２，又は配列番号：２２７に示されるポリペプチドによって通常誘発される細胞性反応が、細胞増殖の刺激である請求項１１に記載の方法。

【請求項１３】

配列番号：９，配列番号：１４，配列番号：１６，配列番号：２１，配列番号：２６，配列番号：３１，配列番号：３６，配列番号：４１，配列番号：４６，配列番号：５１，配列番号：５６，配列番号：６２，配列番号：６７，配列番号：７０，配列番号：７７，配列番号：８５，配列番号：９０，配列番号：９８，配列番号：１０７，配列番号：１１２，配列番号：１１７，配列番号：１２７，配列番号：１３２，配列番号：１３７，配列番号：１４３，配列番号：１４８，配列番号：１５３，配列番号：１５５，配列番号：１６０，配列番号：１６２，配列番号：１７０，配列番号：１８１，配列番号：１８３，配列番号：１９１，配列番号：１９３，配列番号：１９５，配列番号：１９７，配列番号：１９９，配列番号：２０１，配列番号：２０３，配列番号：２０５，配列番号：２１４，配列番号：２１８，配列番号：２２０，配列番号：２２２，又は配列番号：２２７に示されるポリペプチドの活性を阻害する化合物の同定方法において、試験化合物を前記ポリペプチドと、試験化合物とポリペプチドとが相互作用するのに十分な条件及び時間で接触させ、前記ポリペプチドの活性が阻害されるか否かを測定することを含んでなる方法。

【請求項１４】

配列番号：９，配列番号：１４，配列番号：１６，配列番号：２１，配列番号：２６，配列番号：３１，配列番号：３６，配列番号：４１，配列番号：４６，配列番号：５１，配列番号：５６，配列番号：６２，配列番号：６７，配列番号：７０，配列番号：７７，配列番号：８５，配列番号：９０，配列番号：９８，配列番号：１０７，配列番号：１１２，配列番号：１１７，配列番号：１２７，配列番号：１３２，配列番号：１３７，配列番号：１４３，配列番号：１４８，配列番号：１５３，配列番号：１５５，配列番号：１６０，配列番号：１６２，配列番号：１７０，配列番号：１８１，配列番号：１８３，配列番号：１９１，配列番号：１９３，配列番号：１９５，配列番号：１９７，配列番号：１９９，配列番号：２０１，配列番号：２０３，配列番号：２０５，配列番号：２１４，配列番号：２１８，配列番号：２２０，配列番号：２２２，又は配列番号：２２７に示されるポリペプチドの活性を阻害する化合物の同定方法において：

（ａ）細胞とスクリーニングすべき試験化合物とを、前記ポリペプチドの存在下で、前記ポリペプチドによって通常誘発される細胞性反応の誘発に適した条件下で接触させ；そして

（ｂ）前記細胞性反応の誘発を測定して、試験化合物が有効なアンタゴニストであるか否かを決定する工程を含んでなる方法。

【請求項１５】

前記ポリペプチドによって通常誘発される細胞性反応が、細胞増殖の刺激である請求項１４に記載の方法。

【請求項１６】

配列番号：９，配列番号：１４，配列番号：１６，配列番号：２１，配列番号：２６，配列番号：３１，配列番号：３６，配列番号：４１，配列番号：４６，配列番号：５１，配列番号：５６，配列番号：６２，配列番号：６７，配列番号：７０，配列番号：７７，配列番号：８５，配列番号：９０，配列番号：９８，配列番号：１０７，配列番号：１１２

，配列番号：１１７，配列番号：１２７，配列番号：１３２，配列番号：１３７，配列番号：１４３，配列番号：１４８，配列番号：１５３，配列番号：１５５，配列番号：１６０，配列番号：１６２，配列番号：１７０，配列番号：１８１，配列番号：１８３，配列番号：１９１，配列番号：１９３，配列番号：１９５，配列番号：１９７，配列番号：１９９，配列番号：２０１，配列番号：２０３，配列番号：２０５，配列番号：２１４，配列番号：２１８，配列番号：２２０，配列番号：２２２，又は配列番号：２２７に示されるポリペプチドの、通常当該ポリペプチドを発現する細胞における発現を阻害する化合物の同定方法において、当該方法が、当該細胞と試験化合物とを、前記ポリペプチドを発現させるのに適した条件下で接触させ、前記ポリペプチドの発現が阻害されるか否かを測定することを含んでなる方法。

【請求項１７】

配列番号：９，配列番号：１４，配列番号：１６，配列番号：２１，配列番号：２６，配列番号：３１，配列番号：３６，配列番号：４１，配列番号：４６，配列番号：５１，配列番号：５６，配列番号：６２，配列番号：６７，配列番号：７０，配列番号：７７，配列番号：８５，配列番号：９０，配列番号：９８，配列番号：１０７，配列番号：１１２，配列番号：１１７，配列番号：１２７，配列番号：１３２，配列番号：１３７，配列番号：１４３，配列番号：１４８，配列番号：１５３，配列番号：１５５，配列番号：１６０，配列番号：１６２，配列番号：１７０，配列番号：１８１，配列番号：１８３，配列番号：１９１，配列番号：１９３，配列番号：１９５，配列番号：１９７，配列番号：１９９，配列番号：２０１，配列番号：２０３，配列番号：２０５，配列番号：２１４，配列番号：２１８，配列番号：２２０，配列番号：２２２，又は配列番号：２２７に示されるポリペプチドのアゴニスト。

【請求項１８】

配列番号：９，配列番号：１４，配列番号：１６，配列番号：２１，配列番号：２６，配列番号：３１，配列番号：３６，配列番号：４１，配列番号：４６，配列番号：５１，配列番号：５６，配列番号：６２，配列番号：６７，配列番号：７０，配列番号：７７，配列番号：８５，配列番号：９０，配列番号：９８，配列番号：１０７，配列番号：１１２，配列番号：１１７，配列番号：１２７，配列番号：１３２，配列番号：１３７，配列番号：１４３，配列番号：１４８，配列番号：１５３，配列番号：１５５，配列番号：１６０，配列番号：１６２，配列番号：１７０，配列番号：１８１，配列番号：１８３，配列番号：１９１，配列番号：１９３，配列番号：１９５，配列番号：１９７，配列番号：１９９，配列番号：２０１，配列番号：２０３，配列番号：２０５，配列番号：２１４，配列番号：２１８，配列番号：２２０，配列番号：２２２，又は配列番号：２２７に示されるポリペプチドのアンタゴニスト。

【請求項１９】

配列番号：９，配列番号：１４，配列番号：１６，配列番号：２１，配列番号：２６，配列番号：３１，配列番号：３６，配列番号：４１，配列番号：４６，配列番号：５１，配列番号：５６，配列番号：６２，配列番号：６７，配列番号：７０，配列番号：７７，配列番号：８５，配列番号：９０，配列番号：９８，配列番号：１０７，配列番号：１１２，配列番号：１１７，配列番号：１２７，配列番号：１３２，配列番号：１３７，配列番号：１４３，配列番号：１４８，配列番号：１５３，配列番号：１５５，配列番号：１６０，配列番号：１６２，配列番号：１７０，配列番号：１８１，配列番号：１８３，配列番号：１９１，配列番号：１９３，配列番号：１９５，配列番号：１９７，配列番号：１９９，配列番号：２０１，配列番号：２０３，配列番号：２０５，配列番号：２１４，配列番号：２１８，配列番号：２２０，配列番号：２２２，又は配列番号：２２７に示されるポリペプチドの、前記ポリペプチドを発現する哺乳動物細胞における発現を阻害する化合物。

【請求項２０】

前記化合物が、アンチセンスオリゴヌクレオチドである請求項１９に記載の化合物。

【請求項２１】

配列番号：９，配列番号：１４，配列番号：１６，配列番号：２１，配列番号：２６，配列番号：３１，配列番号：３６，配列番号：４１，配列番号：４６，配列番号：５１，配列番号：５６，配列番号：６２，配列番号：６７，配列番号：７０，配列番号：７７，配列番号：８５，配列番号：９０，配列番号：９８，配列番号：１０７，配列番号：１１２，配列番号：１１７，配列番号：１２７，配列番号：１３２，配列番号：１３７，配列番号：１４３，配列番号：１４８，配列番号：１５３，配列番号：１５５，配列番号：１６０，配列番号：１６２，配列番号：１７０，配列番号：１８１，配列番号：１８３，配列番号：１９１，配列番号：１９３，配列番号：１９５，配列番号：１９７，配列番号：１９９，配列番号：２０１，配列番号：２０３，配列番号：２０５，配列番号：２１４，配列番号：２１８，配列番号：２２０，配列番号：２２２，又は配列番号：２２７に示されるポリペプチドに結合する単離された抗体。

【請求項２２】

モノクローナル抗体である請求項２１に記載の抗体。

【請求項２３】

抗体断片である請求項２１に記載の抗体。

【請求項２４】

一本鎖抗体である請求項２１に記載の抗体。

【請求項２５】

配列番号：９，配列番号：１４，配列番号：１６，配列番号：２１，配列番号：２６，配列番号：３１，配列番号：３６，配列番号：４１，配列番号：４６，配列番号：５１，配列番号：５６，配列番号：６２，配列番号：６７，配列番号：７０，配列番号：７７，配列番号：８５，配列番号：９０，配列番号：９８，配列番号：１０７，配列番号：１１２，配列番号：１１７，配列番号：１２７，配列番号：１３２，配列番号：１３７，配列番号：１４３，配列番号：１４８，配列番号：１５３，配列番号：１５５，配列番号：１６０，配列番号：１６２，配列番号：１７０，配列番号：１８１，配列番号：１８３，配列番号：１９１，配列番号：１９３，配列番号：１９５，配列番号：１９７，配列番号：１９９，配列番号：２０１，配列番号：２０３，配列番号：２０５，配列番号：２１４，配列番号：２１８，配列番号：２２０，配列番号：２２２，又は配列番号：２２７に示されるポリペプチド-コード化核酸配列の突然変異に関連する疾患又は疾患に対する感受性を診断する方法において、前記ポリペプチド-コード化核酸配列における前記突然変異の有無を測定することを含んでなり、前記突然変異の有無が前記疾患又は前記疾患に対する感受性の存在を示す方法。

【請求項２６】

哺乳動物における心臓血管、内皮又は血管形成疾患を診断する方法において、（ａ）前記哺乳動物から得た組織細胞の試験試料、及び（ｂ）同じ細胞型の公知の正常組織細胞の対照試料における配列番号：９，配列番号：１４，配列番号：１６，配列番号：２１，配列番号：２６，配列番号：３１，配列番号：３６，配列番号：４１，配列番号：４６，配列番号：５１，配列番号：５６，配列番号：６２，配列番号：６７，配列番号：７０，配列番号：７７，配列番号：８５，配列番号：９０，配列番号：９８，配列番号：１０７，配列番号：１１２，配列番号：１１７，配列番号：１２７，配列番号：１３２，配列番号：１３７，配列番号：１４３，配列番号：１４８，配列番号：１５３，配列番号：１５５，配列番号：１６０，配列番号：１６２，配列番号：１７０，配列番号：１８１，配列番号：１８３，配列番号：１９１，配列番号：１９３，配列番号：１９５，配列番号：１９７，配列番号：１９９，配列番号：２０１，配列番号：２０３，配列番号：２０５，配列番号：２１４，配列番号：２１８，配列番号：２２０，配列番号：２２２，又は配列番号：２２７に示されるポリペプチドをコードする遺伝子の発現レベルを分析することを含んでなり、対照試料に比較した場合の試験試料中の発現レベルの高低が、前記哺乳動物における心臓血管、内皮又は血管形成疾患の存在を示す方法。

【請求項２７】

哺乳動物における心臓血管、内皮又は血管形成疾患を診断する方法において、前記哺乳動

物から得た組織細胞の試験試料における配列番号：９，配列番号：１４，配列番号：１６，配列番号：２１，配列番号：２６，配列番号：３１，配列番号：３６，配列番号：４１，配列番号：４６，配列番号：５１，配列番号：５６，配列番号：６２，配列番号：６７，配列番号：７０，配列番号：７７，配列番号：８５，配列番号：９０，配列番号：９８，配列番号：１０７，配列番号：１１２，配列番号：１１７，配列番号：１２７，配列番号：１３２，配列番号：１３７，配列番号：１４３，配列番号：１４８，配列番号：１５３，配列番号：１５５，配列番号：１６０，配列番号：１６２，配列番号：１７０，配列番号：１８１，配列番号：１８３，配列番号：１９１，配列番号：１９３，配列番号：１９５，配列番号：１９７，配列番号：１９９，配列番号：２０１，配列番号：２０３，配列番号：２０５，配列番号：２１４，配列番号：２１８，配列番号：２２０，配列番号：２２２，又は配列番号：２２７に示されるポリペプチドの有無を検出することを含んでなり、前記試験試料における前記ポリペプチドの有無が前記哺乳動物における心臓血管、内皮又は血管形成疾患の存在を示す方法。

【請求項２８】

哺乳動物における心臓血管、内皮又は血管形成疾患を診断する方法において、（ａ）前記哺乳動物から得た組織細胞の試験試料を配列番号：９，配列番号：１４，配列番号：１６，配列番号：２１，配列番号：２６，配列番号：３１，配列番号：３６，配列番号：４１，配列番号：４６，配列番号：５１，配列番号：５６，配列番号：６２，配列番号：６７，配列番号：７０，配列番号：７７，配列番号：８５，配列番号：９０，配列番号：９８，配列番号：１０７，配列番号：１１２，配列番号：１１７，配列番号：１２７，配列番号：１３２，配列番号：１３７，配列番号：１４３，配列番号：１４８，配列番号：１５３，配列番号：１５５，配列番号：１６０，配列番号：１６２，配列番号：１７０，配列番号：１８１，配列番号：１８３，配列番号：１９１，配列番号：１９３，配列番号：１９５，配列番号：１９７，配列番号：１９９，配列番号：２０１，配列番号：２０３，配列番号：２０５，配列番号：２１４，配列番号：２１８，配列番号：２２０，配列番号：２２２，又は配列番号：２２７に示されるポリペプチドに対する抗体と接触させ、そして（ｂ）試験試料中での前記抗体と配列番号：９，配列番号：１４，配列番号：１６，配列番号：２１，配列番号：２６，配列番号：３１，配列番号：３６，配列番号：４１，配列番号：４６，配列番号：５１，配列番号：５６，配列番号：６２，配列番号：６７，配列番号：７０，配列番号：７７，配列番号：８５，配列番号：９０，配列番号：９８，配列番号：１０７，配列番号：１１２，配列番号：１１７，配列番号：１２７，配列番号：１３２，配列番号：１３７，配列番号：１４３，配列番号：１４８，配列番号：１５３，配列番号：１５５，配列番号：１６０，配列番号：１６２，配列番号：１７０，配列番号：１８１，配列番号：１８３，配列番号：１９１，配列番号：１９３，配列番号：１９５，配列番号：１９７，配列番号：１９９，配列番号：２０１，配列番号：２０３，配列番号：２０５，配列番号：２１４，配列番号：２１８，配列番号：２２０，配列番号：２２２，又は配列番号：２２７に示されるポリペプチドとの複合体形成を検出することを含んでなり、前記複合体の形成が前記哺乳動物における心臓血管、内皮又は血管形成疾患の存在を示す方法。

【請求項２９】

試料中の配列番号：９，配列番号：１４，配列番号：１６，配列番号：２１，配列番号：２６，配列番号：３１，配列番号：３６，配列番号：４１，配列番号：４６，配列番号：５１，配列番号：５６，配列番号：６２，配列番号：６７，配列番号：７０，配列番号：７７，配列番号：８５，配列番号：９０，配列番号：９８，配列番号：１０７，配列番号：１１２，配列番号：１１７，配列番号：１２７，配列番号：１３２，配列番号：１３７，配列番号：１４３，配列番号：１４８，配列番号：１５３，配列番号：１５５，配列番号：１６０，配列番号：１６２，配列番号：１７０，配列番号：１８１，配列番号：１８３，配列番号：１９１，配列番号：１９３，配列番号：１９５，配列番号：１９７，配列番号：１９９，配列番号：２０１，配列番号：２０３，配列番号：２０５，配列番号：２１４，配列番号：２１８，配列番号：２２０，配列番号：２２２，又は配列番号：２２７

に示されるポリペプチドの存在を測定する方法において、前記ポリペプチドを含有すると推測される試料を配列番号：９，配列番号：１４，配列番号：１６，配列番号：２１，配列番号：２６，配列番号：３１，配列番号：３６，配列番号：４１，配列番号：４６，配列番号：５１，配列番号：５６，配列番号：６２，配列番号：６７，配列番号：７０，配列番号：７７，配列番号：８５，配列番号：９０，配列番号：９８，配列番号：１０７，配列番号：１１２，配列番号：１１７，配列番号：１２７，配列番号：１３２，配列番号：１３７，配列番号：１４３，配列番号：１４８，配列番号：１５３，配列番号：１５５，配列番号：１６０，配列番号：１６２，配列番号：１７０，配列番号：１８１，配列番号：１８３，配列番号：１９１，配列番号：１９３，配列番号：１９５，配列番号：１９７，配列番号：１９９，配列番号：２０１，配列番号：２０３，配列番号：２０５，配列番号：２１４，配列番号：２１８，配列番号：２２０，配列番号：２２２，又は配列番号：２２７に示されるポリペプチドに対する抗体と接触させ、前記抗体の前記試料の成分への結合を測定することを含んでなる方法。

【請求項３０】

配列番号：９，配列番号：１４，配列番号：１６，配列番号：２１，配列番号：２６，配列番号：３１，配列番号：３６，配列番号：４１，配列番号：４６，配列番号：５１，配列番号：５６，配列番号：６２，配列番号：６７，配列番号：７０，配列番号：７７，配列番号：８５，配列番号：９０，配列番号：９８，配列番号：１０７，配列番号：１１２，配列番号：１１７，配列番号：１２７，配列番号：１３２，配列番号：１３７，配列番号：１４３，配列番号：１４８，配列番号：１５３，配列番号：１５５，配列番号：１６０，配列番号：１６２，配列番号：１７０，配列番号：１８１，配列番号：１８３，配列番号：１９１，配列番号：１９３，配列番号：１９５，配列番号：１９７，配列番号：１９９，配列番号：２０１，配列番号：２０３，配列番号：２０５，配列番号：２１４，配列番号：２１８，配列番号：２２０，配列番号：２２２，又は配列番号：２２７に示されるポリペプチドに対する抗体と担体とを適切な包装内に具備してなる心臓血管、内皮又は血管形成疾患の診断キット。

【請求項３１】

哺乳動物における心臓血管、内皮又は血管形成疾患を治療する方法において、配列番号：９，配列番号：１４，配列番号：１６，配列番号：２１，配列番号：２６，配列番号：３１，配列番号：３６，配列番号：４１，配列番号：４６，配列番号：５１，配列番号：５６，配列番号：６２，配列番号：６７，配列番号：７０，配列番号：７７，配列番号：８５，配列番号：９０，配列番号：９８，配列番号：１０７，配列番号：１１２，配列番号：１１７，配列番号：１２７，配列番号：１３２，配列番号：１３７，配列番号：１４３，配列番号：１４８，配列番号：１５３，配列番号：１５５，配列番号：１６０，配列番号：１６２，配列番号：１７０，配列番号：１８１，配列番号：１８３，配列番号：１９１，配列番号：１９３，配列番号：１９５，配列番号：１９７，配列番号：１９９，配列番号：２０１，配列番号：２０３，配列番号：２０５，配列番号：２１４，配列番号：２１８，配列番号：２２０，配列番号：２２２，又は配列番号：２２７に示されるポリペプチド、又はそのアゴニスト又はアンタゴニストの治療的有効量を当該哺乳動物に投与することを含んでなる方法。

【請求項３２】

哺乳動物がヒトである請求項３１に記載の方法。

【請求項３３】

ヒトが心筋梗塞に罹患している請求項３２に記載の方法。

【請求項３４】

ヒトが心臓肥大、外傷、癌、又は加齢性黄斑変性を有する請求項３２に記載の方法。

【請求項３５】

心臓肥大が$PGF_2\alpha$のレベル上昇の存在によって特徴づけられる請求項３４に記載の方法。

【請求項３６】

配列番号：９，配列番号：１４，配列番号：１６，配列番号：２１，配列番号：２６，配列番号：３１，配列番号：３６，配列番号：４１，配列番号：４６，配列番号：５１，配列番号：５６，配列番号：６２，配列番号：６７，配列番号：７０，配列番号：７７，配列番号：８５，配列番号：９０，配列番号：９８，配列番号：１０７，配列番号：１１２，配列番号：１１７，配列番号：１２７，配列番号：１３２，配列番号：１３７，配列番号：１４３，配列番号：１４８，配列番号：１５３，配列番号：１５５，配列番号：１６０，配列番号：１６２，配列番号：１７０，配列番号：１８１，配列番号：１８３，配列番号：１９１，配列番号：１９３，配列番号：１９５，配列番号：１９７，配列番号：１９９，配列番号：２０１，配列番号：２０３，配列番号：２０５，配列番号：２１４，配列番号：２１８，配列番号：２２０，配列番号：２２２，又は配列番号：２２７に示されるポリペプチドが心臓血管、内皮又は血管形成薬とともに投与される請求項３１に記載の方法。

【請求項３７】

配列番号：９，配列番号：１４，配列番号：１６，配列番号：２１，配列番号：２６，配列番号：３１，配列番号：３６，配列番号：４１，配列番号：４６，配列番号：５１，配列番号：５６，配列番号：６２，配列番号：６７，配列番号：７０，配列番号：７７，配列番号：８５，配列番号：９０，配列番号：９８，配列番号：１０７，配列番号：１１２，配列番号：１１７，配列番号：１２７，配列番号：１３２，配列番号：１３７，配列番号：１４３，配列番号：１４８，配列番号：１５３，配列番号：１５５，配列番号：１６０，配列番号：１６２，配列番号：１７０，配列番号：１８１，配列番号：１８３，配列番号：１９１，配列番号：１９３，配列番号：１９５，配列番号：１９７，配列番号：１９９，配列番号：２０１，配列番号：２０３，配列番号：２０５，配列番号：２１４，配列番号：２１８，配列番号：２２０，配列番号：２２２，又は配列番号：２２７に示されるポリペプチドが一次血管形成術に続いて投与される請求項３４に記載の方法。

【請求項３８】

心臓血管、内皮又は血管形成疾患が癌である請求項３１に記載の方法。

【請求項３９】

配列番号：９，配列番号：１４，配列番号：１６，配列番号：２１，配列番号：２６，配列番号：３１，配列番号：３６，配列番号：４１，配列番号：４６，配列番号：５１，配列番号：５６，配列番号：６２，配列番号：６７，配列番号：７０，配列番号：７７，配列番号：８５，配列番号：９０，配列番号：９８，配列番号：１０７，配列番号：１１２，配列番号：１１７，配列番号：１２７，配列番号：１３２，配列番号：１３７，配列番号：１４３，配列番号：１４８，配列番号：１５３，配列番号：１５５，配列番号：１６０，配列番号：１６２，配列番号：１７０，配列番号：１８１，配列番号：１８３，配列番号：１９１，配列番号：１９３，配列番号：１９５，配列番号：１９７，配列番号：１９９，配列番号：２０１，配列番号：２０３，配列番号：２０５，配列番号：２１４，配列番号：２１８，配列番号：２２０，配列番号：２２２，又は配列番号：２２７に示されるポリペプチドが、化学治療薬、成長阻害薬又は細胞毒性薬と組み合わせて投与される請求項３８に記載の方法。

【請求項４０】

前記アゴニストが配列番号：９，配列番号：１４，配列番号：１６，配列番号：２１，配列番号：２６，配列番号：３１，配列番号：３６，配列番号：４１，配列番号：４６，配列番号：５１，配列番号：５６，配列番号：６２，配列番号：６７，配列番号：７０，配列番号：７７，配列番号：８５，配列番号：９０，配列番号：９８，配列番号：１０７，配列番号：１１２，配列番号：１１７，配列番号：１２７，配列番号：１３２，配列番号：１３７，配列番号：１４３，配列番号：１４８，配列番号：１５３，配列番号：１５５，配列番号：１６０，配列番号：１６２，配列番号：１７０，配列番号：１８１，配列番号：１８３，配列番号：１９１，配列番号：１９３，配列番号：１９５，配列番号：１９７，配列番号：１９９，配列番号：２０１，配列番号：２０３，配列番号：２０５，配列番号：２１４，配列番号：２１８，配列番号：２２０，配列番号：２２２，又は配列番号

：２２７に示されるポリペプチドに対する抗体である請求項３１に記載の方法。
【請求項４１】
前記アンタゴニストが配列番号：９，配列番号：１４，配列番号：１６，配列番号：２１，配列番号：２６，配列番号：３１，配列番号：３６，配列番号：４１，配列番号：４６，配列番号：５１，配列番号：５６，配列番号：６２，配列番号：６７，配列番号：７０，配列番号：７７，配列番号：８５，配列番号：９０，配列番号：９８，配列番号：１０７，配列番号：１１２，配列番号：１１７，配列番号：１２７，配列番号：１３２，配列番号：１３７，配列番号：１４３，配列番号：１４８，配列番号：１５３，配列番号：１５５，配列番号：１６０，配列番号：１６２，配列番号：１７０，配列番号：１８１，配列番号：１８３，配列番号：１９１，配列番号：１９３，配列番号：１９５，配列番号：１９７，配列番号：１９９，配列番号：２０１，配列番号：２０３，配列番号：２０５，配列番号：２１４，配列番号：２１８，配列番号：２２０，配列番号：２２２，又は配列番号：２２７に示されるポリペプチドに対する抗体である請求項３１に記載の方法。
【請求項４２】
哺乳動物における心臓血管、内皮又は血管形成疾患を治療する方法において、配列番号：９，配列番号：１４，配列番号：１６，配列番号：２１，配列番号：２６，配列番号：３１，配列番号：３６，配列番号：４１，配列番号：４６，配列番号：５１，配列番号：５６，配列番号：６２，配列番号：６７，配列番号：７０，配列番号：７７，配列番号：８５，配列番号：９０，配列番号：９８，配列番号：１０７，配列番号：１１２，配列番号：１１７，配列番号：１２７，配列番号：１３２，配列番号：１３７，配列番号：１４３，配列番号：１４８，配列番号：１５３，配列番号：１５５，配列番号：１６０，配列番号：１６２，配列番号：１７０，配列番号：１８１，配列番号：１８３，配列番号：１９１，配列番号：１９３，配列番号：１９５，配列番号：１９７，配列番号：１９９，配列番号：２０１，配列番号：２０３，配列番号：２０５，配列番号：２１４，配列番号：２１８，配列番号：２２０，配列番号：２２２，又は配列番号：２２７に示されるポリペプチド、又はそのアゴニスト又はアンタゴニストをコードする核酸分子を当該哺乳動物に投与することを含んでなる方法。
【請求項４３】
前記アゴニストが配列番号：９，配列番号：１４，配列番号：１６，配列番号：２１，配列番号：２６，配列番号：３１，配列番号：３６，配列番号：４１，配列番号：４６，配列番号：５１，配列番号：５６，配列番号：６２，配列番号：６７，配列番号：７０，配列番号：７７，配列番号：８５，配列番号：９０，配列番号：９８，配列番号：１０７，配列番号：１１２，配列番号：１１７，配列番号：１２７，配列番号：１３２，配列番号：１３７，配列番号：１４３，配列番号：１４８，配列番号：１５３，配列番号：１５５，配列番号：１６０，配列番号：１６２，配列番号：１７０，配列番号：１８１，配列番号：１８３，配列番号：１９１，配列番号：１９３，配列番号：１９５，配列番号：１９７，配列番号：１９９，配列番号：２０１，配列番号：２０３，配列番号：２０５，配列番号：２１４，配列番号：２１８，配列番号：２２０，配列番号：２２２，又は配列番号：２２７に示されるポリペプチドに対する抗体である請求項４２に記載の方法。
【請求項４４】
前記アンタゴニストが配列番号：９，配列番号：１４，配列番号：１６，配列番号：２１，配列番号：２６，配列番号：３１，配列番号：３６，配列番号：４１，配列番号：４６，配列番号：５１，配列番号：５６，配列番号：６２，配列番号：６７，配列番号：７０，配列番号：７７，配列番号：８５，配列番号：９０，配列番号：９８，配列番号：１０７，配列番号：１１２，配列番号：１１７，配列番号：１２７，配列番号：１３２，配列番号：１３７，配列番号：１４３，配列番号：１４８，配列番号：１５３，配列番号：１５５，配列番号：１６０，配列番号：１６２，配列番号：１７０，配列番号：１８１，配列番号：１８３，配列番号：１９１，配列番号：１９３，配列番号：１９５，配列番号：１９７，配列番号：１９９，配列番号：２０１，配列番号：２０３，配列番号：２０５，配列番号：２１４，配列番号：２１８，配列番号：２２０，配列番号：２２２，又は配列

番号：２２７に示されるポリペプチドに対する抗体である請求項４２に記載の方法。
【請求項４５】
哺乳動物がヒトである請求項４２に記載の方法。
【請求項４６】
核酸分子がエキソビボ遺伝子治療を介して投与される請求項４２に記載の方法。
【請求項４７】
（１）プロモータ、（２）配列番号：９，配列番号：１４，配列番号：１６，配列番号：２１，配列番号：２６，配列番号：３１，配列番号：３６，配列番号：４１，配列番号：４６，配列番号：５１，配列番号：５６，配列番号：６２，配列番号：６７，配列番号：７０，配列番号：７７，配列番号：８５，配列番号：９０，配列番号：９８，配列番号：１０７，配列番号：１１２，配列番号：１１７，配列番号：１２７，配列番号：１３２，配列番号：１３７，配列番号：１４３，配列番号：１４８，配列番号：１５３，配列番号：１５５，配列番号：１６０，配列番号：１６２，配列番号：１７０，配列番号：１８１，配列番号：１８３，配列番号：１９１，配列番号：１９３，配列番号：１９５，配列番号：１９７，配列番号：１９９，配列番号：２０１，配列番号：２０３，配列番号：２０５，配列番号：２１４，配列番号：２１８，配列番号：２２０，配列番号：２２２，又は配列番号：２２７に示されるポリペプチド又はそのアゴニスト又はアンタゴニストをコードする核酸、及び（３）当該ポリペプチドの細胞性分泌のためのシグナル配列から実質的になるレトロウイルスベクターを含み、当該レトロウイルスベクターがレトロウイルス構造タンパク質を伴う組換えレトロウイルス粒子。
【請求項４８】
レトロウイルス構造タンパク質を発現し、（１）プロモータ、（２）配列番号：９，配列番号：１４，配列番号：１６，配列番号：２１，配列番号：２６，配列番号：３１，配列番号：３６，配列番号：４１，配列番号：４６，配列番号：５１，配列番号：５６，配列番号：６２，配列番号：６７，配列番号：７０，配列番号：７７，配列番号：８５，配列番号：９０，配列番号：９８，配列番号：１０７，配列番号：１１２，配列番号：１１７，配列番号：１２７，配列番号：１３２，配列番号：１３７，配列番号：１４３，配列番号：１４８，配列番号：１５３，配列番号：１５５，配列番号：１６０，配列番号：１６２，配列番号：１７０，配列番号：１８１，配列番号：１８３，配列番号：１９１，配列番号：１９３，配列番号：１９５，配列番号：１９７，配列番号：１９９，配列番号：２０１，配列番号：２０３，配列番号：２０５，配列番号：２１４，配列番号：２１８，配列番号：２２０，配列番号：２２２，又は配列番号：２２７に示されるポリペプチド又はそのアゴニスト又はアンタゴニストをコードする核酸、及び（３）当該ポリペプチドの細胞分泌のためのシグナル配列から実質的になるレトロウイルスベクター核酸構造を含むエキソビボ産生細胞であって、前記産生細胞が構造タンパク質を伴うレトロウイルスベクターを包含して組換えレトロウイルス粒子を産生する産生細胞。
【請求項４９】
哺乳動物における内皮細胞成長を阻害する方法において、（ａ）配列番号：９、配列番号：１４、配列番号：２１、配列番号：２６、配列番号：４１、配列番号：４６、配列番号：６２、配列番号：７０、配列番号：８５、配列番号：９０、配列番号：９８、配列番号：１０７、配列番号：１１７、配列番号：１３２、配列番号：１３７、配列番号：１４３、配列番号：１５３、配列番号：１６０、配列番号：１６２、配列番号：１８１、配列番号：１８３、配列番号：１９５、配列番号：１９７、配列番号：２０１、配列番号：２０５、配列番号：２１８又は配列番号：２２０に示されるポリペプチド又はそのアゴニストを当該哺乳動物に投与することを含み、前記哺乳動物における内皮細胞成長が阻害される方法。
【請求項５０】
哺乳動物における内皮細胞成長を刺激する方法において、配列番号：１４、配列番号：３６、配列番号：６７、配列番号：１４８、配列番号：１７０、配列番号：１９１、配列番号：１９３、配列番号：１９９、配列番号：２０３、配列番号：２１８又は配列番号：２

２２に示されるポリペプチド又はそのアゴニストを当該哺乳動物に投与することを含み、前記哺乳動物における内皮細胞成長が刺激される方法。
【請求項５１】
哺乳動物における内皮細胞成長を阻害する方法において、配列番号：１４、配列番号：３６、配列番号：６７、配列番号：１４８、配列番号：１７０、配列番号：１９１、配列番号：１９３、配列番号：１９９、配列番号：２０３、配列番号：２１８又は配列番号：２２２に示されるポリペプチドのアンタゴニストを当該哺乳動物に投与することを含み、前記哺乳動物における内皮細胞成長が阻害される方法。
【請求項５２】
哺乳動物における内皮細胞成長を刺激する方法において、配列番号：９、配列番号：１４、配列番号：２１、配列番号：２６、配列番号：４１、配列番号：４６、配列番号：６２、配列番号：７０、配列番号：８５、配列番号：９０、配列番号：９８、配列番号：１０７、配列番号：１１７、配列番号：１３２、配列番号：１３７、配列番号：１４３、配列番号：１５３、配列番号：１６０、配列番号：１６２、配列番号：１８１、配列番号：１８３、配列番号：１９５、配列番号：１９７、配列番号：２０１、配列番号：２０５、配列番号：２１８又は配列番号：２２０に示されるポリペプチドのアンタゴニストを当該哺乳動物に投与することを含み、前記哺乳動物における内皮細胞成長が刺激される方法。
【請求項５３】
哺乳動物における心臓肥大を抑制する方法において、当該哺乳動物に配列番号：７７又は配列番号：１１２ポリペプチド又はそのアゴニストを投与することを含んでなり、前記哺乳動物における心臓肥大が抑制される方法。
【請求項５４】
心臓肥大が心筋梗塞によって誘発されたものである請求項５３に記載の方法。
【請求項５５】
哺乳動物において心臓肥大を誘発する方法において、配列番号：１４、配列番号：１６、配列番号：３１、配列番号：５１、配列番号：５６、ＰＲＯ１２７、配列番号：１３７、配列番号：１５５、配列番号：１９５又は配列番号：２１４に示されるポリペプチド又はそのアゴニストを当該哺乳動物に投与することを含み、前記哺乳動物における前記心臓肥大が誘発される方法。
【請求項５６】
哺乳動物において心臓肥大を抑制する方法において、配列番号：１４、配列番号：１６、配列番号：３１、配列番号：５１、配列番号：５６、ＰＲＯ１２７、配列番号：１３７、配列番号：１５５、配列番号：１９５又は配列番号：２１４に示されるポリペプチドのアンタゴニストを当該哺乳動物に投与することを含み、前記哺乳動物における心臓肥大が抑制される方法。
【請求項５７】
哺乳動物において心臓肥大を誘発する方法において、配列番号：７７又は配列番号：１１２ポリペプチドのアンタゴニストを当該哺乳動物に投与することを含み、前記哺乳動物における心臓肥大が誘発される方法。
【請求項５８】
哺乳動物において配列番号：１４、配列番号：３６、配列番号：６７、配列番号：１４８、配列番号：１７０、配列番号：１９１、配列番号：１９３、配列番号：１９９、配列番号：２０３、、配列番号：２１８又は配列番号：２２２に示されるポリペプチドによって誘発される血管形成を阻害する方法において、配列番号：１４、配列番号：３６、配列番号：６７、配列番号：１４８、配列番号：１７０、配列番号：１９１、配列番号：１９３、配列番号：１９９、配列番号：２０３、、配列番号：２１８又は配列番号：２２２に示されるポリペプチドに対する抗体を当該哺乳動物に投与することを含み、前記血管形成が阻害される方法。
【請求項５９】
哺乳動物において配列番号：１４、配列番号：３６、配列番号：６７、配列番号：１４８

、配列番号：１７０、配列番号：１９１、配列番号：１９３、配列番号：１９９、配列番号：２０３、、配列番号：２１８又は配列番号：２２２に示されるポリペプチドによって誘発される血管形成を刺激する方法において、前記ポリペプチドの治療的有効量を当該哺乳動物に投与することを含み、それにより前記血管形成が刺激される方法。

【請求項６０】

以下の（ａ）又は（ｂ）の単離された核酸：

（ａ）配列番号：９，配列番号：１４，配列番号：１６，配列番号：２１，配列番号：２６，配列番号：３１，配列番号：３６，配列番号：４１，配列番号：４６，配列番号：５１，配列番号：５６，配列番号：６２，配列番号：６７，配列番号：７０，配列番号：７７，配列番号：８５，配列番号：９０，配列番号：９８，配列番号：１０７，配列番号：１１２，配列番号：１１７，配列番号：１２７，配列番号：１３２，配列番号：１３７，配列番号：１４３，配列番号：１４８，配列番号：１５３，配列番号：１５５，配列番号：１６０，配列番号：１６２，配列番号：１７０，配列番号：１８１，配列番号：１８３，配列番号：１９１，配列番号：１９３，配列番号：１９５，配列番号：１９７，配列番号：１９９，配列番号：２０１，配列番号：２０３，配列番号：２０５，配列番号：２１４，配列番号：２１８，配列番号：２２０，配列番号：２２２，又は配列番号：２２７に示されるアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を有する核酸、及び

（ｂ）（ａ）の核酸と相補的なヌクレオチド配列を有する核酸とストリンジェントな条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列を有する核酸。

【請求項６１】

以下の（ａ）又は（ｂ）の単離された核酸：

（ａ）配列番号：８、配列番号：１３、配列番号：１５、配列番号：２０、配列番号：２５、配列番号：３０、配列番号：３５、配列番号：４０、配列番号：４５、配列番号：５０、配列番号：５５、配列番号：６１、配列番号：６６、配列番号：７１、配列番号：７６、配列番号：８４、配列番号：８９、配列番号：９７、配列番号：１０６、配列番号：１１１、配列番号：１１６、配列番号：１２６、配列番号：１３１、配列番号：１３６、配列番号：１４２、配列番号：１４７、配列番号：１５２、配列番号：１５４、配列番号：１５９、配列番号：１６１、配列番号：１６９、配列番号：１８０、配列番号：１８２、配列番号：１９０、配列番号：１９２、配列番号：１９４、配列番号：１９６、配列番号：１９８、配列番号：２００、配列番号：２０２、配列番号：２０４、配列番号：２１３、配列番号：２１７、配列番号：２１９、配列番号：２２１、又は配列番号：２２に示すヌクレオチド配列を有する核酸、及び

（ｂ）（ａ）の核酸と相補的なヌクレオチド配列を有する核酸とストリンジェントな条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列を有する核酸。

【請求項６２】

以下の（ａ）又は（ｂ）の単離された核酸：

（ａ）配列番号：８、配列番号：１３、配列番号：１５、配列番号：２０、配列番号：２５、配列番号：３０、配列番号：３５、配列番号：４０、配列番号：４５、配列番号：５０、配列番号：５５、配列番号：６１、配列番号：６６、配列番号：７１、配列番号：７６、配列番号：８４、配列番号：８９、配列番号：９７、配列番号：１０６、配列番号：１１１、配列番号：１１６、配列番号：１２６、配列番号：１３１、配列番号：１３６、配列番号：１４２、配列番号：１４７、配列番号：１５２、配列番号：１５４、配列番号：１５９、配列番号：１６１、配列番号：１６９、配列番号：１８０、配列番号：１８２、配列番号：１９０、配列番号：１９２、配列番号：１９４、配列番号：１９６、配列番号：１９８、配列番号：２００、配列番号：２０２、配列番号：２０４、配列番号：２１３、配列番号：２１７、配列番号：２１９、配列番号：２２１、又は配列番号：２２に示すヌクレオチド配列の全長コード化配列を有する核酸、及び

（ｂ）（ａ）の核酸と相補的なヌクレオチド配列を有する核酸とストリンジェントな条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列を有する核酸。

【請求項６３】

以下の（ａ）又は（ｂ）の単離された核酸：
（ａ）ＡＴＣＣ登録番号２０９２８２、２０９７７６、２０９２９６、２０９３７５、２０９２７９、２０９７７２、２０９２５４、２０９３８５、２０９２５６、２０９２６３、２０９２５２、２０９３７４、２０９２６５、２０９３９１、２０９３９７、２０９４００、２０９４３２、２０９５２８、２０９４３９、２０９４２２、２０９４３６、２０９７０４、２０９７５２、２０９６５３、２０９７０５、２０９７４９、２０９８４９、２０９８４６、２０３００９、２０９７７４、２０９８６９、２０９９８０、２０３３５９、２０９９７８、２０３２５３、２０３４５７、２０３２５０、２０３２２３、２０３２３３、２０３２３２、２０３２１９、２０３１３２、２０３１６３、２０３１６０、２０３３１３、又は２０９３８１で寄託されたＤＮＡの全長コード化配列有する単離された核酸、及び
（ｂ）（ａ）の核酸と相補的なヌクレオチド配列を有する核酸とストリンジェントな条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列を有する核酸。
【請求項６４】
請求項６０から６３のいずれか一項に記載の核酸を含むベクター。
【請求項６５】
当該ベクターで形質転換された宿主細胞によって認識されるコントロール配列に作用可能に結合した請求項６４に記載のベクター。
【請求項６６】
請求項６４に記載のベクターを含む宿主細胞。
【請求項６７】
前記細胞がＣＨＯ細胞である請求項６６に記載の宿主細胞。
【請求項６８】
前記細胞が大腸菌である請求項６６に記載の宿主細胞。
【請求項６９】
前記細胞が酵母菌細胞である請求項６６に記載の宿主細胞。
【請求項７０】
前記細胞がバキュウロウイルス感染昆虫細胞である請求項６６に記載の宿主細胞。
【請求項７１】
配列番号：９，配列番号：１４，配列番号：１６，配列番号：２１，配列番号：２６，配列番号：３１，配列番号：３６，配列番号：４１，配列番号：４６，配列番号：５１，配列番号：５６，配列番号：６２，配列番号：６７，配列番号：７０，配列番号：７７，配列番号：８５，配列番号：９０，配列番号：９８，配列番号：１０７，配列番号：１１２，配列番号：１１７，配列番号：１２７，配列番号：１３２，配列番号：１３７，配列番号：１４３，配列番号：１４８，配列番号：１５３，配列番号：１５５，配列番号：１６０，配列番号：１６２，配列番号：１７０，配列番号：１８１，配列番号：１８３，配列番号：１９１，配列番号：１９３，配列番号：１９５，配列番号：１９７，配列番号：１９９，配列番号：２０１，配列番号：２０３，配列番号：２０５，配列番号：２１４，配列番号：２１８，配列番号：２２０，配列番号：２２２，又は配列番号：２２７に示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドの製造方法において、請求項６６に記載の宿主細胞を前記ポリペプチドの発現に適した条件下で培養し、そして前記ポリペプチドを培養培地から回収することを含んでなる方法。
【請求項７２】
以下の（ａ）又は（ｂ）の単離されたポリペプチド：
（ａ）配列番号：９，配列番号：１４，配列番号：１６，配列番号：２１，配列番号：２６，配列番号：３１，配列番号：３６，配列番号：４１，配列番号：４６，配列番号：５１，配列番号：５６，配列番号：６２，配列番号：６７，配列番号：７０，配列番号：７７，配列番号：８５，配列番号：９０，配列番号：９８，配列番号：１０７，配列番号：１１２，配列番号：１１７，配列番号：１２７，配列番号：１３２，配列番号：１３７，配列番号：１４３，配列番号：１４８，配列番号：１５３，配列番号：１５５，配列番号

：１６０，配列番号：１６２，配列番号：１７０，配列番号：１８１，配列番号：１８３，配列番号：１９１，配列番号：１９３，配列番号：１９５，配列番号：１９７，配列番号：１９９，配列番号：２０１，配列番号：２０３，配列番号：２０５，配列番号：２１４，配列番号：２１８，配列番号：２２０，配列番号：２２２，又は配列番号：２２７に示されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、及び
（ｂ）（ａ）のアミノ酸配列において１つ若しくは数個のアミノ酸が置換、欠失又は付加されたアミノ酸配列を有するポリペプチド。
【請求項７３】
以下の（ａ）又は（ｂ）の単離されたポリペプチド：
（ａ）ＡＴＣＣ登録番号２０９２８２、２０９７７６、２０９２９６、２０９３７５、２０９２７９、２０９７７２、２０９２５４、２０９３８５、２０９２５６、２０９２６３、２０９２５２、２０９３７４、２０９２６５、２０９３９１、２０９３９７、２０９４００、２０９４３２、２０９５２８、２０９４３９、２０９４２２、２０９４３６、２０９７０４、２０９７５２、２０９６５３、２０９７０５、２０９７４９、２０９８４９、２０９８４６、２０３００９、２０９７７４、２０９８６９、２０９９８０、２０３３５９、２０９９７８、２０３２５３、２０３４５７、２０３２５０、２０３２２３、２０３２３３、２０３２３２、２０３２１９、２０３１３２、２０３１６３、２０３１６０、２０３３１３、又は２０９３８１の下で寄託されたＤＮＡの全長コード化配列にコードされるアミノ酸配列を有する単離されたポリペプチド、及び
（ｂ）（ａ）のアミノ酸配列において１つ若しくは数個のアミノ酸が置換、欠失又は付加されたアミノ酸配列を有するポリペプチド。
【請求項７４】
異種アミノ酸配列に融合した請求項７２又は７３のいずれか一項に記載のポリペプチドを含むキメラ分子。
【請求項７５】
前記異種アミノ酸配列がエピトープタグ配列である請求項７４に記載のキメラ分子。
【請求項７６】
前記異種アミノ酸配列が免疫グロブリンのＦｃ領域である請求項７４に記載のキメラ分子。
【請求項７７】
請求項７２又は７３のいずれか一項に記載のポリペプチドに特異的に結合する抗体。
【請求項７８】
前記抗体がモノクローナル抗体、ヒト化抗体又は一本鎖抗体である請求項７７に記載の抗体。
【請求項７９】
以下の（ａ）、（ｂ）、（ｃ）、（ｄ）、又は（ｅ）の単離された核酸：
（ａ）配列番号：９，配列番号：１４，配列番号：１６，配列番号：２１，配列番号：２６，配列番号：３１，配列番号：３６，配列番号：４１，配列番号：４６，配列番号：５１，配列番号：５６，配列番号：６２，配列番号：６７，配列番号：７０，配列番号：７７，配列番号：８５，配列番号：９０，配列番号：９８，配列番号：１０７，配列番号：１１２，配列番号：１１７，配列番号：１２７，配列番号：１３２，配列番号：１３７，配列番号：１４３，配列番号：１４８，配列番号：１５３，配列番号：１５５，配列番号：１６０，配列番号：１６２，配列番号：１７０，配列番号：１８１，配列番号：１８３，配列番号：１９１，配列番号：１９３，配列番号：１９５，配列番号：１９７，配列番号：１９９，配列番号：２０１，配列番号：２０３，配列番号：２０５，配列番号：２１４，配列番号：２１８，配列番号：２２０，配列番号：２２２，又は配列番号：２２７に示されるアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を有する核酸、
（ｂ）（ａ）の核酸と相補的なヌクレオチド配列を有する核酸とストリンジェントな条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列を有する核酸であって、そのコードするポリペプチドがシグナルペプチドを欠く核酸、

（ｃ）配列番号：９，配列番号：１４，配列番号：１６，配列番号：２１，配列番号：２６，配列番号：３１，配列番号：３６，配列番号：４１，配列番号：４６，配列番号：５１，配列番号：５６，配列番号：６２，配列番号：６７，配列番号：７０，配列番号：７７，配列番号：８５，配列番号：９０，配列番号：９８，配列番号：１０７，配列番号：１１２，配列番号：１１７，配列番号：１２７，配列番号：１３２，配列番号：１３７，配列番号：１４３，配列番号：１４８，配列番号：１５３，配列番号：１５５，配列番号：１６０，配列番号：１６２，配列番号：１７０，配列番号：１８１，配列番号：１８３，配列番号：１９１，配列番号：１９３，配列番号：１９５，配列番号：１９７，配列番号：１９９，配列番号：２０１，配列番号：２０３，配列番号：２０５，配列番号：２１４，配列番号：２１８，配列番号：２２０，配列番号：２２２，又は配列番号：２２７に示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドの細胞外ドメインをコードするヌクレオチド配列を有する核酸、

（ｄ）（ｃ）の核酸と相補的なヌクレオチド配列を有する核酸とストリンジェントな条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列を有する核酸であって、そのコードするポリペプチドがシグナルペプチドを有する核酸、及び

（ｅ）（ｃ）の核酸と相補的なヌクレオチド配列を有する核酸とストリンジェントな条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列を有する核酸であって、そのコードするポリペプチドがシグナルペプチドを欠く核酸。

【請求項８０】

以下の（ａ）、（ｂ）、（ｃ）（ｄ）、又は（ｅ）の単離されたポリペプチド：

（ａ）配列番号：９，配列番号：１４，配列番号：１６，配列番号：２１，配列番号：２６，配列番号：３１，配列番号：３６，配列番号：４１，配列番号：４６，配列番号：５１，配列番号：５６，配列番号：６２，配列番号：６７，配列番号：７０，配列番号：７７，配列番号：８５，配列番号：９０，配列番号：９８，配列番号：１０７，配列番号：１１２，配列番号：１１７，配列番号：１２７，配列番号：１３２，配列番号：１３７，配列番号：１４３，配列番号：１４８，配列番号：１５３，配列番号：１５５，配列番号：１６０，配列番号：１６２，配列番号：１７０，配列番号：１８１，配列番号：１８３，配列番号：１９１，配列番号：１９３，配列番号：１９５，配列番号：１９７，配列番号：１９９，配列番号：２０１，配列番号：２０３，配列番号：２０５，配列番号：２１４，配列番号：２１８，配列番号：２２０，配列番号：２２２，又は配列番号：２２７に示されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、

（ｂ）（ａ）のアミノ酸配列において１つ若しくは数個のアミノ酸が置換、欠失又は付加されたアミノ酸配列を有し、シグナルペプチドを欠くポリペプチド、

（ｃ）（ａ）のポリペプチドの細胞外ドメイン、

（ｄ）（ｃ）のアミノ酸配列において１つ若しくは数個のアミノ酸が置換、欠失又は付加されたアミノ酸配列を有し、シグナルペプチドを有するポリペプチド、及び

（ｅ）（ｃ）のアミノ酸配列において１つ若しくは数個のアミノ酸が置換、欠失又は付加されたアミノ酸配列を有し、シグナルペプチドをかくポリペプチド。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

本発明は、そのような生物学的効果を必要とする哺乳動物において血管形成及び／又は心臓血管新生を促進又は阻害するのに有用な組成物及び方法に関する。これは、心臓血管障害並びに発癌性疾患の診断及び治療を含む。

【０００２】

(発明の背景)

Ａ．　心臓疾患と因子

約５００万人のアメリカ人が心不全を患っており、心不全の新しい患者は毎年約４０００００にのぼる。これは、アメリカ合衆国における６５歳以上の人々の、最も頻出の入院原因である。急性心筋梗塞を含む急性心臓疾患の治療技術における最近の進歩により、慢

性の心不全が発症した患者数が拡大する結果となった。１９７９年から１９９５年まで、鬱血性心不全(ＣＨＦ)により入院した患者は、３７７,０００から８７２,０００まで増加し(１３０パーセントの増加)、ＣＨＦによる死亡は１１６パーセント増加した。

ＣＨＦは、左心室の機能不全、運動耐性(exercise tolerance)の低下、生活水準の悪化、顕著な寿命の低下により特徴付けられる症候群である。心不全の必須条件は、心臓が体組織の代謝必要量を満たすのに十分な速度で血液を押し出すことが不可能であることである(換言すれば、心拍出量の不足である)。

【０００３】

末梢血管収縮、心拍数の増加、心収縮性の増加、血漿容量の増加を含む、少なくとも４種の主要な補償メカニズムが心不全の場合に活性化される。これらの効果は、交感神経系とレニン-アンギオテンシン系により主に媒介される。Eichhorn, American Journal of Medicine, 140：163-169(1998)を参照されたい。交感神経系からの出力の増加は、血管緊張、心拍数及び収縮性を増加させる。アンギオテンシンＩＩは、１)血管平滑筋収縮を直接刺激し、２)アルドステロンと抗利尿ホルモン分泌を刺激することにより血漿容量の拡大を促進させ、３)交感神経媒介血管緊張を刺激し、４)血管拡張とナトリウム利尿活性を有するブラジキニンの変性を触媒することにより、血圧を上昇させる。BrownとVaughan. Circulation, 97：1411-1420(1998)による概説を参照されたい。以下に記載するように、アンギオテンシンＩＩは、筋細胞壊死(心収縮機能を害する)及び心臓内線維症(心拡張とある場合には心収縮機能を害する)を促進することにより、心臓に直接有害な影響を持つものである。Weber, Circulation, 96：4065-4082(1998)を参照されたい。

【０００４】

鬱血性心不全(ＣＨＦ)の共通した特徴は心臓肥大、つまり機械的及びホルモン刺激の双方により活性化され、心臓を心拍出量の増加に適合させる心臓の拡大である。MorganとBaker. Circulation, 83：13-25(1991)。この肥大応答は、多くの場合、高血圧、大動脈弁狭窄症、心筋梗塞、心筋症、弁閉鎖不全、及び心臓内短絡等の多様な別の病状を伴い、これらは全て慢性的な血行動態過負荷となる。

【０００５】

肥大は一般に、腫瘍形成を含まない、自然の成長と関係のない器官又は構造の大きさの増加として定義されている。心臓肥大は、個々の細胞(ミオサイト)の質量の増加、又は組織を形成する細胞数の増加(過形成)のいずれか、又はその両方による。 胎児の心臓の拡大度合いは、ミオサイト数(誕生のすぐ後まで続く)の増加に依存し、出生後の心臓のミオサイトはその増殖能を失う。さらなる成長は個々の細胞の肥大を通して生じる。

【０００６】

成体ミオサイト肥大は、個々の筋繊維への負荷の減少を可能にすることにより、障害性心機能に対しては短時間の応答として最初は有益である。しかし、過酷で長時間の過負荷を受けると、肥大細胞は劣化し始め、死亡する。Katz, "Heart Failure"：Katz A.M.編, Physiology of the Heart(New York：Raven Press. 1992)pp.638-668。心臓肥大は、心不全の臨床過程において死亡率と罹患率の両方に対してかなりの危険因子である。Katz, Trends Cardiovasc. Med., 5：37-44(1995)。心臓肥大の原因と病状のさらなる詳細については、例えばHeart Disease, A Textbook of Cardiovascular Medicine, Braunwald, E. 編(W.B. Saunders Co., 1988), 14章, "Pathophysiology of Heart Failure"を参照されたい。

【０００７】

細胞レベルでは、心臓はミオサイトと包括的に非ミオサイトを呼ばれる周囲の支持細胞からなる。非ミオサイトは主として線維芽細胞／間葉細胞であるが、それらは内皮及び平滑筋細胞も含む。実際、ミオサイトは成人心筋質量の大部分を形成するが、それらは心臓に存在する全細胞数の約３０％を占めるにすぎない。ホルモン的、生理学的、血行力学的及び病理学的刺激に反応して、成体心室筋細胞は肥大化プロセスの活性化を通して仕事量の増加に適合することができる。この反応は、心房性ナトリウム利尿ペプチド(ＡＮＰ)に対する遺伝子を含む胎性遺伝子の活性化と細胞分割が付随することのない、個々の心筋細

胞の収縮性タンパク質の含有量とミオサイトの細胞サイズの増加により特徴付けられる。Chien等，FASEB J.，5：3037-3046(1991)：Chien等，Annu. Rev. Physiol.，55：75-95(1993)。心筋内冠動脈の周りと細胞外マトリクス内の間質性コラーゲンの蓄積に関連したミオサイトサイズの増大の結果としての心筋質量の増大が、ヒトにおける圧負荷の次の左心室肥大において記載されている。Caspari等，Cardiovasc. Res.，11：554-558(1977)；Schwarz等，Am. J. Cardiol.，42：895-903(1978)：Hess等，Circulation，63：360-371(1981)；Pearlman等，Lab. Invest.，46：158-164(1982)。

【０００８】

非ミオサイト支持細胞により産生されるパラ分泌因子が、心臓肥大の発生にまた関与していることも示唆されており、白血球阻害因子(ＬＩＦ)及びエンドセリン等の様々な非ミオサイト由来肥大因子が同定されている。Metcalf，Growth Factors，7：169-173(1992)；Kurzrock等，Endocrine Reviews，12：208-217(1991)；Inoue等，Proc. Natl. Acad. Sci. USA，86：2863-2867(1989)；Yanagisawa及びMasaki，Trends Pharm. Sci.，10：374-378(1989)；米国特許第5,573,762号(1996年11月12日発行)。心臓肥大の潜在性な媒介物として同定されているさらなる例示的因子には、カルジオトロフィン(cardiotrophin)-１(ＣＴ-１)(Pennica等，Proc. Nat. Acad. Sci. USA，92：1142-1146(1995))、カテコールアミン類、副腎皮質ステロイド類、アンギオテンシン及びプロスタグランジン類が含まれる。

【０００９】

現在、心臓肥大の治療法は、その根本にある心臓疾患に応じて異なる。肥大の潜在性な媒介物として同定されている因子としては、カテコールアミン類、副腎皮質ステロイド類、アンギオテンシン、プロスタグランジン類、ＬＩＦ、エンドセリン[エンドセリン-１、-２及び-３、及び大エンドセリン(big endothelin)を含む]及びＣＴ-１が挙げられる。例えば、β-アドレナリン様レセプターブロック剤(β-ブロッカー、例えばプロプラノロール、チモロール、タータロロール(tertalolol)、カルテオロール、ナドロール、ベタキソロール、ペンブトロール、アセトブトロール(acetobutolol)、アテノロール、メトプロロール、カルベジロール等)及びベラパミルが、肥大心筋症の治療に広く使用されている。徴候(胸の痛み)及び運動耐性に対するβ-ブロッカーの有益な効果は、主として、結果として心拡張の延長と受動的心室充満の増加が伴う心拍数の低下による。Thompson等，Br. Heart J.，44：488-98(1980)；Harrison等，Circulation，29：84-98(1964)。ベラパミルは心室充満を改善し、おそらく心筋虚血を低減させることが記載されている。Bonow等，Circulation，72：853-64(1985)。

【００１０】

ニフェジピンとジルチアゼムもまた、時折、肥大心筋症の治療に使用される。Lorell等，Circulation，65：499-507(1982)；Betocchi等，Am. J. Cardiol.,78：451-457(1996)。しかしながら、その強力な血管拡張性のために、ニフェジピンは、特に流出閉塞症の患者にとっては有害になるおそれもある。ジソピラミドが負の筋収縮性による徴候を緩和するのに使用されている。Pollick，N. Engl. J. Med.，307：997-999(1982)。しかし、多くの患者において、当初の恩恵は時間と共に低減する。Wigle等，Circulation，92：1680-1692(1995)。抗高血圧薬による治療は、血圧の上昇に伴う心臓肥大において有益な効果があることが報告されている。抗高血圧治療において単独で又は組み合わせて使用される薬物の例としては、カルシウムアンタゴニスト、例えばニトレンジピン；アドレナリン様レセプターブロック剤、例えば上に列挙したもの；アンギオテンシン転換酵素(ＡＣＥ)インヒビター、例えばキナプリル、カプトプリル、エナラプリル、ラミプリル、ベナゼプリル、フォシノプリル及びリシノプリル；利尿薬、例えばクロロチアジド、ヒドロクロロチアジド、ヒドロフルメタジド、メチルクロチアジド(methylchlothiazide)、ベンズチアジド、ジクロロフェナミド、アセタゾラミド、及びインダパミド；及びカルシウムチャンネルブロッカー、例えばジルチアゼム、ニフェジピン、ベラパミル及びニカルジピンが挙げられる。

【００１１】

例えば、ジルチアゼム及びカプトプリルを用いた高血圧の治療は、左心室筋肉質量の低減を示しているが、心拡張機能のドップラー指数は正常にはならなかった。Szlachcic等，Am. J. Cardiol., 63：198-201(1989)；Shahi等，Lancet, 336：458-461(1990)。これらの知見は、過度の量の間質性コラーゲンが左心室肥大の緩解後に残るであろうことを示していると解釈される。Rossi等，Am. Heart J., 124：700-709(1992)。上掲のRossi等は、実験用ラットにおける、圧負荷心臓肥大における心筋細胞肥大と間質性線維症の防止と退行に対するカプトプリルの効果を研究した。

【００１２】

心収縮性を直接増大させる薬剤(変力剤)は、短期間で心拍出量を改善するために当初は心不全の患者にとっては有益であると考えられていた。しかし、ジゴキシゲニンを除く全ての陽性変力剤は、心臓性能の短期間の改善にもかかわらず、長期間では死亡率が増加する結果になることが見出されている。Massie, Curr. Op. in Cardiology, 12：209-217(1997)；Reddy等，Curr. Opin. Cardiol., 12：233-241(1997)。近年、β-アドレナリン様レセプターブロッカーの心不全への使用が支持されている。臨床試験の証拠によれば、心機能の改善が死亡率を増加させることなく達成可能であることが示唆されるが、患者生存率の改善は今だ証明されていない。また、ＣＨＦの治療におけるインシュリン様成長因子-Ｉ及び／又は成長ホルモン、又はカルジオトロピン-１又はそのアンタゴニストの使用に関しては米国特許第5,935,924号；同5,624,806号；同5,661,122号；同5,610,134号；及び国際公開第95/28173号を参照されたい。他の治療様式は心臓移植であるが、これはドナーの心臓の入手可能性により制限される。

【００１３】

エンドセリンは、ブタ動脈のエンドセリン培養上清から単離され、構造的に決定された、２１のアミノ酸を含む血管収縮化ペプチドである。Yanagisawa等,Nature, 332,：411-415(1988)。後になって、エンドセリンは種々の作用を示すことが見出され、エンドセリンアンタゴニストのようなエンドセリン抗体は、心筋梗塞、腎不全、及び他の病気に治療に有効であることが証明されている。エンドセリンは生体内に存在していて、血管収縮作用を示すために、循環系の調節に関与している内因性因子であることが予想され、高血圧、心疾患、例えば心筋梗塞、及び腎臓病、例えば急性腎不全と関連があるであろう。エンドセリンアンタゴニストは、例えば米国特許第5,773,414号；日本国特許公開第3130299/1991号、欧州特許第457,195号；欧州特許第460,679号；及び欧州特許第552,489号に記載されている。エンドセリンレセプターアンタゴニストを同定するための新規なエンドセリンＢレセプターは米国特許第5,773,223号に記載されている。

【００１４】

心不全の現在の治療は、主として、アンギオテンシン転換酵素(ＡＣＥ)インヒビター、例えばカプトプリル、及び利尿薬を使用することに向けられている。これらの薬物は血行動態特性と運動耐性を改善し、ＣＨＦ患者の羅患率及び死亡率を低減させる。Kramer等，Circulation, 67(4)：807-816(1983)；Captopril Multicenter Research Group, J.A.C.C., 2(4)：755-763(1983)；The CONSENSUS Trial Study Group, N. Engl. J. Med., 316(23)：1429-1435(1987)；The SOLVD Investigators, N. Engl. J. Med., 325(5)：293-302(1991)。さらに、それらは、高血圧、左心室機能不全、アテローム性動脈硬化症、糖尿病腎障害の治療に有用である。Brown及びVaughan, 上掲。しかしながら、効能が証明されているにもかかわらず、ＡＣＥインヒビターに対する反応性は限られている。例えば、心不全の場合に生存を延ばすが、ＡＣＥインヒビターは末期心不全への進行を遅延させるようであり、ＡＣＥインヒビターを用いた患者のかなりの数が機能クラスＩＩＩの心不全を有している。

【００１５】

さらに、機能的能力と運動時間の改善性は僅かで、死亡率は低減はするが高いままである。The CONSENSUS Trial Study Group, N. Engl. J. Med., 316(23)：1429-1453(1987)；The SOLVD Investigators, N. Engl. J. Med., 325(5)：293-302(1991)；Cohn等，N. Engl. J. Med., 325(5)：303-310(1991)；The Captopril-Digoxin Multicenter Research

Group, JAMA, 259(4)：539-544(1988)。このため、ＡＣＥインヒビターにより、いつも６０％以上の心不全患者において徴候を緩和することができず、心不全による死亡率を約１５-２０％も低減させることはできないようである。さらなる好ましくない効果は 上掲のBrown及びVaughanを参照されたい。

【００１６】

また、ＡＣＥインヒビターの代替物は特定のＡＴ１レセプターアンタゴニストである。臨床研究では、心臓血管及び腎臓の病気の治療における、２つの様式の効能を比較することが計画されている。しかしながら、動物モデルのデータでは、ＡＣＥ／ＡｎｇＩＩ経路は、心臓肥大に明らかに関与しているが、唯一のものではなく、あるいはこの役割に活性な主要経路でさえないことを示唆している。このような一つのモデルにおいては、ＡｎｇＩＩに対する主要な心臓レセプター、ＡＴｓｕｂ１Ａが遺伝学的に欠失されており；これらのマウスは、ＡｎｇＩＩが実験的に付与された場合に肥大を発現しない(ＡｎｇＩＩに二次的な肥大の消滅におけるモデルの基本的な成功を確認する)。しかしながら、これらの動物(高血圧の心臓ストレスのモデル)において大動脈を収縮させた場合、心臓はなおも肥大性になる。このことは、このレセプター(ＡＴサブ１Ａ)に無関係な別のシグナル伝達経路が高血圧において活性化されていることを示唆している。おそらく、ＡＣＥインヒビターはこれらの経路を阻害することはできないであろう。Harada等, Circulation, 97：1952-1959(1998)を参照されたい。また、心臓肥大のプロセスとメカニズムに関連した謎については、Homcy, Circulation, 97：1890-1892(1998)を参照されたい。

【００１７】

毎年約７５００００人の患者が急性心筋梗塞(ＡＭＩ)を患っており、アメリカ合衆国における全死亡の約４分の１がＡＭＩによるものである。近年、血栓溶解剤、例えばストレプトキナーゼ、ウロキナーゼ、特に組織プラスミノーゲンアクチベータ(ｔ-ＰＡ)が、心筋梗塞を患っている患者の生存率をかなり増加させた。１．５～４時間、連続して静脈注入として投与した場合、ｔ-ＰＡは治療した患者の６９％～９０％において９０分で冠動脈を開通させる。Topol等, Am. J. Cardiol., 61, 723-728(1988)；Neuhaus等, J. Am. Coll. Cardiol., 12：581-587(1988)；Neuhaus等, J. Am. Coll. Cardiol., 14：1566-1569(1989)。最も高い開存率が高用量又は加速投薬療法で報告されている。Topol, J. Am. Coll. Cardiol., 15：922-924(1990)。またｔ-ＰＡは一回の大量瞬時投与として投与してもよく、半減期は比較的短いが、注入治療により適している。Tebbe等, Am. J. Cardiol., 64：448-453(1989)。特に長い半減期と非常に高いフィブリン特異性を有するように設計されたｔ-ＰＡ変異体、ＴＮＫ-ｔ-ＰＡ(Ｔ１０３Ｎ、Ｎ１１７Ｑ、ＫＨＲＲ(296-299)ＡＡＡＡｔ-ＰＡ変異体, Keyt等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91：3670-3674(1994))が大量瞬時投与に特に適している。しかしながら、これらのあらゆる進歩にもかかわらず、患者の生存率の長期間の予後は、梗塞後のモニタリングと患者の治療に大きく依存しており、それは心臓肥大のモニタリングと治療を含まなければならない。

【００１８】

Ｂ．　成長因子

種々の天然に生じるポリペプチドは内皮細胞の増殖を誘発すると報告されている。これらのポリペプチドとしては、塩基性及び酸性の線維芽細胞増殖因子(ＦＧＦ)(Burgess及びMaciag, Annual Rev. Biochem., 58：575(1989))、血小板誘導内皮細胞成長因子(ＰＤ-ＥＣＧＦ)(Ishikawa等, Nature, 338：557(1989))、及び血管内皮成長因子(ＶＥＧＦ)を挙げることができる。Leung等, Science, 246：1306(1989)；Ferrara及びHenzel, Biochem. Biophys. Res. Commun., 161：851(1989)；Tischer等, Biochem. Biophys. Res. Commun., 165：1198(1989)；1996年7月31日に許可されたEP471,754B。

【００１９】

ヒトＶＥＧＦ(ｈＶＥＧＦ)ｃＤＮＡが形質移入された細胞により馴化された培地においては、毛管内皮細胞の増殖は促進されるが、これに対し、対照細胞はそうではなかった。Leung等, Science, 246：1306(1989)。ｈＶＥＧＦの１２１-、１８９-及び２０６-アミノ酸イソ型(また集合的にｈＶＥＧＦ関連タンパク質と称される)をコードする、いくつかの

付加的なｃＤＮＡがヒトｃＤＮＡライブラリにおいて同定されている。１２１-アミノ酸タンパク質はｈＶＥＧＦにおける残基１１６と１５９との間の４４アミノ酸が欠失している点でｈＶＥＧＦとは異なる。１８９-アミノ酸タンパク質は、ｈＶＥＧＦにおける残基１１６における２４のアミノ酸の挿入によりｈＶＥＧＦとは異なり、ヒト血管浸透因子(ｈＶＰＦ)と明らかに同一である。２０６-アミノ酸タンパク質はｈＶＥＧＦの残基１１６における４１アミノ酸の挿入によりｈＶＥＧＦとは異なる。Houck等, Mol. Endocrin., 5：1806(1991)；Ferrara等, J. Cell. Biochem., 47：211(1991)；Ferrara等, Endocrine Reviews, 13：18(1992)；Keck等, Science, 246：1309(1989)；Connolly等, J. Biol. Chem., 264：20017(1989)；1990年5月30日に公開された欧州特許第370,989号。

【００２０】

現在では、先在する内皮からの新規な血管の形成に関連した血管新生が、種々の疾病の病原に関与していることが明確に確立されている。これらには固形腫瘍及び転移、アテローム性動脈硬化、水晶体後方線維増殖症、血管腫、慢性炎症、眼新血管新生症候群、例えば増殖性網膜症、例えば糖尿病網膜症、加齢関連性斑変性(ＡＭＤ)、新血管新生緑内障、移植角膜組織及び他の組織の免疫拒絶、慢性関節リウマチ、及び乾癬が含まれる。Folkman等, J. Biol. Chem., 267：10931-10934(1992)；Klagsbrun等, Annu. Rev. Physiol., 53：217-239(1991)；及びGarner A, "Vascular diseases"。Pathobiology of Ocular Disease. A Dynamic Approach, Garner A. Klintworth GK, eds., 2nd Edition(Marcel Dekker, NY,1994) 1625-1710頁。

【００２１】

腫瘍成長の場合では、血管形成は、過形成から新生組織形成への変化、及び固形腫瘍の成長用の滋養物の提供に非常に重要であると思われる。Folkman等, Nature, 339：58(1989)。新血管新生により、腫瘍細胞が正常細胞と比較して成長有利性と増殖自律性を獲得する。従って、腫瘍部位の微小血管密度と乳癌並びに幾つかの他の腫瘍における患者の生存率との間には相関関係が見出されている。Weidner等, N. Engl. J. Med. 324：1-6(1991)；Horak等, Lancet, 340：1120-1124(1992)；Macchiarini.等, Lancet, 340：145-146(1992)。

【００２２】

血管形成の正の調節因子の探索により、ａＦＧＦ、ｂＦＧＦ、ＴＧＦ-α、ＨＧＦ、ＴＮＦ-α、ＴＧＦ-β、アンジオゲニン、ＩＬ-８等を含む多くの候補薬が得られている。上掲のFolkman等, J.B.C.,及び上掲のKlagsbrunら。これまでに同定されている負の調節因子には、トロンボスポンジン(Good等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 87：6624-6628(1990))、プロラクトンの１６-キロダルトンのＮ-末端フラグメント(Clapp等, Endocrinology, 133：1292-1299(1993))、アンギオスタチン(angiostatin)(O'Reilly等, Cell, 79：315-328(1994))及びエンドスタチン(endostatin)が含まれる。O'Reilly等, Cell, 88：277-285(1996)。

【００２３】

最近の数年間にわたってなされた研究で、血管内皮細胞の増殖を刺激するだけでなく、血管の浸透性及び血管形成を誘発する点においてもＶＥＧＦの重要な役割が確立されている。Ferrara等, Endocr. Rev., 18：4-25(1997)。一つのＶＥＧＦ対立遺伝子さえ喪失すると胎児死亡に至るという知見は、血管系の発達と分化におけるこの因子が担っている代替のない役割を示している。さらに、ＶＥＧＦは腫瘍及び眼内疾患に関連した新血管新生の重要な媒介物であることが示されている。Ferrara等, Endocr. Rev., 上掲。ＶＥＧＦｍＲＮＡは検査した多くのヒト腫瘍で過剰発現している。Berkman等, J. Clin. Invest., 91：153-159(1993)；Brown等, Human Pathol., 26：89-91(1995)；Brown等, Cancer Res., 53：4727-4735(1993)；Mattern等, Brit. J. Cancer, 73：931-934(1996)；Dvorak等, Am. J. Pathol., 146：1029-1039(1995)。

【００２４】

また、眼の流体中のＶＥＧＦの濃度レベルは、糖尿病及び他の虚血関連網膜症を有する患者における血管の活性増殖の存在性と高い相関関係がある。Aiello等, N. Engl. J. Me

d., 331：1480-1487(1994)。さらに、近年の研究により、ＡＭＤの影響を受けている患者の脈絡膜新生血管膜にＶＥＧＦが局在化していることが示されている。Lopez等, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 37：855-868(1996)。

【００２５】

抗-ＶＥＧＦ中和抗体は、ヌードマウスにおいて、様々なヒト腫瘍株化細胞の成長を抑制し(Kim等, Nature, 362：841-844(1993)；Warren等, J. Clin. Invest., 95：1789-1797(1995)；Borgstrom等, Cancer Res., 56：4032-4039(1996)；Melnyk等, Cancer Res., 56：921-924(1996))、また虚血性網膜疾患における眼内血管形成を阻害する。Adamis等, Arch. Ophthalmol., 114：66-71(1996)。よって、抗-ＶＥＧＦモノクローナル抗体又はＶＥＧＦ作用に対する他のインヒビターは、固形腫瘍及び種々の眼内新血管疾患の治療用の候補薬とされている。このような抗体は、例えば1998年1月14日に公開されたEP817,648及び1998年4月3日に出願されたPCT/US98/06724に記載されている。

【００２６】

ある種の細胞により発現する遺伝子の複合体を素早く誘導することができる、トランスフォーミング発ガン遺伝子を含む、いくつかの他の成長因子及び分裂促進因子が存在する。Lau及びNathans. Molecular Aspects of Cellular Regulation, 6：165-202(1991)。前初期遺伝子又は初期反応遺伝子と命名されているこれらの遺伝子は、デノボタンパク質合成と無関係に、成長因子又は分裂促進因子と接触後数分間で転写的に活性化される。これらの前初期遺伝子のグループは、分化及び増殖、再生、及び傷治療等の複雑な生物学的プロセスを調整するのに必要な、分泌性の細胞外タンパク質をコードする。Ryseck等, Cell Growth Differ., 2：235-233(1991)。

【００２７】

このグループに属する高度に関連したタンパク質には、ｃｅｆ１０(Simmons等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86：1178-1182(1989))、血清-又は血小板誘導成長因子(ＰＤＧＦ)により素早く活性化されるｃｙｒ６１(O'Brien等, Mol. Cell. Biol., 10：3569-3577(1990))、トランスフォーミング成長因子β(ＴＧＦ-β)による活性化後に高レベルでヒト血管内皮細胞により分泌され、ＰＤＧＦ様の生物学的及び免疫学的活性を示し、特定の細胞表面レセプターに対してＰＤＧＦと競合するヒト結合組織成長因子(ＣＴＧＦ)(Bradham等, J. Cell. Biol., 114：1285-1294(1991))、ｆｉｓｐ-１２(Ryseck等, Cell Growth Differ., 2：235-233(1991))、ヒト血管ＩＢＰ-様成長因子(ＶＩＧＦ)(WO96/17931)、及び通常は成人腎臓細胞に静止され、骨髄芽球-関連-ウイルスＩ型誘発腎芽細胞腫において過剰発現することが見出されているｎｏｖが含まれる。Joloit等, Mol. Cell. Biol., 12：10-21(1992)。

【００２８】

これらの前初期遺伝子の発現は、成長因子により誘発される事象のカスケードにおける「第３のメッセンジャー」として作用する。また、それらは複雑な生物学的プロセス、例えば分化及び細胞増殖が通常の事象である傷治療を統合及び調整するのに必要であると考えられている。

付加的な分裂促進因子として、インシュリン様成長因子結合タンパク質(ＩＧＦＢＰｓ)が、インシュリン様成長因子(ＩＧＦ)との複合体において、線維芽細胞及び平滑筋細胞表面レセプターへのＩＧＦの結合性を増加させるように刺激することが示されている。Clemmonsら., J. Clin. Invest., 77: 1548(1986)。様々なインビトロでのＩＧＦ作用に対するＩＧＦＢＰの阻害効果は、脂肪細胞によるグルコース輸送の刺激、軟骨細胞によるサルフェートの取り込み、及び線維芽細胞中へのチミジンの取り込みを含む。Zapf等, J. Clin. Invest., 63：1077(1979)。さらに、正常な細胞での、成長因子媒介性分裂促進因子活性におけるＩＧＦＢＰの阻害効果が示されている。

【００２９】

Ｃ．　さらなる治療の必要性

多くの病気及び疾患における血管内皮細胞の成長及び血管形成の役割に鑑みると、これらのプロセスに起因する一又は複数の生物学的影響を低減又は抑制する手段を有している

ことが好ましい。また、正常及び病気の状態、特にガンにおいて病原性ポリペプチドの存在を検査する手段を有していることも望ましい。さらに、特定の側面では、心臓肥大の治療には一般的に適用できる治療法がないので、心臓ミオサイト肥大を防止又は低減可能な因子を同定することは、病態生理学的な心臓成長を阻害するための新規な治療方策の開発において非常に重要である。様々な心臓血管及び発癌遺伝子疾患のためのいくつかの治療様式が存在するが、さらなる治療的アプローチがなお必要とされている。

【００３０】

(発明の概要)

従って、本発明は、哺乳類における血管形成及び／又は心臓血管新生を促進又は阻害するための組成物及び方法に関する。本発明は、ある種の生物学的活性の促進又は阻害を試験する種々の心臓血管アッセイにおいて陽性を試験するタンパク質の同定に基づく。従って、血管形成の促進又は阻害、血管内皮細胞成長の阻害又は刺激、血管内皮細胞の成長又は増殖の刺激、腫瘍成長の阻害、血管形成依存性組織成長の阻害、血管形成依存性組織成長の刺激、心臓肥大の阻害及び心臓肥大の刺激、例えば鬱血性心不全の治療等の効果が望まれているところでは、当該タンパク質は疾患の診断及び／又は治療(予防を含む)に有用な薬剤であると考えられる。

【００３１】

一実施態様において、本発明は製薬的に許容される担体と混合されたＰＲＯポリペプチドを含んでなる組成物を提供する。一態様では、組成物は治療的有効量のポリペプチドを含有する。他の態様では、組成物はさらなる活性成分、すなわち、心臓血管、内皮又は血管形成薬又はアンギオスタチック(angiostatic)薬、好ましくは血管形成又はアンギオスタティック薬を含有する。好ましくは組成物は無菌である。ＰＲＯポリペプチドは、液状の製薬調製物の形態で投与することができ、これは、貯蔵安定性が延びるように保存できる。保存された液状の製薬調製物は複数回投与用のＰＲＯポリペプチドを含有していてもよく、よって繰り返し使用に適している。

【００３２】

さらなる実施態様において、本発明は、製薬的に許容される担体と、治療的有効量のＰＲＯポリペプチドとの混合物を含有する、心臓血管、内皮又は血管形成疾患の治療に有用なこのような組成物の調製方法を提供する。

他の実施態様において、本発明は、製薬的に許容される担体と混合された、ＰＲＯポリペプチドのアゴニスト又はアンタゴニストを含有する組成物を提供する。一態様では、組成物はアゴニスト又はアンタゴニストの治療的有効量を含有する。他の態様では、組成物はさらなる活性成分、すなわち、心臓血管、内皮又は血管形成薬又はアンギオスタチック薬、好ましくは血管形成又はアンギオスタチック薬を含有する。好ましくは組成物は無菌である。ＰＲＯポリペプチドのアゴニスト又はアンタゴニストは、液状の製薬調製物の形態で投与してもよく、貯蔵時の安定性の延長が達成されるように保存されてよい。保存された液状の製薬調製物は複数投与量のＰＲＯポリペプチドのアゴニスト又はアンタゴニストを含有していてもよく、よって繰り返し使用に適している。

さらなる実施態様において、本発明は、製薬的に許容される担体と、ＰＲＯポリペプチドのアゴニスト又はアンタゴニストとの混合物を含有する、心臓血管、内皮又は血管形成疾患の治療に有用なこのような組成物の調製方法を提供する。

【００３３】

また他の実施態様において、本発明は、製薬的に許容される担体と混合物された、抗-ＰＲＯ抗体を含有する組成物に関する。一態様において、組成物は治療的有効量の抗体を含有する。他の態様において、組成物はさらなる活性成分、すなわち、心臓血管、内皮又は血管形成薬又はアンギオスタチック薬、好ましくは血管形成又はアンギオスタチック薬を含有する。好ましくは組成物は無菌である。組成物は、液状の製薬調製物の形態で投与してもよく、貯蔵時の安定性の延長が達成されるように保存されてもよい。保存された液状の製薬調製物は複数投与量の抗-ＰＲＯ抗体を含有していてもよく、よって繰り返し使用に適している。好ましい実施態様において、抗体はモノクローナル抗体、抗体断片、ヒ

ト化抗体又は一本鎖抗体である。
さらなる実施態様において、本発明は製薬的に許容される担体と、治療的有効量の抗-ＰＲＯ抗体との混合物を含有する、心臓血管、内皮又は血管形成疾患の治療に有用なこのような組成物の調製方法を提供する。
【００３４】
またさらなる態様において、本発明は：
(ａ)治療的有効量のＰＲＯポリペプチドを含有する物質の組成物；
(ｂ)該組成物を収容する容器；及び
(ｃ)心臓血管、内皮又は血管形成疾患の治療における該ＰＲＯポリペプチドの使用を記した、該容器に添付されるラベル又は当該容器に収納される包装挿入物を具備する製造品を提供し、前記アゴニスト又はアンタゴニストはＰＲＯポリペプチドに結合する抗体であってよい。当該組成物は、治療的有効量のＰＲＯポリペプチド又はそのアゴニスト又はアンタゴニストを含んでいてよい。
【００３５】
他の実施態様において、本発明は、ＰＲＯポリペプチドのアゴニストを同定する方法を提供し、それは：
（ａ）細胞とスクリーニングすべき試験化合物とを、ＰＲＯポリペプチドによって通常誘発される細胞性反応の誘発に適した条件下で接触させ；そして
（ｂ）前記細胞性反応の誘発を測定して、試験化合物が有効なアゴニストであるか否かを決定することを含んでなり、前記細胞性反応の誘発が前記試験化合物が有効なアゴニストであることを示す。
他の実施態様において、本発明は、ＰＲＯポリペプチドのアゴニストを同定する方法を提供し、それは：
（ａ）細胞とスクリーニングすべき試験化合物とを、ＰＲＯポリペプチドによる細胞増殖の刺激に適した条件下で接触させ；そして
（ｂ）前記細胞の増殖を測定して、試験化合物が有効なアゴニストであるか否かを決定することを含んでなり、当該細胞増殖の刺激が前記試験化合物が有効なアゴニストであることを示す。
【００３６】
他の実施態様では、本発明はＰＲＯポリペプチドの活性を阻害する化合物の同定方法を提供し、それは、試験化合物をＰＲＯポリペプチドと、試験化合物とポリペプチドとが相互作用するのに十分な条件及び時間で接触させ、ＰＲＯポリペプチドの活性が阻害されるか否かを測定することを含む。特に好ましい態様では、試験化合物又はＰＲＯポリペプチドのいずれかが固体支持体に固定化される。他の好ましい態様では、非固定化成分は検出可能な標識を担持する。好ましい態様では、この方法は：
（ａ）細胞とスクリーニングすべき試験化合物とを、ＰＲＯポリペプチドの存在したで、ＰＲＯポリペプチドによって通常誘発される細胞性反応の誘発に適した条件下で接触させ；そして
（ｂ）前記細胞性反応の誘発を測定して、試験化合物が有効なアゴニストであるか否かを決定する工程を含む。
他の好ましい態様においては、この方法は：
（ａ）細胞とスクリーニングすべき試験化合物とを、ＰＲＯポリペプチドの存在下で、ＰＲＯポリペプチドによる細胞増殖の刺激に適した条件下で接触させ；そして
（ｂ）前記細胞の増殖を測定して、試験化合物が有効なアゴニストであるか否かを決定する工程を含む。
【００３７】
他の実施態様では、本発明は、通常はＰＲＯポリペプチドを発現する細胞における当該細胞の発現を阻害する化合物の同定方法を提供し、当該方法は、細胞と試験化合物とを接触させ、ＰＲＯポリペプチドの発現が阻害されるか否かを測定することを含む。好ましい態様では、この方法は：

(ａ)細胞とスクリーニングすべき試験化合物とをＰＲＯポリペプチドを発現させるのに適した条件下で接触させ；そして
(ｂ)前記ポリペプチドの発現の阻害を測定する工程を含む。
またさらなる実施態様では、本発明は、前掲の方法により同定された化合物等の、ＰＲＯポリペプチドの発現を阻害する化合物を提供する。

【００３８】
本発明の他の態様は、前掲の方法により同定されてもよいＰＲＯポリペプチドのアゴニスト又はアンタゴニストに向けられる。
ＰＲＯポリペプチドの一又は複数の機能又は活性を阻害するＰＲＯポリペプチドのアンタゴニストの一種は抗体である。よって、他の態様では、本発明はＰＲＯポリペプチドに結合する単離された抗体を提供する。好ましい態様において、抗体はモノクローナル抗体であり、好ましくは非ヒト相補性決定領域(ＣＤＲ)残基及びヒトフレームワーク領域(ＦＲ)残基を有する。抗体は標識されていても固体支持体上に固定化されていてもよい。さらなる態様では、抗体は抗体断片、一本鎖抗体、又はヒト化抗体である。好ましくは、抗体はポリペプチドに特異的に結合する。

【００３９】
またさらなる態様において、本発明は、哺乳動物における心臓血管、内皮又は血管形成疾患を診断する方法を提供し、それは、（ａ）前記哺乳動物から得た組織細胞の試験試料、及び（ｂ）同じ細胞型の公知の正常組織細胞の対照試料におけるＰＲＯポリペプチドをコードする遺伝子の発現レベルを分析することを含んでなり、対照試料に比較した場合の試験試料中の発現レベルの高低が、前記哺乳動物における心臓血管、内皮又は血管形成疾患の存在を示す。ＰＲＯポリペプチドをコードする遺伝子の発現は、場合によっては、対照試料と比較した際の試験試料中のｍＲＮＡ又はポリペプチドのレベルの測定によってなされてもよい。
またさらなる態様において、本発明は、哺乳動物における心臓血管、内皮又は血管形成疾患を診断する方法を提供し、それは、前記哺乳動物から得た組織細胞の試験試料におけるポリペプチドの有無を検出することを含んでなり、前記試験試料における前記ポリペプチドの有無が前記哺乳動物における心臓血管、内皮又は血管形成疾患の存在を示す。

【００４０】
またさらなる態様では、本発明は、哺乳動物における心臓血管、内皮又は血管形成疾患を診断する方法を提供し、それは、（ａ）前記哺乳動物から得た組織細胞の試験試料を抗-ＰＲＯ抗体と接触させ、そして（ｂ）試験試料中での前記抗体とＰＲＯポリペプチドとの複合体形成を検出することを含んでなり、前記複合体の形成が前記哺乳動物における心臓血管、内皮又は血管形成疾患の存在を示す。検出は、定性的でも定量的でもよく、同じ細胞型の公知の正常組織細胞の対照試料における複合体形成の監視と比較して実施してもよい。試験試料における複合体形成量の多少が、試験組織細胞を得た当該哺乳動物における心臓血管、内皮又は血管形成不全の存在を示す。抗体は、好ましくは検出可能な標識を担持している。複合体形成は、例えば、光学顕微鏡、フローサイトメトリー、蛍光定量法、又はこの分野で知られた他の技術によって監視できる。試験試料は通常、心臓血管、内皮又は血管形成疾患を持つと推定される個体から得る。
他の実施態様では、本発明は、試料中のＰＲＯポリペプチドの存在を測定する方法を提供し、それは、ＰＲＯポリペプチドを含有すると推測される試料を抗-ＰＲＯ抗体と接触させ、前記抗体の前記試料の成分への結合を測定することを含んでなる。特別な態様では、当該試料はＰＲＯポリペプチドを含むと推定される細胞を含み、抗体は細胞に結合する。抗体は、好ましくは検出可能に標識され及び／又は固体支持体に固定化される。

【００４１】
さらなる態様において、本発明は、抗-ＰＲＯ抗体と担体とを適切な包装内に具備してなる心臓血管、内皮又は血管形成疾患の診断キットを提供する。好ましくは、そのようなキットは、前記抗体をＰＲＯポリペプチド存在検出に使用するための指示書をさらに具備する。好ましくは、担体は例えばバッファーである。好ましくは、心臓血管、内皮又は血

管形成疾患は癌である。

さらに他の実施態様では、本発明は、哺乳動物における心臓血管、内皮又は血管形成疾患を治療する方法を提供し、それは、ＰＲＯポリペプチドの有効量を当該哺乳動物に投与することを含んでなる。好ましくは、疾患は心臓肥大、創傷又は火傷などの外傷、又は癌の一型である。さらなる態様では、心臓血管、内皮又は血管形成疾患が癌の一型であるならば、哺乳動物は、血管形成術、又は心臓血管、内皮又は血管形成疾患を治療するための薬剤、例えばＡＣＥインヒビター、又は化学治療薬にさらに暴露される。好ましくは哺乳動物はヒト、好ましくは心臓肥大を起こす危険性のあるヒト、より好ましくは心筋梗塞を罹患しているヒトである。

他の好ましい態様において、心臓肥大は、$PGF_{2\alpha}$レベルの上昇が存在することにより特徴付けられる。あるいは、心臓肥大は心筋梗塞により誘発され、ここで、好ましくはＰＲＯポリペプチドの投与は、心筋梗塞に続いて４８時間、好ましくは２４時間以内に開始される。

【００４２】

他の好ましい実施態様において、心臓血管、内皮又は血管形成疾患は心臓肥大であり、前記ＰＲＯポリペプチドは心臓血管、内皮又は血管形成薬と共に投与される。この目的のために好ましい心臓血管、内皮又は血管形成薬は、抗高血圧薬、ＡＣＥインヒビター、エンドセリンレセプターアンタゴニスト及び血栓溶解剤からなる群から選択される。血栓溶解剤が投与される場合、好ましくは、ＰＲＯポリペプチドはこのような薬剤の投与後に投与される。より好ましくは、血栓溶解剤は組換えヒト組織プラスミノーゲン活性化因子である。

他の好ましい態様において、心臓血管、内皮又は血管形成疾患は心臓肥大であり、ＰＲＯポリペプチドは急性心筋梗塞の治療のための一次血管形成術に続いて投与され、ここで好ましくは、当該哺乳動物は血管形成術又は心臓血管、内皮又は血管形成薬にさらに暴露される。

他の好ましい実施態様において、心臓血管、内皮又は血管形成疾患は癌であり、ＰＲＯポリペプチドは化学治療薬、成長阻害薬又は細胞毒性薬と組合せて投与される。

【００４３】

さらなる実施態様において、本発明は、哺乳動物の心臓血管、内皮又は血管形成疾患の治療方法に関し、それは、ＰＲＯポリペプチドのアゴニストの有効量を当該哺乳動物に投与することを含んでなる。好ましくは、心臓血管、内皮又は血管形成疾患は心臓肥大、外傷、癌、又は加齢性黄斑変性である。また好ましくは哺乳動物はヒトであり、有効量の血管形成又はアンギオスタチック薬はアゴニストと共に投与される。

さらなる実施態様において、本発明は、哺乳動物の心臓血管、内皮又は血管形成疾患の治療方法に関し、それは、ＰＲＯポリペプチドのアンタゴニストの有効量を哺乳動物に投与することを含んでなる。好ましくは、心臓血管、内皮又は血管形成疾患は心臓肥大、外傷、癌、又は加齢性黄斑変性である。また好ましくは哺乳動物はヒトであり、有効量の血管形成又はアンギオスタチック薬はアンタゴニストと共に投与される。

さらなる実施態様において、本発明は、哺乳動物の心臓血管、内皮又は血管形成疾患の治療方法に関し、それは、抗-ＰＲＯ抗体の有効量を哺乳動物に投与することを含んでなる。好ましくは、心臓血管、内皮又は血管形成疾患は心臓肥大、外傷、癌、又は加齢性黄斑変性である。また好ましくは哺乳動物はヒトであり、有効量の血管形成又はアンギオスタチック薬は抗体と共に投与される。

【００４４】

さらなる実施態様において、本発明は、心臓血管、内皮又は血管形成疾患を患っている哺乳動物の心臓血管、内皮又は血管形成疾患の治療方法を提供し、それは、(ａ)ＰＲＯポリペプチド、(ｂ)ＰＲＯポリペプチドのアゴニスト、又は(ｃ)ＰＲＯポリペプチドのアンタゴニストのいずれかをコードする核酸分子を哺乳動物に投与することを含んでなり、ここで前記アゴニスト又はアンタゴニストは抗-ＰＲＯ抗体であってよい。好ましい実施態様において哺乳動物はヒトである。他の好ましい実施態様において、遺伝子は、エキソビ

ボの遺伝子治療を介して投与される。さらなる好ましい実施態様において、遺伝子はベクター、より好ましくはアデノウイルス、アデノ関連ウイルス、レンチウイルス、又はレトロウイルスベクター内に包含される。

また、他の態様において、本発明は、プロモータ、(ａ)ＰＲＯポリペプチド、(ｂ)ＰＲＯポリペプチドのアゴニストポリペプチド、又は(ｃ)ＰＲＯポリペプチドのアンタゴニストポリペプチドをコードする核酸分子、及びポリペプチドの細胞分泌のためのシグナル配列から本質的になるレトロウイルスベクターを含有する組換えレトロウイルス粒子を提供し、ここでレトロウイルスベクターはレトロウイルス構造タンパク質を付随している。好ましくは、シグナル配列は哺乳動物、例えば天然ＰＲＯポリペプチドからのものである。

また、さらなる実施態様において、本発明は、レトロウイルス構造タンパク質を発現する核酸構造体を含有し、プロモータ、(ａ)ＰＲＯポリペプチド、(ｂ)ＰＲＯポリペプチドのアゴニストポリペプチド、又は(ｃ)ＰＲＯポリペプチドのアンタゴニストポリペプチドをコードする核酸分子、及びポリペプチドの細胞分泌のためのシグナル配列から本質的になるレトロウイルスベクターをさらに含有するエキソビボ産生細胞(producer cell)を提供し、ここで当該産生細胞は、組換えレトロウイルス粒子を生産させる構造タンパク質を付随するレトロウイルスベクターを包含する。

【００４５】

また他の実施態様において、本発明は、哺乳動物の内皮細胞の成長を阻害する方法を提供し、それは(ａ)ＰＲＯポリペプチド、(ｂ)ＰＲＯポリペプチドのアゴニスト、又は(ｃ)ＰＲＯポリペプチドのアンタゴニストを哺乳動物に投与することを含んでなり、当該哺乳動物の内皮細胞の成長は阻害され、前記アゴニスト又はアンタゴニストは抗-ＰＲＯ抗体であってよい。好ましくは、哺乳動物はヒトであり、内皮細胞の成長は腫瘍又は網膜疾患に関連している。

また他の実施態様において、本発明は、哺乳動物の内皮細胞の成長を刺激する方法を提供し、それは(ａ)ＰＲＯポリペプチド、(ｂ)ＰＲＯポリペプチドのアゴニスト、又は(ｃ)ＰＲＯポリペプチドのアンタゴニストを哺乳動物に投与することを含んでなり、当該哺乳動物の内皮細胞の成長が刺激され、前記アゴニスト又はアンタゴニストは抗-ＰＲＯ抗体であってよい。好ましくは、哺乳動物はヒトである。

また他の実施態様において、本発明は、哺乳動物の心臓肥大を阻害する方法を提供し、それは(ａ)ＰＲＯポリペプチド、(ｂ)ＰＲＯポリペプチドのアゴニスト、又は(ｃ)ＰＲＯポリペプチドのアンタゴニストを哺乳動物に投与することを含んでなり、前記哺乳動物の心臓肥大が阻害され、前記アゴニスト又はアンタゴニストは抗-ＰＲＯ抗体であってよい。好ましくは、哺乳動物はヒトであり、心臓肥大は心筋梗塞によって誘発されたものである。

【００４６】

また他の実施態様において、本発明は、哺乳動物の心臓肥大を刺激する方法を提供し、それは(ａ)ＰＲＯポリペプチド、(ｂ)ＰＲＯポリペプチドのアゴニスト、又は(ｃ)ＰＲＯポリペプチドのアンタゴニストを哺乳動物に投与することを含んでなり、前記哺乳動物の心臓肥大が刺激され、前記アゴニスト又はアンタゴニストは抗-ＰＲＯ抗体であってよい。好ましくは、哺乳動物は鬱血性心不全を罹患したヒトである。

また他の実施態様では、本発明は、哺乳動物においてＰＲＯポリペプチドにより誘発される血管形成を阻害する方法を提供し、それは、当該哺乳動物に治療的有効量の抗-ＰＲＯ抗体を投与することを含んでなる。好ましくは、哺乳動物は鬱血性心不全を罹患したヒトである。

また他の実施態様では、本発明は、哺乳動物においてＰＲＯポリペプチドにより誘発される血管形成を刺激する方法を提供し、それは、当該哺乳動物に治療的有効量の抗-ＰＲＯ抗体を投与することを含んでなる。好ましくは、哺乳動物はヒトであり、より好ましくは血管形成は組織再生又は外傷治癒を促進する。

【００４７】

Ｂ．　さらなる実施態様

本発明の他の態様において、本発明はＰＲＯポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む単離された核酸分子を提供する。

一態様では、単離された核酸分子は、（ａ）ここに開示する全長アミノ酸配列、ここに開示するシグナルペプチドを欠くアミノ酸配列、ここに開示するシグナルペプチド有又は無の膜貫通タンパク質の細胞外ドメイン、又はここに開示する全長アミノ酸配列の特に同定された他の断片を持つＰＲＯポリペプチドをコードするＤＮＡ分子、又は（ｂ）（ａ）のＤＮＡ分子の相補鎖に対して少なくとも約８０％の配列同一性、好ましくは少なくとも約８１％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約８２％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約８３％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約８４％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約８５％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約８６％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約８７％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約８８％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約８９％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約９０％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約９１％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約９２％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約９３％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約９４％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約９５％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約９６％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約９７％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約９８％の配列同一性、そして、より好ましくは少なくとも約９９％の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む。

【００４８】

他の態様では、単離された核酸分子は、（ａ）ここに開示する全長ＰＲＯポリペプチドｃＤＮＡコード化配列、ここに開示するシグナルペプチドを欠くＰＲＯポリペプチドのコード化配列、ここに開示するシグナルペプチド有又は無の膜貫通ＰＲＯポリペプチドの細胞外ドメインのコード化配列、又はここに開示する全長アミノ酸配列の特に同定された他の断片のコード化配列を持つＤＮＡ分子、又は（ｂ）（ａ）のＤＮＡ分子の相補鎖に対して少なくとも約８０％の配列同一性、好ましくは少なくとも約８１％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約８２％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約８３％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約８４％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約８５％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約８６％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約８７％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約８８％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約８９％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約９０％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約９１％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約９２％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約９３％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約９４％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約９５％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約９６％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約９７％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約９８％の配列同一性、そして、より好ましくは少なくとも約９９％の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む。

【００４９】

さらなる態様では、本発明は（ａ）ここに開示するＡＴＣＣに寄託されたヒトタンパク質ｃＤＮＡの任意のものにコードされるのと同じ成熟ポリペプチドをコードするＤＮＡ分子、又は（ｂ）（ａ）のＤＮＡ分子の相補鎖に対して少なくとも約８０％の配列同一性、好ましくは少なくとも約８１％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約８２％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約８３％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約８４％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約８５％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約８６％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約８７％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約８８％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約８９％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約９０％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約９１％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約９２％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約９３％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約９４％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約９５％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約９６％の

配列同一性、より好ましくは少なくとも約９７％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約９８％の配列同一性、そして、より好ましくは少なくとも約９９％の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む単離された核酸分子に関する。

【００５０】

本発明の他の態様は、膜貫通ドメインが欠失しているか又は膜貫通ドメインが不活性化されているＰＲＯポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、又はそのようなコード化ヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を含む単離された核酸分子を提供し、そのようなポリペプチドの膜貫通ドメインはここに開示される。従って、ここに記載されるＰＲＯポリペプチドの可溶性細胞外ドメインが考慮される。

【００５１】

他の実施態様はＰＲＯポリペプチドコード化配列の断片、又はその相補鎖に向けられ、それらは、例えば、場合によっては抗-ＰＲＯ抗体に対する結合部位を含むポリペプチドをコードするＰＲＯポリペプチドのコード化断片のハイブリダイゼーションプローブとして、又はアンチセンスオリゴヌクレオチドプローブとしての用途が見いだされる。このような核酸断片は、通常は少なくとも約２０ヌクレオチド長、好ましくは少なくとも約３０ヌクレオチド長、より好ましくは少なくとも約４０ヌクレオチド長、より好ましくは少なくとも約５０ヌクレオチド長、より好ましくは少なくとも約６０ヌクレオチド長、より好ましくは少なくとも約７０ヌクレオチド長、より好ましくは少なくとも約８０ヌクレオチド長、より好ましくは少なくとも約９０ヌクレオチド長、より好ましくは少なくとも約１００ヌクレオチド長、より好ましくは少なくとも約１１０ヌクレオチド長、より好ましくは少なくとも約１２０ヌクレオチド長、より好ましくは少なくとも約１３０ヌクレオチド長、より好ましくは少なくとも約１４０ヌクレオチド長、より好ましくは少なくとも約１５０ヌクレオチド長、より好ましくは少なくとも約１６０ヌクレオチド長、より好ましくは少なくとも約１７０ヌクレオチド長、より好ましくは少なくとも約１８０ヌクレオチド長、より好ましくは少なくとも約１９０ヌクレオチド長、より好ましくは少なくとも約２００ヌクレオチド長、より好ましくは少なくとも約２５０ヌクレオチド長、より好ましくは少なくとも約３００ヌクレオチド長、より好ましくは少なくとも約３５０ヌクレオチド長、より好ましくは少なくとも約４００ヌクレオチド長、より好ましくは少なくとも約４５０ヌクレオチド長、より好ましくは少なくとも約５００ヌクレオチド長、より好ましくは少なくとも約６００ヌクレオチド長、より好ましくは少なくとも約７００ヌクレオチド長、より好ましくは少なくとも約８００ヌクレオチド長、より好ましくは少なくとも約９００ヌクレオチド長、より好ましくは少なくとも約１０００ヌクレオチド長であり、ここで「約」という語の内容は参照する長さのプラス又はマイナス１０％のヌクレオチド配列長を指すことを意味する。ＰＲＯポリペプチドコード化ヌクレオチド配列の新規な断片は、多くの良く知られた配列アラインメントプログラムの任意のものを用いてＰＲＯポリペプチドコード化ヌクレオチド配列と他の公知のヌクレオチド配列とを整列させ、いずれのＰＲＯポリペプチドコード化ヌクレオチド配列断片が新規であるかを決定することにより、日常的な手法で同定してもよい。このようなＰＲＯポリペプチドコード化ヌクレオチド配列は全てここで考慮される。また、これらのヌクレオチド分子断片、好ましくは抗-ＰＲＯ抗体に対する結合部位を含むＰＲＯポリペプチド断片によってコードされるＰＲＯポリペプチド断片も考慮される。

【００５２】

他の実施態様では、本発明は、上記で特定された単離された核酸配列の任意のものにコードされる単離されたＰＲＯポリペプチドを提供する。

或る態様では、本発明は、ここに開示する全長アミノ酸配列、ここに開示するシグナルペプチドを欠くアミノ酸配列、ここに開示するシグナルペプチド有又は無の膜貫通タンパク質の細胞外ドメイン、又はここに開示する全長アミノ酸配列の特に同定された他の断片を持つＰＲＯポリペプチドに対して少なくとも約８０％の配列同一性、好ましくは少なくとも約８１％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約８２％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約８３％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約８４％の配列同一

性、より好ましくは少なくとも約８５％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約８６％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約８７％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約８８％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約８９％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約９０％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約９１％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約９２％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約９３％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約９４％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約９５％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約９６％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約９７％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約９８％の配列同一性、そして、より好ましくは少なくとも約９９％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む単離されたＰＲＯポリペプチドに関する。

【００５３】

さらなる態様では、本発明は、ここに開示するＡＴＣＣに寄託されたヒトタンパク質ｃＤＮＡの任意のものにコードされるアミノ酸配列に対して少なくとも約８０％の配列同一性、好ましくは少なくとも約８１％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約８２％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約８３％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約８４％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約８５％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約８６％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約８７％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約８８％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約８９％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約９０％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約９１％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約９２％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約９３％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約９４％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約９５％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約９６％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約９７％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約９８％の配列同一性、そして、より好ましくは少なくとも約９９％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む単離されたＰＲＯポリペプチドに関する。

【００５４】

さらなる態様では、本発明は、ここに開示する全長アミノ酸配列、ここに開示するシグナルペプチドを欠くアミノ酸配列、ここに開示するシグナルペプチド有又は無の膜貫通タンパク質の細胞外ドメイン、又はここに開示する全長アミノ酸配列の特に同定された他の断片を持つＰＲＯポリペプチドと比較したときに、少なくとも約８０％ポジティブ、好ましくは少なくとも約８１％ポジティブ、より好ましくは少なくとも約８２％ポジティブ、より好ましくは少なくとも約８３％ポジティブ、より好ましくは少なくとも約８４％ポジティブ、より好ましくは少なくとも約８５％ポジティブ、より好ましくは少なくとも約８６％ポジティブ、より好ましくは少なくとも約８７％ポジティブ、より好ましくは少なくとも約８８％ポジティブ、より好ましくは少なくとも約８９％ポジティブ、より好ましくは少なくとも約９０％ポジティブ、より好ましくは少なくとも約９１％ポジティブ、より好ましくは少なくとも約９２％ポジティブ、より好ましくは少なくとも約９３％ポジティブ、より好ましくは少なくとも約９４％ポジティブ、より好ましくは少なくとも約９５％ポジティブ、より好ましくは少なくとも約９６％ポジティブ、より好ましくは少なくとも約９７％ポジティブ、より好ましくは少なくとも約９８％ポジティブ、そして、より好ましくは少なくとも約９９％ポジティブのスコアとされるアミノ酸配列を含む単離されたＰＲＯポリペプチドに関する。

【００５５】

特別な実施態様では、本発明は、Ｎ-末端シグナル配列及び／又は開始メチオニンを持たず、上記したようなアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列によってコードされる単離されたＰＲＯポリペプチドを提供する。それらを製造する方法もここに記載され、それらの方法は、適当なコード化核酸分子を含むベクターを含む宿主細胞をＰＲＯポリペプチドの発現に適した条件下で培養し、培養培地からＰＲＯポリペプチドを回収することを含む。

本発明の他の態様は、膜貫通ドメインの欠失した又は膜貫通ドメインが不活性化された

、単離されたＰＲＯポリペプチドを提供する。それらを製造する方法もここに記載され、それらの方法は、適当なコード化核酸分子を含むベクターを含む宿主細胞をＰＲＯポリペプチドの発現に適した条件下で培養し、培養培地からＰＲＯポリペプチドを回収することを含む。

さらに他の実施態様では、本発明は、ここで同定される天然ＰＲＯポリペプチドのアゴニスト及びアンタゴニストに関する。特別な実施態様では、アゴニスト又はアンタゴニストは抗-ＰＲＯ抗体又は小分子である。

さらなる実施態様では、本発明は、ＰＲＯポリペプチドのアゴニスト又はアンタゴニストを同定する方法に関し、それは、ＰＲＯポリペプチドを候補分子と接触させ、前記ＰＲＯポリペプチドによって媒介される生物学的活性を監視することを含む。好ましくは、ＰＲＯポリペプチドは天然ＰＲＯポリペプチドである。

【００５６】

またさらなる実施態様では、本発明は、ＰＲＯポリペプチド、又はここに記載するＰＲＯポリペプチドのアゴニスト又はアンタゴニスト、又は抗-ＰＲＯ抗体を、担体と組み合わせて含有する物質の組成物に関する。場合によっては、担体は製薬的に許容される担体である。

本発明の他の実施態様は、ＰＲＯポリペプチド、又は上記したようなそのアゴニスト又はアンタゴニスト、又は抗-ＰＲＯ抗体の、ＰＲＯポリペプチド、そのアゴニスト又はアンタゴニスト又は抗-ＰＲＯ抗体に起因する状態の治療において有用な医薬の調製のための使用に向けられる。

本発明のさらなる実施態様では、本発明は、ここに記載するポリペプチドの任意のものをコードするＤＮＡを含むベクターを提供する。そのようなベクターの任意のものを含む宿主細胞も提供される。例として、宿主細胞はＣＨＯ細胞、大腸菌、又はバキュウロウイルス感染昆虫細胞であってよい。ここに記載する任意のポリペプチドの製造方法がさらに提供され、それは、宿主細胞を所望のポリペプチドの発現に適した条件下で培養し、細胞培地から所望のポリペプチドを回収することを含む。

【００５７】

他の実施態様では、本発明は、異種ポリペプチド又はアミノ酸配列に融合した、ここに記載する任意のポリペプチドを含んでなるキメラ分子を提供する。そのようなキメラ分子の例は、エピトープタグ配列又は免疫グロブリンのＦｃ領域に融合したここに記載の任意のポリペプチドを含む。

他の実施態様では、本発明は、上記又は下記のポリペプチドの任意のものに特異的に結合する抗体を提供する。場合によっては、抗体はモノクローナル抗体、ヒト化抗体、抗体断片又は一本鎖抗体である。

さらに他の実施態様では、本発明は、ゲノム及びｃＤＮＡヌクレオチド配列又はアンチセンスプローブの単離に有用なオリゴヌクレオチドプローブを提供し、それらのプローブは上記又は下記のヌクレオチド配列の任意のものから誘導されうる。

（発明の詳細な説明）

【００５８】

１．　定義

「心臓血管、内皮及び血管形成疾患」、「心臓血管、内皮及び血管形成機能不全」、「心臓血管、内皮又は血管形成疾患」及び「心臓血管、内皮又は血管形成機能不全」という用語は相互交換可能に使用され、並びに血管、例えば動脈、毛細管、静脈、及び／又はリンパ管それ自体の病気の一部を称する。これには、血管形成及び／又は心臓血管新生を刺激する徴候、及び血管形成及び／又は心臓血管新生を阻害する徴候が含まれている。このような疾患には、例えば動脈の病気、例えばアテローム性動脈硬化、高血圧、炎症性脈管炎、レーノー病及びレーノー現象、動脈瘤、及び動脈再狭窄；静脈及びリンパ管の疾患、例えば血栓静脈炎、リンパ管炎、及びリンパ浮腫；及び他の血管疾患、例えば末梢血管病、癌、例えば血管腫瘍、例えば血管腫(毛細管及び海綿状)、グロムス腫瘍、毛細管拡張症、細菌性血管腫症、血管内皮腫、血管肉腫、血管外皮細胞腫、カポジ肉腫、リンパ管腫、

及びリンパ管肉腫、腫瘍血管形成、外傷、例えば傷、火傷、及び他に損傷を被った組織、移植固定、瘢痕化、虚血再潅流傷害、慢性関節リュウマチ、脳血管の病気、腎臓病、例えば急性腎不全、及び骨粗鬆症が含まれる。また、アンギナ、心筋梗塞、例えば急性心筋梗塞、心臓肥大、及び心不全、例えばＣＨＦも含まれる。

【００５９】

ここで使用される場合の「肥大」とは、腫瘍形成に関与しない正常な成長とは無関係に組織又は構造体の大きさが増加することとして定義される。器官又は組織の肥大は個々の細胞の大きさの増加(真性肥大)、又は組織を形成する細胞数の増加(過形成)、又はその両方のいずれかによる。ある種の器官、例えば心臓は誕生後、短い期間で分割能力を失う。従って、「心臓肥大」は心臓の大きさが増加するものとして定義され、成人においては、細胞分割が付随することなのない、収縮性タンパク質の含有量とミオサイトの細胞サイズの増加により特徴付けられる。肥大を刺激する原因となるストレスの特徴(例えば、プレロードの増加、アフターロードの増加、心筋梗塞の場合と同様のミオサイトの損失、収縮性の一次低下)が、反応の性質の決定において重要な役割を担っていることは明らかである。心臓肥大の初期段階は、通常、ミオフィブリルとミトコンドリアのサイズの増加、並びにミトコンドリアと核の拡大により形態学的に特徴付けられる。この段階において、筋細胞は正常なものよりもより大きくなり、細胞組織はかなり保存される。心臓肥大の段階がさらに進行すると、特定のオルガネラ、例えばミトコンドリアの数及びサイズが優先的に増加し、新規の収縮エレメントは不規則な方法で、細胞の局在領域に添加される。長年にわたって肥大を被っている細胞は、隣接するミオフィブリルを置換し、正常なＺ膜レジストレーションの破壊を引き起こす、高度に分葉された膜を有する、かなり拡大した核を含む、細胞組織体におけるより明らかな分裂を示す。「心臓肥大」という用語は、根底にある心疾患に関係なく、心筋の種々の度合いの構造的ダメージにより特徴付けられる病状の進行における全ての段階を含むように使用される。この故に、その用語は、心臓肥大の発達における生理学的病状、例えば血圧の上昇、大動脈狭窄、又は心筋梗塞も含まれる。

【００６０】

「心不全」は、心臓が代謝中の組織の要求が必要とする速さで血液を送らない心機能の異常を指す。心不全は虚血、先天的、リュウマチ性又は特発的形態を含む、種々の因子が原因となり得る。

「鬱血性心不全」(ＣＨＦ)は、末梢組織まで酸素化された血液を送達させるために、十分な心拍出量(経時的に心臓により押し出される血液量)を供給することのできない心臓の進行性の病状である。 ＣＨＦが進行すると、構造的及び血行力学的ダメージが生じる。これらのダメージは色々と現れ、一つの特徴的徴候は心室肥大である。ＣＨＦは多くの心疾患の共通した終末結果である。

【００６１】

「心筋梗塞」は、しばしば多重冠動脈血栓症を伴う、冠動脈のアテローム性動脈硬化に結果であると一般的にされている。それは、心室壁の全厚みにわたって心筋壊死がある壁内梗塞、及び心室壁を通って心外膜に至る全ての経路に伸長することなく、壊死が内皮下層、心筋壁内、又はその両方にある副心内膜(非壁内)梗塞２つのタイプに分けることができる。心筋梗塞は血行力学的影響の変化と心臓のダメージを受けた、及び健康な領域における構造の変化の両方に原因があることが知られている。よって、例えば心筋梗塞により心臓の最大流出量及び心臓鼓動容量が低減する。また、心筋梗塞に関連して、間隙に生じるＤＮＡ合成が刺激され、影響をう受けていない心臓領域におけるコラーゲンの形成が増加する。

【００６２】

長期間にわたる高血圧において、心臓のストレス及び圧力が増加する結果、例えば全末梢耐性が増加して、心臓肥大は長期間「高血圧」を付随するようになる。慢性的に圧力が加わる結果で肥大した心室の特徴は、心拡張の実行が損なわれることである。Fouad等, J. Am. Coll. Cardiol., 4：1500-1506(1984)；Smith等, J. Am. Coll. Cardiol., 5：869-874(1985)。長期間にわたる左心室の弛緩には、心収縮機能が正常又は通常ではないの

にかかわらず、早くに本能性高血圧がみられた。Hartford等,Hypertension, 6: 329-338(1984)。しかし、血圧レベルと心臓肥大との間は平行して近接していない。ヒトにおいて、抗高血圧治療に応じて左心室機能の改善は繰り返されるが、利尿薬(ヒドロクロロチアジド)、β-ブロッカー(プレパノロール)、又はカルシウムチャンネルブロッカー(ジルチアゼム)で治療している患者は、心拡張機能が改善されることなく左心室肥大への逆戻りがみられる。Inouye等, Am. J. Cardiol., 53：1583-7(1984)。

【００６３】

心臓肥大に関連した他の複合的心疾患は「肥大性心筋症」である。この病状は形態学的、機能的及び臨床的特性が非常に多様であること(Maron等, N. Engl. J. Med., 316：780-789(1987)；Spirito等, N. Engl. J. Med., 320：749-755(1989)；Louie及びEdwards, Prog. Cardiovasc. Dis., 36：275-308(1994)；Wigle等, Circulation, 92：1680-1692(1995))、全年齢の患者を悩ます事実により強調される異種性により特徴付けられる。Spirito等, N. Engl. J. Med., 336：775-785(1997)。また、肥大心筋症の原因となる要因は多様であり、ほとんど理解されていない。一般的に、サルコメアタンパク質をコードする遺伝子における変異が肥大性心筋症に関与している。近年のデータでは、β-ミオシン重鎖変異が、家族性肥大性心筋症の原因の約３０から４０パーセントであると計測されていることを示唆している。Watkins等, N. Engl. J. Med., 326：1108-1114(1992)；Schwartz等, Circulation, 91：532-540(1995)；Marian及びRoberts, Circulation, 92：1336-1347(1995)；Thierfelder等, Cell, 77：701-712(1994)；Watkins等, Nat. Gen., 11：434-437(1995)。β-ミオシン重鎖の他にも、他の位置の遺伝子変異に、心臓トロポニンＴ、アルファトポミオシン、心臓ミオシン結合プロテインＣ、必須ミオシン軽鎖、及び調節性ミオシン軽鎖が含まれる。Malik及びWatkins, Curr. Opin. Cardiol., 12：295-302(1997)を参照されたい。

【００６４】

上弁「大動脈狭窄」は、上行大動脈が狭くなることにより特徴付けられる遺伝性血管疾患であるが、肺動脈を含む他の動脈もさらに影響をうけるおそれがある。未治療の大動脈狭窄では、心内圧力が増加し、結果として心臓肥大が生じ、実際には心不全及び死に至る。この疾患の病因は十分には理解されていないが、中間平滑筋の過形成可能性及び肥大はこの疾患の顕著な特徴である。エラスチン遺伝子の分子変異体が大動脈狭窄の発現の病因に関与していることが、1997年7月22日公開の米国特許第5,650,282号に報告されている。

「心臓弁逆流」は心臓弁の疾患の結果による心臓病の結果として生じる。リュウマチ熱のような種々の病気は、弁オリフィスの収縮又は引っ張りを引き起こすものであるが、他の病気は、心内膜炎、心内膜又は心房オリフィスの内側の膜の炎症、及び心臓の手術になる。欠損、例えば弁狭窄又は弁の欠損近接により、心臓腔における血液の蓄積、又は弁を通過しての血液の逆流が生じる。弁狭窄又は不全を長期間治癒しないと、心臓肥大や心筋に関連したダメージを被る結果となり、最終的には弁の交換が必要となる。

これら全て、及び心臓肥大が付随してもしなくてもよい他の心臓血管、内皮及び血管形成疾患の治療が本発明に含まれる。

【００６５】

用語「癌」、「癌性」及び「悪性」は、典型的には調節されない細胞成長を特徴とする、哺乳動物における生理学的状態を指すか記述する。癌の例には、これらに限定されるものではないが、腺癌、リンパ腫、芽細胞腫、黒色腫、肉腫、及び白血病が含まれる。このような癌のより特定の例には、扁平上皮細胞癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、胃癌、ホジキン及び非ホジキンリンパ腫、膵臓癌、神経膠芽細胞腫、子宮頸癌、卵巣癌、肝臓癌、例えば肝癌(hepatic carcinoma)及び肝細胞腫(hepatoma)、膀胱癌、乳癌、大腸癌、結腸直腸癌、子宮体癌、唾液腺癌、腎細胞癌及びウィルムス腫瘍等の腎臓癌、基底細胞癌、黒色腫、前立腺癌、産卵口癌、甲状腺癌、精巣癌、食道癌、及び様々な種類の頭部及び頸部の癌が含まれる。ここでの治療に好適な癌は乳癌、大腸癌、肺癌、黒色腫、卵巣癌及び上述に記した血管腫瘍に係るものである。

【００６６】

ここで用いられる「細胞毒性薬」という用語は、細胞の機能を阻害又は阻止し及び／又は細胞破壊を生ずる物質を指す。この用語は、放射性同位体（例えば、^{131}Ｉ、^{125}Ｉ、^{90}Ｙ及び^{186}Ｒｅ）、化学治療薬、及び細菌、真菌、植物又は動物起源の酵素活性毒素等の毒素、又はそれらの断片を含むことを意図する。

「化学治療薬」は、癌の治療に有用な化学化合物である。化学治療薬の例には、アルキル化剤、葉酸アンタゴニスト、核酸代謝の代謝産物、抗生物質、ピリミジン類似物、５-フルオロウラシル、シスプラチン、プリンヌクレオシド、アミン類、アミノ酸、トリアゾールヌクレオシド、又はコルチコステロイド類が含まれる。特定の例には、アドリアマイシン、ドキソルビシン、５-フルオロウラシル、シトシンアラビノシド（「Ａｒａ-Ｃ」）、シクロホスファミド、チオテパ、ブスルファン、サイトキシン、タキソール、トキソテア、メトトレキセート、シスプラチン、メルファラン、ビンブラスチン、ブレオマイシン、エトポシド、イフォスファミド、マイトマイシンＣ、ミトキサントン、ビンクリスチン、ビノレルビン、カルボプラチン、テニポシド、ダウノマイシン、カルミノマイシン、アミノプテリン、ダクチノマイシン、マイトマイシン、エスペラマイシン（米国特許第4,675,187号参照）、メルファラン及び関連するナイトロジェンマスタードを含む。また、タモキシフェン及びオナプリストン等の腫瘍に対するホルモン作用を調節又は阻害するように機能するホルモン薬もこの定義に含まれる。

【００６７】

「成長阻害薬」は、ここで用いられる場合、インビトロ又はインビボで、細胞、例えばＷｎｔ-過剰発現癌細胞の成長を阻害する化合物又は組成物を称する。即ち、成長阻害薬は、Ｓ相における悪性細胞のパーセンテージをかなり低減させるものである。成長阻害薬の例は、細胞周期の進行を（Ｓ相以外の位置で）阻止する薬剤、例えば、Ｇ１停止及びＭ相停止を誘発する薬剤を含む。古典的なＭ相ブロッカーは、ビンカス（ビンクリスチン及びビンブラスチン）、タキソール、及びトポＩＩ阻害剤、例えばドキソルビシン、ダウノルビシン、エトポシド、及びブレオマイシンを含む。Ｇ１停止させるこれらの薬剤は、Ｓ相停止にも波及し、例えば、ＤＮＡアルキル化剤、例えばタモキシフェン、プレドニソン、ダカルバジン、メクロレタミン、シスプラチン、メトトレキセート、５-フルオロウラシル及びＡｒａ-Ｃである。さらなる情報は、The Molecular Basis of Cancer, Mendelsohn及びIsrael,編集, Chapter 1, Murakamiらによる表題「Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs」（WB Saunders: Philadelphia, 1995）、特に13頁に見出される。さらなる例には、腫瘍壊死因子(ＴＮＦ)、酸性又は塩基性ＦＧＦ又は肝実質細胞成長因子(ＨＧＦ)の血管形成活性を阻害又は中和可能な抗体、組織因子の凝固活性を阻害又は中和可能な抗体、プロテインＣ又はプロテインＳ(1991年2月21日に公開されたWO 91/01753を参照されたい)、又はＨＥＲ２レセプターに結合可能な抗体(WO89/06692)、例えば４Ｄ５抗体(及びそれらの機能的等価物)(例えばWO92/22653)が含まれる。

【００６８】

「治療」とは、心臓血管、内皮及び血管形成疾患の病的状態の進行又は改変の防止を意図して行われる。治療の概念は最も広い意味に使用され、任意の段階の心臓血管、内皮及び血管形成疾患の防止(予防)、緩和、低減、及び治癒を特に含む。従って、「治療」は治癒的処置、及び予防的又は防止的手段の両方を称し、患者は心臓血管、内皮及び血管形成疾患を防止又は遅延化させられる。治療が必要なものとは、既に疾患に罹っているもの、並びに疾患に罹りやすいもの又は疾患が防止されているものを含む。疾患は、特発症、心栄養性（cardiotrophic）、又は筋栄養性の原因、又は虚血又は虚血発作、例えば心筋梗塞を含む、任意の原因の結果によるものである。

「慢性」投与とは、急性様式とは異なり連続的な様式での薬剤を投与し、初期の治療効果、例えば抗肥大効果を長時間に渡って維持することを称する。

治療の目的のための「哺乳動物」は、ヒト、家庭及び農業用動物、動物園、スポーツ、又はペット動物、例えばイヌ、ウマ、ネコ、ウシ、ヒツジ、ブタなどを含む哺乳類に分類される任意の動物を称する。好ましくは、哺乳動物はヒトである。

一又は複数のさらなる治療薬と「組み合わせた」投与とは、同時（同時期）及び任意の

順序での連続した投与を含む。

【００６９】

「心臓血管、内皮及び血管形成薬」なる用語は、一般的に、心臓血管、内皮及び血管形成疾患の治療に作用する任意の薬剤を称する。心臓血管剤の例は、血圧、心拍数、心収縮、及び内皮及び平滑筋の生物学を調節する血管ホメオスタシスを促進するもので、全因子は心臓血管病における役割を有している。これらの特定の例には、アンギオテンシン-ＩＩレセプターアンタゴニスト：エンドセリンレセプターアンタゴニスト、例えばBOSENTAN^{TM}及びMOXONODIN^{TM}、インターフェロン-ガンマ(ＩＦＮ-γ)；デス-アスパラート-アンギオテンシンＩ：血栓溶解剤、例えばストレプトキナーゼ、ウロキナーゼ、ｔ-ＰＡ、及び半減期がより長く、非常に高いフィブリン特異性を有するように設計されたｔ-ＰＡ変異体、ＴＮＫ-ｔ-ＰＡ(Ｔ１０３Ｎ、Ｎ１１７Ｑ、ＫＨＲＲ(296-299)ＡＡＡＡｔ-ＰＡ変異体，Keyt等，Proc. Natl. Acad. Sci. USA，91：3670-3674(1994))：強心薬又は昇圧薬、例えばジゴキシゲニン、及びβ-アドレナリン様レセプターブロック剤、例えばプロプラノロール、チモロール、タータロロール、カルテオロール、ナドロール、ベタキソロール、ペンブトロール、アセトブトロール、アテノロール、メトプロロール、及びカーベジルロール：アンギオテンシン転換酵素(ＡＣＥ)インヒビター、例えばクイナピリル、カプトプリル、エナラプリル、ラミプリル、ベナゼプリル、フォシノプリル及びリシノプリル；ジウレティクス、例えばクロロチアザイド、ヒドロクロロチアザイド、ヒドロフルメタザイド、メチルクロチアザイド、ベンズチアザイド、ジクロロフェナミド、アセタゾラミド、及びインダパミド；及びカルシウムチャンネルブロッカー、例えばジルチアゼム、ニフェジピン、ベラパミル及びニカルジピンが含まれる。この種の好ましい一カテゴリーは、心臓肥大、又は心臓肥大の進行におけつ生理学的状態、例えば血圧の上昇、大動脈狭窄又は心筋梗塞の治療に使用される治療薬である。

【００７０】

「血管形成薬」及び「内皮薬」は、血管形成及び／又は内皮細胞の成長、又は適切であるならば血管形成を促進する活性剤である。これには、傷の治癒を促進する因子、例えば成長ホルモン、インシュリン様成長因子-Ｉ(ＩＧＦ-Ｉ)、ＶＥＧＦ、ＶＩＧＦ、ＰＤＧＦ、表皮成長因子(ＥＧＦ)、ＣＴＧＦ及びそのファミリーのメンバー、ＦＧＦ、及びＴＧＦ-α及びＴＧＦ-βが含まれる。

「アンギオスタチック薬」は血管形成又は管形成を阻害、又は癌細胞の成長を阻害又は防止する活性剤である。例には、上述した血管形成剤の抗体又は他のアンタゴニスト、例えばＶＥＧＦに対する抗体が含まれる。さらに、細胞治療薬、例えば細胞毒性薬、化学治療薬、成長阻害、アポトーシス薬、及び癌を治療する他の薬剤、例えば抗-ＨＥＲ-２、抗-ＣＤ２０、及び生物活性及び有機化学薬が含まれる。

【００７１】

本発明における薬理学的意味で、活性剤、例えばＰＲＯポリペプチド、又はそれらのアゴニスト又はアンタゴニスト、又は抗-ＰＲＯ抗体の「治療的有効量」とは、哺乳動物の心臓血管、内皮及び血管形成疾患の治療に有効な量を称するものであり、経験的に決定することができる。

ここで使用される場合、活性剤、例えばＰＲＯポリペプチド、又はそれらのアゴニスト又はアンタゴニスト、又は抗-ＰＲＯ抗体の「有効量」とは記載した目的の実行に有効な量を称するものであり、このような量は、所望する効果に応じて経験的に決定することができる。

【００７２】

ここで用いられる用語「ＰＲＯポリペプチド」及び「ＰＲＯ」は、直後に数値符号がある場合に種々のポリペプチドを指し、完全な符号（例えば、ＰＲＯ／数字）は、ここに記載する特定のポリペプチド配列を意味する。ここで使用される「ＰＲＯ／数字ポリペプチド」及び「ＰＲＯ／数字」であって、「数字」がここで使用される実際の数値符号として与えられる用語は、天然配列ポリペプチド及び変異体（ここで更に詳細に定義する）を含む。ここに記載されるＰＲＯポリペプチドは、ヒト組織型又は他の供給源といった種々の

供給源から単離してもよく、組換え又は合成方法によって調製してもよい。
「天然配列ＰＲＯポリペプチド」は、天然由来の対応するＰＲＯポリペプチドと同一のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含んでいる。このような天然配列ＰＲＯポリペプチドは、自然から単離することもできるし、組換え又は合成手段により生産することもできる。「天然配列ＰＲＯポリペプチド」という用語には、特に、特定のＰＲＯポリペプチドの自然に生じる切断又は分泌形態(例えば、細胞外ドメイン配列)、自然に生じる変異形態(例えば、選択的にスプライシングされた形態)及びそのポリペプチドの自然に生じる対立遺伝子変異体が含まれる。本発明の種々の実施態様において、ここに開示される天然配列ＰＲＯポリペプチドは、添付の図面に示される全長アミノ酸配列を含む成熟又は全長天然配列ポリペプチドである。開始及び停止コドンは、図において太字及び下線で示した。しかし、添付の図面に開示したＰＲＯポリペプチドは、図面におけるアミノ酸１としてここに命名されるメチオニン残基で始まるように示されているが、図面におけるアミノ酸位置１の上流又は下流に位置する他のメチオニン残基をＰＲＯポリペプチドの開始アミノ酸残基として用いることも考えられるし可能でもある。

【００７３】
ＰＲＯポリペプチド「細胞外ドメイン」又は「ＥＣＤ」は、膜貫通及び細胞質ドメインを実質的に有しないＰＲＯポリペプチドの形態を意味する。通常、ＰＲＯポリペプチドＥＣＤは、それらの膜貫通及び／又は細胞質ドメインを１％未満、好ましくはそのようなドメインを０．５％未満しか持たない。本発明のＰＲＯポリペプチドについて同定された任意の膜貫通ドメインは、疎水性ドメインのその型を同定するために当該分野において日常的に使用される基準に従い同定されることが理解されるであろう。膜貫通ドメインの厳密な境界は変わり得るが、最初に同定されたドメインのいずれかの末端から約５アミノ酸を越えない可能性が高い。従って、ＰＲＯポリペプチド細胞外ドメインは、場合によっては、実施例又は明細書で同定されるように膜貫通ドメイン及び／又は細胞外ドメインの境界のいずれかの側から約５を越えないアミノ酸を含んでもよく、シグナルペプチドを伴う又は伴わない、それらのポリペプチド及びそれらをコードする核酸は、本発明で考慮される。

【００７４】
ここに開示する種々のＰＲＯポリペプチドの「シグナルペプチド」の適切な位置は、添付の図面に示す。しかし、注記するように、シグナルペプチドのＣ-末端境界は変化しうるが、ここで最初に定義したようにシグナルペプチドＣ-末端境界のいずれかの側で約５アミノ酸未満である可能性が最も高く、シグナルペプチドのＣ-末端境界は、そのような型のアミノ酸配列成分を同定するのに日常的に使用される基準に従って同定しうる（例えば、Nielsen等, Prot. Eng. 10: 1-6 (1997)及びvon Heinje等, Nucl. Acids. Res. 14: 4683-4690 (1986)）。さらに、幾つかの場合には、分泌ポリペプチドからのシグナルペプチドの切断は完全に均一ではなく、一以上の分泌種をもたらすことも認められる。シグナルペプチドがここに定義されるシグナルペプチドのＣ-末端境界の何れかの側の約５アミノ酸未満内で切断されるこれらの成熟ポリペプチド、及びそれらをコードするポリヌクレオチドは、本発明で考慮される。

【００７５】
「ＰＲＯポリペプチド変異体」とは、上記又は下記に定義されるように、ここに開示される全長天然配列ＰＲＯポリペプチド、ここに開示されたシグナルペプチドを欠く全長天然配列ＰＲＯポリペプチド配列、シグナルペプチド有無のここに開示されたＰＲＯの細胞外ドメイン又はここに開示された全長ＰＲＯポリペプチドの他の断片と、少なくとも約８０％のアミノ酸配列同一性を有する活性ＰＲＯポリペプチドを意味する。このようなＰＲＯポリペプチド変異体には、例えば、全長天然アミノ酸配列のＮ-又はＣ-末端において一又は複数のアミノ酸残基が付加、もしくは欠失されたＰＲＯポリペプチドが含まれる。通常、ＰＲＯポリペプチド変異体は、ここに開示される全長天然アミノ酸配列、ここに開示されたシグナルペプチドを欠く全長天然配列ＰＲＯポリペプチド配列、シグナルペプチド有無のここに開示されたＰＲＯの細胞外ドメイン又はここに開示された全長ＰＲＯポリペ

プチドの他の断片と、少なくとも約８０％のアミノ酸配列同一性、好ましくは少なくとも約８１％のアミノ酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約８２％のアミノ酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約８３％のアミノ酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約８４％のアミノ酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約８５％のアミノ酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約８６％のアミノ酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約８７％のアミノ酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約８８％のアミノ酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約８９％のアミノ酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約９０％のアミノ酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約９１％のアミノ酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約９２％のアミノ酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約９３％のアミノ酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約９４％のアミノ酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約９５％のアミノ酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約９６％のアミノ酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約９７％のアミノ酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約９８％のアミノ酸配列同一性、そして、より好ましくは少なくとも約９９％のアミノ酸配列同一性を有している。通常は、ＰＲＯ変異体ポリペプチドは、少なくとも約１０アミノ酸長、より多くは少なくとも約２０アミノ酸長、より多くは少なくとも約３０アミノ酸長、より多くは少なくとも約４０アミノ酸長、より多くは少なくとも約５０アミノ酸長、より多くは少なくとも約６０アミノ酸長、より多くは少なくとも約７０アミノ酸長、より多くは少なくとも約８０アミノ酸長、より多くは少なくとも約９０アミノ酸長、より多くは少なくとも約１００アミノ酸長、より多くは少なくとも約１５０アミノ酸長、より多くは少なくとも約２００アミノ酸長、より多くは少なくとも約３００アミノ酸長、又はそれ以上である。

【００７６】

以下に示すように、表１はALIGN-2配列比較コンピュータプログラムの安全なソースコードを与える。このソースコードは、UNIXオペレーティングシステムでの使用のために日常的にコンパイルされ、ALIGN-2配列比較コンピュータプログラムを与える。

さらに、表２Ａ-２Ｄは、ALIGN-2配列比較コンピュータプログラムを用いた％アミノ酸配列同一性（表２Ａ-２Ｂ）及び％核酸配列同一性（表２Ｃ-２Ｄ）を決定するために下記の方法を使用する仮説的な例を示し、「ＰＲＯ」は対象とする仮説的ＰＲＯポリペプチドのアミノ酸配列を示し、「比較タンパク質」は対象とする「ＰＲＯ」ポリペプチドが比較されるポリペプチドのアミノ酸配列を示し、「ＰＲＯ-ＤＮＡ」は対象とする仮説的ＰＲＯ-コード化核酸配列を示し、「比較ＤＮＡ」は対象とする「ＰＲＯ-ＤＮＡ」核酸分子が比較される核酸分子のヌクレオチド配列を示し、「Ｘ」、「Ｙ」及び「Ｚ」は各々異なる仮説的アミノ酸残基を示し、「Ｎ」、「Ｌ」及び「Ｖ」は各々異なる仮説的ヌクレオチドを示す。

【００７７】

表 1

```
/*
 *
 * C-C increased from 12 to 15
 * Z is average of EQ
 * B is average of ND
 * match with stop is _M; stop-stop = 0; J (joker) match = 0
 */
#define    _M          -8          /* value of a match with a stop */

int        _day[26][26] = {
/*     A  B  C  D  E  F  G  H  I  J  K  L  M  N  O  P  Q  R  S  T  U  V  W  X  Y  Z */
/* A */    { 2, 0,-2, 0, 0,-4, 1,-1,-1, 0,-1,-2,-1, 0,_M, 1, 0,-2, 1, 1, 0, 0,-6, 0,-3, 0},
/* B */    { 0, 3,-4, 3, 2,-5, 0, 1,-2, 0, 0,-3,-2, 2,_M,-1, 1, 0, 0, 0, 0,-2,-5, 0,-3, 1},
/* C */    {-2,-4,15,-5,-5,-4,-3,-3,-2, 0,-5,-6,-5,-4,_M,-3,-5,-4, 0,-2, 0,-2,-8, 0, 0,-5},
/* D */    { 0, 3,-5, 4, 3,-6, 1, 1,-2, 0, 0,-4,-3, 2,_M,-1, 2,-1, 0, 0, 0,-2,-7, 0,-4, 2},
/* E */    { 0, 2,-5, 3, 4,-5, 0, 1,-2, 0, 0,-3,-2, 1,_M,-1, 2,-1, 0, 0, 0,-2,-7, 0,-4, 3},
/* F */    {-4,-5,-4,-6,-5, 9,-5,-2, 1, 0,-5, 2, 0,-4,_M,-5,-5,-4,-3,-3, 0,-1, 0, 0, 7,-5},
/* G */    { 1, 0,-3, 1, 0,-5, 5,-2,-3, 0,-2,-4,-3, 0,_M,-1,-1,-3, 1, 0, 0,-1,-7, 0,-5, 0},
/* H */    {-1, 1,-3, 1, 1,-2,-2, 6,-2, 0, 0,-2,-2, 2,_M, 0, 3, 2,-1,-1, 0,-2,-3, 0, 0, 2},
/* I */    {-1,-2,-2,-2,-2, 1,-3,-2, 5, 0,-2, 2, 2,-2,_M,-2,-2,-2,-1, 0, 0, 4,-5, 0,-1,-2},
/* J */    { 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0,_M, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0},
/* K */    {-1, 0,-5, 0, 0,-5,-2, 0,-2, 0, 5,-3, 0, 1,_M,-1, 1, 3, 0, 0, 0,-2,-3, 0,-4, 0},
/* L */    {-2,-3,-6,-4,-3, 2,-4,-2, 2, 0,-3, 6, 4,-3,_M,-3,-2,-3,-3,-1, 0, 2,-2, 0,-1,-2},
/* M */    {-1,-2,-5,-3,-2, 0,-3,-2, 2, 0, 0, 4, 6,-2,_M,-2,-1, 0,-2,-1, 0, 2,-4, 0,-2,-1},
/* N */    { 0, 2,-4, 2, 1,-4, 0, 2,-2, 0, 1,-3,-2, 2,_M,-1, 1, 0, 1, 0, 0,-2,-4, 0,-2, 1},
/* O */    {_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M, 0,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M},
/* P */    { 1,-1,-3,-1,-1,-5,-1, 0,-2, 0,-1,-3,-2,-1,_M, 6, 0, 0, 1, 0, 0,-1,-6, 0,-5, 0},
/* Q */    { 0, 1,-5, 2, 2,-5,-1, 3,-2, 0, 1,-2,-1, 1,_M, 0, 4, 1,-1,-1, 0,-2,-5, 0,-4, 3},
/* R */    {-2, 0,-4,-1,-1,-4,-3, 2,-2, 0, 3,-3, 0, 0,_M, 0, 1, 6, 0,-1, 0,-2, 2, 0,-4, 0},
/* S */    { 1, 0, 0, 0, 0,-3, 1,-1,-1, 0, 0,-3,-2, 1,_M, 1,-1, 0, 2, 1, 0,-1,-2, 0,-3, 0},
/* T */    { 1, 0,-2, 0, 0,-3, 0,-1, 0, 0, 0,-1,-1, 0,_M, 0,-1,-1, 1, 3, 0, 0,-5, 0,-3, 0},
/* U */    { 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0,_M, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0},
/* V */    { 0,-2,-2,-2,-2,-1,-1,-2, 4, 0,-2, 2, 2,-2,_M,-1,-2,-2,-1, 0, 0, 4,-6, 0,-2,-2},
/* W */    {-6,-5,-8,-7,-7, 0,-7,-3,-5, 0,-3,-2,-4,-4,_M,-6,-5, 2,-2,-5, 0,-6,17, 0, 0,-6},
/* X */    { 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0,_M, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0},
/* Y */    {-3,-3, 0,-4,-4, 7,-5, 0,-1, 0,-4,-1,-2,-2,_M,-5,-4,-4,-3,-3, 0,-2, 0, 0,10,-4},
/* Z */    { 0, 1,-5, 2, 3,-5, 0, 2,-2, 0, 0,-2,-1, 1,_M, 0, 3, 0, 0, 0, 0,-2,-6, 0,-4, 4}
 };
                                                                                    Page 1 of day.h
```

【００７８】

```
/*
 */
#include <stdio.h>
#include <ctype.h>

#define    MAXJMP 16          /* max jumps in a diag */
#define    MAXGAP 24          /* don't continue to penalize gaps larger than this */
#define    JMPS               1024    /* max jmps in an path */
#define    MX                 4       /* save if there's at least MX-1 bases since last jmp */

#define    DMAT               3       /* value of matching bases */
#define    DMIS               0       /* penalty for mismatched bases */
#define    DINS0              8       /* penalty for a gap */
#define    DINS1              1       /* penalty per base */
#define    PINS0              8       /* penalty for a gap */
#define    PINS1              4       /* penalty per residue */

struct jmp {
        short              n[MAXJMP];      /* size of jmp (neg for dely) */
        unsigned short     x[MAXJMP];      /* base no. of jmp in seq x */
};                                         /* limits seq to 2^16 -1 */

struct diag {
        int                score;          /* score at last jmp */
        long               offset;         /* offset of prev block */
        short              ijmp;           /* current jmp index */
        struct jmp jp;             /* list of jmps */
};

struct path {
        int        spc;            /* number of leading spaces */
        short      n[JMPS];  /* size of jmp (gap) */
        int        x[JMPS];  /* loc of jmp (last elem before gap) */
};

char            *ofile;                    /* output file name */
char            *namex[2];                 /* seq names: getseqs() */
char            *prog;                     /* prog name for err msgs */
char            *seqx[2];                  /* seqs: getseqs() */
int             dmax;                      /* best diag: nw() */
int             dmax0;                     /* final diag */
int             dna;                       /* set if dna: main() */
int             endgaps;                   /* set if penalizing end gaps */
int             gapx, gapy;                /* total gaps in seqs */
int             len0, len1;        /* seq lens */
int             ngapx, ngapy;              /* total size of gaps */
int             smax;                      /* max score: nw() */
int             *xbm;                      /* bitmap for matching */
long            offset;                    /* current offset in jmp file */
struct  diag    *dx;                       /* holds diagonals */
struct  path    pp[2];                     /* holds path for seqs */

char            *calloc(), *malloc(), *index(), *strcpy();
char            *getseq(), *g_calloc();
```

```
/* Needleman-Wunsch alignment program
 *
 * usage: progs file1 file2
 *   where file1 and file2 are two dna or two protein sequences.
 *   The sequences can be in upper- or lower-case an may contain ambiguity
 *   Any lines beginning with ';', '>' or '<' are ignored
 *   Max file length is 65535 (limited by unsigned short x in the jmp struct)
 *   A sequence with 1/3 or more of its elements ACGTU is assumed to be DNA
 *   Output is in the file "align.out"
 *
 * The program may create a tmp file in /tmp to hold info about traceback.
 * Original version developed under BSD 4.3 on a vax 8650
 */
#include "nw.h"
#include "day.h"

static  _dbval[26] = {
        1,14,2,13,0,0,4,11,0,0,12,0,3,15,0,0,0,5,6,8,8,7,9,0,10,0
};

static  _pbval[26] = {
        1, 2|(1<<('D'-'A'))|(1<<('N'-'A')), 4, 8, 16, 32, 64,
        128, 256, 0xFFFFFFF, 1<<10, 1<<11, 1<<12, 1<<13, 1<<14,
        1<<15, 1<<16, 1<<17, 1<<18, 1<<19, 1<<20, 1<<21, 1<<22,
        1<<23, 1<<24, 1<<25|(1<<('E'-'A'))|(1<<('Q'-'A'))
};

main(ac, av)                                                    main
        int     ac;
        char    *av[];
{
        prog = av[0];
        if (ac != 3) {
                fprintf(stderr,"usage: %s file1 file2\n", prog);
                fprintf(stderr,"where file1 and file2 are two dna or two protein sequences.\n");
                fprintf(stderr,"The sequences can be in upper- or lower-case\n");
                fprintf(stderr,"Any lines beginning with ';' or '<' are ignored\n");
                fprintf(stderr,"Output is in the file \"align.out\"\n");
                exit(1);
        }
        namex[0] = av[1];
        namex[1] = av[2];
        seqx[0] = getseq(namex[0], &len0);
        seqx[1] = getseq(namex[1], &len1);
        xbm = (dna)? _dbval : _pbval;

        endgaps = 0;                            /* 1 to penalize endgaps */
        ofile = "align.out";            /* output file */

        nw();                   /* fill in the matrix, get the possible jmps */
        readjmps();             /* get the actual jmps */
        print();                /* print stats, alignment */

        cleanup(0);             /* unlink any tmp files */
}
                                                                Page 1 of nw.c
```

【００８０】

```
/* do the alignment, return best score: main()
 * dna: values in Fitch and Smith, PNAS, 80, 1382-1386, 1983
 * pro: PAM 250 values
 * When scores are equal, we prefer mismatches to any gap, prefer
 * a new gap to extending an ongoing gap, and prefer a gap in seqx
 * to a gap in seq y.
 */
nw()                                                                    nw
{
        char            *px, *py;       /* seqs and ptrs */
        int             *ndely, *dely;  /* keep track of dely */
        int             ndelx, delx;    /* keep track of delx */
        int             *tmp;           /* for swapping row0, row1 */
        int             mis;            /* score for each type */
        int             ins0, ins1; /* insertion penalties */
        register        id;             /* diagonal index */
        register        ij;             /* jmp index */
        register        *col0, *col1;   /* score for curr, last row */
        register        xx, yy;         /* index into seqs */

        dx = (struct diag *)g_calloc("to get diags", len0+len1+1, sizeof(struct diag));

        ndely = (int *)g_calloc("to get ndely", len1+1, sizeof(int));
        dely = (int *)g_calloc("to get dely", len1+1, sizeof(int));
        col0 = (int *)g_calloc("to get col0", len1+1, sizeof(int));
        col1 = (int *)g_calloc("to get col1", len1+1, sizeof(int));
        ins0 = (dna)? DINS0 : PINS0;
        ins1 = (dna)? DINS1 : PINS1;

        smax = -10000;
        if (endgaps) {
                for (col0[0] = dely[0] = -ins0, yy = 1; yy <= len1; yy++) {
                        col0[yy] = dely[yy] = col0[yy-1] - ins1;
                        ndely[yy] = yy;
                }
                col0[0] = 0;            /* Waterman Bull Math Biol 84 */
        }
        else
                for (yy = 1; yy <= len1; yy++)
                        dely[yy] = -ins0;

        /* fill in match matrix
         */
        for (px = seqx[0], xx = 1; xx <= len0; px++, xx++) {
                /* initialize first entry in col
                 */
                if (endgaps) {
                        if (xx == 1)
                                col1[0] = delx = -(ins0+ins1);
                        else
                                col1[0] = delx = col0[0] - ins1;
                        ndelx = xx;
                }
                else {
                        col1[0] = 0;
                        delx = -ins0;
                        ndelx = 0;
                }                                               Page 2 of nw.c
```

【００８１】

...nw

```
for (py = seqx[1], yy = 1; yy <= len1; py++, yy++) {
        mis = col0[yy-1];
        if (dna)
                mis += (xbm[*px-'A']&xbm[*py-'A'])? DMAT : DMIS;
        else
                mis += _day[*px-'A'][*py-'A'];

        /* update penalty for del in x seq;
         * favor new del over ongong del
         * ignore MAXGAP if weighting endgaps
         */
        if (endgaps || ndely[yy] < MAXGAP) {
                if (col0[yy] - ins0 >= dely[yy]) {
                        dely[yy] = col0[yy] - (ins0+ins1);
                        ndely[yy] = 1;
                } else {
                        dely[yy] -= ins1;
                        ndely[yy]++;
                }
        } else {
                if (col0[yy] - (ins0+ins1) >= dely[yy]) {
                        dely[yy] = col0[yy] - (ins0+ins1);
                        ndely[yy] = 1;
                } else
                        ndely[yy]++;
        }

        /* update penalty for del in y seq;
         * favor new del over ongong del
         */
        if (endgaps || ndelx < MAXGAP) {
                if (col1[yy-1] - ins0 >= delx) {
                        delx = col1[yy-1] - (ins0+ins1);
                        ndelx = 1;
                } else {
                        delx -= ins1;
                        ndelx++;
                }
        } else {
                if (col1[yy-1] - (ins0+ins1) >= delx) {
                        delx = col1[yy-1] - (ins0+ins1);
                        ndelx = 1;
                } else
                        ndelx++;
        }

        /* pick the maximum score; we're favoring
         * mis over any del and delx over dely
         */
```


【００８２】

...nw

```
                id = xx - yy + len1 - 1;
                if (mis >= delx && mis >= dely[yy])
                        col1[yy] = mis;
                else if (delx >= dely[yy]) {
                        col1[yy] = delx;
                        ij = dx[id].ijmp;
                        if (dx[id].jp.n[0] && (!dna || (ndelx >= MAXJMP
                        && xx > dx[id].jp.x[ij]+MX) || mis > dx[id].score+DINS0)) {
                                dx[id].ijmp++;
                                if (++ij >= MAXJMP) {
                                        writejmps(id);
                                        ij = dx[id].ijmp = 0;
                                        dx[id].offset = offset;
                                        offset += sizeof(struct jmp) + sizeof(offset);
                                }
                        }
                        dx[id].jp.n[ij] = ndelx;
                        dx[id].jp.x[ij] = xx;
                        dx[id].score = delx;
                }
                else {
                        col1[yy] = dely[yy];
                        ij = dx[id].ijmp;
if (dx[id].jp.n[0] && (!dna || (ndely[yy] >= MAXJMP
                        && xx > dx[id].jp.x[ij]+MX) || mis > dx[id].score+DINS0)) {
                                dx[id].ijmp++;
                                if (++ij >= MAXJMP) {
                                        writejmps(id);
                                        ij = dx[id].ijmp = 0;
                                        dx[id].offset = offset;
                                        offset += sizeof(struct jmp) + sizeof(offset);
                                }
                        }
                        dx[id].jp.n[ij] = -ndely[yy];
                        dx[id].jp.x[ij] = xx;
                        dx[id].score = dely[yy];
                }
                if (xx == len0 && yy < len1) {
                        /* last col
                         */
                        if (endgaps)
                                col1[yy] -= ins0+ins1*(len1-yy);
                        if (col1[yy] > smax) {
                                smax = col1[yy];
                                dmax = id;
                        }
                }
        }
        if (endgaps && xx < len0)
                col1[yy-1] -= ins0+ins1*(len0-xx);
        if (col1[yy-1] > smax) {
                smax = col1[yy-1];
                dmax = id;
        }
        tmp = col0; col0 = col1; col1 = tmp;
}
(void) free((char *)ndely);
(void) free((char *)dely);
(void) free((char *)col0);
(void) free((char *)col1); }
```

Page 4 of nw.c

【００８３】

```
/*
 *
 * print() -- only routine visible outside this module
 *
 * static:
 * getmat() -- trace back best path, count matches: print()
 * pr_align() -- print alignment of described in array p[]: print()
 * dumpblock() -- dump a block of lines with numbers, stars: pr_align()
 * nums() -- put out a number line: dumpblock()
 * putline() -- put out a line (name, [num], seq, [num]): dumpblock()
 * stars() - -put a line of stars: dumpblock()
 * stripname() -- strip any path and prefix from a seqname
 */

#include "nw.h"

#define SPC             3
#define P_LINE          256     /* maximum output line */
#define P_SPC           3       /* space between name or num and seq */

extern  _day[26][26];
int     olen;                   /* set output line length */
FILE    *fx;                    /* output file */

print()                                                         print
{
        int     lx, ly, firstgap, lastgap;              /* overlap */

        if ((fx = fopen(ofile, "w")) == 0) {
                fprintf(stderr,"%s: can't write %s\n", prog, ofile);
                cleanup(1);
        }
        fprintf(fx, "<first sequence: %s (length = %d)\n", namex[0], len0);
        fprintf(fx, "<second sequence: %s (length = %d)\n", namex[1], len1);
        olen = 60;
        lx = len0;
        ly = len1;
        firstgap = lastgap = 0;
        if (dmax < len1 - 1) { /* leading gap in x */
                pp[0].spc = firstgap = len1 - dmax - 1;
                ly -= pp[0].spc;
        }
        else if (dmax > len1 - 1) {             /* leading gap in y */
                pp[1].spc = firstgap = dmax - (len1 - 1);
                lx -= pp[1].spc;
        }
        if (dmax0 < len0 - 1) {                 /* trailing gap in x */
                lastgap = len0 - dmax0 -1;
                lx -= lastgap;
        }
        else if (dmax0 > len0 - 1) {            /* trailing gap in y */
                lastgap = dmax0 - (len0 - 1);
                ly -= lastgap;
        }
        getmat(lx, ly, firstgap, lastgap);
        pr_align();
}
```


【００８４】

```
/*
 * trace back the best path, count matches
 */
static
getmat(lx, ly, firstgap, lastgap)                                    getmat
        int     lx, ly;                         /* "core" (minus endgaps) */
        int     firstgap, lastgap;              /* leading trailing overlap */
{
        int             nm, i0, i1, siz0, siz1;
        char            outx[32];
        double          pct;
        register        n0, n1;
        register char   *p0, *p1;

        /* get total matches, score
         */
        i0 = i1 = siz0 = siz1 = 0;
        p0 = seqx[0] + pp[1].spc;
        p1 = seqx[1] + pp[0].spc;
        n0 = pp[1].spc + 1;
        n1 = pp[0].spc + 1;

        nm = 0;
        while ( *p0 && *p1 ) {
                if (siz0) {
                        p1++;
                        n1++;
                        siz0--;
                }
                else if (siz1) {
                        p0++;
                        n0++;
                        siz1--;
                }
                else {
                        if (xbm[*p0-'A']&xbm[*p1-'A'])
                                nm++;
                        if (n0++ == pp[0].x[i0])
                                siz0 = pp[0].n[i0++];
                        if (n1++ == pp[1].x[i1])
                                siz1 = pp[1].n[i1++];
                        p0++;
                        p1++;
                }
        }

        /* pct homology:
         * if penalizing endgaps, base is the shorter seq
         * else, knock off overhangs and take shorter core
         */
        if (endgaps)
                lx = (len0 < len1)? len0 : len1;
        else
                lx = (lx < ly)? lx : ly;
        pct = 100.*(double)nm/(double)lx;
        fprintf(fx, "\n");
        fprintf(fx, "<%d match%s in an overlap of %d: %.2f percent similarity\n",
                nm, (nm == 1)? "" : "es", lx, pct);
```


【００８５】

```
                                                                    ...getmat
        fprintf(fx, "<gaps in first sequence: %d", gapx);
        if (gapx) {
                (void) sprintf(outx, " (%d %s%s)",
                        ngapx, (dna)? "base":"residue", (ngapx == 1)? "":"s");
                fprintf(fx,"%s", outx);

        fprintf(fx, ", gaps in second sequence: %d", gapy);
        if (gapy) {
                (void) sprintf(outx, " (%d %s%s)",
                        ngapy, (dna)? "base":"residue", (ngapy == 1)? "":"s");
                fprintf(fx,"%s", outx);
        }
        if (dna)
                fprintf(fx,
                "\n<score: %d (match = %d, mismatch = %d, gap penalty = %d + %d per base)\n",
                smax, DMAT, DMIS, DINS0, DINS1);
        else
                fprintf(fx,
                "\n<score: %d (Dayhoff PAM 250 matrix, gap penalty = %d + %d per residue)\n",
                smax, PINS0, PINS1);
        if (endgaps)
                fprintf(fx,
                "<endgaps penalized. left endgap: %d %s%s, right endgap: %d %s%s\n",
                firstgap, (dna)? "base" : "residue", (firstgap == 1)? "" : "s",
                lastgap, (dna)? "base" : "residue", (lastgap == 1)? "" : "s");
        else
                fprintf(fx, "<endgaps not penalized\n");
}

static          nm;             /* matches in core -- for checking */
static          lmax;           /* lengths of stripped file names */
static          ij[2];          /* jmp index for a path */
static          nc[2];          /* number at start of current line */
static          ni[2];          /* current elem number -- for gapping */
static          siz[2];
static char     *ps[2];         /* ptr to current element */
static char     *po[2];         /* ptr to next output char slot */
static char     out[2][P_LINE]; /* output line */
static char     star[P_LINE];   /* set by stars() */

/*
 * print alignment of described in struct path pp[]
 */
static
pr_align()                                                          pr_align
{
        int             nn;     /* char count */
        int             more;
        register        i;

        for (i =  0, lmax = 0; i < 2; i++) {
                nn = stripname(namex[i]);
                if (nn > lmax)
                        lmax = nn;

                nc[i] = 1;
                ni[i] = 1;
                siz[i] = ij[i] = 0;
                ps[i] = seqx[i];
                po[i] = out[i];
                }
```


【００８６】

```
        for (nn = nm = 0, more = 1; more; ) {                    ...pr_align
                for (i = more = 0; i < 2; i++) {
                        /*
                         * do we have more of this sequence?
                         */
                        if (!*ps[i])
                                continue;

                        more++;

                        if (pp[i].spc) {        /* leading space */
                                *po[i]++ = ' ';
                                pp[i].spc--;
                        }
                        else if (siz[i]) {      /* in a gap */
                                *po[i]++ = '-';
                                siz[i]--;
                        }
                        else {                  /* we're putting a seq element
                                                 */
                                *po[i] = *ps[i];
                                if (islower(*ps[i]))
                                        *ps[i] = toupper(*ps[i]);
                                po[i]++;
                                ps[i]++;

                                /*
                                 * are we at next gap for this seq?
                                 */
                                if (ni[i] == pp[i].x[ij[i]]) {
                                        /*
                                         * we need to merge all gaps
                                         * at this location
                                         */
                                        siz[i] = pp[i].n[ij[i]++];
                                        while (ni[i] == pp[i].x[ij[i]])
                                                siz[i] += pp[i].n[ij[i]++];
                                }
                                ni[i]++;
                        }
                }
                if (++nn == olen || !more && nn) {
                        dumpblock();
                        for (i = 0; i < 2; i++)
                                po[i] = out[i];
                        nn = 0;
                }
        }
}

/*
 * dump a block of lines, including numbers, stars: pr_align()
 */
static
dumpblock()                                                      dumpblock
{
        register    i;

        for (i = 0; i < 2; i++)
                *po[i]-- = '\0';
                                                        Page 4 of nwprint.c
```

【００８７】

...dumpblock

```
        (void) putc('\n', fx);
        for (i = 0; i < 2; i++) {
                if (*out[i] && (*out[i] != ' ' || *(po[i]) != ' ')) {
                        if (i == 0)
                                nums(i);
                        if (i == 0 && *out[1])
                                stars();
                        putline(i);
                        if (i == 0 && *out[1])
                                fprintf(fx, star);
                        if (i == 1)
                                nums(i);
                }
        }
}

/*
 * put out a number line: dumpblock()
 */
static
nums(ix)
        int     ix;     /* index in out[] holding seq line */
{
        char            nline[P_LINE];
        register        i, j;
        register char   *pn, *px, *py;

        for (pn = nline, i = 0; i < lmax+P_SPC; i++, pn++)
                *pn = ' ';
        for (i = nc[ix], py = out[ix]; *py; py++, pn++) {
                if (*py == ' ' || *py == '-')
                        *pn = ' ';
                else {
                        if (i%10 == 0 || (i == 1 && nc[ix] != 1)) {
                                j = (i < 0)? -i : i;
                                for (px = pn; j; j /= 10, px--)
                                        *px = j%10 + '0';
                                if (i < 0)
                                        *px = '-';
                        }
                        else
                                *pn = ' ';
                        i++;
                }
        }
        *pn = '\0';
        nc[ix] = i;
        for (pn = nline; *pn; pn++)
                (void) putc(*pn, fx);
        (void) putc('\n', fx);
}

/*
 * put out a line (name, [num], seq, [num]): dumpblock()
 */
static
putline(ix)
        int     ix;
{
```

nums

putline

【００８８】

...putline

```
        int             i;
        register char   *px;

        for (px = namex[ix], i = 0; *px && *px != ':'; px++, i++)
                (void) putc(*px, fx);
        for (; i < lmax+P_SPC; i++)
                (void) putc(' ', fx);

        /* these count from 1:
         * ni[] is current element (from 1)
         * nc[] is number at start of current line
         */
        for (px = out[ix]; *px; px++)
                (void) putc(*px&0x7F, fx);
        (void) putc('\n', fx);
}

/*
 * put a line of stars (seqs always in out[0], out[1]): dumpblock()
 */
static
stars()
{
        int             i;
        register char   *p0, *p1, cx, *px;

        if (!*out[0] || (*out[0] == ' ' && *(po[0]) == ' ') ||
           !*out[1] || (*out[1] == ' ' && *(po[1]) == ' '))
                return;
        px = star;
        for (i = lmax+P_SPC; i; i--)
                *px++ = ' ';

        for (p0 = out[0], p1 = out[1]; *p0 && *p1; p0++, p1++) {
                if (isalpha(*p0) && isalpha(*p1)) {

                        if (xbm[*p0-'A']&xbm[*p1-'A']) {
                                cx = '*';
                                nm++;
                        }
                        else if (!dna && _day[*p0-'A'][*p1-'A'] > 0)
                                cx = '.';
                        else
                                cx = ' ';
                }
                else
                        cx = ' ';
                *px++ = cx;
        }
        *px++ = '\n';
        *px = '\0';
}
```

stars

Page 6 of nwprint.c

【0089】

```
/*
 * strip path or prefix from pn, return len: pr_align()
 */
static
stripname(pn)
        char    *pn;    /* file name (may be path) */
{
        register char   *px, *py;

        py = 0;
        for (px = pn; *px; px++)
                if (*px == '/')
                        py = px + 1;
        if (py)
                (void) strcpy(pn, py);
        return(strlen(pn));

}
```

stripname

Page 7 of nwprint.c

【0090】

```
/*
 * cleanup() -- cleanup any tmp file
 * getseq() -- read in seq, set dna, len, maxlen
 * g_calloc() -- calloc() with error checkin
 * readjmps() -- get the good jmps, from tmp file if necessary
 * writejmps() -- write a filled array of jmps to a tmp file: nw()
 */
#include "nw.h"
#include <sys/file.h>

char    *jname = "/tmp/homgXXXXXX";             /* tmp file for jmps */
FILE    *fj;

int     cleanup();                              /* cleanup tmp file */
long    lseek();

/*
 * remove any tmp file if we blow
 */
cleanup(i)                                                          cleanup
        int     i;
{
        if (fj)
                (void) unlink(jname);
        exit(i);
}

/*
 * read, return ptr to seq, set dna, len, maxlen
 * skip lines starting with ';', '<', or '>'
 * seq in upper or lower case
 */
char    *
getseq(file, len)                                                   getseq
        char    *file;  /* file name */
        int     *len;   /* seq len */
{
        char            line[1024], *pseq;
        register char   *px, *py;
        int             natgc, tlen;
        FILE            *fp;

        if ((fp = fopen(file,"r")) == 0) {
                fprintf(stderr,"%s: can't read %s\n", prog, file);
                exit(1);
        }
        tlen = natgc = 0;
        while (fgets(line, 1024, fp)) {
                if (*line == ';' || *line == '<' || *line == '>')
                        continue;
                for (px = line; *px != '\n'; px++)
                        if (isupper(*px) || islower(*px))
                                tlen++;
        }
        if ((pseq = malloc((unsigned)(tlen+6))) == 0) {
                fprintf(stderr,"%s: malloc() failed to get %d bytes for %s\n", prog, tlen+6, file);
                exit(1);
        }
        pseq[0] = pseq[1] = pseq[2] = pseq[3] = '\0';
                                                                    Page 1 of nwsubr.c
```

【００９１】

...getseq

```
        py = pseq + 4;
        *len = tlen;
        rewind(fp);

        while (fgets(line, 1024, fp)) {
                if (*line == ';' || *line == '<' || *line == '>')
                        continue;
                for (px = line; *px != '\n'; px++) {
                        if (isupper(*px))
                                *py++ = *px;
                        else if (islower(*px))
                                *py++ = toupper(*px);
                        if (index("ATGCU",*(py-1)))
                                natgc++;
                }
        }
        *py++ = '\0';
        *py = '\0';
        (void) fclose(fp);
        dna = natgc > (tlen/3);
        return(pseq+4);
}

char    *
g_calloc(msg, nx, sz)                                                   g_calloc
        char    *msg;           /* program, calling routine */
        int     nx, sz;         /* number and size of elements */
{
        char            *px, *calloc();

        if ((px = calloc((unsigned)nx, (unsigned)sz)) == 0) {
                if (*msg) {
                        fprintf(stderr, "%s: g_calloc() failed %s (n=%d, sz=%d)\n", prog, msg, nx, sz);
                        exit(1);
                }
        }
        return(px);
}

/*
 * get final jmps from dx[] or tmp file, set pp[], reset dmax: main()
 */
readjmps()                                                              readjmps
{
        int             fd = -1;
        int             siz, i0, i1;
        register        i, j, xx;

        if (fj) {
                (void) fclose(fj);
                if ((fd = open(jname, O_RDONLY, 0)) < 0) {
                        fprintf(stderr, "%s: can't open() %s\n", prog, jname);
                        cleanup(1);
                }
        }
        for (i = i0 = i1 = 0, dmax0 = dmax, xx = len0; ; i++) {
                while (1) {
                        for (j = dx[dmax].ijmp; j >= 0 && dx[dmax].jp.x[j] >= xx; j--)
```


【0092】

```
                if (j < 0 && dx[dmax].offset && fj) {
                        (void) lseek(fd, dx[dmax].offset, 0);
                        (void) read(fd, (char *)&dx[dmax].jp, sizeof(struct jmp));
                        (void) read(fd, (char *)&dx[dmax].offset, sizeof(dx[dmax].offset));
                        dx[dmax].ijmp = MAXJMP-1;
                }
                else
                        break;
        }
        if (i >= JMPS) {
                fprintf(stderr, "%s: too many gaps in alignment\n", prog);
                cleanup(1);
        }
        if (j >= 0) {
                siz = dx[dmax].jp.n[j];
                xx = dx[dmax].jp.x[j];
                dmax += siz;
                if (siz < 0) {                  /* gap in second seq */
                        pp[1].n[i1] = -siz;
                        xx += siz;
                        /* id = xx - yy + len1 - 1
                         */
                        pp[1].x[i1] = xx - dmax + len1 - 1;
                        gapy++;
                        ngapy -= siz;
/* ignore MAXGAP when doing endgaps */
                        siz = (-siz < MAXGAP || endgaps)? -siz : MAXGAP;
                        i1++;
                }
                else if (siz > 0) {     /* gap in first seq */
                        pp[0].n[i0] = siz;
                        pp[0].x[i0] = xx;
                        gapx++;
                        ngapx += siz;
/* ignore MAXGAP when doing endgaps */
                        siz = (siz < MAXGAP || endgaps)? siz : MAXGAP;
                        i0++;
                }
        }
        else
                break;
    }
    /* reverse the order of jmps
     */
    for (j = 0, i0--; j < i0; j++, i0--) {
        i = pp[0].n[j]; pp[0].n[j] = pp[0].n[i0]; pp[0].n[i0] = i;
        i = pp[0].x[j]; pp[0].x[j] = pp[0].x[i0]; pp[0].x[i0] = i;
    }
    for (j = 0, i1--; j < i1; j++, i1--) {
        i = pp[1].n[j]; pp[1].n[j] = pp[1].n[i1]; pp[1].n[i1] = i;
        i = pp[1].x[j]; pp[1].x[j] = pp[1].x[i1]; pp[1].x[i1] = i;
    }
    if (fd >= 0)
        (void) close(fd);
    if (fj) {
        (void) unlink(jname);
        fj = 0;
        offset = 0;
    }
}
```


【００９３】

```
/*
 * write a filled jmp struct offset of the prev one (if any): nw()
 */
writejmps(ix)
        int     ix;                                                     writejmps
{
        char    *mktemp();

        if (!fj) {
                if (mktemp(jname) < 0) {
                        fprintf(stderr, "%s: can't mktemp() %s\n", prog, jname);
                        cleanup(1);
                }
                if ((fj = fopen(jname, "w")) == 0) {
                        fprintf(stderr, "%s: can't write %s\n", prog, jname);
                        exit(1);
                }
        }
        (void) fwrite((char *)&dx[ix].jp, sizeof(struct jmp), 1, fj);
        (void) fwrite((char *)&dx[ix].offset, sizeof(dx[ix].offset), 1, fj);
}
                                                                Page 4 of nwsubr.c
```

【００９４】

表　２Ａ

PRO	XXXXXXXXXXXXXXX	(長さ = 15 アミノ酸)
比較タンパク質	XXXXXYYYYYYY	(長さ = 12 アミノ酸)

% アミノ酸配列同一性＝

（ＡＬＩＧＮ−２で決定した２つのポリペプチド配列間の同一一致したアミノ酸残基の数）を
（ＰＲＯポリペプチドのアミノ酸残基の総数）で 除する＝

５を１５で除する ＝ 33.3%

【００９５】

表　２Ｂ

PRO	XXXXXXXXXX	(長さ = 10 アミノ酸)
比較タンパク質	XXXXXYYYYYYZZYZ	(長さ = 15 アミノ酸)

% アミノ酸配列同一性＝

（ＡＬＩＧＮ−２で決定した２つのポリペプチド配列間の同一一致したアミノ酸残基の数）を
（ＰＲＯポリペプチドのアミノ酸残基の総数）で 除する＝

５を１０で除する ＝ 50%

【００９６】

表　２Ｃ

PRO-DNA	NNNNNNNNNNNNN	(長さ = 14 ヌクレオチド)
比較ＤＮＡ	NNNNNNLLLLLLLLL	(長さ = 16 ヌクレオチド)

% 核酸配列同一性＝

（ＡＬＩＧＮ−２で決定した２つの核酸配列間の同一一致 したヌクレオチド数）を
（ＰＲＯ−ＤＮＡ核酸配列のヌクレオチドの総数）で 除する＝

６を１４で除する ＝ 42.9%

【００９７】

表　２Ｄ

PRO-DNA	NNNNNNNNNNNN	（長さ＝12ヌクレオチド）
比較ＤＮＡ	NNNNLLLVV	（長さ＝９ヌクレオチド）

％核酸配列同一性＝

（ＡＬＩＧＮ-２で決定した２つの核酸配列間の同一一致したヌクレオチド数）を
（ＰＲＯ-ＤＮＡ核酸配列のヌクレオチドの総数）で除する＝

４を12で除する　＝33.3%

【００９８】

ここに定義されるＰＲＯポリペプチド配列に対する「パーセント(％)アミノ酸配列同一性」は、配列を整列させ、最大のパーセント配列同一性を得るために必要ならば間隙を導入し、如何なる保存的置換も配列同一性の一部と考えないとした、ＰＲＯ配列のアミノ酸残基と同一である候補配列中のアミノ酸残基のパーセントとして定義される。パーセントアミノ酸配列同一性を決定する目的のためのアラインメントは、当業者の技量の範囲にある種々の方法、例えばBLAST、BLAST-2、ALIGN、ALIGN-2又はMegalign(DNASTAR)ソフトウエアのような公に入手可能なコンピュータソフトウエアを使用することにより達成可能である。当業者であれば、比較される配列の全長に対して最大のアラインメントを達成するために必要な任意のアルゴリズムを含む、アラインメントを測定するための適切なパラメータを決定することができる。しかし、ここでの目的のためには、％アミノ酸配列同一性値は、以下に記載するように、ALIGN-2プログラム用の完全なソースコードが表１に与えられている配列比較プログラムALIGN-2を用いて得られる。ALIGN-2配列比較コンピュータプログラムはジェネンテク社によって作成され、表１に示したソースコードは米国著作権事務所，Washington D.C., 20559に使用者用書類とともに提出され、米国著作権登録番号TXU510087の下で登録されている。ALIGN-2はジェネンテク社、South San Francisco, Californiaを通して公的に入手可能であり、また表１に与えたソースコードからコンパイルしてもよい。ALIGN-2プログラムは、UNIXオペレーティングシステム、好ましくはデジタルUNIX V4.0Dでの使用のためにコンパイルされる。全ての配列比較パラメータは、ALIGN-2プログラムによって設定され変動しない。

【００９９】

ここでの目的のためには、与えられたアミノ酸配列Ａの、与えられたアミノ酸配列Ｂとの、又はそれに対する％アミノ酸配列同一性（あるいは、与えられたアミノ酸配列Ｂと、又はそれに対して或る程度の％アミノ酸配列同一性を持つ又は含む与えられたアミノ酸配列Ａと言うこともできる）は次のように計算される：

分率Ｘ／Ｙの１００倍

ここで、Ｘは配列アラインメントプログラムALIGN-2のＡ及びＢのアラインメントによって同一であると一致したスコアのアミノ酸残基の数であり、ＹはＢの全アミノ酸残基数である。アミノ酸配列Ａの長さがアミノ酸配列Ｂの長さと異なる場合、ＡのＢに対する％アミノ酸配列同一性は、ＢのＡに対する％アミノ酸配列同一性とは異なることは理解されるであろう。この方法を用いた％アミノ酸配列同一性の計算の例として、表２Ａ-Ｂは、「比較タンパク質」と称されるアミノ酸配列の「ＰＲＯ」と称されるアミノ酸配列に対する％アミノ酸配列同一性の計算方法を示す。

【０１００】

特に断らない限りは、ここでの全ての％アミノ酸配列同一性値は上記のようにALIGN-2配列比較コンピュータプログラムを用いて得られる。しかしながら、％アミノ酸配列同一性は、配列比較プログラムNCBI-BLAST2（Altschul等，Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402 (1997)）を用いて決定してもよい。NCBI-BLAST2配列比較プログラムは、http://ww.ncbi.nlm.nih.govからダウンロードできる。NCBI-BLAST2は幾つかの検索パラメータを使用し、それら検索パラメータの全ては初期値に設定され、例えば、unmask＝可、鎖＝全て、予

測される発生＝１０、最小低複合長＝１５／５、マルチパスｅ-値＝０．０１、マルチパスの定数＝２５、最終ギャップアラインメントのドロップオフ＝２５、及びスコアリングマトリクス＝BLOSUM62を含む。

【０１０１】

アミノ酸配列比較にNCBI-BLAST2が用いれれる状況では、与えられたアミノ酸配列Ａの、与えられたアミノ酸配列Ｂとの、又はそれに対する％アミノ酸配列同一性（あるいは、与えられたアミノ酸配列Ｂと、又はそれに対して或る程度の％アミノ酸配列同一性を持つ又は含む与えられたアミノ酸配列Ａと言うこともできる）は次のように計算される：

分率Ｘ／Ｙの１００倍

ここで、Ｘは配列アラインメントプログラムNCBI-BLAST2のＡ及びＢのアラインメントによって同一であると一致したスコアのアミノ酸残基の数であり、ＹはＢの全アミノ酸残基数である。アミノ酸配列Ａの長さがアミノ酸配列Ｂの長さと異なる場合、ＡのＢに対する％アミノ酸配列同一性は、ＢのＡに対する％アミノ酸配列同一性とは異なることは理解されるであろう。

さらに、％アミノ酸配列同一性値は、WU-BLAST-2コンピュータプログラム（Altschul等, Methods in Enzymology 266: 460-480 (1996)）を用いて決定してもよい。殆どのWU-BLAST-2検索パラメータは初期値に設定される。初期値に設定されない、即ち調節可能なパラメータは以下の値に設定する：オーバーラップスパン＝１、オーバーラップフラクション＝０．１２５、ワード閾値（Ｔ）＝１１、及びスコアリングマトリクス＝BLOSUM62。ここでの目的のために、％アミノ酸配列同一性値は、（ａ）天然ＰＲＯポリペプチドから誘導された配列を有する対象とするＰＲＯポリペプチドのアミノ酸配列と、対象とする比較アミノ酸配列（即ち、対象とするＰＲＯポリペプチドが比較されるＰＲＯポリペプチド変異体であってもよい配列）との間の、WU-BLAST-2によって決定した一致する同一アミノ酸残基の数を、（ｂ）対象とするＰＲＯポリペプチドの残基の総数で除した商によって決定される。例えば、「アミノ酸配列Ｂに対して少なくとも８０％のアミノ酸配列同一性を持つ又は持っているアミノ酸配列Ａを含んでなるポリペプチド」という表現では、アミノ酸配列Ａが対象とする比較アミノ酸配列であり、アミノ酸配列Ｂが対象とするＰＲＯポリペプチドのアミノ酸配列である。

【０１０２】

「ＰＲＯ変異体ポリヌクレオチド」又は「ＰＲＯ変異体核酸配列」は、以下に定義するような活性なＰＲＯポリペプチドをコードする核酸分子を意味し、ここに開示する全長天然配列ＰＲＯポリペプチド配列、ここに開示するシグナルペプチドを欠く全長天然配列ＰＲＯポリペプチド配列、ここに開示するシグナルペプチド有又は無のＰＲＯポリペプチド細胞外ドメイン、又はここに開示する全長ＰＲＯポリペプチド配列の他の断片をコードする核酸配列に対して少なくとも約８０％の核酸配列同一性を有する。通常は、ＰＲＯ変異体ポリヌクレオチドは、ここに開示する全長天然配列ＰＲＯポリペプチド配列、ここに開示するシグナルペプチドを欠く全長天然配列ＰＲＯポリペプチド配列、ここに開示するシグナルペプチド有又は無のＰＲＯポリペプチド細胞外ドメイン、又はここに開示する全長ＰＲＯポリペプチド配列の他の断片をコードする核酸配列と少なくとも約８０％の核酸配列同一性、好ましくは少なくとも約８１％の核酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約８２％の核酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約８３％の核酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約８４％の核酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約８５％の核酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約８６％の核酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約８７％の核酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約８８％の核酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約８９％の核酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約９０％の核酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約９１％の核酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約９２％の核酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約９３％の核酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約９４％の核酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約９５％の核酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約９６％の核酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約９７％の核酸配列同一性、より好ましくは少なくとも

約９８％の核酸配列同一性、そして、より好ましくは少なくとも約９９％の核酸配列同一性を有している。変異体は、天然のヌクレオチド配列を含まない。

【０１０３】

通常は、ＰＲＯ変異体ポリヌクレオチドは、少なくとも約３０ヌクレオチド長、より多くは少なくとも約６０ヌクレオチド長、より多くは少なくとも約９０ヌクレオチド長、より多くは少なくとも約１２０ヌクレオチド長、より多くは少なくとも約１５０ヌクレオチド長、より多くは少なくとも約１８０ヌクレオチド長、より多くは少なくとも約２１０ヌクレオチド長、より多くは少なくとも約２４０ヌクレオチド長、より多くは少なくとも約２７０ヌクレオチド長、より多くは少なくとも約３００ヌクレオチド長、より多くは少なくとも約４５０ヌクレオチド長、より多くは少なくとも約６００ヌクレオチド長、より多くは少なくとも約９００ヌクレオチド長、又はそれ以上である。

【０１０４】

ここに定義されるＰＲＯポリペプチドコード化核酸配列に対して同定されている「パーセント(％)核酸配列同一性」は、配列を整列させ、最大のパーセント配列同一性を得るために必要ならば間隙を導入し、如何なる保存的置換も配列同一性の一部と考えないとした、ＰＲＯポリペプチドコード化配列のヌクレオチドと同一である候補配列中のヌクレオチドのパーセントとして定義される。パーセント核酸配列同一性を決定する目的のためのアラインメントは、当業者の技量の範囲にある種々の方法、例えばBLAST、BLAST-2、ALIGN、ALIGN-2又はMegalign(DNASTAR)ソフトウエアのような公に入手可能なコンピュータソフトウエアを使用することにより達成可能である。当業者であれば、比較される配列の全長に対して最大のアラインメントを達成するために必要な任意のアルゴリズムを含む、アラインメントを測定するための適切なパラメータを決定することができる。しかし、ここでの目的のためには、％核酸配列同一性値は、以下に記載するように、ALIGN-2プログラム用の完全なソースコードが表１に与えられている配列比較プログラムALIGN-2を用いて得られる。ALIGN-2配列比較コンピュータプログラムはジェネンテク社によって作成され、表１に示したソースコードは米国著作権事務所，Washington D.C.，20559に使用者用書類とともに提出され、米国著作権登録番号TXU510087の下で登録されている。ALIGN-2はジェネンテク社、South San Francisco，Californiaを通して公的に入手可能であり、また図２Ａ-Ｐに与えたソースコードからコンパイルしてもよい。ALIGN-2プログラムは、UNIXオペレーティングシステム、好ましくはデジタルUNIX V4.0Dでの使用のためにコンパイルされる。全ての配列比較パラメータは、ALIGN-2プログラムによって設定され変動しない。

【０１０５】

ここでの目的のためには、与えられた核酸配列Ｃの、与えられた核酸配列Ｄとの、又はそれに対する％核酸配列同一性（あるいは、与えられた核酸配列Ｄと、又はそれに対して或る程度の％核酸配列同一性を持つ又は含む与えられたアミノ酸配列Ｃと言うこともできる）は次のように計算される：

分率Ｗ／Ｚの１００倍

ここで、Ｗは配列アラインメントプログラムALIGN-2のＣ及びＤのアラインメントによって同一であると一致したスコアのヌクレオチドの数であり、ＺはＤの全ヌクレオチド数である。核酸配列Ｃの長さが核酸配列Ｄの長さと異なる場合、ＣのＤに対する％核酸配列同一性は、ＤのＣに対する％核酸配列同一性とは異なることは理解されるであろう。この方法を用いた％核酸配列同一性の計算の例として、表２Ｃ-Ｄは、「比較ＤＮＡ」と称される核酸配列の「ＰＲＯ-ＤＮＡ」と称される核酸配列に対する％核酸配列同一性の計算方法を示す。

特に断らない限りは、ここでの全ての％核酸配列同一性値は上記のようにALIGN-2配列比較コンピュータプログラムを用いて得られる。しかしながら、％核酸配列同一性は、配列比較プログラムNCBI-BLAST2（Altschul等，Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402 (1997)）を用いて決定してもよい。NCBI-BLAST2配列比較プログラムは、http://www.ncbi.nlm.nih.govからダウンロードできる。NCBI-BLAST2は幾つかの検索パラメータを使用し、それら検索パラメータの全ては初期値に設定され、例えば、unmask＝可、鎖＝全て、予測される

発生＝１０、最小低複合長＝１５／５、マルチパスｅ-値＝０．０１、マルチパスの定数＝２５、最終ギャップアラインメントのドロップオフ＝２５、及びスコアリングマトリクス＝BLOSUM62を含む。

【０１０６】

配列比較にNCBI-BLAST2が用いれれる状況では、与えられた核酸配列Ｃの、与えられた核酸配列Ｄとの、又はそれに対する％核酸配列同一性（あるいは、与えられた核酸配列Ｄと、又はそれに対して或る程度の％核酸配列同一性を持つ又は含む与えられた核酸配列Ｃと言うこともできる）は次のように計算される：

分率Ｗ／Ｚの１００倍

ここで、Ｗは配列アラインメントプログラムNCBI-BLAST2のＣ及びＤのアラインメントによって同一であると一致したスコアのヌクレオチドの数であり、ＺはＤの全ヌクレオチド数である。核酸配列Ｃの長さが核酸配列Ｄの長さと異なる場合、ＣのＤに対する％核酸配列同一性は、ＤのＣに対する％核酸配列同一性とは異なることは理解されるであろう。

さらに、％核酸配列同一性値は、WU-BLAST-2コンピュータプログラム（Altschul等，Methods in Enzymology 266: 460-480 (1996)）を用いて決定してもよい。殆どのWU-BLAST-2検索パラメータは初期値に設定される。初期値に設定されない、即ち調節可能なパラメータは以下の値に設定する：オーバーラップスパン＝１、オーバーラップフラクション＝０．１２５、ワード閾値（Ｔ）＝１１、及びスコアリングマトリクス＝BLOSUM62。ここでの目的のために、％核酸配列同一性値は、（ａ）天然配列ＰＲＯポリペプチドコード化核酸から誘導された配列を有する対象とするＰＲＯポリペプチドコード化配列の核酸配列と、対象とする比較核酸分子（即ち、対象とするＰＲＯポリペプチドコード化核酸分子の配列が比較される変異体ポリヌクレオチドであってもよい配列）との間の、WU-BLAST-2によって決定した一致する同一ヌクレオチドの数を、（ｂ）対象とするＰＲＯポリペプチドコード化核酸のヌクレオチドの総数で除した商によって決定される。例えば、「核酸配列Ｂに対して少なくとも８０％のアミノ酸配列同一性を持つ又は持っている核酸配列Ａを含んでなる単離された核酸分子」という表現では、核酸配列Ａが対象とする比較核酸配列であり、核酸配列Ｂが対象とするＰＲＯポリペプチドコード化核酸分子の核酸配列である。

【０１０７】

他の実施態様では、ＰＲＯ変異体ポリヌクレオチドは、活性なＰＲＯポリペプチドをコードする核酸分子であり、好ましくはストリンジェントなハイブリダイゼーション及び洗浄条件下で、各々図２（配列番号：４）、図４（配列番号：９）、図６（配列番号：１４）、図８（配列番号：１６）、図１０（配列番号：２１）、図１２（配列番号：２６）、図１４（配列番号：３１）、図１６（配列番号：３６）、図１８（配列番号：４１）、図２０（配列番号：４６）、図２２（配列番号：５１）、図２４（配列番号：５６）、図２６（配列番号：６２）、図２８（配列番号：６７）、図３０（配列番号：７２）、図３２（配列番号：７７）、図３４（配列番号：８５）、図３６（配列番号：９０）、図３８（配列番号：９８）、図４０（配列番号：１０７）、図４２（配列番号：１１２）、図４４（配列番号：１１７）、図４６（配列番号：１２７）、図４８（配列番号：１３２）、図５０（配列番号：１３７）、図５２（配列番号：１４３）、図５４（配列番号：１４８）、図５６（配列番号：１５３）、図５８（配列番号：１５５）、図６０（配列番号：１６０）、図６２（配列番号：１６２）、図６４（配列番号：１７０）、図６６（配列番号：１８１）、図６８（配列番号：１８３）、図７０（配列番号：１９１）、図７２（配列番号：１９３）、図７４（配列番号：１９５）、図７６（配列番号：１９７）、図７８（配列番号：１９９）、図８０（配列番号：２０１）、図８２（配列番号：２０３）、図８４（配列番号：２０５）、図８６（配列番号：２１４）、図８８（配列番号：２１６）、図９０（配列番号：２１８）、図９２（配列番号：２２０）、図９４（配列番号：２２２）、及び図９６（配列番号：２２７）に示す全長ＰＲＯポリペプチドをコードするヌクレオチド配列にハイブリダイゼーションできる。ＰＲＯ変異体ポリペプチドは、ＰＲＯ変異体ポリヌクレオチドにコードされるものであってもよい。

【０１０８】

上記のように実施されるアミノ酸配列同一性比較の文脈における「ポジティブ（陽性）」という用語は、比較された配列において同一であるアミノ酸残基ばかりでなく特性を有するものも含む。対象とするアミノ酸残基に対してポジティブ値をスコアされるアミノ酸残基は、対象とするアミノ酸残基と同一であるか、又は対象とするアミノ酸残基の（下記の表３で特定するように）好ましい置換とされるものである。

ここでの目的のために、与えられたアミノ酸配列Ａの、与えられたアミノ酸配列Ｂとの、又はそれに対する％ポジティブ値（あるいは、与えられたアミノ酸配列Ｂと、又はそれに対して或る程度の％ポジティブを持つ又は含む与えられたアミノ酸配列Ａと言うこともできる）は次のように計算される：

分率Ｘ／Ｙの１００倍

ここで、Ｘは配列アラインメントプログラムALIGN-2のＡ及びＢのアラインメントによってポジティブであるとのスコアのアミノ酸残基の数であり、ＹはＢの全アミノ酸残基数である。アミノ酸配列Ａの長さがアミノ酸配列Ｂの長さと異なる場合、ＡのＢに対する％ポジティブは、ＢのＡに対する％ポジティブとは異なることは理解されるであろう。

【０１０９】

「単離された」とは、ここで開示された種々のポリペプチドを記述するために使用するときは、その自然環境の成分から同定され分離され及び／又は回収されたポリペプチドを意味する。好ましくは、単離されたポリペプチドは、自然に結合する全ての成分と結合していない。その自然環境の汚染成分とは、そのポリペプチドの診断又は治療への使用を典型的には妨害する物質であり、酵素、ホルモン、及び他のタンパク質様又は非タンパク質様溶質が含まれる。好ましい実施態様において、ポリペプチドは、(１)スピニングカップシークエネーターを使用することにより、少なくとも１５残基のＮ末端あるいは内部アミノ酸配列を得るのに充分なほど、あるいは、(２)クーマシーブルーあるいは好ましくは銀染色を用いた非還元あるいは還元条件下でのＳＤＳ-ＰＡＧＥによる均一性まで精製される。単離されたポリペプチドには、ＰＲＯポリペプチドの自然環境の少なくとも１つの成分が存在しないため、組換え細胞内のインサイツのタンパク質が含まれる。しかしながら、通常は、単離されたポリペプチドは少なくとも１つの精製工程により調製される。

ＰＲＯポリペプチドをコードする「単離された」核酸分子、又は抗-ＰＲＯ抗体をコードする「単離された」核酸分子は、同定され、ＰＲＯ-コード化核酸の天然源、又は抗-ＰＲＯ-コード化核酸の天然源に通常付随している少なくとも１つの汚染核酸分子から分離された核酸分子である。好ましくは、単離された核酸分子は、自然に結合する全ての汚染物質と結合していない。単離されたＰＲＯ-コード化核酸分子又は単離された抗-ＰＲＯ-コード化核酸分子は、天然に見出される形態あるいは設定以外のものである。ゆえに、単離された核酸分子は、天然の細胞中に存在するＰＲＯ-コード化核酸分子又は抗-ＰＲＯ-コード化核酸分子とは区別される。しかし、ＰＲＯポリペプチドをコードする単離された核酸分子、又は抗-ＰＲＯ抗体をコードする単離された核酸分子は、例えば、核酸分子が天然細胞のものとは異なった染色体位置にあるＰＲＯポリペプチド又は抗-ＰＲＯ抗体を通常は発現する細胞に含まれるＰＲＯ-核酸分子、又は抗-ＰＲＯ-核酸分子を含む。

【０１１０】

「コントロール配列」という用語は、特定の宿主生物において作用可能に結合したコード配列を発現するために必要なＤＮＡ配列を指す。例えば原核生物に好適なコントロール配列は、プロモーター、場合によってはオペレータ配列、及びリボソーム結合部位を含む。真核生物の細胞は、プロモーター、ポリアデニル化シグナル及びエンハンサーを利用することが知られている。

核酸は、他の核酸配列と機能的な関係にあるときに「作用可能に結合し」ている。例えば、プレ配列あるいは分泌リーダーのＤＮＡは、ポリペプチドの分泌に参画するプレタンパク質として発現されているなら、そのＰＲＯポリペプチドのＤＮＡに作用可能に結合している；プロモーター又はエンハンサーは、配列の転写に影響を及ぼすならば、コード配列に作用可能に結合している；又はリボソーム結合部位は、もしそれが翻訳を容易にするような位置にあるなら、コード配列と作用可能に結合している。一般的に、「作用可能に

結合している」とは、結合したＤＮＡ配列が近接しており、分泌リーダーの場合には近接していて読みフェーズにあることを意味する。しかし、エンハンサーは必ずしも近接している必要はない。結合は簡便な制限部位でのライゲーションにより達成される。そのような部位が存在しない場合は、従来の手法に従って、合成オリゴヌクレオチドアダプターあるいはリンカーが使用される。

【０１１１】

ハイブリダイゼーション反応の「ストリンジェンシー」は、当業者によって容易に決定され、一般的にプローブ長、洗浄温度、及び塩濃度に依存する経験的な計算である。一般に、プローブが長くなると適切なアニーリングのための温度が高くなり、プローブが短くなると温度は低くなる。ハイブリダイゼーションは、一般的に、相補的ストランドがその融点より低い環境に存在する場合における変性ＤＮＡの再アニールする能力に依存する。プローブとハイブリダイゼーション可能な配列との間の所望の相同性の程度が高くなると、使用できる相対温度が高くなる。その結果、より高い相対温度は、反応条件をよりストリンジェントにするが、低い温度はストリンジェンシーを低下させる。ハイブリダイゼーション反応のストリンジェンシーの更なる詳細及び説明は、Ausubel等, Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience Publishers, (1995)を参照のこと。

ここで定義される「ストリンジェントな条件」又は「高度にストリンジェントな条件」は、（１）洗浄のために低イオン強度及び高温度、例えば、５０℃において０．０１５Ｍの塩化ナトリウム／０．００１５Ｍのクエン酸ナトリウム／０．１％のドデシル硫酸ナトリウムを用いるもの；（２）ハイブリダイゼーション中にホルムアミド等の変性剤、例えば、４２℃において５０％（v/v）ホルムアミドと０．１％ウシ血清アルブミン／０．１％フィコール／０．１％のポリビニルピロリドン／５０ｍＭのｐＨ６．５のリン酸ナトリウムバッファー、及び７５０ｍＭの塩化ナトリウム、７５ｍＭクエン酸ナトリウムを用いるもの；（３）４２℃における５０％ホルムアミド、５ｘＳＳＣ（０．７５ＭのＮａＣｌ、０．０７５Ｍのクエン酸ナトリウム）、５０ｍＭのリン酸ナトリウム（ｐＨ６．８）、０．１％のピロリン酸ナトリウム、５ｘデンハード液、超音波処理サケ精子ＤＮＡ（５０μｇ／ｍｌ）、０．１％ＳＤＳ、及び１０％のデキストラン硫酸と、４２℃における０．２ｘＳＳＣ（塩化ナトリウム／クエン酸ナトリウム）中の洗浄及び５５℃での５０％ホルムアミド、次いで５５℃におけるＥＤＴＡを含む０．１ｘＳＳＣからなる高度にストリンジェントな洗浄を用いるものによって同定される。

「中程度のストリンジェントな条件」は、Sambrook等, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)に記載されているように同定され、上記のストリンジェンシーより低い洗浄溶液及びハイブリダイゼーション条件（例えば、温度、イオン強度及び％ＳＤＳ）の使用を含む。中程度のストリンジェントな条件は、２０％ホルムアミド、５ｘＳＳＣ（１５０ｍＭのＮａＣｌ、１５ｍＭのクエン酸三ナトリウム）、５０ｍＭリン酸ナトリウム（ｐＨ７．６）、５ｘデンハード液、１０％デキストラン硫酸、及び２０ｍｇ／ｍｌの変性剪断サケ精子ＤＮＡを含む溶液中の３７℃での終夜インキュベーション、次いで１ｘＳＳＣ中３７－５０℃でのフィルターの洗浄といった条件である。当業者であれば、プローブ長などの因子に適合させる必要に応じて、どのようにして温度、イオン強度等を調節するかを認識するであろう。

【０１１２】

「エピトープタグ」なる修飾詞は、ここで用いられるときは、「タグポリペプチド」に融合したＰＲＯポリペプチドを含んでなるキメラポリペプチドを指す。タグポリペプチドは、その抗体が産生され得るエピトープを提供するに十分な数の残基を有しているが、その長さは融合するポリペプチドの活性を阻害しないよう充分に短い。また、タグポリペプチドは、好ましくは、抗体が他のエピトープと実質的に交差反応をしないようにかなり独特である。適切なタグポリペプチドは、一般に、少なくとも６のアミノ酸残基、通常は約８～５０のアミノ酸残基(好ましくは約１０～約２０のアミノ酸残基)を有する。

ＰＲＯ変異体における「活性な」及び「活性」とは、天然又は天然発生ＰＲＯポリペプチドの生物学的及び／又は免疫学的活性を保持するＰＲＯタンパク質の形態を称する。

ここで開示されているスクリーニングアッセイにより同定可能なＰＲＯポリペプチドに拮抗する分子(例えば、有機又は無機小分子、ペプチド等)における「生物学的活性」とは、ここで同定されたＰＲＯポリペプチドに結合又は複合体化、又は他の細胞タンパク質とＰＲＯポリペプチドとの相互作用を干渉、又はＰＲＯポリペプチドの転写又は翻訳を阻害する分子の能力を称するときに使用される。特に好ましい生物学的活性には、血管に影響を及ぼす全身疾患、例えば真性糖尿病、並びに動脈、毛細管、静脈及び／又はリンパ管の病気、及び癌に作用する心臓肥大活性が含まれる。

【０１１３】

「アンタゴニスト」なる用語は最も広い意味で用いられ、ここに開示した天然ＰＲＯポリペプチドの一又は複数の生物学的活性、例えば適切であるならば、その分裂促進又は血管形成活性を阻止、阻害、又は中和する任意の分子を含む。ＰＲＯポリペプチドのアンタゴニストは、ＰＲＯポリペプチドの細胞レセプターへの結合に干渉する、ＰＲＯポリペプチドにより活性化される細胞を無力化又は死亡させる、又はＰＲＯポリペプチドが細胞レセプターに結合した後に血管内皮細胞の活性化に干渉することにより作用する。ＰＲＯポリペプチドアンタゴニストによる仲介のこのような点の全ては、この発明の目的と等しいと考えられる。アンタゴニストは、分裂促進、血管形成、又はＰＲＯポリペプチドの他の生物学的活性を阻害し、よって、腫瘍、特に固形悪性腫瘍、慢性関節リュウマチ、乾癬、アテローム性動脈硬化、糖尿病、他の網膜症、水晶体後繊維増殖症、年齢関連性斑変性、新血管新生緑内障、移植角膜組織及び他の組織の免疫拒絶、慢性関節リウマチ、血管新生緑内障、血管腫、甲状腺過形成(グレイブス病)、角膜及び他の組織の移植、及び慢性炎症を含む、所望しない過度の新血管新生により特徴付けられる病気又は疾患の治療に有用である。また、アンタゴニストは、所望しない過度の血管浸透性により特徴付けられる病気又は疾患、例えば脳腫瘍に関連した浮腫、悪性腫瘍に関連した腹水症、メーグス症候群、肺炎、ネフローゼ症候群、心外膜液(例えば心膜炎に関連したもの)、胸膜滲出の治療に有用である。同様に「アゴニスト」なる用語は最も広い意味で用いられ、ここに開示した天然ＰＲＯポリペプチドの生物学的活性を模倣する任意の分子を含む。好適なアゴニスト又はアンタゴニスト分子は特に、アゴニスト又はアンタゴニスト抗体又は抗体断片、天然ＰＲＯポリペプチドの断片又はアミノ酸配列変異体、ペプチド、有機小分子等を含む。

「小分子」とは、ここでは約５００ダルトン以下の分子量を有するものと定義する。

ここで使用される場合の「ＰＲＯポリペプチドレセプター」なる用語は、ＰＲＯポリペプチドの細胞性レセプター、通常は血管内皮細胞に見出される細胞表面レセプター、並びにＰＲＯポリペプチドに結合する能力を保持しているそれらの変異体を称する。

【０１１４】

「抗体」(Ａｂｓ)と「免疫グロブリン」(Ｉｇｓ)は同じ構造的特徴を有する糖タンパク質である。抗体は特定の抗原に対して結合特異性を示すものであるが、免疫グロブリンは、抗体及び抗原特異性を欠く他の抗体様分子の両方を含むものである。後者の種類のポリペプチドは、例えばリンパ系により低レベルで、骨髄腫により増加したレベルで産生される。「抗体」という用語は最も広い意味において使用され、限定するものではないが、特に無傷のモノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、少なくとも２つの無傷の抗体から形成された多重特異性抗体(例えば二重特異性抗体)、及びそれらが所望の生物活性を示す限り抗体断片も含む。

「天然抗体」及び「天然免疫グロブリン」は、通常、２つの同一の軽(Ｌ)鎖及び２つの同一の重(Ｈ)鎖からなる、約１５００００ダルトンのヘテロ四量体糖タンパク質である。各軽鎖は一つの共有ジスルフィド結合により重鎖に結合しており、ジスルフィド結合の数は、異なった免疫グロブリンアイソタイプの重鎖の中で変化する。また各重鎖と軽鎖は、規則的に離間した鎖間ジスルフィド結合を有している。各重鎖は、多くの定常ドメインが続く可変ドメイン(V_H)を一端に有する。各軽鎖は、一端に可変ドメイン(V_L)を、他端に定常ドメインを有し；軽鎖の定常ドメインは重鎖の第一定常ドメインと整列し、軽鎖の可変ドメインは重鎖の可変ドメインと整列している。特定のアミノ酸残基が、軽鎖及び重鎖可変ドメイン間の界面を形成すると考えられている。

【０１１５】
「可変」という用語は、可変ドメインのある部位が、抗体の中で配列が広範囲に異なっており、その特定の抗原に対する各特定の抗体の結合性及び特異性に使用されているという事実を称する。しかしながら、可変性は抗体の可変ドメインにわたって一様には分布していない。軽鎖及び重鎖の可変ドメインの両方の高頻度可変領域又は相補性決定領域(ＣＤＲ)と呼ばれる３つのセグメントに濃縮される。可変ドメインのより高度に保持された部分はフレームワーク領域(ＦＲ)と呼ばれる。天然の重鎖及び軽鎖の可変ドメインは、βシート構造を結合し、ある場合にはその一部を形成するループ結合を形成する、３つのＣＤＲにより連結されたβシート配置を主にとる４つのＦＲ領域をそれぞれ含んでいる。各鎖のＣＤＲは、ＦＲにより近接して結合せしめられ、他の鎖のＣＤＲと共に、抗体の抗原結合部位の形成に寄与している。Kabat等, NIH Publ. No.91-3242, Vol.I, 647-669頁[1991]を参照のこと。定常ドメインは、抗体の抗原への結合に直接関連しているものではないが、種々のエフェクター機能、例えば抗体依存性細胞障害活性への抗体の関与を示す。
【０１１６】
「抗体断片」には、無傷の抗体の一部、好ましくは無傷の抗体の抗原結合又は可変領域が含まれる。抗体断片の例には、Ｆａｂ、Ｆａｂ'、$F(ab')_2$及びＦｖ断片；ダイアボディー(diabodies)；直鎖状抗体(Zapata等, Protein Eng. 8(10):1057-1062[1995])；単鎖抗体分子；及び抗体断片から形成される多重特異性抗体が含まれる。
抗体のパパイン消化により、各々が単一の抗原結合部位を有する「Ｆａｂ」断片と呼ばれる２つの同一の抗原結合断片と、その名称が容易に結晶化する能力を表す、残りの「Ｆｃ」断片が産生される。ペプシン処理により、２つの抗原結合部位を有し、更に抗原を架橋させ得る$F(ab')_2$断片が得られる。
「Ｆｖ」は、完全な抗原認識及び抗原結合部位を含む最小抗体断片である。この領域は、堅固な非共有結合をなした一つの重鎖及び一つの軽鎖可変ドメインの二量体からなる。この配置において、各可変ドメインの３つのＣＤＲは相互に作用してV_H-V_L二量体表面に抗原結合部位を形成する。集合的に、６つのＣＤＲが抗体に抗原結合特異性を付与する。しかし、単一の可変ドメイン(又は抗原に対して特異的な３つのＣＤＲのみを含むＦｖの半分)でさえ、全結合部位よりも親和性が低くなるが、抗原を認識して結合する能力を有している。
【０１１７】
またＦａｂ断片は、軽鎖の定常ドメインと重鎖の第一定常領域(ＣＨ１)を有する。Ｆａｂ'断片は、抗体ヒンジ領域からの一又は複数のシステインを含む重鎖ＣＨ１領域のカルボキシ末端に数個の残基が付加している点でＦａｂ断片とは異なる。Ｆａｂ'-ＳＨは、定常ドメインのシステイン残基が遊離チオール基を担持しているＦａｂ'に対するここでの命名である。$F(ab')_2$抗体断片は、間にヒンジシステインを有するＦａｂ'断片の対として生産された。抗体断片の他の化学結合も知られている。
任意の脊椎動物種からの抗体(免疫グロブリン)の「軽鎖」には、その定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、カッパ(κ)及びラムダ(λ)と呼ばれる２つの明確に区別される型の一つが割り当てられる。
重鎖の定常ドメインのアミノ酸配列に応じて、免疫グロブリンは異なるクラスに割り当てることができる。免疫グロブリンには５つの主たるクラス：ＩｇＡ、ＩｇＤ、ＩｇＥ、ＩｇＧ及びＩｇＭがあり、それらのいくつかは更にサブクラス(アイソタイプ)、例えばＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３及びＩｇＧ４、ＩｇＡ及びＩｇＡ２に分割される。異なるクラスの免疫グロブリンに対応する重鎖定常ドメインは、それぞれα、σ、ε、γ及びμと呼ばれる。異なるクラスの免疫グロブリンのサブユニット構造及び３次元構造はよく知られている。
【０１１８】
ここで使用される「モノクローナル抗体」という用語は、実質的に均一な抗体の集団から得られる抗体を指す、すなわち、集団を構成する個々の抗体が、少量で存在しうる自然に生じる可能な突然変異を除いて同一である。モノクローナル抗体は高度に特異的であり

、一つの抗原部位に対している。更に、異なる決定基(エピトープ)に対する異なる抗体を典型的には含む通常の(ポリクローナル)抗体と比べて、各モノクローナル抗体は、抗原上の単一の決定基を対するものである。その特異性に加えて、モノクローナル抗体は、他の免疫グロブリンによって汚染されていないハイブリドーマ培養から合成される点で有利である。「モノクローナル」との修飾詞は、実質的に均一な抗体集団から得られているという抗体の特徴を示し、抗体を何か特定の方法で生産しなければならないことを意味するものではない。例えば、本発明において使用されるモノクローナル抗体は、最初にKohler等, Nature 256, 495 (1975)により開示されたハイブリドーマ法によって作ることができ、あるいは組換えＤＮＡ法によって作ることができる(例えば、米国特許第4,816,567号参照)。また「モノクローナル抗体」は、例えばClackson等, Nature 352:624-628(1991)、及びMarksほか, J. Mol. Biol. 222:581-597(1991)に記載された技術を用いてファージ抗体ライブラリから単離することもできる。

ここで、モノクローナル抗体は、重鎖及び／又は軽鎖の一部が特定の種由来の抗体あるいは特定の抗体クラス又はサブクラスに属する抗体の対応する配列と同一であるか相同であり、鎖の残りの部分が他の種由来の抗体あるいは他の抗体クラスあるいはサブクラスに属する抗体の対応する配列と同一であるか相同である「キメラ」抗体(免疫グロブリン)、並びにそれが所望の生物的活性を有する限りそれら抗体の断片を特に含む(米国特許第4,816,567号; Morrisonほか, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855[1984])。

【０１１９】

非ヒト(例えばマウス)抗体の「ヒト化」形とは、キメラ免疫グロブリン、免疫グロブリン鎖あるいはそれらの断片(例えばＦｖ、Ｆａｂ、Ｆａｂ'、$F(ab')_2$あるいは抗体の他の抗原結合サブ配列)であって、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小配列を含むものである。大部分においてヒト化抗体はレシピエントのＣＤＲの残基が、マウス、ラット又はウサギのような所望の特異性、親和性及び能力を有する非ヒト種(ドナー抗体)のＣＤＲの残基によって置換されたヒト免疫グロブリン(レシピエント抗体)である。ある場合には、ヒト免疫グロブリンのＦｖＦＲク領域残基は、対応する非ヒト残基によって置換される。更に、ヒト化抗体は、レシピエント抗体にも、移入されたＣＤＲもしくはフレームワーク配列にも見出されない残基を含んでもよい。これらの修飾は抗体の特性を更に洗練し、最適化するために行われる。一般に、ヒト化抗体は、全てあるいはほとんど全てのＣＤＲ領域が非ヒト免疫グロブリンのものに対応し、全てあるいはほとんど全てのＦＲ領域がヒト免疫グロブリン配列のものである、少なくとも１つ、典型的には２つの可変ドメインの実質的に全てを含む。ヒト化抗体は、最適には免疫グロブリン定常領域(Ｆｃ)、典型的にはヒトの免疫グロブリンの定常領域の少なくとも一部を含んでなる。更なる詳細は、Jones等, Nature 321, 522-525(1986)；Reichmann等, Nature 332, 323-329(1988)；及びPresta, Curr. Op. Struct. Biol. 2, 593-596(1992)を参照のこと。ヒト化抗体は、抗体の抗原結合領域が、関心のある抗原でマカクザルを免疫化することにより生産された抗体から由来するプリマタイズした(PRIMATIZED^{TM})抗体を含む。

【０１２０】

「一本鎖Ｆｖ」又は「ｓＦｖ」抗体断片は、抗体のV_H及びV_Lドメインを含有するもので、これらのドメインはポリペプチド単鎖に存在する。好ましくは、ＦｖポリペプチドはＦｖが抗原結合に対する所望の構造を形成できるようにするポリペプチドリンカーをV_HとV_Lドメインの間に更に含んでいる。ｓＦｖのレビューには、例えば、Pluckthun, The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol.113, Rosenburg及びMoore編(Springer-Verlag, New York, 1994)pp.269-315を参照されたい。

「ダイアボディー」という用語は、２つの抗原結合部位を有する小さな抗体断片を意味するもので、断片は軽鎖可変ドメイン(V_L)に結合した重鎖可変ドメイン(V_H)を同じポリペプチド鎖(V_H-V_L)に含有する。同じ鎖上での二つのドメイン間の対合が許されないほど短いリンカーを使用することにより、ドメインが、他の鎖の相補的ドメインとの対合を強いられ、二つの抗原結合部位をつくりだす。ダイアボディーは、例えば、欧州特許第404,097号；国際公開93/11161号；及びHollinger等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90

:6444-6448 (1993)に更に詳しく記載されている。

「単離された」抗体は、その自然環境の成分から同定され分離及び／又は回収されたものである。その自然環境の汚染成分とは、その抗体の診断又は治療への使用を妨害する物質であり、酵素、ホルモン、及び他のタンパク質様又は非タンパク質様溶質が含まれる。好ましい実施態様において、抗体は、（１）ローリ法(Lowry method)で測定した場合９５％を越える抗体、最も好ましくは９９重量％を越えるまで、(２)スピニングカップシークエネーターを使用することにより、少なくとも１５残基のＮ末端あるいは内部アミノ酸配列を得るのに充分なほど、あるいは、(３)クーマシーブルーあるいは好ましくは銀染色を用いた非還元あるいは還元条件下でのＳＤＳ-ＰＡＧＥによる均一性まで精製される。単離された抗体には、抗体の自然環境の少なくとも１つの成分が存在しないため、組換え細胞内のインサイツの抗体が含まれる。しかしながら、通常は、単離された抗体は少なくとも１つの精製工程により調製される。

【０１２１】

「標識」なる語は、ここで用いられる場合、抗体に直接又は間接的に複合して「標識」抗体を生成する検出可能な化合物又は組成物を称する。標識は、それ自身検出可能でもよく（例えば、放射性標識又は蛍光標識）、又は酵素標識の場合、検出可能な基質化合物又は組成物の化学変換を触媒してもよい。検出可能な標識として提供できる放射性核種は、例えば、Ｉ-１３１、Ｉ-１２３、Ｉ-１２５、Ｙ-９０、Ｒｅ-１８８、Ａｔ-２１１、Ｃｕ-６７、Ｂｉ-２１２、及びＰｄ-１０９を含む。また、標識は毒素などの検出できない物質であってもよい。

「固相」とは、本発明の抗体がそれに付着することのできる非水性マトリクスを意味する。ここに含まれる固相の例は、部分的又は全体的に、ガラス（例えば、孔制御ガラス）、多糖類（例えばアガロース）、ポリアクリルアミド、ポリスチレン、ポリビニルアルコール及びシリコーンから形成されたものを含む。或る種の実施態様では、内容に応じて、固相はアッセイプレートのウェルを構成することができ；その他では精製カラム（例えばアフィニティクロマトグラフィーカラム）とすることもできる。また、この用語は、米国特許第4,275,149号に記載されたような、別個の粒子の不連続な固相も包含する。

【０１２２】

「リポソーム」は、種々の型の脂質、リン脂質及び／又は界面活性剤からなる小型の小胞であり、哺乳動物への薬物（ＰＲＯポリペプチド又はここに開示されているそれらの抗体など）の輸送に有用である。リポソームの成分は、通常は生体膜の脂質配列に類似する二層形式に配列させる。

ここで用いられる「イムノアドヘシン」なる用語は、異種タンパク質（「アドヘシン」）の結合特異性と免疫グロブリン定常ドメインのエフェクター機能とを結合した抗体様分子を指す。構造的には、イムノアドヘシンは、所望の結合特異性を持ち、抗体の抗原認識及び結合部位以外である（即ち「異種の」）アミノ酸配列と、免疫グロブリン定常ドメイン配列との融合物を含む。イムノアドヘシン分子のアドヘシン部分は、典型的には少なくともレセプター又はリガンドの結合部位を含む隣接アミノ酸配列である。イムノアドヘシンの免疫グロブリン定常ドメイン配列は、ＩｇＧ-１、ＩｇＧ-２、ＩｇＧ-３又はＩｇＧ-４サブタイプ、ＩｇＡ（ＩｇＡ-１及びＩｇＡ-２を含む）、ＩｇＥ、ＩｇＤ又はＩｇＭなどの任意の免疫グロブリンから得ることができる。

【０１２３】

ＩＩ．本発明の組成物と方法

Ａ．　ＰＲＯ変異体

ここに記載した全長天然配列ＰＲＯポリペプチドに加えて、ＰＲＯ変異体も調製できると考えられる。ＰＲＯ変異体は、ＰＲＯＤＮＡに適当なヌクレオチド変化を導入することにより、及び／又は所望のＰＲＯポリペプチドを合成することにより調製できる。当業者は、グリコシル化部位の数又は位置の変化あるいは膜固着特性の変化などのアミノ酸変化がＰＲＯポリペプチドの翻訳後プロセスを変えうることと評価されるであろう。

天然全長配列ＰＲＯポリペプチド又はここに記載したＰＲＯポリペプチドの種々のドメ

インにおける変異は、例えば、米国特許第5,364,934号に記載されている保存的及び非保存的変異についての任意の技術及び指針を用いてなすことができる。変異は、結果として天然配列ＰＲＯポリペプチドと比較してＰＲＯポリペプチドのアミノ酸配列が変化するＰＲＯポリペプチドをコードする一又は複数のコドンの置換、欠失又は挿入であってよい。場合によっては、変異は少なくとも１つのアミノ酸のＰＲＯポリペプチドの一又は複数のドメインの任意の他のアミノ酸による置換である。いずれのアミノ酸残基が所望の活性に悪影響を与えることなく挿入、置換又は欠失されるかの指針は、ＰＲＯポリペプチドの配列を相同性の知られたタンパク質分子の配列と比較し、相同性の高い領域内でなされるアミノ酸配列変化を最小にすることによって見出される。アミノ酸置換は、一のアミノ酸の類似した構造及び／又は化学特性を持つ他のアミノ酸での置換、例えばロイシンのセリンでの置換、即ち保存的アミノ酸置換の結果とすることができる。挿入及び欠失は、場合によっては１から５のアミノ酸の範囲内とすることができる。許容される変異は、配列においてアミノ酸の挿入、欠失又は置換を系統的に作成し、得られた変異体を全長又は成熟天然配列により示される活性について試験することにより決定される。

【０１２４】

特別の実施態様では、関心のある保存的置換を、好ましい置換を先頭にして表３に示す。このような置換が生物学的活性の変化をもたらす場合、表３に例示的置換を示し又は以下にアミノ酸分類でさらに記載するように、より置換的な変化が導入され生成物がスクリーニングされる。

表　3

元の残基	例示的置換	好ましい置換
Ala (A)	val; leu; ile	val
Arg (R)	lys; gln; asn	lys
Asn (N)	gln; his; lys; arg	gln
Asp (D)	glu	glu
Cys (C)	ser	ser
Gln (Q)	asn	asn
Glu (E)	asp	asp
Gly (G)	pro; ala	ala
His (H)	asn; gln; lys; arg	arg
Ile (I)	leu; val; met; ala; phe;	
	ノルロイシン	leu
Leu (L)	ノルロイシン; ile; val;	
	met; ala; phe	ile
Lys (K)	arg; gln; asn	arg
Met (M)	leu; phe; ile	leu
Phe (F)	leu; val; ile; ala; tyr	leu
Pro (P)	ala	ala
Ser (S)	thr	thr
Thr (T)	ser	ser
Trp (W)	tyr; phe	tyr
Tyr (Y)	trp; phe; thr; ser	phe
Val (V)	ile; leu; met; phe;	
	ala; ノルロイシン	leu

【０１２５】

ＰＲＯポリペプチドの機能及び免疫学的同一性の置換的修飾は、（ａ）置換領域のポリペプチド骨格の構造、例えばシート又は螺旋配置、（ｂ）標的部位の分子の電荷又は疎水性、又は（ｃ）側鎖の嵩を維持しながら、それらの効果において実質的に異なる置換基を選択することにより達成される。天然発生残基は共通の側鎖特性に基づいてグループに分けることができる：

（１）疎水性：ノルロイシン，met，ala，val，leu，ile;

（２）中性の親水性：cys，ser，thr;

（３）酸性：asp，glu;

（４）塩基性：asn，gln，his，lys，arg;

（５）鎖配向に影響する残基：gly，pro；及び

（６）芳香族：trp，tyr，phe。

非保存的置換は、これらの分類の一つのメンバーを他の分類に交換することを必要とするであろう。また、そのように置換された残基は、保存的置換部位、好ましくは残された

（非保存）部位に導入されうる。

【０１２６】

変異は、オリゴヌクレオチド媒介（部位特異的）突然変異誘発、アラニンスキャンニング、及びＰＣＲ突然変異誘発等の当該技術において公知の技術を使用して作成することができる。部位指向性突然変異誘発［Carter等, Nucl. Acids Res., 13: 4331 (1986); Zoller等, Nucl. Acids Res., 10: 6487 (1987)］、カセット突然変異誘発［Wells等, Gene, 34: 315 (1985)］、制限選択突然変異誘発［Wells等, Philos. Trans. R. Soc. London SerA, 317: 415 (1986)］又は他の周知の技術が、ＰＲＯ変異体ＤＮＡを製造するために、クローン化されたＤＮＡに実施できる。

また、隣接配列に沿って一又は複数のアミノ酸を同定するのにスキャンニングアミノ酸分析を用いることができる。好ましいスキャンニングアミノ酸は比較的小さく、中性のアミノ酸である。そのようなアミノ酸は、アラニン、グリシン、セリン、及びシステインを含む。アラニンは、ベータ炭素を越える側鎖を排除し変異体の主鎖構造を変化させにくいので、この群の中で典型的に好ましいスキャンニングアミノ酸である［Cunningham及びWells, Science, 244：1081-1085(1989)］。また、アラニンは最もありふれたアミノ酸であるため典型的には好ましい。さらに、それは埋もれた及び露出した位置の両方に見られることが多い［Creighton, The Proteins, (W.H. Freeman & Co., N.Y.); Chothia, J. Mol. Biol., 150: 1 (1976)］。アラニン置換が十分な量の変異体を生じない場合は、アイソテリック(isoteric)アミノ酸を用いることができる。

【０１２７】

Ｂ．　ＰＲＯポリペプチドの修飾

ＰＲＯポリペプチドの共有結合的修飾は本発明の範囲内に含まれる。共有結合的修飾の一型は、ＰＲＯポリペプチドの標的とするアミノ酸残基を、ＰＲＯポリペプチドの選択された側鎖又はＮ-又はＣ-末端残基と反応できる有機誘導体化試薬と反応させることである。二官能性試薬での誘導体化が、例えばＰＲＯポリペプチドを水不溶性支持体マトリクスあるいは抗-ＰＲＯ抗体の精製方法又はその逆で用いるための表面に架橋させるのに有用である。通常用いられる架橋剤は、例えば、１，１-ビス（ジアゾアセチル）-２-フェニルエタン、グルタルアルデヒド、Ｎ-ヒドロキシスクシンイミドエステル、例えば４-アジドサリチル酸、３，３’-ジチオビス（スクシンイミジルプロピオネート）等のジスクシンイミジルエステルを含むホモ二官能性イミドエステル、ビス-Ｎ-マレイミド-１，８-オクタン等の二官能性マレイミド、及びメチル-３-[(ｐ-アジドフェニル)-ジチオ］プロピオイミダート等の試薬を含む。

他の修飾は、グルタミニル及びアスパラギニル残基の各々対応するグルタミル及びアスパルチルへの脱アミノ化、プロリン及びリシンのヒドロキシル化、セリル又はトレオニル残基のヒドロキシル基のリン酸化、リシン、アルギニン、及びヒスチジン側鎖のα-アミノ基のメチル化[T.E. Creighton, Proteins: Structure and Molecular Properties, W.H. Freeman & Co., San Francisco, pp.79-86 (1983)]、Ｎ-末端アミンのアセチル化、及び任意のＣ-末端カルボキシル基のアミド化を含む。

【０１２８】

本発明の範囲内に含まれるＰＲＯポリペプチドの共有結合的修飾の他の型は、ポリペプチドの天然グリコシル化パターンの変更を含む。「天然グリコシル化パターンの変更」とは、ここで意図されるのは、天然配列ＰＲＯポリペプチドに見られる一又は複数の炭水化物部分の欠失（存在するグリコシル化部位の除去又は化学的及び／又は酵素的手段によるグリコシル化の削除のいずれかによる）、及び／又は天然配列ＰＲＯポリペプチドに存在しない一又は複数のグリコシル化部位の付加を意味する。さらに、この文節は、存在する種々の炭水化物部分の性質及び割合の変化を含む、天然タンパク質のグリコシル化における定性的変化を含む。

ＰＲＯポリペプチドへのグリコシル化部位の付加はアミノ酸配列の変更を伴ってもよい。この変更は、例えば、一又は複数のセリン又はトレオニン残基の天然配列ＰＲＯポリペプチド（Ｏ-結合グリコシル化部位）への付加、又は置換によってなされてもよい。ＰＲ

Ｏアミノ酸配列は、場合によっては、ＤＮＡレベルでの変化、特に、ＰＲＯポリペプチドをコードするＤＮＡを予め選択された塩基において変異させ、所望のアミノ酸に翻訳されるコドンを生成させることを通して変更されてもよい。

【０１２９】

ＰＲＯポリペプチド上に炭水化物部分の数を増加させる他の手段は、グリコシドのポリペプチドへの化学的又は酵素的結合による。このような方法は、この技術分野において、例えば、1987年9月11日に発行されたWO 87/05330、及びAplin及びWriston, CRC Crit. Rev. Biochem., pp. 259-306 (1981)に記載されている。

ＰＲＯポリペプチド上に存在する炭水化物部分の除去は、化学的又は酵素的に、あるいはグルコシル化の標的として提示されたアミノ酸残基をコードするコドンの変異的置換によってなすことができる。化学的脱グリコシル化技術は、この分野で知られており、例えば、Hakimuddin等, Arch. Biochem. Biophys., 259:52 (1987)により、及びEdge等, Anal. Biochem., 118: 131 (1981)により記載されている。ポリペプチド上の炭水化物部分の酵素的切断は、Thotakura等, Meth. Enzymol. 138:350 (1987)に記載されているように、種々のエンド及びエキソグリコシダーゼを用いることにより達成される。

ＰＲＯポリペプチドの共有結合的修飾の他の型は、ＰＲＯポリペプチドの、種々の非タンパク質様ポリマー、例えばポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、又はポリオキシアルキレンの一つへの、米国特許第4,640,835号；第4,496,689号；第4,301,144号；第4,670,417号；第4,791,192号又は第4,179,337号に記載された方法での結合を含む。

【０１３０】

また、本発明のＰＲＯポリペプチドは、他の異種ポリペプチド又はアミノ酸配列に融合したＰＲＯを含むキメラ分子を形成する方法で修飾してもよい。

一実施態様では、このようなキメラ分子は、抗-タグ抗体が選択的に結合できるエピトープを提供するタグポリペプチドとＰＲＯポリペプチドとの融合を含む。エピトープタグは、一般的にはＰＲＯのアミノ-又はカルボキシル-末端に位置する。このようなＰＲＯポリペプチドのエピトープタグ形態の存在は、タグポリペプチドに対する抗体を用いて検出することができる。また、エピトープタグの提供は、抗-タグ抗体又はエピトープタグに結合する他の型の親和性マトリクスを用いたアフィニティ精製によってＰＲＯポリペプチドを容易に精製できるようにする。種々のタグポリペプチド及びそれら各々の抗体はこの分野で良く知られている。例としては、ポリ-ヒスチジン（poly-his）又はポリ-ヒスチジン-グリシン（poly-his-gly）タグ；flu HAタグポリペプチド及びその抗体１２ＣＡ５［Field等, Mol. Cell. Biol., 8:2159-2165 (1988)］；c-mycタグ及びそれに対する８Ｆ９、３Ｃ７、６Ｅ１０、Ｇ４、Ｂ７及び９Ｅ１０抗体［Evan等, Molecular and Cellular Biology, 5:3610-3616 (1985)］；及び単純ヘルペスウイルス糖タンパク質Ｄ（gD）タグ及びその抗体［Paborsky等, Protein Engineering, 3(6):547-553 (1990)］を含む。他のタグポリペプチドは、フラッグペプチド［Hopp等, BioTechnology, 6:1204-1210 (1988)］；ＫＴ３エピトープペプチド［Martin等, Science, 255:192-194 (1992)］；α-チューブリンエピトープペプチド［Skinner等, J. Biol. Chem., 266:15163-15166 (1991)］；及びＴ７遺伝子１０タンパク質ペプチドタグ［Lutz-Freyermuth等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6393-6397 (1990)］を含む。

これに換わる実施態様では、キメラ分子はＰＲＯと免疫グロブリン又は免疫グロブリンの特定領域との融合体を含んでもよい。キメラ分子の二価形態（「イムノアドヘシン」とも呼ばれる）については、そのような融合体はＩｇＧ分子のＦｃ領域であり得る。Ｉｇ融合体は、好ましくはＩｇ分子内の少なくとも１つの可変領域に換えてＰＲＯポリペプチドの可溶化（膜貫通ドメイン欠失又は不活性化）形態を含む。特に好ましい実施態様では、免疫グロブリン融合体は、ＩｇＧ１分子のヒンジ、ＣＨ２及びＣＨ３、又はヒンジ、ＣＨ１、ＣＨ２及びＣＨ３領域を含む。免疫グロブリン融合体の製造については、1995年6月27日発行の米国特許第5,428,130号を参照のこと。

【０１３１】

Ｃ．　ＰＲＯポリペプチドの調製

本発明は、本出願においてＰＲＯと称される、新規に同定及び単離されたポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を提供するものである。特に、ＰＲＯポリペプチドをコードするｃＤＮＡは、以下の実施例にさらに詳細に開示するようにして、同定され単離された。別々の発現ラウンドで産生されるタンパク質は異なるＰＲＯ番号が付与されるが、ＵＮＱ番号は任意の与えられたＤＮＡ及びコード化タンパク質に独特であり変わることはない。しかしながら、簡単にする目的で、本明細書においては、ＤＮＡ３５９１６-１１６１、ＤＮＡ２３３３９-１１３０、ＤＮＡ１６４５１-１３８８、ＤＮＡ２７８６５-１０９１、ＤＮＡ２７８６４-１１５５、ＤＮＡ２８４９７-１１３０、ＤＮＡ２６８４７-１３９５、ＤＮＡ３０９４２-１１３４、ＤＮＡ３２２８６-１１９１、ＤＮＡ３３０９４-１１３１、ＤＮＡ３３２２１-１１３３、ＤＮＡ３４４３４-１１３９、ＤＮＡ３５５５８-１１６７、ＤＮＡ３５６３８-１１４１、ＤＮＡ３３４７３-１１７６、ＤＮＡ３８２６０-１１８０、ＤＮＡ３９９６９-１１８５、ＤＮＡ４０６２８-１２１６、ＤＮＡ３５５９５-１２２８、ＤＮＡ４０９８１-１２３４、ＤＮＡ４７４７０-１１３０-Ｐ１、ＤＮＡ４７３６５-１２０６、ＤＮＡ４４１８４-１３１９、ＤＮＡ４８６１３-１２６８、ＤＮＡ２９１０１-１１２２、ＤＮＡ４９６４６-１３２７、ＤＮＡ４９８２９-１３４６、ＤＮＡ５６４０５-１３５７、ＤＮＡ５６３５２-１３５８、ＤＮＡ５９２０５-１４２１、ＤＮＡ５３９７４-１４０１、ＤＮＡ５７６８９-１３８５、ＤＮＡ６０６１５-１４８３、ＤＮＡ５９８１４-１４８６、ＤＮＡ５９８４６-１５０３、ＤＮＡ６４８８３-１５２６、ＤＮＡ６４８８５-１５２９、ＤＮＡ６４８８９-１５４１、ＤＮＡ６４９０３-１５５３、ＤＮＡ６４９０５-１５５８、ＤＮＡ６５４０９-１５６６、ＤＮＡ６５４０６-１５６７、ＤＮＡ６１８７３-１５７３、ＤＮＡ６４９６６-１５７５、ＤＮＡ６７３００-１６０５、ＤＮＡ６８８７２-１６２０、ＤＮＡ７６５３８-１６７０、又はＤＮＡ３３０８７にコードされるタンパク質、並びにさらなる天然相同体、及びＰＲＯの先の定義に含まれる変異体は、由来又は調製方法とは無関係に、各々「ＰＲＯ」と称される。

以下の説明は、主として、ＰＲＯポリペプチドをコードする核酸を含むベクターで形質転換又は形質移入された細胞を培養することによりＰＲＯポリペプチドを生産する方法に関する。もちろん、当該分野においてよく知られている他の方法を用いてＰＲＯを調製することができると考えられる。例えば、ＰＲＯポリペプチド配列、又はその一部は、固相技術を用いた直接ペプチド合成によって生産してもよい。例えば、Stewart等, Solid-Phase Peptide Synthesis,(W.H. Freeman Co., San Francisco, CA 1969)；Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 85:2149-2154 (1963)参照。手動技術又は自動によるインビトロタンパク質合成を行ってもよい。自動合成は、例えば、アプライド・バイオシステムズ・ペプチド合成機（Foster City, CA）を用いて、製造者の指示により実施してもよい。ＰＲＯポリペプチドの種々の部分は、別々に化学的に合成され、化学的又は酵素的方法を用いて結合させて全長ＰＲＯポリペプチドを生産してもよい。

【０１３２】

ｉ．ＰＲＯポリペプチドをコードするＤＮＡの単離

ＰＲＯポリペプチドをコードするＤＮＡは、ＰＲＯポリペプチドをコードするｍＲＮＡを保有していてそれを検出可能なレベルで発現すると考えられる組織から調製されたｃＤＮＡライブラリから得ることができる。従って、ヒトＰＲＯポリペプチドをコードするＤＮＡは、実施例に記載されるように、ヒトの組織から調製されたｃＤＮＡライブラリから簡便に得ることができる。またＰＲＯポリペプチドをコードする遺伝子は、ゲノムライブラリから又はオリゴヌクレオチド合成により得ることもできる。

ライブラリは、対象となる遺伝子あるいはそれによりコードされるタンパク質を同定するために設計されたプローブ(ＰＲＯポリペプチドに対する抗体又は少なくとも約２０－８０塩基のオリゴヌクレオチド等)によってスクリーニングできる。選択されたプローブによるｃＤＮＡ又はゲノムライブラリのスクリーニングは、例えばSambrook等, 上掲に記載されている標準的な手順を使用して実施することができる。所望のＰＲＯをコードする遺伝子を単離する他の方法はＰＣＲ法を使用するものである。Sambrook等, 上掲；Dieffe

nbach等，PCR Primer：A Laboratory Manual(New York：Cold Spring Harbor Laboratory Press，1995)。

【０１３３】

下記の実施例には、ｃＤＮＡライブラリのスクリーニング技術を記載している。プローブとして選択されたオリゴヌクレオチド配列は、充分な長さで、疑陽性が最小化されるよう充分に明瞭でなければならない。オリゴヌクレオチドは、スクリーニングされるライブラリ内のＤＮＡとのハイブリダイゼーション時に検出可能であるように標識されていることが好ましい。標識化の方法は当該分野において良く知られており、^{32}Ｐ標識されたＡＴＰのような放射線標識、ビオチン化あるいは酵素標識の使用が含まれる。中程度の厳密性及び高度の厳密性を含むハイブリダイゼーション条件は、上掲のSambrook等に与えられている。

このようなライブラリースクリーニング法において同定された配列は、Genbank等の公共データベース又は個人の配列データベースに寄託され公衆に利用可能とされている周知の配列と比較及びアラインメントすることができる。分子の決定された領域内又は全長配列に渡っての（アミノ酸又は核酸レベルのいずれかでの）配列同一性は、相同性を測定する種々のアルゴリズムを使用する、コンピュータソフトウエアプログラム、例えばALIGN、DNAstar及びINHERITにより決定することができる。

タンパク質コード化配列を有する核酸は、初めてここで開示された推定アミノ酸配列を使用し、また必要ならば、ｃＤＮＡに逆転写されなかったｍＲＮＡの生成中間体及び先駆物質を検出する上掲のSambrook等に記述されているような従来のプライマー伸展法を使用し、選択されたｃＤＮＡ又はゲノムライブラリをスクリーニングすることにより得られる。

【０１３４】

ｉｉ．宿主細胞の選択及び形質転換

宿主細胞を、ここに記載したＰＲＯポリペプチド生産のための発現又はクローニングベクターで形質移入又は形質転換し、プロモーターを誘導し、形質転換体を選択し、又は所望の配列をコードする遺伝子を増幅するために適当に変性された常套的栄養培地で培養する。培養条件、例えば培地、温度、ｐＨ等々は、過度の実験をすることなく当業者が選ぶことができる。一般に、細胞培養の生産性を最大にするための原理、プロトコール、及び実用技術は、Mammalian Cell Biotechnology: A Practical Approach, M.Butler編 (IRL Press, 1991)及びSambrook等，上掲に見出すことができる。

形質移入の方法、例えば、$CaPO_4$処理及びエレクトロポレーションは当業者に知られている。用いられる宿主細胞に応じて、その細胞に対して適した標準的な方法を用いて形質転換はなされる。前掲のSambrook等に記載された塩化カルシウムを用いるカルシウム処理又はエレクトロポレーションは、原核生物又は実質的な細胞壁障壁を含む他の細胞に対して一般に用いられる。アグロバクテリウム・トゥメファシエンス(Agrobacterium tumefaciens)による感染が、Shaw等，Gene，23: 315 (1983)及び1989年6月29日公開の国際特許出願第ＷＯ89/05859号に記載されたように、ある種の植物細胞の形質転換に用いられる。このような細胞壁のない哺乳動物の細胞に対しては、Graham及びvan der Eb, Virology，52: 456-457 (1978)のリン酸カルシウム沈降法が用いられる。哺乳動物細胞の宿主系形質転換の一般的な態様は米国特許第4,399,216号に記載されている。酵母中への形質転換は、典型的には、Van solingen等，J. Bact.，130: 946 (1977)及びHsiao等，Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)，76:3829 (1979)の方法に従って実施される。しかしながら、ＤＮＡを細胞中に導入する他の方法、例えば、核マイクロインジェクション、エレクトロポレーション、無傷の細胞、又はポリカチオン、例えばポリブレン、ポリオルニチン等を用いる細菌プロトプラスト融合もまた用いることができる。哺乳動物細胞を形質転換するための種々の技術については、Keown等，Methods in Enzymology，185: 527-537 (1990)及び Mansour等，Nature，336: 348-352 (1988)を参照のこと。

【０１３５】

ここに記載のベクターにＤＮＡをクローニングあるいは発現するために適切な宿主細胞

は、原核生物、酵母菌、又は高等真核生物細胞を含む。適切な原核生物は、限定するものではないが、真正細菌、例えばグラム陰性又はグラム陽性生物体、例えば大腸菌のような腸内細菌科を含む。種々の大腸菌株が公衆に利用可能であり、例えば、大腸菌Ｋ１２株ＭＭ２９４（ATCC31,446）；大腸菌Ｘ１７７６（ATCC31,537）；大腸菌株Ｗ３１１０（ATCC 27,325）及びＫ５７７２（ATCC53,635）である。他の好ましい原核動物宿主細胞は、大腸菌、例えば、E. coli、エンテロバクター、エルビニア(Erwinia)、クレブシエラ(Klebsiella)、プロテウス(Proteus)、サルモネラ、例えば、ネズミチフス菌、セラチア、例えば、セラチアマルセサンス(Serratia marcescans)、及び赤痢菌、並びに桿菌、例えばバシリスブチリス(B. subtilis)及びバシリリチェニフォルミス(B. licheniformis)（例えば、1989年4月12日発行のDD 266,710に記載されたバシリリチェニフォルミス４１Ｐ）、シュードモナス、例えば緑膿筋及びストレプトマイセスなどの腸内細菌科を含む。これらの例は限定ではなく例示である。株Ｗ３１１０は、組換えＤＮＡ生産発行のための共通の宿主株であるので一つの特に好ましい宿主又は親宿主である。好ましくは、宿主細胞は最小量のタンパク質分解酵素を分泌する。例えば、株Ｗ３１１０は、宿主に外来のタンパク質をコードする遺伝子における遺伝子変異をするように修飾してもよく、そのような宿主の例としては、完全な遺伝子型ｔｏｎＡを有する大腸菌Ｗ３１１０株１Ａ２；完全な遺伝子型ｔｏｎＡ　ｐｔｒ３を有する大腸菌Ｗ３１１０株９Ｅ４；完全な遺伝子型ｔｏｎＡ　ｐｒｔ３　ｐｈｏＡ　Ｅ１５　(ａｒｇＦ-ｌａｃ)１６９　ｄｅｇＰ　ｏｍｐＴkan^rを有する大腸菌Ｗ３１１０株２７Ｃ７（ATCC 55,244）；完全な遺伝子型ｔｏｎＡ　ｐｔｒ３　ｐｈｏＡ　Ｅ１５　(ａｌｇＦ-ｌａｃ)１６９　ｄｅｇＰ　ｏｍｐＴ　ｒｂｓ７ｉｌ　ｖＧkan^rを有する大腸菌Ｗ３１１０株３７Ｄ６；非カナマイシン耐性ｄｅｇＰ欠失変異を持つ３７Ｄ６株である大腸菌Ｗ３１１０株４０Ｂ４；及び1990年8月7日発行の米国特許第4,946,783号に開示された変異周辺質プロテアーゼを有する大腸菌株を含む。あるいは、クローニングのインビトロ法、例えばＰＣＲ又は他の核酸ポリメラーゼ反応が好ましい。

【０１３６】

原核生物に加えて、糸状菌又は酵母菌のような真核微生物は、ＰＲＯコード化ベクターのための適切なクローニング又は発現宿主である。サッカロミセス・セレヴィシアは、通常用いられる下等真核生物宿主微生物である。他に、シゾサッカロミセスプロンブ(Schizosaccharomyces prombe)（Beach及びNurse, Nature, 290: 140 [1981]; 1985年5月2日発行のEP 139,383）；クルベロミセスホスツ(Kluveromyces hosts)（米国特許第4,943,529号; Fleer等, Bio/Technology, 9: 968-975 (1991)）、例えばケー.ラクチス(K. lactis)（MW98-8C, CBS683, CBS4574; Louvencourt等, J. Bacteriol. 737 [1983]）、ケー.フラギリス(K. fragilis)（ATCC 12,424）、ケー.ブルガリクス(K. bulgaricus)（ATCC 16,045）、ケー.ウィケラミイ(K. wickeramii)（ATCC 24,178）、ケー.ワルチイ(K. waltii)（ATCC 56,500）、ケー.ドロソフィラルム(K. drosophilarum)（ATCC 36,906; Van den Berg等, Bio/Technology, 8: 135 (1990)）、ケー.テモトレランス(K. themotolerans)及びケー.マルキシアナス(K. marxianus)；ヤロウィア(yarrowia)（EP 402,226）；ピッチャパストリス(Pichia pastoris)（EP 183,070; Sheekrishna等, J. Basic Microbiol, 28: 265-278 [1988]）；カンジダ；トリコデルマレーシア(reesia)（EP 244,234）；アカパンカビ（Case等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76: 5259-5263 [1979]）；シュワニオマイセス(schwanniomyces)、例えばシュワニオマイセスオクシデンタリス(occidentalis)（1990年10月31日発行のEP 394,538）；及び糸状真菌、例えば、ニューロスポラ、ペニシリウム、トリポクラジウム(Tolypocladium)（1991年1月10日発行のWO 91/00357）；及びコウジ菌、例えば偽巣性コウジ菌（Ballance等, Biochem. Biophys. Res. Commun., 112: 284-289 [1983]; Tilburn等, Gene, 26: 205-221 [1983]; Yelton等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 1470-1474 [1984]）及びクロカビ（Kelly及びHynes, EMBO J., 4: 475-479 [1985]）が含まれる。ここで好ましいメチロトロピック(methylotropic)酵母は、これらに限られないが、ハンセヌラ(Hansenula)、カンジダ、クロエケラ(Kloeckera)、ピチア(Pichia)、サッカロミセス、トルロプシス(Torulopsis)、及びロドトルラ(Rhodotorula)か

らなる属から選択されるメタノールで成長可能な酵母を含む。この酵母の分類の例示である特定の種のリストは、C. Anthony, The Biochemistry of Methylotrophs, 269 (1982)に記載されている。

グリコシル化ＰＲＯポリペプチドをコードする核酸の発現に適切な宿主細胞は、多細胞生物から誘導される。無脊椎動物細胞の例としては、ショウジョウバエＳ２及びスポドスペラＳｆ９等の昆虫細胞並びに植物細胞が含まれる。有用な哺乳動物宿主株化細胞の例は、チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）及びＣＯＳ細胞を含む。より詳細な例は、ＳＶ４０によって形質転換されたサル腎臓ＣＶ１株 (COS-7, ATCC CRL 1651);ヒト胚腎臓株（293又は懸濁培養での増殖のためにサブクローン化された293細胞、Graham等, J. Gen Virol., 36:59 (1977)）;チャイニーズハムスター卵巣細胞／-ＤＨＦＲ(CHO, Urlaub及びChasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216 (1980));マウスのセルトリ細胞（TM4, Mather, Biol. Reprod., 23:243-251 (1980)）；ヒト肺細胞 (W138, ATCC CCL 75); ヒト肝細胞 (Hep G2, HB 8065); 及びマウス乳房腫瘍細胞 (MMT 060562, ATTC CCL51)を含む。適切な宿主細胞の選択は、この分野の技術常識内にある。

【０１３７】

ｉｉｉ．複製可能なベクターの選択及び使用

ＰＲＯポリペプチドをコードする核酸(例えば、ｃＤＮＡ又はゲノムＤＮＡ)は、クローニング(ＤＮＡの増幅)又は発現のために複製可能なベクター内に挿入される。様々なベクターが公的に入手可能である。ベクターは、例えば、プラスミド、コスミド、ウイルス粒子、又はファージの形態とすることができる。適切な核酸配列が、種々の手法によってベクターに挿入される。一般に、ＤＮＡはこの分野で周知の技術を用いて適当な制限エンドヌクレアーゼ部位に挿入される。ベクター成分としては、一般に、これらに制限されるものではないが、配列が分泌されるならば、一又は複数のシグナル配列、複製開始点、一又は複数のマーカー遺伝子、エンハンサーエレメント、プロモーター、及び転写終結配列を含む。これらの成分の一又は複数を含む適当なベクターの作成には、当業者に知られた標準的なライゲーション技術を用いる。

ＰＲＯポリペプチドは組換え手法によって直接的に産生されるだけではなく、シグナル配列あるいは成熟タンパク質あるいはポリペプチドのＮ-末端に特異的切断部位を有する他のポリペプチドである異種性ポリペプチドとの融合ペプチドとしても生産される。一般に、シグナル配列はベクターの成分であるか、ベクターに挿入されるＰＲＯポリペプチドをコードするＤＮＡの一部である。シグナル配列は、例えばアルカリホスファターゼ、ペニシリナーゼ、ｌｐｐあるいは熱安定性エンテロトキシンＩＩリーダーの群から選択される原核生物シグナル配列であってよい。酵母の分泌に関しては、シグナル配列は、例えば酵母インベルターゼリーダー、アルファ因子リーダー(酵母菌属(Saccharomyces)及びクルイベロマイシス(Kluyveromyces)α因子リーダーを含み、後者は米国特許第5,010,182号に記載されている)、又は酸ホスフォターゼリーダー、白体(C.albicans)グルコアミラーゼリーダー(1990年4月4日発行のEP362179)、又は1990年11月15日に公開されたWO 90/13646に記載されているシグナルであり得る。哺乳動物細胞の発現においては、哺乳動物シグナル配列は、同一あるいは関連ある種の分泌ポリペプチド由来のシグナル配列並びにウイルス分泌リーダーのようなタンパク質の直接分泌に使用してもよい。

【０１３８】

発現及びクローニングベクターは共に一又は複数の選択された宿主細胞においてベクターの複製を可能にする核酸配列を含む。そのような配列は多くの細菌、酵母及びウイルスに対してよく知られている。プラスミドｐＢＲ３２２に由来する複製開始点は大部分のグラム陰性細菌に好適であり、２μプラスミド開始点は酵母に適しており、様々なウイルス開始点(ＳＶ４０、ポリオーマ、アデノウイルス、ＶＳＶ又はＢＰＶ)は哺乳動物細胞におけるクローニングベクターに有用である。

発現及びクローニングベクターは、典型的には、選択可能マーカーとも称される選択遺伝子を含む。典型的な選択遺伝子は、(a)アンピシリン、ネオマイシン、メトトレキセートあるいはテトラサイクリンのような抗生物質あるいは他の毒素に耐性を与え、(b)栄養

要求性欠陥を補い、又は(c)例えばバシリに対する遺伝子コードD-アラニンラセマーゼのような、複合培地から得られない重要な栄養素を供給するタンパク質をコードする。

哺乳動物細胞に適切な選択可能マーカーの例は、ＤＨＦＲあるいはチミジンキナーゼのように、ＰＲＯポリペプチドをコードする核酸を取り込むことのできる細胞成分を同定することのできるものである。野生型ＤＨＦＲを用いた場合の好適な宿主細胞は、Urlaub等により, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216 (1980)に記載されているようにして調製され増殖されたＤＨＦＲ活性に欠陥のあるＣＨＯ株化細胞である。酵母菌中での使用に好適な選択遺伝子は酵母プラスミドＹＲｐ７に存在するｔｒｐ１遺伝子である。Stinchcomb等, Nature, 282：39(1979)；Kingman等, Gene, 7：141(1979)；Tschemper等, Gene, 10：157(1980)。ｔｒｐ１遺伝子は、例えば、ＡＴＣＣ番号４４０７６あるいはＰＥＰ４-１のようなトリプトファン内で成長する能力を欠く酵母菌の突然変異株に対する選択マーカーを提供する。Jones, Genetics, 85:12 (1977)。

【０１３９】

発現及びクローニングベクターは、通常、ＰＲＯポリペプチドをコードする核酸配列に作用可能に結合し、ｍＲＮＡ合成を制御するプロモーターを含む。種々の可能な宿主細胞により認識される好適なプロモーターが知られている。原核生物宿主での使用に好適なプロモーターはβ-ラクタマーゼ及びラクトースプロモーター系［Cahng等, Nature, 275:615 (1978)； Goeddel等, Nature, 281:544 (1979)］、アルカリホスファターゼ、トリプトファン(trp)プロモーター系［Goeddel, Nucleic Acids Res., 8:4057 (1980); EP 36,776］、及びハイブリッドプロモーター、例えばｔａｃプロモーター［deBoer 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80:21-25 (1983)］を含む。細菌系で使用するプロモータもまたＰＲＯポリペプチドをコードするＤＮＡと作用可能に結合したシャイン・ダルガーノ(S.D.)配列を有する。

酵母宿主と共に用いて好適なプロモーター配列の例としては、３-ホスホグリセラートキナーゼ［Hitzeman 等, J. Biol. Chem., 255:2073 (1980)］又は他の糖分解酵素［Hess 等, J. Adv. Enzyme Reg., 7:149 (1968)；Holland, Biochemistry, 17：4900(1987)］、例えばエノラーゼ、グリセルアルデヒド-３-リン酸デヒドロゲナーゼ、ヘキソキナーゼ、ピルビン酸デカルボキシラーゼ、ホスホフルクトキナーゼ、グルコース-６-リン酸イソメラーゼ、３-ホスホグリセレートムターゼ、ピルビン酸キナーゼ、トリオセリン酸イソメラーゼ、ホスホグルコースイソメラーゼ、及びグルコキナーゼが含まれる。

他の酵母プロモーターとしては、成長条件によって転写が制御される付加的効果を有する誘発的プロモーターであり、アルコールデヒドロゲナーゼ２、イソチトクロムＣ、酸ホスファターゼ、窒素代謝と関連する分解性酵素、メタロチオネイン、グリセルアルデヒド-３-リン酸デヒドロゲナーゼ、及びマルトース及びガラクトースの利用を支配する酵素のプロモーター領域がある。酵母菌での発現に好適に用いられるベクターとプロモータはEP 73,657に更に記載されている。

【０１４０】

哺乳動物の宿主細胞におけるベクターからＰＲＯ核酸の転写は、例えば、ポリオーマウィルス、伝染性上皮腫ウィルス(1989年7月5日公開のUK 2,211,504)、アデノウィルス(例えばアデノウィルス２)、ウシ乳頭腫ウィルス、トリ肉腫ウィルス、サイトメガロウィルス、レトロウィルス、Ｂ型肝炎ウィルス及びサルウィルス４０(SV40)のようなウィルスのゲノムから得られるプロモーター、異種性哺乳動物プロモーター、例えばアクチンプロモーター又は免疫グロブリンプロモーター、及び熱衝撃プロモーターから得られるプロモーターによって、このようなプロモーターが宿主細胞系に適合し得る限り制御される。

より高等の真核生物による所望のＰＲＯポリペプチドをコードするＤＮＡの転写は、ベクター中にエンハンサー配列を挿入することによって増強され得る。エンハンサーは、通常は約１０から３００塩基対で、プロモーターに作用してその転写を増強するＤＮＡのシス作動要素である。哺乳動物遺伝子由来の多くのエンハンサー配列が現在知られている(グロビン、エラスターゼ、アルブミン、α-フェトプロテイン及びインスリン)。しかしながら、典型的には、真核細胞ウィルス由来のエンハンサーが用いられるであろう。例とし

ては、複製起点の後期側のＳＶ４０エンハンサー(１００－２７０塩基対)、サイトメガロウィルス初期プロモーターエンハンサー、複製起点の後期側のポリオーマエンハンサー及びアデノウィルスエンハンサーが含まれる。エンハンサーは、ＰＲＯポリペプチドをコードする配列の５’又は３’位でベクター中にスプライシングされ得るが、好ましくはプロモーターから５’位に位置している。

また真核生物宿主細胞(酵母、真菌、昆虫、植物、動物、ヒト、又は他の多細胞生物由来の有核細胞)に用いられる発現ベクターは、転写の終結及びｍＲＮＡの安定化に必要な配列も含む。このような配列は、真核生物又はウィルスのＤＮＡ又はｃＤＮＡの通常は５’、時には３’の非翻訳領域から取得できる。これらの領域は、ＰＲＯポリペプチドをコードするｍＲＮＡの非翻訳部分にポリアデニル化断片として転写されるヌクレオチドセグメントを含む。

組換え脊椎動物細胞培養でのＰＲＯポリペプチドの合成に適応化するのに適切な他の方法、ベクター及び宿主細胞は、Gething等, Nature, 293:620-625 (1981); Mantei等, Nature, 281:40-46 (1979); EP 117,060; 及びEP 117,058に記載されている。

【０１４１】

ｉｖ．遺伝子増幅／発現の検出

遺伝子の増幅及び／又は発現は、ここで提供された配列に基づき、適切に標識されたプローブを用い、例えば、従来よりのサザンブロット法、ｍＲＮＡの転写を定量化するノーザンブロット法［Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA,77:5201-5205 (1980)］、ドットブロット法(ＤＮＡ分析)、又はインサイツハイブリダイゼーション法によって、直接的に試料中で測定することができる。あるいは、ＤＮＡ二本鎖、ＲＮＡ二本鎖及びＤＮＡ－ＲＮＡハイブリッド二本鎖又はＤＮＡ-タンパク二本鎖を含む、特異的二本鎖を認識することができる抗体を用いることもできる。次いで、抗体を標識し、アッセイを実施することができ、ここで二本鎖は表面に結合しており、その結果二本鎖の表面での形成の時点でその二本鎖に結合した抗体の存在を検出することができる。

あるいは、遺伝子の発現は、遺伝子産物の発現を直接的に定量する免疫学的な方法、例えば細胞又は組織切片の免疫組織化学的染色及び細胞培養又は体液のアッセイによって測定することもできる。試料液の免疫組織化学的染色及び／又はアッセイに有用な抗体は、モノクローナルでもポリクローナルでもよく、任意の哺乳動物で調製することができる。簡便には、抗体は、天然配列ＰＲＯポリペプチドに対して、又はここで提供されるＤＮＡ配列をベースとした合成ペプチドに対して、又はＰＲＯポリペプチドをコードするＤＮＡに融合し特異的抗体エピトープをコードする外因性配列に対して調製され得る。

【０１４２】

ｖ．ポリペプチドの精製

ＰＲＯポリペプチドの形態は、培地又は宿主細胞の溶菌液から回収することができる。膜結合性であるならば、適切な洗浄液(例えばトリトン-X^{TM}１００)又は酵素的切断を用いて膜から引き離すことができる。ＰＲＯポリペプチドの発現に用いられる細胞は、凍結融解サイクル、超音波処理、機械的破壊、又は細胞溶解剤などの種々の化学的又は物理的手段によって破壊することができる。

ＰＲＯポリペプチドを、組換え細胞タンパク又はポリペプチドから精製することが望ましい。適切な精製手順の例である次の手順により精製される：すなわち、イオン交換カラムでの分画；エタノール沈殿；逆相ＨＰＬＣ；シリカ又はカチオン交換樹脂、例えばＤＥＡＥによるクロマトグラフィー；クロマトフォーカシング；ＳＤＳ-ＰＡＧＥ；硫酸アンモニウム沈殿；例えばセファデックスＧ-７５を用いるゲル濾過;ＩｇＧのような汚染物を除くプロテインＡセファロースカラム；及びＰＲＯポリペプチドのエピトープタグ形態を結合させる金属キレート化カラムである。この分野で知られ、例えば、Deutcher, Methodes in Enzymology, 182 (1990)；Scopes, Protein Purification: Principles and Practice, (Springer-Verlag, New York 1982)に記載された多くのタンパク質精製方法を用いることができる。選ばれる精製過程は、例えば、用いられる生産方法及び特に生産される特定のＰＲＯの性質に依存する。

【０１４３】
Ｄ．　ＰＲＯポリペプチドの用途
ｉ．心臓血管、内皮及び血管形成活性のアッセイ
種々のアッセイがここで記載されたポリペプチドの心臓血管、内皮及び血管形成活性を試験するために使用可能である。このようなアッセイは、下記の実施例に記載されるもの含む。
米国特許第5,773,414号に開示されているエンドセリンアンタゴニスト活性を試験するアッセイには、レセプターアッセイにおけるポリペプチドのヨード化エンドセリン-Ｉ結合を阻害する能力を試験するラット心室結合アッセイ、ウサギ腎動脈平滑筋細胞を使用し、放射能標識されたエンドセリン-Ｉの無傷細胞結合性を試験するエンドセリンレセプタ結合アッセイ、機能活性が第２のメッセッンジャーの細胞内レベルを測定することにより、Ｒａｔ-Ｉ細胞内で測定されるイノシトールホスファート蓄積アッセイ、雄のニュージーランドウサギの内皮を使用するインビボ(単離された管)研究、及びＳＤラットを使用するインビトロ研究において、添加化合物の、培養血管平滑筋内に放出されるエンドセリン刺激アラキドン酸を低減させる能力を測定するアラキドン酸放出アッセイが含まれる。
【０１４４】
組織生成活性のアッセイには、限定するものではないが、WO95/16035(骨、軟骨、腱)、；WO95/05846(神経、ニューロン)、及びWO91/07491(皮膚、内皮)に記載されているものが含まれる。
創傷治癒活性のアッセイには、例えば、Eaglstein及びMertz, J. Invest. Dermatol., 71：382-384(1978)の論文で改変されている、Winter, Epidermal Wound Healing, Maibach, HI及びRovee, DT,編(Year Book Medical Publishers. Inc., Chicago),pp71-112に記載されているものが含まれる。
エンドセリンB_1(ＥＴB_1)レセプターポリペプチドに結合し、シグナル変換活性を調節するＰＲＯポリペプチドに関連したテスト用分子のスクリーニングアッセイは、米国特許第5,773,223号に記載されたようにして、エンドセリンB_1レセプターポリペプチドをコードするＤＮＡで形質転換した宿主細胞を提供し、試験用候補薬に細胞を曝露し、エンドセリンB_1レセプターシグナル変換活性を測定する。
幾つかの心臓肥大アッセイが存在する。インビトロアッセイには、成体ラット心臓ミオサイトの拡散の誘導が含まれる。このアッセイにおいて、心室ミオサイトは、Piper等,「Adult ventricular rat heart muscle cells」, Cell Culture Techniques in Heart and Vessel Research. H.M. Piper. ed(Berlin：Springer-Verlag,1990),pp.36-60により詳細に記載されている手順を改変したものに本質的に従って、単一の(雄のSprague-Dawley)ラットから単離される。この手順により、成長心室ミオサイトの単離、及び桿体フェノタイプ細胞の長期間にわたる培養が可能になる。フェニレフリンとプロスタグランジン$F_{2\alpha}$(ＰＧ$F_{2\alpha}$)は、これら成長細胞の転移反応を誘発することが示されている。種々の心臓肥大の潜在的インヒビターによる、ＰＧ$F_{2\alpha}$又はＰＧ$F_{2\alpha}$類似体(例えばフルプロステノール)及びフェニレフリンにより誘発されるミオサイト転移阻害を次いで試験する。
【０１４５】
インビボアッセイの一例は、インビボにおけるフルプロステノールにより誘発される心臓肥大の阻害をテストすることである。この薬理学的モデルは、フルプロステノール(ＰＧ$F_{2\alpha}$のアゴニスト類似体)の皮下注射によりラット(例えば、雄のWistar又はＳprague-Dawley)において誘発された心臓肥大を阻害するＰＲＯポリペプチドの能力を試験するものである。心筋梗塞により誘発される病的な心臓肥大のあるラットにおいて、心筋内のＰＧ$F_{2\alpha}$が検出可能なレベルまで慢性的に上昇していることが知られている。Lai等, Am. J. Physiol.(Heart Circ. Physiol.), 271：H2197-H2208(1996)。従って、インビボでの心筋成長におけるフルプロステノールの影響を阻害可能な因子は、心臓肥大の治療に有用である可能性がある。心臓肥大におけるＰＲＯポリペプチドの効力は、ＰＲＯポリペプチドを受容しないフルプロステノール処理されたラットに対する、心臓、心室及び左心

室(体重により規格化)の重量を測定することにより決定される。

インビボアッセイの他の例は、圧力負荷心臓肥大アッセイである。インビボ試験において、試験用動物の腹部大動脈の収縮による圧力負荷心臓肥大を誘発することは共通している。典型的なプロトコルにおいて、ラット(例えば雄のWistar又はＳＤ)は麻酔処理され、各ラットの腹部大動脈を横隔膜の真下まで狭窄する。Beznak M., Can. J. Biochem. Physiol., 33：985-94(1955)。 大動脈を外科的切開により曝露し、短い太針を管の隣におく。大動脈を針周囲に絹糸で結紮して収縮させ、すぐに除去し、針の直径まで大動脈の管腔を低減させる。このアプローチは、例えばRossi等, Am. Heart J., 124：700-709(1992)及びO'Rourke及びReibel, P.S.E.M.B., 200：95-100(1992)に記載されている。

【０１４６】

また他のインビボアッセイにおいて、心臓肥大、続いて実験的に誘発された心筋梗塞(ＭＩ)における効果を測定する。ラットにおいて、急性ＭＩを左冠動脈結紮にて誘発し、さらにこれを心電図試験で確認する。また動物の擬似操作グループを対照動物として用意する。初期のデータには、心臓肥大はＭＩを有するグループに存在することが示され、体重に対し心臓重量は１８％増加していることが明らかとなった。Lai等, 上掲。心臓肥大の候補ブロッカー、例えばＰＲＯポリペプチドでこれらの動物を治療し、テストした候補薬の治療可能性についての貴重な情報を提供する。Sprague-Dawleyラットを使用する、心臓肥大の誘発におけるさらなるアッセイテストは米国特許第5,773,415号に開示されている。

癌において、腫瘍の病原及び進行におけるここで同定された遺伝子の役割をさらに理解し、天然ＰＲＯポリペプチドの抗体及び他のアンタゴニスト、例えば小分子アンタゴニストを含む治療用候補薬の効力をテストするために、種々のよく知られた動物モデルを使用することができる。このようなモデルのインビボの性質は、ヒト患者に前兆となる反応を特に起こさせるものである。腫瘍及び癌(乳癌、結腸癌、前立腺癌、肺癌等)の動物モデルには、非組換え及び組換え(トランスジェニク)動物が含まれる。非組換え動物モデルには、例えば齧歯動物、例えばネズミモデルが含まれる。このようなモデルは標準的な技術、例えば皮下注射、尾静脈注射、脾臓移植、腹膜移植、腎嚢下移植、又はオルソピン(orthopin)移植、例えば結腸組織に移植された結腸癌細胞を使用し、同系のマウスに腫瘍細胞を移入することにより作成することができる。例えば、1997年9月18日に公開されたPCT公開番号WO97/33551を参照されたい。おそらくは癌遺伝子の研究に最も頻繁に使用される動物種は、免疫欠損マウス、特にヌードマウスである。胸腺刺激／形成不全を有するヌードマウスがヒト腫瘍異種移植片用の宿主として成功裡に作用するという知見はこの目的への広範な使用に導いた。常染色体劣性ｎｕ遺伝子は、例えばＡＳＷ、Ａ／Ｈｅ、ＢＡＬＢ／ｃ、Ｂ１０、ＬＰ、Ｃ１７、ＣＨ３、Ｃ５７ＢＬ、Ｃ５７、ＣＢＡ、ＤＢＡ、ＤＤＤ、Ｉ／ｓｔ、ＮＣ、ＮＦＲ、ＮＦＳ、ＮＦＳ／Ｎ、ＮＺＢ、ＮＺＣ、ＮＺＷ、Ｐ、ＲＩＩＩ及びＳＪＬを含む、非常に多数の明確に同族のヌードマウスに導入される。さらに、ヌードマウス以外に免疫学的欠損を受け継いだ広範囲の他の動物を育て、腫瘍異種移植片のレシピエントとして使用する。さらなる詳細は、The Nude Mouse in Oncology Research, E. Boven及びB. Winograd. eds.(CRC Press, Inc., 1991)を参照されたい。

【０１４７】

このような動物に導入された細胞は周知の腫瘍／癌細胞、例えば上述にて列挙した任意の腫瘍細胞系、例えばＢ１０４-１細胞系(ｎｅｕ原腫瘍遺伝子で形質移入された安定ＮＩＨ-３Ｔ３細胞系)；Ｃａｃｏ-２(ＡＴＣＣ ＨＴＢ-３７)；又は中程度に分化したグレードＩＩヒト結腸腺癌細胞系、ＨＴ-２９(ＡＴＣＣ ＨＴＢ-３８)、又は腫瘍及び癌からのものを誘導可能である。腫瘍又は癌細胞のサンプルは凍結及び液体窒素での保管等を含む標準的な状態で使用され、外科手術により患者から得ることができる。Karmali等, Br. J. Cancer. 48：689-696(1983)。

腫瘍細胞は種々の手順によりヌードマウス等の動物に導入することができる。腫瘍の移植には、マウスの皮下(s.c.)空間が非常に適している。腫瘍は、固体ブロックとして、例えばトロカール(trochar)の使用による針バイオプシー、又は細胞懸濁液を移植すること

もできる。固体ブロック又はトロカール移植用に適した大きさの腫瘍組織断片が皮下空間に導入される。細胞懸濁液は一次腫瘍又は安定腫瘍細胞系から新鮮に調製され、皮下注射される。また、腫瘍細胞は皮下移植として注射することもできる。この位置において、移植片は真皮結合組織の下部と皮下組織との間に付与される。

【０１４８】

乳癌の動物モデルは、Drebin等， Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 83：9129-9133(1986)に記載されたようにして、例えばラット神経芽細胞(当初単離されたｎｅｕ癌遺伝子からのもの)、又はｎｅｕ-形質転換ＮＩＨ-３Ｔ３細胞を、ヌードマウスに移植することにより作成することができる。

同様に、結腸癌の動物モデルは、動物、例えばヌードマウスに結腸癌細胞を通過させ、これらの動物に腫瘍を出現せしめることにより作成することができる。ヌードマウスにおけるヒト結腸癌の同所移植モデルは、例えばWang等, Cancer Research, 54：4726-4728(1994)及びToo等, Cancer Research, 55：681-684(1995)により記載されている。このモデルはAntiCancer,Inc.,(San Diego, California)から販売されている、いわゆる「METAMOUSE^{TM}」に基づく。

動物内で生じた腫瘍は除去され、インビトロで培養することができる。ついで、インビトロ培養からの細胞を動物に継代させる。このような腫瘍はさらなるテスト又は薬剤スクリーニングを目的となりうる。あるいは、継代により得られた腫瘍は単離可能で、継代前細胞及び一又は複数の継代段階の後に単離された細胞のＲＮＡは、関心のある遺伝子の差次的発現用に分析される。このような継代技術は、任意の周知の腫瘍又は癌細胞系で行うことができる。

例えば、Ｍｅｔｈ Ａ、ＣＭＳ-４、ＣＭＳ５、ＣＭＳ２１及びＷＥＨＩ-１６４はＢＡＬＢ／ｃ雌マウス(DeLeo等, J. Exp. Med., 146：720(1977))の繊維肉腫を化学的に誘発し、種々の薬剤の抗腫瘍活性を研究する高度に制御されたモデル系を提供する。Palladino等, J. Immunol., 138：4023-4032(1987)。簡単に言えば、腫瘍細胞は細胞培養におけるインビトロで増殖される。動物に注射をする前に細胞系を洗浄し、１０ｘ１０^{6}から１０ｘ１０^{7}細胞／ｍｌの細胞密度でバッファーに懸濁させる。ついで、動物に１０から１００μｌの細胞懸濁液を皮下注射すると、１から３週間で腫瘍が出現する。

【０１４９】

さらに、最も詳細に研究されている試験用腫瘍の一つであるマウスのルイス肺(３ＬＬ)癌腫を研究用腫瘍モデルとして使用することができる。この腫瘍モデルの効力は、肺の小細胞癌腫(ＳＣＣＬ)と診断されたヒト患者における好ましい効果と相関している。この腫瘍は、病気になったマウス、又は培養されている細胞からの腫瘍断片を注射することで、正常なマウスに導入することができる。Zupi等, Br. J. Cancer, 41：suppl. 4. 30(1980)。腫瘍が単一細胞の注射から出発して、感染した細胞がかなりの高割合で生存しているという証拠が示された。この腫瘍モデルについてのさらなる情報は、Zacharski, Haemostasis, 16：300-320(1986)を参照されたい。

移植腫瘍を有する動物モデルにおける試験化合物の効力を評価する方法の一つは、治療前又は後の腫瘍の大きさを測定することである。伝統的に、移植腫瘍の大きさは２又は３次元のスライドカリパスで測定される。２次元に限定する測定は腫瘍の大きさを正確に反映せず；よって通常は数学的公式を使用し、対応する量に転換する。しかし、腫瘍サイズの測定は非常に不正確である。候補薬の治療効果は治療誘発性の成長が遅れ、特定の成長が遅れた場合に、より良好であると記載することができる。腫瘍成長の記載における他の重要な変数は腫瘍量が２倍になる時間である。また、腫瘍成長の算出及び記載のためのコンピュータプログラム、例えばRygaard及びSpang-Thomsen, Proc. 6th Int. Workshop on Immune-Deficient Animals. Wu及びSheng. eds.(Basel. 1989), p.301により報告されているプログラムを入手することができる。しかし、治療後の壊死及び炎症反応は、実際には少なくとも当初には腫瘍サイズの増加の結果となり得ることに留意されるべきである。よって、これらの変化は形態計測とフローサイトメトリー分析を組み合わせて、注意深く監視する必要がある。

【０１５０】
さらに、組換え(トランスジェニック)動物モデルは、ここで同定されたＰＲＯ遺伝子のコード化部位を、関心のある動物のゲノムに導入し、トランスジェニック動物を作成するための標準的な技術を使用して加工することができる。トランスジェニック操作の標的として提供可能な動物には、限定するものではないが、マウス、ラット、ウサギ、モルモット、ヒツジ、ヤギ、ブタ、及び非ヒト霊長類、例えばヒヒ、チンパンジー及びサルが含まれる。このような動物に導入遺伝子を導入するための、当該技術における周知の技術には、前核のミクロ注射(米国特許第4,873,191号)；胚へのレトロウイルス媒介性遺伝子移動(例えば、Van der Putten等, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 82：6148-615(1985))；胚幹細胞における遺伝子を標的化(Thompson等, Cell, 56：312-321(1989))；胚のエレクトロポレーション(Lo, Mol. Cell. Biol., 3：1803-1814(1983))；及び精子媒介性遺伝子移動が含まれる。Lavitrano等, Cell, 57：717-73(1989)。レビューには、例えば米国特許第4,736,866号を参照されたい。

本発明の目的に関して、トランスジェニック動物にはそれらの細胞の一部のみに導入遺伝子を担持するもの(「モザイク動物」)が含まれる。導入遺伝子は、単一の導入遺伝子として、又は鎖状体で組み込むことができ、例えば、ヘッド対ヘッド又はヘッド対テイルのタンデムで組み込むことができる。また特定の細胞系への導入遺伝子の選択的導入は、例えばLasko等, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 89：6232-636(1992)の技術に続いて可能である。

トランスジェニック動物における導入遺伝子の発現は通常の技術により監視可能である。例えば、サザンブロット分析又はＰＣＲ増幅を導入遺伝子の統合を証明するために使用することができる。ついで、ｍＲＮＡの発現レベルはインサイツハイブリダイゼーション、ノーザンブロット分析、ＰＣＲ又は免疫細胞化学等の技術を使用して分析することができる。動物は腫瘍又は癌進行の徴候のためにさらに試験される。

【０１５１】
また、動物の胚性細胞に導入されたＰＲＯポリペプチドをコードする変更ゲノムＤＮＡと、ＰＲＯポリペプチドをコードする内在性遺伝子との間の相同的組換えによって、ここで同定されるＰＲＯポリペプチドをコードする欠陥又は変更遺伝子を有する「ノックアウト」動物を構成することができる。例えば、特定のＰＲＯポリペプチドをコードするｃＤＮＡは、確立された技術に従い、該ポリペプチドをコードするゲノムＤＮＡのクローニングに使用できる。特定のＰＲＯポリペプチドをコードするゲノムＤＮＡの一部を欠失したり、組み込みを監視するために使用する選択可能なマーカーをコードする遺伝子等の他の遺伝子で置換することができる。典型的には、ベクターは無変化のフランキングＤＮＡ(５’と３’末端の両方)を数キロベース含む。例えば、相同的組換えベクターについてはThomas及びCapecchi, Cell, 51:503(1987)を参照のこと。ベクターは胚性幹細胞に(例えばエレクトロポレーションによって)導入し、導入されたＤＮＡが内在性ＤＮＡと相同的に組換えられた細胞が選択される。例えば、Li等, Cell, 69:915(1992)参照。選択された細胞は次に動物(例えばマウス又はラット)の胚盤胞内に注入されて集合キメラを形成する。例えば、Bradley, Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach, E. J. Robertson, ed. (IRL, Oxford, 1987), pp. 113-152参照。その後、キメラ性胚を適切な偽妊娠の雌性乳母に移植し、期間をおいて「ノックアウト」動物をつくり出す。胚細胞に相同的に組換えられたＤＮＡを有する子孫は標準的な技術により同定され、それらを利用して動物の全細胞が相同的に組換えられたＤＮＡを含む動物を繁殖させることができる。ノックアウト動物は、ＰＲＯポリペプチドが不在であることによるある種の病理的状態及びその病理的状態の進行に対する防御能力によって特徴付けられる。

【０１５２】
ここで同定されたＰＲＯポリペプチドに特異的に結合する抗体、及び他の候補薬の効果は、自発的動物腫瘍の治療においてさらに試験することができる。この研究のための適切な標的はネコ口部扁平上皮細胞癌腫(ＳＣＣ)である。ネコ口部ＳＣＣは侵入性が高く、この悪性腫瘍はネコにおいて最も一般的な口部悪性腫瘍とされ、口部腫瘍の６０％以上がこ

の種において繰り返されると計測されている。それは遠くの部位にはめったに転移しないが、転移の発生率が低いのは、この腫瘍を有するネコの生存期間が短いことに反映されている。これらの腫瘍は、主としてネコの口腔の解剖学的構造により、通常外科手術により処理することができない。現在では、この腫瘍に対する効果的な治療はない。この研究に入る前に、各々のネコを完全な臨床実験用のバイオプシーとし、コンピュータＸ線断層撮影(ＣＴ)によりスキャンする。舌下口部扁平上皮細胞腫瘍であると診断されたネコはこの研究から除外する。舌はこのような腫瘍の結果として麻痺し、治療により腫瘍が死亡しても、動物は自分自身で食餌することができない。各々のネコを長期間繰り返し治療する。治療期間中、腫瘍の写真を毎日取り、続いて再チェックする。治療後、各ネコを他のＣＴスキャンにかける。ＣＴスキャンと胸部放射線写真を、その後８週間毎に評価する。データは、対照グループに対し、生存率、反応性及び毒性において異なっていると評価した。ポジティブ反応は、好ましくは生存の質の改善及び／又はライフスパンの増加を伴う腫瘍退行の証拠を必要とする。

さらに、イヌ、ネコ及びヒヒ他の自発的動物腫瘍、例えば繊維肉腫、腺癌、リンパ腫、軟骨腫、又は平滑筋肉腫もテストすることができる。もちろん、イヌ及びネコの乳房腺癌は好ましいモデルであり、その外観及び性質はヒトのものと非常に似ている。しかし、このモデルの使用は動物におけるこの種の腫瘍の発生率により制限される。

また、当該技術で周知の他のインビトロ及びインビボ心臓血管、内皮及び血管形成試験もここで適切である。

【０１５３】

ｉｉ．組織分布

さらなる研究、例えば種々のヒト組織におけるｍＲＮＡ発現を測定することにより、ここで心臓血管、内皮及び血管形成アッセイの結果を証明することができる。

上述したように、種々の組織における遺伝子の増幅及び／又は発現は、ここで提供された配列に基づき、適切に標識されたプローブを用い、例えば、従来よりのサザンブロット法、ｍＲＮＡの転写を定量化するノーザンブロット法(Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA,77:5201-5205 (1980))、ドットブロット法(ＤＮＡ分析)、又はインサイツハイブリダイゼーション法によって測定することができる。あるいは、ＤＮＡ二本鎖、ＲＮＡ二本鎖及びＤＮＡ-ＲＮＡハイブリッド二本鎖又はＤＮＡ-タンパク二本鎖を含む、特異的二本鎖を認識することができる抗体を用いることもできる。

あるいは、種々の組織における遺伝子の発現は、遺伝子産物の発現を直接的に定量する免疫学的な方法、例えば組織切片の免疫組織化学的染色及び細胞培養又は体液のアッセイによって測定することもできる。試料液の免疫組織化学的染色及び／又はアッセイに有用な抗体は、モノクローナルでもポリクローナルでもよく、任意の哺乳動物で調製することができる。簡便には、抗体は、天然配列ＰＲＯポリペプチドに対して、又はここで提供されるＤＮＡ配列をベースとした合成ペプチドに対して、又はＰＲＯＤＮＡに融合し特異的抗体エピトープをコードする外因性配列に対して調製され得る。抗体生産のための一般的な技術、及びインサイツハイブリダイゼーションのための特定のプロトコルは以下に提供する。

【０１５４】

ｉｉｉ．抗体結合性の研究

心臓血管、内皮及び血管形成アッセイに使用される内皮細胞又は他の細胞におけるＰＲＯポリペプチドの効果を阻害する抗-抗体の能力を試験する、心臓血管、内皮及び血管形成研究の結果は、抗体結合性を研究することで証明することができる。抗体の例としては、ポリクローナル、モノクローナル、ヒト化、二重特異性及びヘテロ複合体抗体が含まれ、その調製は以下に記載する。

抗体結合性の研究は任意の周知のアッセイ方法、例えば競合結合アッセイ、直接及び間接サンドイッチアッセイ、及び免疫沈降アッセイ等で行われうる。Zola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, (CRC Press, Inc. 1987)pp. 147-158 。

競合結合アッセイは、有限量の抗体との結合における、試験用サンプルに対して競合す

る標識された標準体の能力による。試験用サンプル中の標的タンパク質の量は、抗体が結合する標準体の量に対して逆比例する。結合する標準体の量の測定を容易にするため、好ましくは抗体は競合の前後に不溶化され、抗体に結合する分析物及び標準体は、便宜上、結合しないで残存する標準体及び分析物から分離する。

サンドイッチアッセイでは、検出される互いに異なる免疫原部分、又はエピトープ、又はタンパク質に結合可能な２つの抗体が使用される。サンドイッチアッセイにおいて、分析されるテスト用サンプルは、固体支持体に固定化された第１の抗体に結合し、その後、第２の抗体が分析物に結合し、よって不溶性の３部位複合体が形成される。例えば、米国特許第4,376,100号を参照されたい。第２の抗体は検出可能な部分で、それ自身がラベルされてもよく（直接サンドイッチアッセイ）、又は検出可能な部分でラベルされた抗免疫グロブリン抗体を使用して測定してもよい(間接サンドイッチアッセイ)。例えば、一方の種類のサンドイッチアッセイはＥＬＩＳＡアッセイであり、この場合、検出可能な部分は酵素である。

免疫組織化学において、組織サンプルは新鮮なものであるか凍結されていてもよく、パラフィンに埋設されていてもよく、防腐剤、例えばホルマリンで固定されていてもよい。

【０１５５】

ｉｖ．細胞ベースの腫瘍アッセイ

心臓血管、内皮及び血管形成疾患、例えば腫瘍のための細胞ベースのアッセイ及び動物モデルは、ここで心臓血管、内皮及び血管形成アッセイの発見を立証し、さらに、ここで同定された遺伝子と所望しない心臓血管、内皮及び血管形成細胞成長の進行及び病因との関係を理解するために使用可能である。所望しない心臓血管、内皮及び血管形成細胞成長、例えば腫瘍の進行及び病因におけるここで同定された遺伝子産物の役割は、ＰＲＯポリペプチドにより刺激又は阻害されると同定された細胞又は細胞系を使用して試験することができる。このような細胞には、例えば以下の実施例に示すものが含まれる。

異なるアプローチにおいて、特定の心臓血管、内皮及び血管形成疾患に係る周知の細胞種の細胞を、ｃＤＮＡを用いて形質移入し、これらのｃＤＮＡが過度の成長を誘発するか、又は成長を阻害する能力を分析する。心臓血管、内皮及び血管形成疾患が癌である場合、適切な腫瘍細胞には、例えば安定腫瘍細胞系、例えばＢ１０４-１細胞系(ｎｅｕ原腫瘍遺伝子で形質移入された安定ＮＩＨ-３Ｔ３細胞系)及びｒａｓ-形質移入ＮＩＨ-３Ｔ３細胞が含まれ、これらは所望する遺伝子を形質移入することができ、腫瘍形成成長を監視することができる。ついで、このような形質移入細胞系を使用し、ポリ-又はモノクローナル抗体又は抗体組成物が、形質移入細胞の成長における細胞増殖抑制又は細胞毒性活性を働かせることによる、又は抗体-依存性細胞性細胞毒性（ＡＤＣＣ）を媒介することによる腫瘍形成細胞成長を阻害する能力をテストする。さらに、ここで同定された遺伝子のコード化配列で形質移入された細胞を、心臓血管、内皮及び血管形成疾患、例えば癌の治療用の候補薬を同定するのに使用することができる。

さらに、トランスジェニック動物の腫瘍から得られた一次培地(上述に記載)を細胞ベースのアッセイに使用することができるが、安定細胞系が好ましい。トランスジェニック動物から一定の細胞系を誘導するための技術は当該技術においてよく知られている。例えばSmall等, Mol. Cell. Biol., 5：642-648(1985)を参照されたい。

【０１５６】

ｖ．遺伝子治療

ここで、ＰＲＯポリペプチド、及びポリペプチド性アゴニスト及びアンタゴニストは、それらのペプチドをインビトロでの発現により本発明に従って用いてもよく、しばしば遺伝子治療と呼ばれる。

核酸（場合によってはベクター内に含まれたもの）を患者の細胞に入れるために：インビボ及びエキソビボという２つの主要な方法がある。インビボ送達では、核酸は、通常はＰＲＯポリペプチドが必要とされている部位、すなわちＰＲＯポリペプチドの合成部位、もし知られているならばＰＲＯポリペプチドの生物学的活性が必要とされる部位(例えば傷)に、患者に直接注入される。エキソビボ処理では、患者の細胞を取り出し、核酸をこ

れらの単離された細胞に導入し、修飾された細胞を患者に、直接、又は例えば患者に埋め込まれる多孔性膜にカプセル化して投与する（米国特許第4,892,538号及び第5,283,187号参照）。核酸を生細胞に導入するために利用可能な種々の技術がある。これらの技術は、核酸が培養された細胞にインビトロで移入されるか、又は対象とする宿主にインビボで移入されるかに依る。哺乳動物細胞にインビトロで核酸を移入するのに適した技術は、リポソーム、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、形質導入、細胞融合、ＤＥＡＥ-デキストラン、リン酸カルシウム沈降法などを含む。形質導入は、複製欠陥、組換えウイルス（好ましくはレトロウイルス）粒子の細胞レセプターとの結合、次いで粒子に含まれる核酸の細胞への導入を含む。遺伝子のエキソビボ送達に通常用いられるベクターはレトロウイルスである。

【０１５７】

現在インビボ核酸移入技術で好ましいのは、ウイルス又は非ウイルスベクター（アデノウイルス、レンチウイルス、単純ヘルペスＩウイルス、又はアデノ関連ウイルス（ＡＡＶ））、及び脂質ベースの系（遺伝子の脂質媒介移入に有用な脂質は、例えば、ＤＯＴＭＡ、ＤＯＰＥ、及びＤＣ-Ｃｈｏｌである；例えば、Tonkinson等, Cancer Investigation, 14(1): 54-65 (1996) 参照）での形質移入を含む。遺伝子治療で使用するために最も好ましいベクターはウイルス、最も好ましくはアデノウイルス、ＡＡＶ、レンチウイルス、又はレトロウイルスである。レトロウイルスベクター等のウイルスベクターは、少なくとも１つの転写プロモーター／エンハンサー又は位置決定因子、あるいは選択的スプライシング、核ＲＮＡ輸出、又はメッセンジャーの翻訳後修飾などの他の手段により遺伝子発現を制御する他の因子を含む。さらに、レトロウイルスベクター等のウイルスベクターは、ＰＲＯポリペプチドをコードする遺伝子の存在下で転写されたとき、それに作用可能に結合し、翻訳開始配列として機能する核酸分子を含む。このようなベクター作成物はまた、用いるウイルスに適したパッケージングシグナル、末端反復配列（ＬＴＲ）又はその一部、及びポジティブ及びネガティブストランドプライマー結合部位を含む（これらがウイルスベクターに既に存在しない場合）。さらに、これらのベクターは、典型的には、それらが配置される宿主細胞からＰＲＯポリペプチドを分泌させるシグナル配列を含む。好ましくは、この目的のためのシグナル配列は哺乳動物シグナル配列、最も好ましくはＰＲＯポリペプチドのための天然シグナル配列である。場合によっては、ベクター作成物は、ポリアデニル化並びに一又は複数の制限部位を指向するシグナル及び翻訳終結配列も含む。例として、このようなベクターは典型的には５’ＬＴＲ、ｔＲＮＡ結合部位、パッケージングシグナル、第二鎖ＤＮＡ合成の開始点、及び３’ＬＴＲ又はその一部を含む。非ウイルスの他のベクター、例えばカチオン性脂質、ポリリジン、及びデンドリマーを用いることもできる。

【０１５８】

幾つかの状況では、核酸供給源を標的細胞をターゲティングする試薬、例えば細胞表面膜タンパク質に特異的な抗体又は標的細胞、標的細胞上のレセプターのリガンドなどとともに提供するのが望ましい。リポソームが用いられる場合、エンドサイトーシスを伴って細胞表面膜タンパク質に結合するタンパク質が、ターゲティング及び／又は取り込みの促進のために用いられ、例えば、特定の細胞型向性のキャプシドタンパク質又はその断片、サイクリングにおいて内部移行を受けるタンパク質の抗体、及び細胞内局在化をターゲティングし細胞内半減期を向上させるタンパク質である。レセプター媒介エンドサイトーシスの技術は、例えば、Wu等, J. Biol. Chem., 262:4429-4432 (1987)及びWagner等, Proc. Natl. Acad. Sci., 87: 3410-3414 (1990)に記載されている。現在知られている遺伝子標識化及び遺伝子治療プロトコールの概説については、Anderson等, Science, 256:808-813 (1992)を参照のこと。また、WO 93/25673及びそこに引用された参考文献も参照。

好適な遺伝子治療及びレトロウイルス粒子及び構造タンパク質の作成方法は、米国特許第5,681,746号に見出される。

【０１５９】

ｖｉ．診断法としての遺伝子の用途

また本発明は、診断法としてのＰＲＯポリペプチドをコードする遺伝子の用途に関する。ＰＲＯポリペプチド中の変異体は腫瘍の原因であるため、変異した形態のＰＲＯポリペプチドの検出は、心臓血管、内皮及び血管形成疾患、又は心臓血管、内皮及び血管形成疾患、例えば腫瘍への感染性の診断を可能にする。

ヒトＰＲＯポリペプチドをコードする遺伝子に変異体を担持する個人は、種々の技術でＤＮＡレベルが検出される。診断用の核酸は患者の細胞、例えば血液、尿、唾液、組織バイオプシー、及び検屍物質から得ることができる。ゲノムＤＮＡは、分析の前にＰＣＲを使用して酵素的に増幅させる(Saiki等，Nature，324：163-166(1986))か、又は直接検出に使用することができる。ＲＮＡ又はｃＤＮＡは同じ目的のために使用することができる。例として、ＰＲＯポリペプチドをコードする核酸に相補的なＰＣＲプライマーを、ＰＲＯポリペプチド変異体の同定及び分析に使用することができる。例えば、欠失及び挿入は正常な遺伝子型と比較した増幅産物の大きさの変化により検出することができる。点変異(point mutations)は、ＰＲＯポリペプチドをコードする放射能標識されたＲＮＡ、又はＰＲＯポリペプチドをコードする放射能標識されたアンチセンスＤＮＡ配列に対し、増幅ＤＮＡをハイブリダイゼーションさせることにより同定することができる。好ましい適合配列はＲＮアーゼＡ消化又は溶解温度の相違により非適合二重鎖と区別することができる。

【０１６０】

ＤＮＡ配列の相違に基づく遺伝子試験は、変性剤有又は無のゲル中でのＤＮＡ断片の電気泳動移動度の変化を検出することにより達成される。小配列の欠失及び挿入は高解像度のゲル電気泳動により可視化することができる。異なる配列のＤＮＡ断片は、変性ホルムアミジン勾配ゲルにおいて区別され、異なるＤＮＡ断片の移動は、特定の溶解又は部分的な溶解温度により、ゲルの異なる位置で阻害される。例えば、Myers等，Science，230：1242(1985)。

また特定の位置における配列変化はヌクレアーゼ保護アッセイ、例えばＲＮアーゼ及びＳＩ保護、又は化学的切断方法、例えばCotton等，Proc. Nat. Acad. Sci. USA，85：4397-4401(1985)により明らかになる。

よって、特定のＤＮＡ配列の欠失はハイブリダイゼーション、ＲＮアーゼ保護、化学的切断、直接ＤＮＡ配列化、又は制限酵素、例えば制限断片長のポリモルフィズム(ＲＦＬＰ)の使用、及びゲノムＤＮＡのサザンブロット等の方法により達成することができる。

【０１６１】

ｖｉｉ．ＰＲＯポリペプチドレベル検出のための用途

より便宜的なゲル電気泳動及びＤＮＡ配列化に加えて、変異はインサイツ分析で検出することもできる。

ＰＲＯポリペプチドをコードする核酸の発現は、腫瘍形成に関連した血管の病気、又は新血管新生に連動している。ＰＲＯポリペプチドがシグナル配列を有している場合は、ｍＲＮＡは平滑筋細胞では少ないのに対して内皮細胞では高度に発現しており、このことはＰＲＯポリペプチドが血清中に存在していることを示している。従って、このＰＲＯポリペプチドのレベルの変化が腫瘍形成に関連した血管の病気、又は新血管新生であることを示しているために、抗-ＰＲＯポリペプチド抗体は、このような疾患の診断に使用することができる。

ＰＲＯポリペプチドに特異的な抗体を固体支持体上に取り付け、標識されたＰＲＯポリペプチド及び宿主から誘導されたサンプルを固体支持体に通過させる競合アッセイを使用することもでき、固体支持体に取り付けた検出されるレベルの量はサンプル中のＰＲＯポリペプチドの量と相関関係がある。

【０１６２】

ｖｉｉｉ．染色体マッピング

また、本発明の配列は染色体同定において重要である。配列は特異的に標的とされ、個人のヒト染色体の特定の位置にハイブリダイゼーションさせることができる。さらに、染色体の特定の部位を同定するために、現在必要である。実際の配列データ(反復多形性)に

基づいたいくつかの染色体マーキング試薬は、現在、染色体位置のマーキングのために入手可能である。本発明の染色体のＤＮＡマッピングは、病気に関連した遺伝子を有する配列を相関させるために、重要な第１段階である。

簡単に言えば、配列はｃＤＮＡからＰＣＲプライマー(好ましくは１５－２５塩基対)を調製することにより、染色体にマッピングすることができる。３'-非翻訳領域のコンピュータ分析を使用すると、ゲノムＤＮＡの一エクソン以上のスパンではないプライマーが素早く選択され、よって増幅プロセスがより複雑になる。これらのプライマーを、次に、個々のヒト染色体を遺伝子を含有する体細胞ハイブリッドのＰＣＲスクリーニングに使用する。プライマーに対応するヒト遺伝子を含有するハイブリッドのみが、増幅断片を作成するであろう。

体細胞ハイブリッドのＰＣＲマッピングは、特定の染色体に特定のＤＮＡを割り当てるための急速な手順である。同様のオリゴヌクレオチドプライマーを本発明で使用すると、サブ局部限定を、類似した方法で、大きなゲノムクローンのプール又は特定の染色体からの断片のパネルで達成することができる。同様に、その染色体へのマッピングに使用可能な他のマッピング方法には、インサイツハイブリダイゼーション、標識されたフローソート染色体を用いたプレスクリーニング、及び染色体特異性ｃＤＮＡライブラリを組み立てるためのハイブリダイゼーションによるプレ選択が含まれる。

【０１６３】

中期染色体展開へのｃＤＮＡクローンの蛍光インサイツハイブリダイゼーション(ＦＩＳＨ)を、正確な染色体位置を一工程で提供するために使用することができる。この技術は５００又は６００塩基と短いｃＤＮＡで使用することができるが；２０００塩基対を越える長さのクローンは、単純な検出に対して十分なシグナル強さを有する独特の染色体位置に結合する見込みが高い。ＦＩＳＨには、ＰＲＯポリペプチドをコードする遺伝子を誘導するクローンの使用が必要であり、長くなればなる程良好になる。例えば、２０００塩基対で良好であり、４０００塩基対でより好ましく、４０００を越えても、時間の合理的なパーセンテージの良好な結果を得るのには、おそらく必要ではない。この技術のレビューについては、Verma等，Human Chromosomes；a Manual of Basic Techniques(Pergamon Press，New York．1988)を参照されたい。

一度、配列を厳密な染色体位置にマッピングすると、染色体上の配列の物理的位置は遺伝子地図データと相関可能である。このようなデータは、例えば、V．McKusick，Mendelian Inheritance in Man（Johns Hopkins University Welch Medical Library)に見出される。次に、同じ染色体領域にマッピングされる遺伝子と病気の関係を連鎖アッセイにより同定する(物理的に隣接する遺伝子の共同相続)。

次に、病気に罹患した又は病気に罹患しなかった個体間のｃＤＮＡ又はゲノム配列における差異を測定する必要がある。変異が病気に罹患し個体の数人又は全員に見出され、正常な個体では見出されない場合、変異は病気の原因であると思われる。

物理的マッピング及び遺伝子マッピング技術の現在の解像度によれば、病気に関連した染色体領域に厳密に位置するｃＤＮＡは、５０と５００潜在的原因遺伝子の間の一つである(このことは、１メガベースのマッピング解像度で、２０ｋｂ当たり１遺伝子であると仮定している)。

【０１６４】

ｉｘ．候補薬のスクリーニングアッセイ

本発明は、ＰＲＯポリペプチドを模倣する（アゴニスト）又はＰＲＯポリペプチドの効果を阻害する（アンタゴニスト）ものを同定するための化合物のスクリーニング方法も包含する。アンタゴニスト候補薬のスクリーニングアッセイは、ここに同定した遺伝子にコードされるＰＲＯポリペプチドと結合又は複合体形成する化合物、又は他にコード化ポリペプチドと他の細胞性タンパク質との相互作用を阻害する化合物を同定するために設計される。このようなスクリーニングアッセイは、それを特に小分子候補薬の同定に適したものにする、化学的ライブラリの高スループットスクリーニングに適用可能なアッセイを含む。

このアッセイは、タンパク質－タンパク質結合アッセイ、生化学的スクリーニングアッセイ、イムノアッセイ、及び細胞ベースのアッセイを含む方式で実施され、それらはこの分野で良好に特徴付けされている。

アンタゴニストについての全てのアッセイは、それらが候補薬をここで同定された核酸にコードされるＰＲＯポリペプチドと、これら２つの成分が相互作用するのに十分な条件下及び時間で接触させることを必要とすることにおいて共通する。

【０１６５】

結合アッセイにおいて、相互作用は結合であり、形成された複合体は単離されるか、又は反応混合物中で検出される。特別な実施態様では、ここに同定された遺伝子にコードされるＰＲＯポリペプチド又は候補薬が、共有又は非共有結合により固相、例えばミクロタイタープレートに固定化される。非共有結合は、一般的に固体表面をＰＲＯポリペプチドの溶液で被覆し乾燥させることにより達成される。あるいは、固定化されるＰＲＯポリペプチドに特異的な固定化抗体、例えばモノクローナル抗体を、それを固体表面に固着させるために用いることができる。アッセイは、固定化成分、例えば固着成分を含む被覆表面に、検出可能な標識で標識されていてもよい非固定化成分を添加することにより実施される。反応が完了したとき、未反応成分を例えば洗浄により除去し、固体表面に固着した複合体を検出する。最初の非固定化成分が検出可能な標識を有している場合、表面に固定化された標識の検出は複合体形成が起こったことを示す。最初の非固定化成分が標識を持たない場合は、複合体形成は、例えば、固定化された複合体に特異的に結合する標識抗体によって検出できる。

【０１６６】

候補化合物が相互作用するがここに同定した遺伝子にコードされる特定のＰＲＯポリペプチに結合しない場合、そのポリペプチドとの相互作用は、タンパク質－タンパク質相互作用を検出するために良く知られた方法によってアッセイすることができる。そのようなアッセイは、架橋、同時免疫沈降、及び勾配又はクロマトグラフィカラムを通す同時精製などの伝統的な手法を含む。さらに、タンパク質－タンパク質相互作用は、、Chevray及びNathans［Proc.Natl. Acad. Sci. USA 89, 5789-5793 (1991)］に開示されているようにして、Fields及び共同研究者等［Fiels及びSong, Nature(London) 340, 245-246 (1989); Chien等, Proc.Natl. Acad. Sci. USA 88, 9578-9582 (1991)］に記載された酵母菌ベースの遺伝子系を用いることにより監視することができる。酵母菌ＧＡＬ４などの多くの転写活性化剤は、２つの物理的に別個のモジュラードメインからなり、一方はＤＮＡ結合ドメインとして作用し、他方は転写活性化ドメインとして機能する。以前の文献に記載された酵母菌発現系（一般に「２-ハイブリッド系」と呼ばれる）は、この特性の長所を利用して、２つのハイブリッドタンパク質を用い、一方では標的タンパク質がＧＡＬ４のＤＮＡ結合ドメインに融合し、他方では、候補となる活性化タンパク質が活性化ドメインに融合している。ＧＡＬ１-ｌａｃＺリポーター遺伝子のＧＡＬ４活性化プロモーターの制御下での発現は、タンパク質-タンパク質相互作用を介したＧＡＬ４活性の再構成に依存する。相互作用するポリペプチドを含むコロニーは、β-ガラクトシダーゼに対する色素生産性物質で検出される。２-ハイブリッド技術を用いた２つの特定なタンパク質間のタンパク質-タンパク質相互作用を同定するための完全なキット（MATCHMAKER(商品名)）は、Clontechから商業的に入手可能である。この系は、特定のタンパク質相互作用に含まれるタンパク質ドメインのマッピング、並びにこの相互作用にとって重要なアミノ酸残基の特定にも拡張することができる。

【０１６７】

ここで同定されたＰＲＯポリペプチドをコードする遺伝子と細胞内又は細胞外成分との相互作用を阻害する化合物は、次のように試験できる：通常は反応混合物は、遺伝子産物と細胞外又は細胞内成分を、それら２つの生成物が相互作用及び結合する条件下及び時間で含むように調製される。候補化合物が結合を阻害する能力を試験するために、反応は試験化合物の不存在及び存在下で実施される。さらに、プラシーボを第３の反応混合物に添加してポジティブ対照を提供してもよい。混合物中に存在する試験化合物と細胞内又は細

胞外成分との結合（複合体形成）は上記のように監視される。試験化合物を含有する反応混合物ではなく対照反応における複合体の形成は、試験化合物が試験化合物とその結合パートナーとの相互作用を阻害することを示す。

ＰＲＯポリペプチドが同時有糸分裂促進物質ＣｏｎＡの存在下で内皮細胞の増殖を刺激する能力を有している場合、スクリーニング方法の一例では、この能力の利点が利用される。特に、増殖アッセイにおいて、ヒト臍帯静脈内皮細胞を得、９６-ウェル平底培養皿(Costar, Cambridge, MA)で培養し、細胞の増殖を容易にするのに適切な反応混合物を補い、該混合物はＣｏｎ-Ａ(Calbiochem, La Jolla, CA)を含有している。Ｃｏｎ-Ａ及びスクリーニングされる化合物を添加し、３７℃でインキュベートした後、培養物を^{3}－Ｈチミジンで標識し、ガラス繊維フィルター上に収集する(ｐｈＤ；Cambridge Technology, Watertown, MA)。３媒体の平均^{3}－Ｈチミジン取り込み(cpm)を、液体シンチレーション計測器を使用して測定する(Beckman Instruments. Irvine. CA)。有意な^{3}－(Ｈ)チミジン混入率が内皮細胞の刺激において示された。

【０１６８】

アンタゴニストを検定するために、上述したアッセイを行うが、このアッセイにおいて、ＰＲＯポリペプチドはスクリーニングされる化合物とともに添加してよく、ＰＲＯポリペプチド存在下での^{3}－(Ｈ)チミジン導入を阻害する化合物の能力が、化合物がＰＲＯポリペプチドのアンタゴニストであることを示す。あるいは、アンタゴニストは、ＰＲＯポリペプチド及び膜結合ＰＲＯポリペプチドレセプター又は組換えレセプターを持つ潜在的アンタゴニストを、競合的阻害アッセイに適した条件下で結合させることにより検出してもよい。ＰＲＯポリペプチドは、放射活性等で標識でき、レセプターに結合したＰＲＯポリペプチド分子の数を潜在的アンタゴニストの有効性を決定するのに使用できる。レセプターをコードする遺伝子は、当業者に知られた多くの方法、例えばリガンドパンニング及びＦＡＣＳソートにより同定できる。Coligan等, Current Protocols in Immun., 1(2): Chapter 5 (1991)。好ましくは、発現クローニングが用いられ、ポリアデニル化ＲＮＡがＰＲＯポリペプチドに反応性の細胞から調製され、このＲＮＡから生成されたｃＤＮＡライブラリがプールに分配され、ＣＯＳ細胞又はＰＲＯポリペプチド反応性でない他の細胞の形質移入に使用される。スライドガラスで成長させた形質移入細胞を標識したＰＲＯポリペプチドに暴露する。ＰＲＯポリペプチドは、ヨウ素化又は部位特異的タンパク質キナーゼの認識部位の包含を含む種々の手段で標識できる。固定及びインキュベーションの後、スライドにオートラジオグラフィ分析を施す。ポジティブプールを同定し、相互作用サブプール化及び再スクリーニング工程を用いてサブプールを調製して再形質移入し、結果的に推定レセプターをコードする単一のクローンを生成する。

【０１６９】

これに換わるレセプター同定のアプローチとして、標識したＰＲＯポリペプチドをレセプター分子を発現する細胞膜又は抽出調製物に光親和性結合させることができる。架橋材料はＰＡＧＥに溶解させ、Ｘ線フィルムに暴露する。レセプターを含む標識複合体を励起し、ペプチド断片に分離し、タンパク質マイクロ配列決定を施すことができる。マイクロ配列から得たアミノ酸配列は、推定レセプターをコードする遺伝子を同定するｃＤＮＡライブラリをスクリーニングする分解性オリゴヌクレオチドプローブの組の設計に用いられる。

アンタゴニストの他の検定では、レセプターを発現する哺乳動物細胞又は膜調製物を、候補化合物の存在下で標識ＰＲＯポリペプチドとともにインキュベートする。次いで、この相互作用を促進又は阻止する化合物の能力を測定する。

心臓血管、内皮及び血管形成疾患の治療に有用な組成物には、限定するものではないが、標的遺伝子産物の活性及び／又は発現を阻害する抗体、小有機及び無機分子、ペプチド、リンペプチド、アンチセンス及びリボザイム分子、トリプルヘリックス分子が含まれる。

潜在的なアンタゴニストのより特別な例は、免疫グロブリンとＰＲＯポリペプチドとの融合体に結合するオリゴヌクレオチド、特に、限られないが、ポリ-及びモノクローナル

抗体及び抗体断片、単鎖抗体、抗-イディオタイプ抗体、及びこれらの抗体又は断片のキメラ又はヒト化形態、並びにヒト抗体及び抗体断片を含む抗体を含んでいる。あるいは、潜在的アンタゴニストは、密接に関連したタンパク質、例えば、レセプターを認識するが影響せず、それによりＰＲＯポリペプチドの作用を競合的に阻害するＰＲＯポリペプチドの変異形態であってもよい。

【０１７０】

他の潜在的なＰＲＯポリペプチドアンタゴニストは、アンチセンス技術を用いて調製されたアンチセンスＲＮＡ又はＤＮＡ作成物であり、例えば、アンチセンスＲＮＡ又はＤＮＡは、標的ｍＲＮＡにハイブリダイゼーションしてタンパク質翻訳を妨害することによりｍＲＮＡの翻訳を直接阻止するように作用する。アンチセンス技術は、トリプルヘリックス形成又はアンチセンスＤＮＡ又はＲＮＡを通して遺伝子発現を制御するのに使用でき、それらの方法はともに、ポリヌクレオチドのＤＮＡ又はＲＮＡへの結合に基づく。例えば、ここでの成熟ＰＲＯポリペプチドをコードするポリペプチドヌクレオチド配列の５’コード化部分は、約１０から４０塩基対長のアンチセンスＲＮＡオリゴヌクレオチドの設計に使用される。ＤＮＡオリゴヌクレオチドは、転写に含まれる遺伝子の領域に相補的であるように設計され（トリプルヘリックス－Lee等, Nucl, Acid Res., 6: 3073 (1979); Cooney等, Science, 241: 456 (1988); Dervan等, Science, 251: 1360 (1991)参照）、それによりＰＲＯポリペプチドの転写及び生成を防止する。アンチセンスＲＮＡオリゴヌクレオチドはインビボでｍＲＮＡにハイブリダイゼーションしてｍＲＮＡ分子のＰＲＯポリペプチドへの翻訳を阻止する（アンチセンス－Okano, Neurochem., 56: 560 (1991); Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression (CRC Press: Boca Raton, FL, 1988)）。上記のオリゴヌクレオチドは、細胞に輸送され、アンチセンスＲＮＡ又はＤＮＡをインビボで発現させて、ＰＲＯポリペプチドの生産を阻害することもできる。アンチセンスＤＮＡが用いられる場合、翻訳開始部位、例えば標的遺伝子ヌクレオチド配列の－１０から＋１０位置の間から誘導されるオリゴデオキシリボヌクレオチドが好ましい。

【０１７１】

アンチセンスＲＮＡ又はＤＮＡ分子は、一般的に少なくとも約５塩基長、約１０塩基長、約１５塩基長、約２０塩基長、約２５塩基長、約３０塩基長、約３５塩基長、約４０塩基長、約４５塩基長、約５０塩基長、約５５塩基長、約６０塩基長、約６５塩基長、約７０塩基長、約７５塩基長、約８０塩基長、約８５塩基長、約９０塩基長、約９５塩基長、約１００塩基長、又はそれ以上である。

潜在的アンタゴニストは、ＰＲＯポリペプチドの活性部位、レセプター結合部位、又は成長因子又は他の関連結合部位に結合し、それによりＰＲＯリペプチドの正常な生物学的活性を阻止する小分子を含む。小分子の例は、これらに限られないが、小型ペプチド又はペプチド様分子、好ましくは可溶性ペプチド、及び合成非ペプチド有機又は無機化合物を含む。

リボザイムは、ＲＮＡの特異的切断を触媒できる酵素的ＲＮＡ分子である。リボザイムは、相補的標的ＲＮＡへの配列特異的ハイブリダイゼーション、次いでヌクレオチド鎖切断的切断により作用する。潜在的ＲＮＡ標的内の特異的リボザイム切断部位は、既知の技術で同定できる。更なる詳細は、例えば、Rossi, Current Biology 4: 469-471 (1994)及びＰＣＴ公報、番号WO 97/33551（1997年9月18日発行）を参照されたい。

転写阻害に用いられるトリプルヘリックス形成における核酸分子は一本鎖でデオキシヌクレオチドからなる。これらのオリゴヌクレオチドの基本組成は、フーグスチン塩基対則を介するトリプルヘリックス形成を促進するように設計され、それは一般に二重鎖の一方の鎖上のプリン又はピリミジンのサイズ変更可能な伸展を必要とする。さらなる詳細は、例えば、上掲のＰＣＴ公報、番号WO 97/33551を参照されたい。

これらの小分子は、上記で議論したスクリーニングアッセイの一又は複数の任意のものにより及び／又は当業者に良く知られた他の任意のスクリーニング技術により同定できる。

【０１７２】

ｘ．治療される心臓血管、内皮及び血管形成疾患の型

ここで記載された心臓血管、内皮及び血管形成アッセイにおいて活性を有し、及び／又はそれらの遺伝子産物が心臓血管系に位置することが見出されているＰＲＯポリペプチド又はそれらのアゴニスト又はアンタゴニストは、血管に影響を及ぼす全身疾患、例えば真性糖尿病を含む種々の心臓血管、内皮及び血管形成疾患において治療用途を有していると思われる。それらの治療有効性は、動脈、毛細管、静脈、及び／又はリンパ管の病気を含みうる。以下治療例には、筋肉消耗病治療、骨粗鬆症治療、移植周囲の細胞成長を刺激するための移植固定補助、よってその意図する部位への結合を容易にするもの、組織又は血清中のＩＧＦ安定性の増加、適切であるならば、ＩＧＦレセプターへの結合性の増加(ＩＧＦがヒト骨髄赤血球及び顆粒球原種細胞の成長を高めることが、インビトロで示されているため)が含まれる。

また、ＰＲＯポリペプチド又はそのアゴニスト又はアンタゴニストは、赤血球生成又は顆粒球生成を刺激し、傷の治癒及び組織の再生を刺激し、組織、例えば結合組織、皮膚、骨、軟骨、筋肉、肺又は腎臓の再成長に関連した治療に関連し、内皮細胞の移動を刺激又は阻害するために使用することができる。ＰＲＯポリペプチド又はアンタゴニストにより媒介される血管形成の増加は、虚血組織、心臓の側枝冠動脈、続いて冠動脈狭窄に有益である。アンタゴニストはこのようなポリペプチドの作用を阻害し、例えば傷の治癒又は胚線維症の間に、過度の結合組織の生成を制限するために使用される。これには急性心筋梗塞及び心不全が含まれる。

【０１７３】

さらに、本発明は原因にかかわらず、治療的有効量のＰＲＯポリペプチド、又はそれらのアゴニスト又はアンタゴニストを投与することによる、心臓肥大の治療に関する。目的がヒト患者の治療である場合、ＰＲＯポリペプチドは、好ましくは組換えヒトＰＲＯポリペプチド(ｒｈＰＲＯポリペプチド)である。心臓肥大の治療は、心筋梗塞、高血圧、肥大性心筋症、及び心臓弁逆流を含む、多種多様な病状の結果おける、その種々の段階の任意において行うことができる。治療は、根本にある心疾患にかかわらず、心筋の構造的ダメージを有するか又は有さない、心臓肥大の進行の全ての段階に広げることができる。

分子のアンタゴニストに対抗する場合、特定の指示に対し、分子それ自身又はそのアゴニストを使用するか否かの決定は、主として、分子が新血管新生、内皮細胞の発生、又は血管形成を促進する、又はこれらの病状を阻害するか否かに依存する。例えば、分子が血管形成を促進する場合は、そのアンタゴニストは血管形成の制限又は防止が所望されている疾患の治療に有用である。このような疾病の例には、血管腫瘍、例えば血管腫、腫瘍血管形成、網膜の新血管新生、糖尿病性網膜症又は時期尚早の幼児性網膜症又は黄斑変性及び増殖性硝子体網膜症に関連した脈絡膜、慢性関節リュウマチ、クローン病、アテローム性動脈硬化、卵巣過剰刺激、乾癬、新血管新生に関連した子宮内膜症、気球血管形成が続く再狭窄、瘢痕組織過剰生成、例えば外科手術の後の形成されるケロイドのようなもの、心筋梗塞の後の線維症、又は胚線維症に関連した線維症障害が含まれる。

しかし、分子が血管形成を阻害するならば、上述した病状の治療に直接使用されることが予期される。

【０１７４】

他方、分子が血管形成を刺激する場合、指示に対し、それ自体を所望する血管形成、例えば末梢血管病、高血圧、血管炎、レーノー病及びレーノー現象、動脈瘤、及び動脈再狭窄、血栓静脈炎、リンパ管炎、リンパ浮腫、創傷治癒及び組織の修復、虚血再潅流傷害、アンギナ、心筋梗塞、例えば急性心筋梗塞、慢性心疾患、心不全、例えばうっ血性心不全、及び骨粗鬆症等に使用される。

しかし、分子が血管形成を阻害するならば、そのアンタゴニストは血管形成が所望される病状の治療に使用される。

特定の型の病気は以下に記載され、ここでのＰＲＯポリペプチド又はそのアンタゴニストは疾患の予防、又は治療のための治療標的として、又は標的とする血管放出剤に有用な

ものとして提供される。アテローム性動脈硬化は、体液の蓄積、平滑筋細胞の増殖、及び動脈壁内の繊維組織の形成により、動脈内の厚みが増した脈管内膜にプラークが蓄積することにより特徴付けられる病気である。病気は、任意の器官において大、中及び小動脈を襲う。内皮及び血管平滑筋細胞機能の変化は、これらのプラークの蓄積及び緩和を調節する、重要な役割を担っていることが知られている。

高血圧は全身性動脈、肺動脈、又は門脈系において血圧が上昇することにより特徴付けられる。上昇した血圧は、欠陥のある内皮機能及び／又は血管病に帰着するか、又はこれらに起因する。

【０１７５】

血管炎には、巨大細胞動脈炎、タカヤス動脈炎、多発性動脈nodosa(細小血管障害形態を含む)、カワサキ病、微小多発性血管炎、ウェゲナー肉芽腫症、種々の感染症関連の血管疾患(Henoch-Schonlein prupuraを含む)が含まれる。変更内皮細胞機能はこれらの病気において重要であることが示されている。

レーノー病は及びレーノー現象は、冷気にさらされた手足を通って、循環の間欠性異常欠陥により特徴付けられるものである。変更内皮細胞機能がこれらの病気において重要であることが示されている。

動脈瘤は、変更内皮細胞及び／又は血管平滑筋細胞に関連した動脈又は静脈樹状分の嚢状又は紡錘状拡張症である。

動脈再狭窄(動脈壁再狭窄)は、内皮及び血管平滑筋細胞の増殖及び機能の変更の結果によるもので、続いて血管形成を生じる。

血栓静脈炎は及びリンパ管炎は静脈及びリンパ管の炎症性疾患であり、それぞれ内皮細胞機能の変更に帰着するか、及び／又は起因する。同様に、リンパ浮腫は内皮細胞機能からのリンパ管の欠陥に関連した病状である。

良性及び悪性血管腫瘍のファミリーは、血管系の細胞エレメントの異常な増殖及び成長により特徴付けられる。例えば、リンパ管腫は、先天的で、しばしば膀胱のリンパ系の良性腫瘍、通常新生児に生じるリンパの奇形である。膀胱腫瘍は隣接した組織内で成長する傾向にある。膀胱腫瘍は、通常、子宮頸部及び腋か領域に生じる。また、それらは四肢の軟組織でも生じる。主たる徴候は膨張であり、時折、網状に構造化されたリンパ及びリンパ球(lymphocyst)は結合組織に囲まれている。リンパ管腫は、胎性リンパ管又はそれらの欠失に不適当に結合することに起因すると仮定されている。結果は局所的にリンパドレナージを害している。Griener等, Lymphology, 4: 140-144 (1971)。

【０１７６】

ここでのＰＲＯポリペプチド又はそのアンタゴニストの他の用途は、成長及び／又は転移可能な腫瘍の血管新生に関与する腫瘍血管形成にある。このプロセスは新しい血管の成長に依存する。新生物及び腫瘍血管形成に係る関連した病状の例には、乳癌腫、肺癌腫、胃癌腫、食道癌腫、結腸直腸癌腫、肝臓癌腫、卵巣癌腫、テコーマ、男性胚腫、子宮頸部癌腫、子宮内膜癌腫、子宮内膜過形成、子宮内膜症、繊維肉腫、絨毛癌、頭部及び首部の癌、鼻咽腔癌腫、喉頭癌腫、肝臓芽腫、カポジ肉腫、黒色腫、皮膚癌腫、血管腫、海面性血管腫、血管芽腫、膵臓癌腫、網膜癌腫、星状細胞腫、膠芽腫、シュワン細胞腫、乏突起膠細胞腫、髄芽腫、神経芽腫、横紋筋肉腫、骨原性肉腫、平滑筋肉腫、尿路肉腫、甲状腺癌腫、ウィルムス腫瘍、腎細胞癌腫、前立腺癌腫、phakomatosesに関連した異常な血管増殖、浮腫(例えば脳腫瘍に関連したもの)、及びMeigs症候群が含まれる。

加齢性黄斑変性(ＡＭＤ)は年輩者の集団における、ひどい視覚損失に至る原因である。ＡＭＤの滲出形態は脈絡膜新血管新生及び網膜色素内皮細胞剥離により特徴付けられる。脈絡膜新血管新生が予後の動的低下に関連しているため、ＰＲＯポリペプチド又はそれらのアンタゴニストは、重度のＡＭＤを低減させるのに有用であることが予期される。

【０１７７】

また、外傷の治癒、例えば傷の治癒及び組織の修復は、ここでのＰＲＯポリペプチド又はそれらのアンタゴニストが目的とする用途である。新しい血管の形成及び緩和は、本質的に組織の治癒及び修復である。この範疇には、骨、軟骨、腱、靱帯、及び／又は神経組

織の成長又は再生、並びに傷の治癒及び組織の再生及び交換、及び火傷、切断、及び潰瘍の治療が含まれる。骨が正常に形成されない環境で軟骨及び／又は骨の成長を誘発するＰＲＯポリペプチド又はそのアンタゴニストは、骨折及び軟骨のダメージ、又はヒト及び他の動物の欠損の治療に適用される。ＰＲＯポリペプチドまたはそのアンタゴニストを使用するこのような調製物は、骨折の低減及び人工関節の固定の改善において予防的に使用される。骨形成剤により誘発される新たな骨の形成は、先天的、外傷誘発性、又は腫瘍学的、切除誘発性頭蓋欠損の修復に寄与し、また美容形成外科においても有用である。

さらに、ＰＲＯポリペプチド又はそのアンタゴニストは、限定するものではないが、圧迫潰瘍、血管不全に関連した潰瘍、外科的又は外傷的な傷等を含む治癒していない傷を、より良好により早く閉塞させることを促進させるのに有用である。

またさらに、ＰＲＯポリペプチド又はそのアンタゴニストは、他の組織、例えば器官(例えば、膵臓、肝臓、腸、腎臓、配列又は内皮を含む)、筋肉(平滑筋、骨格筋又は心筋)、及び血管(血管内皮を含む)組織の生成又は再生、又はこのような組織を含む細胞成長の促進活性を示し得る。所望の効果の一部は、線維性瘢痕化を阻害又は調節して、正常な組織を再生することである。

【０１７８】

またここでのＰＲＯポリペプチド又はそのアンタゴニストは、全身的サイトカインダメージからの病状、及び種々の組織における傷の再灌流、肺又は肝臓線維症の治療、及び再生又は保護に有用である。また、ＰＲＯポリペプチド又はそのアンタゴニストは、先駆組織又は細胞からの上述した組織の分化を促進又は阻害、又は上述した組織の成長を阻害するのに有用である。

さらに、ＰＲＯポリペプチド又はそのアンタゴニストは歯周病の治療及び他の歯修復プロセスに使用することができる。このような薬剤は骨形成細胞を誘引し、骨形成細胞の成長を刺激し、又は骨形成細胞の原種の分化を誘発する環境で提供される。ここでのＰＲＯポリペプチド又はそのアンタゴニストは、血管が、骨の回転及び成長の調節において重要な役割を担っているため、骨粗鬆症又は骨関節症の、例えば骨及び／又は軟骨修復を刺激、又は炎症プロセスにより媒介される組織破壊(コラゲナーセ活性、破骨細胞等)のプロセス又は炎症をブロックすることによる治療に有用である。

ここでＰＲＯポリペプチド又はそのアンタゴニストにあるとされる組織再生活性の他の範疇は、腱／靱帯形成である。組織が通常形成されない環境での腱／靱帯様組織又は他の組織形成を誘発するタンパク質は、ヒト及び他の動物の腱又は靱帯の裂け目、奇形、及びの腱又は靱帯の欠損の治癒に適用される。このような調製物は、腱又は靱帯組織へのダメージの予防、並びに腱又は靱帯の骨又は他の組織への固定の改善、及び腱又は靱帯組織の欠損の修復において予防的に使用される。ここでのＰＲＯポリペプチド又はそのアンタゴニストの組成物により誘発される新しい腱／靱帯様組織形成は、先天的、外傷誘発性、又は他の由来による腱又は靱帯のたの欠損の修復に寄与し、また腱又は靱帯の取り付け又は修復のための美容形成外科においても有用である。ここでの組成物は、腱-又は靱帯-形成細胞を誘引、腱-又は靱帯-形成細胞の成長を刺激、腱-又は靱帯-形成細胞原種の分化を誘発、又はイクスビボでの回復インビボでの組織修復効果における腱／靱帯細胞又は原種の成長を誘発する環境で提供される。また、ここでの組成物は、腱炎、手根管症候群、及び他の腱又は靱帯欠損にも有用である。さらに組成物は、当該技術でよく知られている担体と同じ適切なマトリクス及び／又は金属イオン封鎖剤の含む。

【０１７９】

ＰＲＯポリペプチド又はそのアンタゴニストは神経細胞の増殖、及び神経及び脳組織の再生、すなわち神経細胞又は神経組織の変性、死亡又は外傷に関与する中枢及び末梢神経系の病気及び神経障害、並びに機械的又は外傷的疾患の治療に有用である。特に、ＰＲＯポリペプチド又はそのアンタゴニストは、末梢神経系の病気、例えば末梢神経損傷、末梢神経障害及び局所的神経障害、及び中枢神経系の病気、例えばアルツハイマー病、パーキンソン病、ハンティングドン病、筋萎縮性側索硬化症、及びシャイ・ドレーガー症候群の治療に使用される。本発明で治療されるさらなる病状には、機械的又は外傷的疾患、例え

ば脊髄疾患、頭部外傷及び脳血管疾患、例えば脳卒中が含まれる。また、化学療法又は他の医学的療法の結果による末梢神経障害も、ＰＲＯポリペプチド又はそれに対するアンタゴニストを使用しての治療が可能である。

虚血-再潅流傷害は他の徴候である。内皮細胞機能不全は虚血-再潅流傷害が続いて生じる事象の後遺症の開始及び調節の両方において重要である。

慢性関節リュウマチはさらなる徴候である。血管成長及び脈管構造を通過する炎症細胞の標的は、関節炎のリュウマチ様及び血清ネガティブの形態の病因の重要な要因である。

【０１８０】

また、ＰＲＯポリペプチド又はそのアンタゴニストは、病状の進行の防止、無症候性の患者の死を含む急死の回避のために、心臓肥大を有する患者に予防的に投与される。このような予防的治療は大きな左心室心臓肥大(成人においては最大壁厚が３５ｍｍ又はそれ以上、又は子供においてはそれに匹敵する値)のケース、又は心臓における血管腫の負荷が特に強くなった場合の例において、特に正当である。

さらにＰＲＯポリペプチド又はそのアンタゴニストは、肥大性心筋症と診断された患者のかなりの部分に発現する、心房細動の治療に有用である。

さらなる徴候には、アンギナ、心筋梗塞、例えば急性心筋梗塞、及び心不全、例えば鬱血性心不全が含まれる。さらなる、非新生物病状には乾癬、糖尿病、及び時期尚早の網膜症、水晶体後方繊維増殖症、新血管緑内障を含む他の増殖性網膜症、甲状腺過形成(グレーブス病を含む)、角膜及び他の組織の移植、慢性的炎症、肺炎、ネフローゼ症候群、子癇前症、心膜滲出(例えば心膜炎に関連するもの)、及び胸膜滲出が含まれる。

上述した観点から、内皮細胞機能、増殖及び／又は形態を変更又はこれに衝撃を与えると示されている、ここで記載されたＰＲＯポリペプチド、又はそのアゴニスト又はアンタゴニストは、上述した多くの又は全ての疾患の原因及び病因において重要な役割を担っており、これらの疾患を標的とする血管関連剤、又はこれらのプロセスを増大又は阻害するための治療標的として提供可能であると思われる。

【０１８１】

ｘｉ．投与プロコトール、スケジュール、用量及び製剤

ここに記載された分子及びそれらのアゴニスト及びアンタゴニストは、上述した種々の疾患及び病気の予防及び治療薬として製薬的に有用である。

ＰＲＯポリペプチド又はアゴニスト又はアンタゴニストの治療用組成物は、適当な純度を持つ所望の分子を任意の製薬的に許容可能な担体、賦形剤、又は安定化剤（Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Osol, A.編, (1980)）と、凍結乾燥した製剤又は水溶液の形態で混合することにより調製することができる。許容可能な担体、賦形剤、又は安定化剤は、好ましくは用いられる投与量及び濃度で受容者に非毒性であり、リン酸塩、クエン酸炎、及び他の有機酸などのバッファー；アスコルビン酸及びメチオニンを含む酸化防止剤；防腐剤（オクタデシルジメチルベンジルアンモニウムクロライド；ヘキサメトニウムクロライド；ベンザルコニウムクロライド；ベンゼトニウムクロライド；フェノール、ブチル又はベンジルアルコール；メチル又はプロピルパラベン等のアルキルパラベン；カテコール；レゾルシノール；シクロヘキサノール；３-ペンタノール；及びｍ-クレゾール）；低分子量（約１０残基未満）ポリペプチド；血清アルブミン、ゼラチン、又は免疫グロブリン等のタンパク質；ポリビニルピロリドン等の親水性ポリマー；グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン、又はリシン等のアミノ酸；グルコース、マンノース、又はデキストランを含む単糖類、二糖類、及び他の炭水化物；ＥＤＴＡ等のキレート剤；スクロース、マンニトール、トレハロース又はソルビトール等の糖；ナトリウム等の塩形成対イオン；金属錯体（例えば、Ｚｎ-タンパク質錯体）；及び／又はＴＷＥＥＮ™、ＰＬＵＲＯＮＩＣＳ™又はポリエチレングリコール（ＰＥＧ）等の非イオン性界面活性剤を含む。

【０１８２】

このような担体の更なる例は、イオン交換体、アルミナ、ステアリン酸アルミニウム、レシチン、血清アルブミン、例えばヒト血清アルブミン、緩衝物質、例えばリン酸塩、グ

リシン、ソルビン酸、ソルビン酸カリウム、飽和植物脂肪酸の部分的グリセリド混合物、水、塩、又は電解質、例えば硫酸プロタミン、リン酸水素二ナトリウム、リン酸水素カリウム、塩化ナトリウム、亜鉛塩、コロイダルシリカ、マグネシウムトリシリケート、ポリビニルピロリドン、セルロースベースの物質、及びプロピレングリコールである。局所用の担体又はゲルベースの形態は、ナトリウムカルボキシメチルセルロース又はメチルセルロース等の多糖類、ポリビニルピロリドン、ポリアクリレート、ポリオキシエチレン－ポリオキシプロピレンブロックコポリマー、ポリエチレングリコール、及びモクロウアルコールを含む。あらゆる投与について、従来のデポー形態が好適に用いられる。このような形態は、例えば、マイクロカプセル、ナノ-カプセル、リポソーム、硬膏剤、吸入形態、鼻スプレー、舌下状錠剤、及び除放性製剤を含む。ＰＲＯポリペプチド又はアゴニスト又はアンタゴニストは、典型的にはそのような媒体中に約０．１ｍｇ／ｍｌから１００ｍｇ／ｍｌの濃度で処方される。

【０１８３】

他の調製物は、形成された製品中に、ＰＲＯポリペプチド又はそれらのアンタゴニストを導入して含有される。このような製品は内皮細胞の成長及び血管形成の調節に使用することができる。加えて、腫瘍侵入及び転移をこれらの製品で調節してよい。

インビボ投与に用いられるＰＲＯポリペプチド又はアンタゴニストは無菌でなければならない。これは、凍結乾燥及び再形成の前又は後の滅菌濾過膜を通した濾過によって容易に達成される。ＰＲＯポリペプチドは通常は凍結乾燥形態又は全身投与される場合には溶液中に貯蔵される。凍結乾燥形態にある場合、ＰＲＯポリペプチド又はアゴニストは典型的には使用時の適当な希釈剤を含む他の成分と組み合わせて処方される。ＰＲＯポリペプチド又はアンタゴニストの液体製剤の例は、無菌の、透明な、無色の生鮮溶液で、皮下注射用の１回投与バイアルに充填されている。繰り返し使用に適切な防腐製薬組成物は、例えばポリペプチドの種類及び指示に主として依存し、

ａ）ＰＲＯポリペプチド又はそれらのアゴニスト又はアンタゴニスト；

ｂ）溶液中のポリペプチド又は他の分子の安定性を最大にする範囲内のｐＨ、好ましくは約４-８のｐＨを維持可能なバッファー；

ｃ）主として、撹拌誘発性集合体に対しポリペプチド又は分子を安定化させる洗浄剤／界面活性剤；

ｄ）等張剤；

ｅ）フェノール、ベンジルアルコール及びベンゼトニウムハロゲン化物、例えば塩化物の群から選択される防腐剤；及び

ｆ）水；

を含有し得る。

【０１８４】

使用される洗浄剤が非イオン性であるならば、それは、例えばポリソルベート(例えば、POLYSORBATE^{TM} (TWEEN^{TM})２０、８０等)、ポロキサマー(例えば、POLOXAMER^{TM} １８８等)であってよい。非イオン性界面活性剤を使用することにより、タンパク質の変性を引き起こすことなく、表面応力の剪断に調製物をさらすことができる。さらに、このような界面活性剤含有調製物は、エアゾール装置、例えば静脈投与、及びニードレスジェット注入ガンに使用されるものにおいて、使用され得る(例えば、EP257,956を参照されたい)。

等張剤は、ＰＲＯポリペプチド又はそのアゴニスト又はアンタゴニストの液体組成物を確実に等浸透圧とするために存在し、多価糖アルコール、好ましくは３価又は高級糖アルコール、例えばグリセリン、エリトリトール、アラビトール、キシリトール、ソルビトール及びマンニトールが含まれる。これらの糖アルコールは、単独で、又は組合せて使用することもできる。また、塩化ナトリウム又は他の適切な塩を、溶液を等にするために使用してもよい。

バッファーは、所望するｐＨに応じて、アセタート、シタラート、スクシナート又はホスファートバッファーであってよい。本発明の液状調製物の一種類のｐＨは、約４から８

、好ましくはほぼ生理学的ｐＨの範囲に緩衝される。
防腐剤、フェノール、ベンジルアルコール及びベンゼトニウムハロゲン化物、例えば塩化物は、使用可能な周知の抗菌薬である。
【０１８５】
治療用ＰＲＯポリペプチド組成物は、一般的に無菌のアクセスポートを具備する容器、例えば、静脈内溶液バッグ又は皮下注射針で穿孔可能なストッパーを具備するバイアルに配される。製剤は、好ましくは静脈内（ｉ．ｖ．）、皮下（ｓ．ｃ．）、又は筋肉内（ｉ．ｍ．）の繰り返し注射として、あるいは鼻内又は肺内送達に適したエアロゾル製剤として投与される（肺内送達については、例えばEP 257,956参照）。
また、ＰＲＯポリペプチドは持続放出製剤の形態で投与することもできる。持続放出製剤の好適な例は、タンパク質を含む固体疎水性ポリマーの半透性マトリクスを含み、当該マトリクスは成形物、例えばフィルム又はマイクロカプセルの形態である。持続放出マトリクスの例は、ポリエステル、ヒドロゲル（例えば、Langer等, J. Biomed. Mater. Res., 15: 167-277 (1981)及びLanger, Chem. Tech., 12: 98-105 (1982)に記載されたようなポリ(２-ヒドロキシエチル-メタクリレート)、又はポリ(ビニルアルコール)）、ポリアクチド（米国特許第3,773,919号、EP 58,481）、Ｌ-グルタミン酸及びガンマエチル-Ｌ-グルタメートのコポリマー（Sidman等, Biopolymers, 22: 547-556 (1983)）、非分解性エチレン－酢酸ビニル（Langer等, 上掲）、分解性乳酸－グリコール酸コポリマー、例えばLupron Depot^{TM}（乳酸－グリコール酸コポリマ及び酢酸ロイプロリドからなる注射可能な微小球）、及びポリ-Ｄ-(－)-３-ヒドロキシブチル酸（EP 133,988）を含む。
【０１８６】
エチレン－酢酸ビニルや乳酸－グリコール酸等の重合体は１００日以上分子を放出できるが、特定のヒドロゲルはより短い時間タンパク質を放出する。カプセル化タンパク質は、長時間体内に残存すると、３７℃で水分に曝されることで、変性又は凝集し、生理活性の喪失や免疫原生の変化のおそれがある。かかる機構によって安定性を得るための合理的な処置が考えられる。例えば、凝集機構がチオ－ジスルフィド交換による分子間Ｓ－Ｓ結合であることが分かったら、スルフヒドリル残基を変更し、酸性溶液から凍結乾燥し、水分量を調整し、適当な添加物を使用し、特定の重合体マトリクス化合物を開発することで安定性を保証することができる。、
ＰＲＯポリペプチドの持続放出組成物は、リポソーム的に包括されたＰＲＯポリペプチドを含む。ＰＲＯポリペプチドを含有するリポソームは、それ自体周知である方法、例えば、DE 3,218,121、Epstein等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:3688-3692 (1985)、Hwang等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4030-4034 (1980)、EP 52,322、EP 36,676、EP 88,046、EP 143,949、EP 142,641、特願昭58-118008、米国特許第4,485,045号及び第4,544,545号、及びEP 102,324等による方法によって調製する。通常、リポソームは、脂質含有量が約３０モル％以上コレステロールであり、選択される割合が最適な治療法に対して調整された微小（約２００-８００オングストローム）な単ラメラ状のものである。
【０１８７】
ＰＲＯポリペプチド又はそのアンタゴニストの治療的有効量は、当然のことながら、治療（予防を含む）すべき病理学的状態、投与方法、治療に用いられる化合物の型、包含される任意の同時治療、患者の年齢、体重、一般的な医学的状態、医学的履歴などの要因によって変化し、それは担当する医師の技量の範囲内で良好に決定される。従って、治療者は、最大の治療効果が得られるように、投与量を滴定し投与経路を修正する必要がある。ＰＲＯポリペプチドが狭い範囲の宿主を有しているならば、ヒトの患者の治療には、ヒトＰＲＯポリペプチド、より好ましくは天然配列ヒトＰＲＯポリペプチドを含有する調製物であることが好ましい。臨床医は投与量が当該病状の治療において所望する効果が得られるまで、ＰＲＯポリペプチドを投与するであろう。例えば、目的がＣＨＦの治療である場合、この病状に関連した進行性心臓肥大を阻害する量とされる。この治療及び進行状況は、エコーカルジオグラフィーにより容易に監視される。同様に、肥大性心筋症の患者には、経験に基づいてＰＲＯポリペプチドを投与することができる。

上記の指針では、有効投与量は、一般的に約０．００１から約１．０ｍｇ／ｋｇ、好ましくは約０．０１－１．０ｍｇ／ｋｇ、最も好ましくは約０．０１－０．１ｍｇ／ｋｇの範囲内である。

【０１８８】

成人の高血圧の治療におけ非経口用途では、注射の形態で、体重１ｋｇ当たり約０．０１から５０ｍｇ、好ましくは約０．０５から２０ｍｇ、最も好ましくは１から２０ｍｇのＰＲＯポリペプチドを、静脈内注射により１日に１から３回投与するのが有利である。経口投与では、ＰＲＯポリペプチドをベースとする分子を、好ましくは体重１ｋｇ当たり約５ｍｇから１ｇ、好ましくは約１０から１００ｍｇ、１日に１から３回投与する。内毒素汚染物質、安全レベルの最小量、例えば０．５ｎｇ／ｍｇタンパク質未満に保持すべきである。さらにヒト投与では、調製物は好ましくは滅菌され、発熱性であり、一般的に安全で、FDA Office and biologics standardsで要求されるようにして精製される。

組織再生に使用されるＰＲＯポリペプチドを含有する製薬組成物の用量計画は、ポリペプチドの作用を変える種々の要因、例えばを、形成が望まれる組織(例えば骨)の重量、患者の年齢、性別、食餌、感染症の重傷度、投与時間、及び他の臨床的要因を考慮して、担当する医師により決定されるであろう。用量は、再構成に使用されるマトリクスの種類、製薬組成物の他のタンパク質含有物により変わり得る。例えば、他の周知の成長因子、例えばＩＧＦ－Ｉを最終組成物に添加すると、さらに用量に影響を与える。進行状況は組織／骨の成長及び／又は修復を、例えばＸ線、組織形態測定(histomorphometric determinations)及びテトラサイクリン標識化により、定期的に評価することにより監視可能である。

【０１８９】

ＰＲＯポリペプチド又はアンタゴニスト又はアゴニスト投与の経路は周知の方法に従い、例えば静脈内、筋肉内、脳内、腹腔内、脳脊髄内、皮下、眼内、関節内、滑膜内、包膜内、経口、局所又は吸入経路による注射又は注入、あるいは以下に記載する持続放出系による。またＰＲＯポリペプチド又はそれらのアンタゴニストは腫瘍内、腫瘍周辺、病巣内、又は病巣周辺経路で好適に投与され、局所的並びに全身に治療効果を発揮する。腹腔内経路は、例えば卵巣腫瘍の治療に特に有用であることが予期されている。

ペプチド又は小分子がアンタゴニスト又はアゴニストとして使用される場合、好ましくは、液体又は固体の形態で経口的又は非経口的に哺乳動物に投与される。

塩を形成し下記において有用な分子の薬理学的に許容可能な塩類の例には、アルカリ金属塩(例えばナトリウム塩、カリウム塩)、アルカリ土類金属塩(例えばカルシウム塩、マグネシウム塩)、アンモニウム塩、有機塩基塩(例えばピリジン塩、トリエチルアミン塩)、無機酸塩(例えば塩酸、硫酸塩、硝酸塩)及び有機酸塩(例えば酢酸塩、シュウ酸塩、ｐ-トルエンスルホン酸塩)が含まれる。

ここで記載され、骨、軟骨、腱、又は靱帯再生に有用な組成物における治療方法には、移植又は装置としての、局所的(topically)、全身的又は局部的(locally)な組成物の投与が含まれる。投与した場合、有用な治療用組成物は、発熱物質を含有しない生理学的に許容可能形態である。さらに組成物は、骨、軟骨又は組織のダメージ部位に送達される粘性のある形態で注射されるかカプセル化されることが望ましい。局所的投与は傷の治癒及び組織の修復に適している。好ましくは、骨及び／又は軟骨の形成のためには、組成物は、骨及び／又は軟骨のダメージ部位にタンパク質含有組成物を送達せしめ、好ましくは体内に再吸収可能な骨及び軟骨を発育する構造体を提供することのできるマトリクスを含む。このようなマトリクスは他の移植医療用途に使用される材料で作成される。

【０１９０】

マトリクス材料の選択は、生物学的融和性、生物分解性能、機械的特性、美容的外観、及び界面活性に基づく。組成物の特定の用途は、適切な処方により定義される。組成物の潜在的マトリクスは生物分解性であり、化学的に定義される硫酸カルシウム、リン酸三カルシウム、ヒドロキシアパタイト、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、及びポリ無水物であってよい。他の潜在的マトリクスは生物分解性で生物学的に明確に定義された、例えば骨又

は真皮コラーゲンである。さらなるマトリクスは純粋タンパク質又は細胞外マトリクス成分からなる。他の潜在的マトリクスは、非生物分解性であり、化学的に定義された、例えば焼結ヒドロキシアパタイト、生体ガラス、アルミナート、又は他のセラミックスである。マトリクスは上述した任意の種類の材料、例えばポリ乳酸とヒドロキシアパタイト又はコラーゲンとリン酸三カルシウムの組合せからなるものであってもよい。生物セラミックは組成において、例えばカルシウム-アルミナート-ホスファートに変えてもよく、孔サイズ、粒子サイズ及び生物分解性能を変更するためのプロセスが施されていてもよい。

特定の一実施態様では、乳酸とグリコール酸が５０：５０(モル重量)のコポリマーであり、１５０から１８０ミクロンの範囲の直径を有する多孔質粒子の形態である。いくつかの用途において、金属イオン封鎖剤、例えばカルボキシメチルセルロース、又は自己移植血塊を利用し、マトリクスからの分離から組成物を保護するのに有用である。

一好適なファミリーの金属イオン封鎖剤は、セルロース材料、例えばメチルセルロース、エチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース及びカルボキシメチルセルロースを含むアルキルセルロース(ヒドロキシアルキルセルロースを含む)であり、好ましくはカルボキシメチルセルロース(ＣＭＣ)のカチオン塩である。他の好ましい金属イオン封鎖剤には、ヒアルロン酸、アルギニン酸ナトリウム、ポリ(エチレングリコール)、ポリオキシエチレンオキシド、カルボキシビニルポリマー、及びポリ(ビニルアルコール)が含まれる。ここで有用な金属イオン封鎖剤の量は、調製物の全量に基づき、０．５－２０重量％、好ましくは１－１０重量％であり、ポリマトリクスからのポリペプチド(又はそのアンタゴニスト)の脱着を防止し、組成物に適切な操作性を付与し、さらに原細胞のマトリクスへの浸透を防止し、よって、ポリペプチドに原細胞の骨形成活性を助長する機会を付与するのに必要な量である。

【０１９１】

ｘｉｉ．組合せ治療

当問題となる疾患の防止又は治療におけるＰＲＯポリペプチド、アミンそのアゴニスト又はアンタゴニストの効力は、同じ組成物又は別個の組成物において、これらの目的のために有効な他の薬剤と組合せるか、又は活性剤を連続して投与することにより改善される。

例えば、心臓肥大の治療のためには、ＰＲＯポリペプチド治療は、周知の心筋ミオサイト肥大因子のインヒビター、例えばフェニレフリン等のα-アドレナリンアゴニストのインヒビター；エンドセリン-Ｉインヒビター、例えばBOSENTAN™及びMOXONODIN™；ＣＴ-１に対するインヒビター(米国特許第5,679,545号)；ＬＩＦに対するインヒビター；ＡＣＥインヒビター；デス-アスパラタート-アンギオテンシンＩインヒビター(米国特許第5,773,415号)及びアンギオテンシンＩＩインヒビターの投与を組合せることができる。

高血圧に関連した心臓肥大の治療のためには、ＰＲＯポリペプチドを、β-アドレナリン様レセプターブロック剤、例えばプロプラノロール、チモロール、タータロロール、カルテオロール、ナドロール、ベタキソロール、ペンブトロール、アセトブトロール、アテノロール、メトプロロール、又はカーベジロール；ＡＣＥインヒビター、例えばクイナピリル、カプトプリル、エナラプリル、ラミプリル、ベナゼプリル、フォシノプリル又はリシノプリル；ジウレティクス、例えばクロロチアザイド、ヒドロクロロチアザイド、ヒドロフルメタザイド、メチルクロチアザイド、ベンズチアザイド、ジクロロフェナミド、アセタゾラミド、又はインダパミド；及び／又はカルシウムチャンネルブロッカー、例えばジルチアゼム、ニフェジピン、ベラパミル又はニカルジピンと組合せて投与することができる。一般名によりここで同定された治療薬を遺伝子製薬用組成物は市販されており、用量、投与方法、副作用、禁忌等の製造者の使用説明書に従い投与される。例えば、Physicians'Desk Reference(Medical Economics Data Production Co.：Montvale, N.J., 1997), 51th版を参照されたい。

【０１９２】

心臓肥大の治療における組合せ治療用の好ましい候補薬は、β-アドレナリン様レセプ

ターブロック剤(プロプラノロール、チモロール、タータロロール、カルテオロール、ナドロール、ベタキソロール、ペンブトロール、アセトブトロール、アテノロール、メトプロロール、又はカーベジルロール）、ベラパミル、ジフェジピン、又はジルチアゼムである。高血圧を伴う肥大の治療には、カルシウムチャンネルブロッカー、例えばジルチアゼム、ニフェジピン、ベラパミル及びニカルジピン；β-アドレナリン様レセプターブロック剤；ジウレティクス、例えばクロロチアザイド、ヒドロクロロチアザイド、ヒドロフルメタザイド、メチルクロチアザイド、ベンズチアザイド、ジクロロフェナミド、アセタゾラミド、又はインダパミド；及び／又はＡＣＥインヒビター、例えばクイナピリル、カプトプリル、エナラプリル、ラミプリル、ベナゼプリル、フォシノプリル又はリシノプリルを使用する、抗高血圧治療薬の使用が必要である。

他の徴候のために、ＰＲＯポリペプチド又はそれらのアンタゴニストは、当該問題における骨及び／又は軟骨欠損、傷又は組織の治療に有用な他の薬剤と組合せてもよい。このような薬剤には、種々の成長因子、例えばＥＧＦ、ＰＤＧＦ、ＴＧＦ-α又はＴＧＦ-β、ＩＧＦ、ＦＧＦ、及びＣＴＧＦが含まれる。

加えて、癌の治療に使用されるＰＲＯポリペプチド又はそれらのアンタゴニストは、上述にて同定したような細胞毒性薬、化学治療薬又は成長阻害薬と組合せられる。また癌の治療のために、ＰＲＯポリペプチド又はそのアンタゴニストは適切に連続投与されるか、又は、放射活性物質の照射又は投与を含んでも含まなくても、放射線学的治療と組合せられる。

ＰＲＯポリペプチド又はそのアンタゴニストと組合せて投与される治療薬の有効量は、医師又は獣医の裁量による。投与量とその調節は処理される病状に最大の治療効果が達成されるようになされる。例えば、高血圧の治療においては、これらの量は、理想的にはジウレティクス又はデジタルの使用、及び高血圧又は低血圧、腎損傷等を考慮に入れる。用量は、治療される特定の患者及び使用される治療薬の種類等の因子に依存する。典型的には、使用される量は、治療薬をＰＲＯポリペプチドと共に投与しない場合と同じ用量である。

【０１９３】

ｘｉｉｉ．製造品

上述した疾患の診断又は治療に有用なＰＲＯポリペプチド又はそのアンタゴニストを含むキットのような製造品は、少なくとも１つの容器及びラベルを具備する。適切な容器には、例えばボトル、バイアル、シリンジ及び試験管が含まれる。容器はガラス又はプラスチックのような種々の物質から形成できる。容器は、状態の診断又は治療に有効な組成物を収容し、無菌のアクセスポートを有し得る（例えば、容器は皮下注射針で穿孔可能なストッパーを具備する静脈内バッグ又はバイアルであってよい）。組成物中の活性剤はＰＲＯポリペプチド又はそのアゴニスト又はアンタゴニストである。容器上又は添付されるラベルには、組成物が選択した状態の診断又は治療に使用されることが示されている。この製造品は、製薬的に許容可能なバッファー、例えばリン酸緩衝塩水、リンガー液、及びデキストロース溶液を収容した第２の容器をさらに具備してもよい。さらに、他のバッファー、希釈剤、フィルター、針、シリンジ、及び使用説明書を備えた包装挿入物を含む、商業的及び使用者の立場から望ましい他の材料を具備してもよい。また、この製造品は、上述の他の活性剤を収容した第２又は第３の容器を具備してもよい。

【０１９４】

Ｅ．　抗体

本発明で最も有望な候補薬の幾つかは、ここで同定された遺伝子の産生又は遺伝子産物を阻害及び／又は遺伝子産物の活性を低減する抗体及び抗体断片である。

ｉ．ポリクローナル抗体

ポリクローナル抗体の調製方法は当業者に知られている。哺乳動物においてポリクローナル抗体は、例えば免疫化剤、及び所望するのであればアジュバントを、一又は複数回注射することで発生させることができる。典型的には、免疫化剤及び／又はアジュバントを複数回皮下又は腹腔内注射により、哺乳動物に注射する。免疫化剤は、ＰＲＯポリペプチ

ド又はその融合タンパク質を含みうる。免疫化剤を免疫化された哺乳動物において免疫原性が知られているタンパク質に複合させるのが有用である。このような免疫原タンパク質の例は限られないが、キーホールリンペットヘモシアニン、血清アルブミン、ウシサイログロブリン及び大豆トリプシンインヒビターが含まれる。使用され得るアジュバントの例には、フロイント完全アジュバント及びＭＰＬ-ＴＤＭアジュバント(モノホスホリル脂質Ａ、合成トレハロースジコリノミコラート)が含まれる。免疫化プロトコールは、過度の実験なく当業者により選択されるであろう。

【０１９５】

ｉｉ．モノクローナル抗体

あるいは、抗-ＰＲＯ抗体はモノクローナル抗体であってもよい。モノクローナル抗体は、Kohler及びMilstein, Nature, 256:495 (1975)に記載されているようなハイブリドーマ法を使用することで調製することができる。ハイブリドーマ法では、マウス、ハムスター又は他の適切な宿主動物を典型的には免疫化剤により免疫化することで、免疫化剤に特異的に結合する抗体を生成するかあるいは生成可能なリンパ球を誘発する。また、リンパ球をインビトロで免疫化することもできる。

免疫化剤は、典型的には対象とするＰＲＯポリペプチド又はその融合タンパク質を含む。一般にヒト由来の細胞が望まれる場合には末梢血リンパ球(「ＰＢＬ」)が使用され、あるいは非ヒト哺乳動物源が望まれている場合は、脾臓細胞又はリンパ節細胞が使用される。次いで、ポリエチレングリコール等の適当な融合剤を用いてリンパ球を不死化株化細胞と融合させ、ハイブリドーマ細胞を形成する。Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice,(New York；Academic Press, 1986) pp. 59-103。不死化株化細胞は、通常は、形質転換した哺乳動物細胞、特に齧歯動物、ウシ、及びヒト由来の骨髄腫細胞である。通常、ラット又はマウスの骨髄腫株化細胞が使用される。ハイブリドーマ細胞は、好ましくは、未融合の不死化細胞の生存又は成長を阻害する一又は複数の物質を含有する適切な培地で培養される。例えば、親細胞が、酵素のヒポキサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ(HGPRT又はHPRT)を欠いていると、ハイブリドーマの培地は、典型的には、ヒポキサチン、アミノプチリン及びチミジンを含み(「ＨＡＴ培地」)、この物質がＨＧＰＲＴ欠乏性細胞の増殖を阻止する。

【０１９６】

好ましい不死化株化細胞は、効率的に融合し、選択された抗体生成細胞による安定した高レベルの抗体発現を支援し、ＨＡＴ培地のような培地に対して感受性である。より好ましい不死化株化細胞はマウス骨髄腫株であり、これは例えばカリフォルニア州サンディエゴのSalk Institute Cell Distribution Centerやバージニア州マナサスのアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションより入手可能である。ヒトモノクローナル抗体を生成するためのヒト骨髄腫及びマウス-ヒト異種骨髄腫株化細胞も開示されている。Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984)、Brodeur等, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987) pp. 51-63。

次いでハイブリドーマ細胞が培養される培養培地を、ＰＲＯポリペプチドに対するモノクローナル抗体の存在について検定する。好ましくは、ハイブリドーマ細胞によって生成されたモノクローナル抗体の結合特異性は免疫沈降又はラジオイムノアッセイ(ＲＩＡ)や酵素結合免疫測定法(ＥＬＩＳＡ)等のインビトロ結合検定法によって測定する。このような技術及びアッセイは、当該分野において公知である。モノクローナル抗体の結合親和性は、例えばMunson及びPollard, Anal. Biochem., 107:220 (1980)によるスキャッチャード分析法によって測定することができる。

【０１９７】

所望のハイブリドーマ細胞が同定された後、クローンを制限希釈工程によりサブクローニングし、標準的な方法で成長させることができる。Goding, 上掲。この目的のための適当な培地には、例えば、ダルベッコの改変イーグル培地及びＲＰＭＩ-１６４０倍地が含まれる。あるいは、ハイブリドーマ細胞は哺乳動物においてインビボで腹水として成長させることもできる。

サブクローンによって分泌されたモノクローナル抗体は、例えばプロテインＡ－セファロース法、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー法、ゲル電気泳動法、透析法又はアフィニティークロマトグラフィー等の従来の免疫グロブリン精製方法によって培養培地又は腹水液から単離又は精製される。

【０１９８】

また、モノクローナル抗体は、組換えＤＮＡ法、例えば米国特許第4,816,567号に記載された方法により作成することができる。本発明のモノクローナル抗体をコードするＤＮＡは、常套的な方法を用いて(例えば、マウス抗体の重鎖及び軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合可能なオリゴヌクレオチドプローブを使用して)、容易に単離し配列決定することができる。本発明のハイブリドーマ細胞はそのようなＤＮＡの好ましい供給源となる。ひとたび単離されたら、ＤＮＡは発現ベクター内に配することができ、これが宿主細胞、例えばサルＣＯＳ細胞、チャイニーズハムスター卵巣(ＣＨＯ)細胞、あるいは免疫グロブリンタンパク質を生成等しない骨髄腫細胞内に形質移入され、組換え宿主細胞内でモノクローナル抗体の合成をすることができる。また、ＤＮＡは、例えば相同マウス配列に換えてヒト重鎖及び軽鎖定常ドメインのコード配列を置換することにより（米国特許第4,816,567号；Morrison等，上掲)、又は免疫グロブリンコード配列に非免疫グロブリンポリペプチドのコード配列の一部又は全部を共有結合することにより修飾することができる。このような非免疫グロブリンポリペプチドは、本発明の抗体の定常ドメインに置換でき、あるいは本発明の抗体の１つの抗原結合部位の可変ドメインに置換でき、キメラ性二価抗体を生成する。

抗体は一価抗体であってもよい。一価抗体の調製方法は当該分野においてよく知られてる。例えば、一つの方法は免疫グロブリン軽鎖と修飾重鎖の組換え発現を含む。重鎖は一般的に、重鎖の架橋を防止するようにＦｃ領域の任意の点で切断される。あるいは、関連するシステイン残基を他のアミノ酸残基で置換するか欠失させて架橋を防止する。

一価抗体の調製にはインビトロ法がまた適している。抗体の消化による、その断片、特にＦａｂ断片の生成は、当該分野において知られている慣用的技術を使用して達成できる。

【０１９９】

ｉｉｉ．ヒト及びヒト化抗体

抗-ＰＲＯ抗体は、さらにヒト化抗体又はヒト抗体を含む。非ヒト(例えばマウス)抗体のヒト化形とは、キメラ免疫グロブリン、免疫グロブリン鎖あるいはその断片(例えばＦｖ、Ｆａｂ、Ｆａｂ'、$F(ab')_2$ あるいは抗体の他の抗原結合サブ配列)であって、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小配列を含むものである。ヒト化抗体はＣＤＲの残基が、マウス、ラット又はウサギのような所望の特異性、親和性及び能力を有する非ヒト種(ドナー抗体)のＣＤＲの残基によって置換されたヒト免疫グロブリン(レシピエント抗体)を含む。幾つかの例では、ヒト免疫グロブリンのＦｖフレームワーク残基は、対応する非ヒト残基によって置換されている。また、ヒト化抗体は、レシピエント抗体にも、移入されたＣＤＲもしくはフレームワーク配列にも見出されない残基を含んでいてもよい。一般に、ヒト化抗体は、全てあるいはほとんど全てのＣＤＲ領域が非ヒト免疫グロブリンのものに対応し、全てあるいはほとんど全てのＦＲ領域がヒト免疫グロブリンコンセンサス配列のものである、少なくとも１つ、典型的には２つの可変ドメインの実質的に全てを含む。ヒト化抗体は、最適には免疫グロブリン定常領域(Ｆｃ)、典型的にはヒトの免疫グロブリンの定常領域の少なくとも一部を含んでなる。Jones等，Nature，321:522-525 (1986); Riechmann等，Nature，332:323-329 (1988); 及びPresta，Curr. Op Struct. Biol.，2:593-596 (1992)。

非ヒト抗体をヒト化する方法はこの分野でよく知られている。一般的に、ヒト化抗体には非ヒトを源にする一又は複数のアミノ酸残基が導入される。これら非ヒトアミノ酸残基は、しばしば、典型的には「移入」可変ドメインから得られる「移入」残基と称される。ヒト化は基本的に齧歯動物のＣＤＲ又はＣＤＲ配列でヒト抗体の該当する配列を置換することによりウィンター(winter)及び共同研究者［Jones等，Nature，321:522-525 (1986)

；Riechmann等，Nature，332:323-327 (1988)；Verhoeyen等，Science，239:1534-1536 (1988)］の方法に従って、齧歯類ＣＤＲ又はＣＤＲ配列をヒト抗体の対応する配列に置換することにより実施される。よって、このような「ヒト化」抗体は、無傷のヒト可変ドメインより実質的に少ない分が非ヒト種由来の対応する配列で置換されたキメラ抗体(米国特許第4,816,567号)である。実際には、ヒト化抗体は典型的には幾つかのＣＤＲ残基及び場合によっては幾つかのＦＲ残基が齧歯類抗体の類似する部位からの残基によって置換されたヒト抗体である。

【０２００】

また、ヒト抗体は、ファージ表示ライブラリを含むこの分野で知られた種々の方法を用いて作成することもできる。Hoogenboom及びWinter，J. Mol. Biol.，227:381 (1992)；Marks等，J. Mol. Biol.，222:581 (1991)。また、Cole等及びBoerner等の方法も、ヒトモノクローナル抗体の調製に利用することができる。Cole等，Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy，Alan R. Liss. p.77(1985)及びBoerner等，J. Immunol.，147(1)：86-95(1991) 。同様に、ヒト抗体はヒト免疫グロブリン座位をトランスジェニック動物、例えば内在性免疫グロブリン遺伝子は部分的又は完全に不活性化されたマウスに導入することにより産生することができる。投与の際に、遺伝子再配列、組立、及び抗体レパートリーを含むあらゆる観点においてヒトに見られるものに非常に類似しているヒト抗体の生産が観察される。このアプローチは、例えば米国特許第5,545,807号；同第5,545,806号；同第5,569,825号；同第5,625,126号；同第5,633,425号；同第5,661,016号、及び次の科学文献：Marks等，Bio/Technology 10，779-783 (1992)；Lonberg等，Nature 368 856-859 (1994)；Morrison，Nature 368，812-813 (1994)；Fishwild等，Nature Biotechnology 14，845-851 (1996)；Neuberger，Nature Biotechnology 14，826 (1996)；Lonberg及びHuszar，Intern. Rev. Immunol. 13 65-93 (1995)に記載されている。

【０２０１】

ｉｖ．二重特異性抗体

二重特異性抗体は、少なくとも２つの異なる抗原に対して結合特異性を有するモノクローナル抗体、好ましくはヒトもしくはヒト化抗体である。本ケースの場合において、結合特異性の一方はＰＲＯポリペプチドに対してであり、他方は任意の他の抗原、好ましくは細胞表面タンパク質又はレセプター又はレセプターサブユニットに対してである。

二重特異性抗体を作成する方法は当該技術分野において周知である。伝統的には、二重特異性抗体の組換え生産は、二つの重鎖が異なる特異性を持つ二つの免疫グロブリン重鎖／軽鎖対の同時発現に基づく。Milstein及びCuello，Nature，305:537-539 (1983)。免疫グロブリンの重鎖と軽鎖を無作為に取り揃えるため、これらハイブリドーマ(クアドローマ)は１０種の異なる抗体分子の潜在的混合物を生成し、その内一種のみが正しい二重特異性構造を有する。正しい分子の精製は、アフィニティークロマトグラフィー工程によって通常達成される。同様の手順が1993年5月13日公開のWO 93/08829、及びTraunecker等，EMBO J.,10:3655-3656 (1991)に開示されている。

所望の結合特異性(抗体-抗原結合部位)を有する抗体可変ドメインを免疫グロブリン定常ドメイン配列に融合できる。融合は、好ましくは少なくともヒンジ部、ＣＨ２及びＣＨ３領域の一部を含む免疫グロブリン重鎖定常ドメインとのものである。少なくとも一つの融合には軽鎖結合に必要な部位を含む第一の重鎖定常領域(ＣＨ１)が存在することが望ましい。免疫グロブリン重鎖融合をコードするＤＮＡ、及び望むのであれば免疫グロブリン軽鎖を、別々の発現ベクターに挿入し、適当な宿主生物に同時形質移入する。二重特異性抗体を作成するための更なる詳細については、例えばSuresh等，Methods in Enzymology，121:210(1986)を参照されたい。

【０２０２】

ｖ．ヘテロ複合抗体

ヘテロ複合抗体は、２つの共有結合した抗体からなる。このような抗体は、例えば、免疫系細胞を不要な細胞に対してターゲティングさせるため(米国特許第4,676,980号)及びＨＩＶ感染の治療のために（WO 91/00360；WO 92/200373；EP 03089)提案されている。こ

の抗体は、架橋剤に関連したものを含む合成タンパク化学における既知の方法を使用して、インビトロで調製することができると考えられる。例えば、ジスルフィド交換反応を使用するか又はチオエーテル結合を形成することにより、免疫毒素を作成することができる。この目的に対して好適な試薬の例には、イミノチオレート及びメチル-４-メルカプトブチリミデート、及び例えば米国特許第4,6767,980号に開示されているものが含まれる。

【０２０３】

ｖｉ．エフェクター機能の加工

本発明の抗体をエフェクター機能について改変し、例えば癌治療における抗体の有効性を向上させるのが望ましい。例えば、システイン残基をＦｃ領域に導入し、それにより、この領域に鎖間ジスルフィド結合を形成させるようにしてもよい。そのようにして生成された同種二量体抗体は、向上した内部移行能力及び／又は増加した補体媒介細胞殺傷及び抗体-依存性細胞性細胞毒性（ＡＤＣＣ）を有しうる。Caron等，J. Exp. Med. 176: 1191-1195 (1992)及びShopes, B. J. Immunol. 148: 2918-2922 (1992)参照。向上した抗腫瘍活性を持つ同種二量体抗体はまた、Wolff等，Cancer research 53: 2560-2565 (1993)に記載されたような異種二官能性架橋を用いても調製しうる。あるいは、抗体は、２つのＦｃ領域を有するように加工して、それにより補体溶解及びＡＤＣＣ能力を向上させることもできる。Stevenson等，Anti-Cancer Drug Design 3: 219-230 (1989)参照。

【０２０４】

ｖｉｉ．免疫複合体

本発明はまた、化学治療薬、毒素（例えば、細菌、真菌、植物又は動物由来の酵素活性毒素、又はその断片）などの細胞毒性薬、あるいは放射性同位体（即ち、放射性複合）に複合された抗体を含む免疫複合体にも関する。

このような免疫複合体の生成に有用な化学治療薬は上記した。用いることのできる酵素活性毒素及びその断片は、ジフテリアＡ鎖、ジフテリア毒素の非結合活性断片、（緑膿菌からの）外毒素Ａ鎖、リシンＡ鎖、アブリンＡ鎖、モデクシン(modeccin)Ａ鎖、アルファ-サルシン、アレウリテス・フォーディ(Aleurites fordii)タンパク質、ジアンチン(dianthin)タンパク質、フィトラカ・アメリカーナ(Phytolaca americana)タンパク質（ＰＡＰＩ、ＰＡＰＩＩ、及びＰＡＰ-Ｓ）、モモルディカ・チャランチア(momordica charantia)インヒビター、クルシン(curcin)、クロチン(crotin)、サパオナリア・オフィシナリス(sapaonaria oficinalis)インヒビター、ゲロニン(gelonin)、ミトゲリン(mitogellin)、レストリクトシン(restrictocin)、フェノマイシン(phenomycin)、エノマイシン(enomycin)及びトリコテセン(tricothecene)を含む。様々な放射性ヌクレオチドが放射性複合抗体の生成に利用可能である。例として、^{212}Ｂｉ、^{131}Ｉ、^{131}Ｉｎ、^{90}Ｙ及び^{186}Ｒｅを含む。

抗体及び細胞毒性薬の複合体は、種々の二官能性タンパク質カップリング剤、例えば、Ｎ-スクシンイミジル-３-(２-ピリジルジチオール)プロピオネート（ＳＰＤＰ）、イミノチオラン（ＩＴ）、イミドエステルの二官能性誘導体（ジメチルアジピミデートＨＣＬ等）、活性エステル（ジスクシンイミジルスベレート等）、アルデヒド（グルタルアルデヒド等）、ビス-アジド化合物（ビス(ｐ-アジドベンゾイル)ヘキサンジアミン等）、ビス-ジアゾニウム誘導体（ビス-(ｐ-ジアゾニウムベンゾイル)-エチレンジアミン等）、ジイソシアネート（トリエン２，６-ジイソシアネート等）、及びビス-活性フッ素化合物（１，５-ジフルオロ-２，４-ジニトロベンゼン等）を用いて作成できる。例えば、リシン免疫毒素は、Vitetta等，Science 238: 1098 (1987)に記載されたように調製することができる。カーボン-１４-標識１-イソチオシアナトベンジル-３-メチルジエチレントリアミン五酢酸（ＭＸ-ＤＴＰＡ）は、放射性ヌクレオチドの抗体への複合のためのキレート剤の例である。WO 94/11026参照。

他の実施態様では、腫瘍の予備標的化で使用するために、抗体は「レセプター」（ストレプトアビジン等）に複合されてもよく、抗体-レセプター複合体は患者に投与され、次いで清澄化剤を用いて未結合複合体を循環から除去し、次に細胞毒性薬（例えば、放射性ヌクレオチド等）に複合された「リガンド」（アビジン等）を投与する。

【０２０５】
ｖｉｉｉ．免疫リポソーム
また、ここに開示する抗体は、免疫リポソームとして調製してもよい。抗体を含むリポソームは、Epstein等，Proc. Natl. acad. Sci. USA, 82: 3688 (1985); Hwang等，Proc. natl. Acad. Sci. USA, 77: 4030 (1980); 及び米国特許第4,485,045号及び第4,544,545号に記載されたような、この分野で知られた方法で調製される。向上した循環時間を持つリポソームは、米国特許第5,013,556号に開示されている。
特に有用なリポソームは、ホスファチジルコリン、コレステロール及びＰＥＧ-誘導ホスファチジルエタノールアミン（ＰＥＧ-ＰＥ）を含む脂質組成物での逆相蒸発法によって生成される。リポソームは、所定サイズの孔のフィルターを通して押し出され、所望の径を有するリポソームが生成される。本発明の抗体のＦａｂ'断片は、Martin等，J. Biol. Chem. 257: 286-288 (1982)に記載されているように、ジスルフィド交換反応を介してリポソームに複合され得る。化学治療薬（ドキソルビシン等）は、場合によってはリポソーム内に包含される。Gabizon等，J. National Cancer Inst. 81(19) 1484 (1989)参照。
【０２０６】
ｉｘ．抗体の製薬組成物
ここで同定されるＰＲＯポリペプチドに特異的に結合する抗体、並びに上記に開示したスクリーニングアッセイで同定された他の分子は、上記及び下記に記した種々の疾患の治療のために、製薬組成物の形態で投与することができる。
ＰＲＯポリペプチドが細胞内であり、全抗体が阻害剤として用いられる場合、内在化抗体が好ましい。しかし、リポフェクション又はリポソームも抗体、又は抗体断片を細胞に導入するのに使用できる。抗体断片が用いられる場合、標的タンパク質の結合ドメインに特異的に結合する最小阻害断片が好ましい。例えば、抗体の可変領域配列に基づいて、標的タンパク質配列に結合する能力を保持したペプチド分子が設計できる。このようなペプチドは、化学的に合成でき、及び／又は組換えＤＮＡ技術によって生成できる。例えば、Marasco等，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 7889-7893 (1993)を参照。
ここでの製剤は、治療すべき特定の徴候に必要な場合に１以上の活性化合物、好ましくは互いに悪影響を及ぼさない相補的活性を持つものも含んでよい。あるいは、又はそれに加えて、組成物は、細胞毒性薬、サイトカイン又は成長阻害剤を含んでもよい。これらの分子は、適切には、意図する目的に有効な量の組み合わせで存在する。
また、活性成分は、例えばコアセルベーション技術により又は界面重合により調製されたマイクロカプセル、例えば、各々ヒドロキシメチルセルロース又はゼラチン-マイクロカプセル及びポリ（メタクリル酸メチル）マイクロカプセル中、コロイド状薬物送達系（例えば、リポソーム、アルブミン小球、マイクロエマルション、ナノ粒子及びナノカプセル）中、又はマイクロエマルション中に包括されていてもよい。これらの技術は、Remington's Pharmaceutical Science, 上掲に開示されている。
【０２０７】
インビボ投与に使用される製剤は無菌でなけらばならない。これは、滅菌濾過膜を通した濾過により容易に達成される。
持続放出製剤を調製してもよい。持続放出製剤の好適な例は、抗体を含有する固体疎水性ポリマーの半透性マトリクスを含み、このマトリクスは成形された物品、例えばフィルム、又はマイクロカプセルの形状である。持続放出性マトリクスの例は、ポリエステルヒドロゲル（例えば、ポリ(２-ヒドロキシエチル-メタクリレート)又はポリ(ビニルアルコール)）、ポリラクチド（米国特許第3,773,919号）、Ｌ-グルタミン酸及びγ-エチル-Ｌ-グルタメートのコポリマー、非分解性エチレン-酢酸ビニル、LUPRON DEPOT(商品名)（乳酸-グリコール酸コポリマーと酢酸リュープロリドの注射可能な小球）などの分解性乳酸-グリコール酸コポリマー、ポリ-(Ｄ)-３-ヒドロキシブチル酸を含む。エチレン-酢酸ビニル及び乳酸-グリコール酸などのポリマーは分子を１００日に渡って放出することができるが、ある種のヒドロゲルはより短時間でタンパク質を放出してしまう。カプセル化された抗体が身体内に長時間残ると、それらは３７℃の水分に露出されることにより変性又は

凝集し、その結果、生物学的活性の低下及び起こりうる免疫原性の変化をもたらす。合理的な方法は、含まれる機構に依存する安定化について工夫することができる。例えば、凝集機構がチオージスルフィド交換を通した分子間Ｓ－Ｓ結合形成であると発見された場合、安定化はスルフヒドリル残基の修飾、酸性溶液からの凍結乾燥、水分含有量の制御、適切な添加剤の付加、及び特異的ポリマーマトリクス組成物の開発によって達成されうる。

【０２０８】

ｘ．抗体を使用する治療方法

ＰＲＯポリペプチドに対する抗体を上述した種々の心臓血管、内皮及び血管形成病の治療に使用できることが予期されている。

抗体は、哺乳動物、好ましくはヒトに、周知の方法、例えば、ボーラスとして又は所定時間に渡る連続注入による静脈内投与、筋肉内、腹膜内、脳脊髄内、皮下、関節間、滑膜内、鞘内、経口、局所、又は吸入経路などにより投与される。抗体の静脈内投与が好ましい。

他の治療的養生法を例えば本発明の抗体の投与と組み合わせてもよい。例えば、抗体で癌の治療をする場合は、このような抗体で治療される患者は放射線治療を受けてもよい。あるいは、又はそれに加えて、患者に化学治療薬を投与してもよい。このような化学治療薬の調製法及び用量スケジュールは、製造者の指示に従って使用されるか、熟練した実務者により経験的に決定される。そのような化学治療に対する調製法及び用量スケジュールはまたChemotherapy Service M.C. Perry編, (Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 1992)にも記載されている。化学治療薬は、抗体の投与に先立って、又は続いて投与してもよく、あるいはそれらと同時に投与してもよい。抗体は、タモキシフェン又はEVISTM等の抗エストロゲン化合物又はオナプリストンなどの抗プロゲステロン（EP 616812参照）の、それらの分子について知られた用量と組み合わせてもよい。

また、抗体を癌の治療に使用する場合、他の腫瘍関連抗原に対する抗体、例えば一又は複数のＥｒｂＢ２、ＥＧＦＲ、ＥｒｂＢ３、ＥｒｂＢ４、又はＶＥＧＦレセプターに結合する抗体を投与することも好ましい。また、上述した薬剤も含む。抗体は適切に連続投与されるか、又は、放射活性物質の照射又は投与を含んでも含まなくても、放射線学的治療と組合せられる。あるいは、又はそれに加えて、ここで開示されており、同じか、又は二又はそれ以上の異なる抗原に対して結合する二又はそれ以上の抗体を、患者に同時投与してもよい。ときどきは、患者に一又は複数のサイトカインを投与することも有利である。好ましい実施態様では、ここの抗体は、成長阻害剤と同時投与される。例えば、まず成長阻害剤を投与し、続いて本発明の抗体を投与する。しかしながら、同時投与、又は本発明の抗癌剤を最初に投与することも考えられる。成長阻害剤についての適切な用量は現在用いられている量であるが、成長阻害剤とこの抗体との組み合わせ（相乗）効果により減少させ得る。

【０２０９】

一実施態様において、腫瘍の血管新生は、組合せ治療において攻撃される。抗-ＰＲＯポリペプチド抗体及び他の抗体(例えば抗-ＶＥＧＦ)は、例えば腫瘍又は転移病巣の壊死がみられるように決定された治療的有効量で、腫瘍を有する患者に投与される。この治療は、好ましい効果が観察されるか、又は腫瘍又は任意の転移病巣の痕跡がなくなるまで続けられる。ついで、ＴＮＦを、補助剤、例えばアルファ-、ベータ-又はガンマ-インターフェロン、抗-ＨＥＲ２抗体、ヘレグリン(heregulin)、抗ヘレグリン抗体、Ｄ-因子、インターロイキン-１(ＩＬ-１)、インターロイキン-２(ＩＬ-２)、顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子(ＧＭ-ＣＳＦ)、又は腫瘍中の微細血管凝固促進剤、例えば抗-プロテインＣ抗体、抗-プロテインＳ抗体、又はＣ４ｂ結合プロテイン(1991年2月21日公開のWO91/01753)。

補助剤はその有効性に応じて変わり、便宜的な方式でスクリーニングされるマトリクスにより、腫瘍における影響力と比較することが望ましい。抗-ＰＲＯポリペプチド抗体及びＴＮＦの投与は、所望する臨床効果が達成されるまで繰り返される。また、抗-ＰＲＯポリペプチド抗体は、ＴＮＦ、場合によっては補助剤と共に投与される。固形腫瘍が、四

肢又は一般的な循環器からの単離が可能な他の位置で見出される例では、ここに記載される治療薬は単離された腫瘍又は器官に投与される。他の実施態様において、ＦＧＦ又はＰＤＧＦアンタゴニスト、例えば抗-ＦＧＦ又は抗-ＰＤＧＦ中和剤は、抗-ＰＲＯポリペプチド抗体と共に患者に投与される。抗-ＰＲＯポリペプチド抗体を用いた治療は、好ましくは傷の治癒又は所望する新血管新生の期間中は中止する。

【０２１０】

心臓血管、内皮及び血管形成疾患の予防又は治療のための、ここでの抗体の適切な用量は、上記で定義したような治療される疾患の型、疾患の重篤さ及び経過、防止又は治療目的で薬剤が投与されるか否か、従前の治療、患者の臨床履歴及び抗体に対する反応、及び主治医の裁量による。抗体は、適切には患者に一回又は一連の治療に渡って適切に投与される。

例えば、疾患の型及び重篤さに応じて、約１μｇ／ｋｇから５０ｍｇ／ｋｇ（例えば、０．１－２０ｍｇ／ｋｇ）の抗体が、例えば、１又はそれ以上の別々の投与あるいは連続注入のいずれにしても、患者に投与するための最初の候補用量である。典型的な１日の用量は、上記の要因に応じて、約１μｇ／ｋｇから１００ｍｇ／ｋｇ又はそれ以上であろう。数日以上に渡る繰り返し投与のためには、状態に応じて、疾患の徴候に所望の抑制が現れるまで治療が続けられる。しかしながら、他の用量計画が有用であることもある。この治療の進行は、従来の技術及びアッセイ、例えばＸ線腫瘍イメージングによって容易に監視される。

【０２１１】

ｘｉ．製造品

また、抗体を収容する容器とラベルをも具備する製造品も提供される。このような製造品は上述しており、ここで活性剤は抗-ＰＲＯ抗体である。

ｘｉｉ．抗体を使用する腫瘍の診断及び予知

抗体が使用される徴候が癌である場合、或る種の腫瘍で過剰発現される成長レセプター等の細胞表面タンパク質は候補薬剤又は腫瘍（例えば、癌）治療の優れた標的であるが、ＰＲＯポリペプチドと同じタンパク質は腫瘍の診断及び予知におけるさらなる用途が見出されている。例えば、ＰＲＯポリペプチドに対して向けられる抗体は腫瘍の診断及び予知に使用することができる。

例えば、抗体断片を含む抗体は、ＰＲＯポリペプチドをコードする遺伝子を含む遺伝子の発現の定性的又は定量的検出に用いることができる。抗体は、好ましくは検出可能な、例えば蛍光標識を備え、結合は光学顕微鏡、フローサイトメトリー、フルオロメトリー、又はこの分野で知られた他の技術によって監視できる。このような結合アッセイは、実質的に上述のように実施される。

マーカー遺伝子産物に結合する抗体のインサイツ検出は、例えば、免疫蛍光又は免疫電子顕微鏡によって実施できる。この目的のために、組織学的試料を患者から取り出し、好ましくは生物学的試料に抗体を被せることにより、標識抗体をそれに適用する。この手法はまた、試験される組織におけるマーカー遺伝子産物の分布も決定できるようにする。当業者には、インサイツ検出のために広範な組織学的方法が容易に利用できることは明らかであろう。

【０２１２】

以下の実施例は例示するためにのみ提供されるものであって、本発明の範囲を決して限定することを意図するものではない。

本明細書で引用した全ての特許及び文献の開示の全体を、出典明示によりここに取り込む。

（実施例）

実施例で言及されている市販試薬は、特に示さない限りは製造者の使用説明に従い使用した。ＡＴＣＣ登録番号により以下の実施例及び明細書全体を通して特定されている細胞の供給源はアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション、マナッサス、ＶＡである。特に記さない限り、本発明は上記及び以下の教科書に記載されたもののような組換えＤＮ

Ａ技術の標準的な手法を用いた：上掲のSambrook等；Ausubel等，Current Protocols in Molecular Biology（Green Publishing Associates and Wiley Interscience，N.Y.，1989）；Innis等，PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications（Academic Press，Inc.；N.Y..，1990)；Harlow等，Antibodies: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Press: Cold Spring Harbor 1988)；Gait，Oligonucleotide synthesis（IRL Press，Oxford，1984）；Freshney，Animal Cell Culture，1987；Coligan等，Current Protocols in Immunology，1991。

【実施例１】

【０２１３】

新規なポリペプチド及びそれをコードするｃＤＮＡを同定するための細胞外ドメイン相同性スクリーニング

Swiss-Prot公的データベースからの約９５０の既知の分泌タンパク質からの細胞外ドメイン（ＥＣＤ）配列（もしあれば、分泌シグナル配列を含む）を、ＥＳＴデータベースの検索に使用した。ＥＳＴデータベースは、公的データベース（例えば、Dayhoff、GenBank）及び企業のデータベース（例えば、LIFESEQ(商品名)、Incyte Pharmaceuticals、Palo Alto，CA）を含む。検索は、コンピュータプログラムBLAST又はBLAST-2（Altschul等，Methods in Enzymology 266: 460-480 (1996)）を用いて、ＥＣＤタンパク質配列のＥＳＴ配列の６フレーム翻訳との比較として実施した。既知のタンパク質をコードせず、BLASTスコア７０（９０の場合もある）又はそれ以上を持つ比較物は、プログラム「phrap」（Phil Green，University of Washington，Seattle，WA）で集団化してコンセンサスＤＮＡ配列を構築した。

この細胞外ドメイン相同性スクリーニングを用いて、phrapを用いて他の同定されたＥＳＴ配列に対してコンセンサスＤＮＡ配列を構築した。さらに、得られたコンセンサスＤＮＡ配列を、しばしば（常にではない）BLAST又はBLAST-2及びphrapの繰り返しサイクルを用いて伸長し、コンセンサス配列を上で議論したＥＳＴ配列の供給源を用いて可能な限り伸長させた。

【０２１４】

上記のように得られたコンセンサス配列に基づいて、次いでオリゴヌクレオチドを合成し、ＰＣＲにより対象とする配列を含むｃＤＮＡライブラリを同定するため、及びＰＲＯポリペプチドの全長コード化配列のクローンを単離するプローブとして用いるために使用した。正方向及び逆方向ＰＣＲプライマーは一般的に２０から３０ヌクレオチドの範囲であり、しばしば約１００－１０００ｂｐ長のＰＣＲ産物を与えるために設計される。プローブ配列は、典型的に４０－５５ｂｐ長である。幾つかの場合には、コンセンサス配列が約１－１．５ｋｂｐより大きいときに付加的なオリゴヌクレオチドが合成される。全長クローンについて幾つかのライブラリをスクリーニングするために、ライブラリからのＤＮＡを、Ausubel等，Current Protocols in Molecular Biology，のように、ＰＣＲプライマー対でのＰＣＲによりスクリーニングした。ポジティブライブラリを、次いで、プローブオリゴヌクレオチド及びプライマー対の一方を用いて対象とする遺伝子をコードするクローンの単離するのに使用した。

ｃＤＮＡクローンの単離に用いたｃＤＮＡライブラリは、Invitrogen，San Diego，CAからのもの等の市販試薬を用いて標準的な方法によって作成した。ｃＤＮＡは、ＮｏｔＩ部位を含むオリゴｄＴでプライムし、平滑末端でＳａｌＩヘミキナーゼアダプターに結合させ、ＮｏｔＩで切断し、ゲル電気泳動でおよそのサイズ分類し、そして適切なクローニングベクター（ｐＲＫ５Ｂ又はｐＲＫ５Ｄ等；ｐＲＫ５ＢはＳｆｉＩ部位を含まないｐＲＫ５Ｄの前駆体である；Holmes等，Science，253: 1278-1280 (1991)参照）に、独特のＸｈｏＩ及びＮｏｔＩ部位において、所定の方向でクローニングした。

【実施例２】

【０２１５】

アミラーゼスクリーニングによるｃＤＮＡクローンの単離

１．オリゴｄＴプライムｃＤＮＡライブラリの調製

ｍＲＮＡを対象とするヒト組織から、Invitrogen, San Diego, CAからの試薬及びプロトコールを用いて単離した（Fast Track 2）。このＲＮＡを、Life Technologies, Gaithersburg, MD (Super Script Plasmid System)からの試薬及びプロトコールを用いるベクターｐＲＫ５ＤにおけるオリゴｄＴプライムしたｃＤＮＡの生成に使用した。この方法において、二本鎖ｃＤＮＡは１０００ｂｐを越えるサイズ分類し、ＳａｌＩ／ＮｏｔＩ結合ｃＤＮＡをＸｈｏＩ／ＮｏｔＩ切断ベクターにクローニングした。ｐＲＫ５Ｄを、ｓｐ６転写開始部位、それに続くＳｆｉＩ制限酵素部位、さらにＸｈｏＩ／ＮｏｔＩｃＤＮＡクローニング部位を持つベクターにクローニングした。

２．ランダムプライムｃＤＮＡライブラリの調製

一次ｃＤＮＡクローンの５’末端を好ましく表現するために二次ｃＤＮＡライブラリを作成した。Ｓｐ６ＲＮＡを（上記の）一次ライブラリから生成し、このＲＮＡを、ベクターｐＳＳＴ-ＡＭＹ．０におけるLife Technologies (上で参照したSuper Script Plasmid System)からの試薬及びプロトコールを用いたランダムプライムしたｃＤＮＡライブラリの生成に使用した。この方法において、二本鎖ｃＤＮＡを５００－１０００ｂｐにサイズ分類し、平滑末端でＮｏｔＩアダプターに結合させ、ＳｆｉＩ部位で切断し、そしてＳｆｉＩ／ＮｏｔＩ切断ベクターにクローニングした。ｐＳＳＴ-ＡＭＹ．０は、ｃＤＮＡクローニング部位の前に酵母アルコールデヒドロゲナーゼプロモータ、及びクローニング部位の後にマウスアミラーゼ配列（分泌シグナルを持たない成熟配列）に次いで酵母アルコールデヒドロゲナーゼ転写終結区を有するクローニングベクターである。即ち、アミラーゼ配列でフレームに融合するこのベクターにクローニングされたｃＤＮＡは、適当に形質移入された酵母コロニーからのアミラーゼの分泌を導くであろう。

【０２１６】

３．形質転換及び検出

上記２パラグラフに記載したライブラリからのＤＮＡを氷上で冷却し、それにエレクトロコンピテントＤＨ１０Ｂ細菌（Life Technoligies、２０ｍｌ）を添加した。細菌及びベクターの混合物は、次いで製造者に推奨されているように電気穿孔した。次いで、ＳＯＣ培地（Life Technplogies、１ｍｌ）を添加し、この混合物を３７℃で３０分間インキュベートした。形質転換体は、次いでアンピシリンを含む２０標準１５０ｍｍＬＢプレートに蒔き、１６時間インキュベートした（３７℃）。ポジティブコロニーをプレートから廃棄し、細菌ペレットから標準的な方法、例えばＣｓＣｌ-勾配を用いてＤＮＡを単離した。精製ＤＮＡは、次いで以下の酵母プロトコールにのせた。

酵母方法は３つの範疇に分けられる：（１）酵母のプラスミド／ｃＤＮＡ結合ベクターでの形質転換；（２）アミラーゼを分泌する酵母クローンの検出及び単離；及び（３）酵母コロニーから直接的な挿入物のＰＣＲ増幅及び配列決定及びさらなる分析のためのＤＮＡの精製。

用いた酵母菌株はＨＤ５６-５Ａ（ATCC-90785）であった。この株は以下の遺伝子型：ＭＡＴアルファ、ｕｒａ３-５２、ｌｅｕ２-３、ｌｅｕ２-１１２、ｈｉｓ３-１１、ｈｉｓ３-１５、MAL^{+}、SUC^{+}、GAL^{+}を有する。好ましくは、不完全な翻訳後経路を持つ酵母変異体を用いることができる。このような変異体は、ｓｅｃ７１、ｓｅｃ７２、ｓｅｃ６２に転位不全対立遺伝子を持つが、切断されたｓｅｃ７１が最も好ましい。あるいは、これらの遺伝子の正常な操作を阻害するアンタゴニスト（アンチセンスヌクレオチド及び／又はリガンドを含む）、この翻訳後経路に含まれる他のタンパク質（例えば、ＳＥＣ６１ｐ、ＳＥＣ７２ｐ、ＳＥＣ６２ｐ、ＳＥＣ６３ｐ、ＴＤＪ１ｐ又はＳＳＡ１ｐ-４ｐ）又はこれらのタンパク質の複合体形成も、アミラーゼ発現酵母と組み合わせて好ましく用いられる。

【０２１７】

形質転換は、Gietz等, Nucl. Acid. Res., 20: 1425 (1992)に概略が記されたプロトコールに基づいて実施された。形質転換細胞は、次いで寒天からＹＥＰＤ複合培地ブロス（１００ｍｌ）に播種し、３０℃で終夜成長させた。ＹＥＰＤブロスは、Kaiser等, Methods in Yeast Genetics, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, p. 207 (1

994)に記載されているように調製した。終夜培地は、次いで新鮮なＹＥＰＤブロス（５００ｍｌ）中におよそ２ｘ１０^{6}細胞／ｍｌ（約ＯＤ$_{６００}$＝０．１）に希釈し、１ｘ１０^{7}細胞／ｍｌ（約ＯＤ$_{６００}$＝０．４－０．５）まで再成長させた。

次いで細胞を収穫し、5,000rpmで５分間のSorval GS3 ローターのＧＳ３ローターボトルに移し、上清を捨て、次いで無菌水に再懸濁することにより形質転換のために調製し、そして５０ｍｌのファルコン管内で、Beckman GS-6KR遠心機において3,500rpmで再度遠心分離した。上清を捨て、細胞をＬｉＡｃ／ＴＥ（10ml，10mMのトリス-HCl，1mMのEDTA pH7.5，100mMのＬｉ$_{2}$ＯＯＣＣＨ$_{3}$）で続けて洗浄し、ＬｉＡｃ／ＴＥ（2.5ml）中に再懸濁させた。

形質転換は、マイクロチューブ内で、調製した細胞（100μｌ）を新鮮な変性一本鎖サケ精子ＤＮＡ（Lofstrand Labs，Gaitherburg，MD）及び形質転換ＤＮＡ（1μg．vol.＜10μｌ）と混合することにより起こした。混合物はボルテックスにより簡単に混合し、次いで40%ＰＥＧ／ＴＥ（600μｌ，40%のポリエチレングリコール-４０００，10mMのトリス-HCl，1mMのEDTA，100mMのLi$_{2}$OOCCH$_{3}$，pH 7.5）を添加した。この混合物を緩く撹拌し、３０℃で撹拌しながら３０分間インキュベートした。次いで細胞に４２℃で１５分間熱衝撃を与え、反応容器をミクロチューブ内で12,000rpmで5-10秒間遠心分離し、デカント及びＴＥ（500μｌ，10mMのトリス-HCl，1mMのEDTA pH 7.5）への再懸濁に次いで遠心分離した。次いで、細胞をＴＥ（1ml）中に希釈し、アリコート（200μｌ）を150mm成長プレート（ＶＷＲ）に予め調製した選択培地に拡げた。

【０２１８】

あるいは、複数の少量反応ではなく、形質転換を１回の大規模反応で実施したが、試薬の量はしかるべくスケールアップした。

用いた選択培地は、Kaiser等，Methods in Yeast Genetics，Cold Spring Harbor press，Cold Spring Harbor，NY，p. 208-210 (1994)に記載されているようにに調製したウラシルを欠く合成完全デキストロース寒天（ＳＣＤ-Ｕｒａ）であった。形質転換体は３０℃で２－３日成長させた。

アミラーゼを分泌するコロニーの検出は、選択成長培地における赤色デンプンの包含により実施した。Biely等，Anal. Biochem.，172: 176-179 (1988)に記載された方法に従って、デンプンを赤色染料（反応性 Red-120，Sigma）に結合させた。結合したデンプンをＳＣＤ-Ｕｒａ寒天プレートに最終濃度0.15%（w/v）で導入し、リン酸カリウムでｐＨ７．０に緩衝した（最終濃度50-100mM）。

ポジティブコロニーを拾って新鮮な選択培地（150mmプレート）に画線し、良好に単離され同定可能な単一コロニーを得た。アミラーゼ分泌についてポジティブな良好に単離されたコロニーは、緩衝ＳＣＤ-Ｕｒａ寒天への赤色団分の直接導入により検出した。ポジティブコロニーは、デンプンを分解して、ポジティブコロニーの周囲に直接目視できる暈を形成する能力により決定した。

【０２１９】

４．ＰＣＲ増幅によるＤＮＡの単離

ポジティブコロニーが単離された場合、その一部を楊枝で拾い、９６ウェルプレートにおいて無菌水（30μｌ）に希釈した。この時点で、ポジティブコロニーは凍結して次の分析のために保存するか、即座に増幅するかのいずれかである。細胞のアリコート（5μｌ）を、0.5μｌのKlentaq（Clontech，Palo Alto，CA）；4.0μｌの10mM dNTP（Perkin Elmer-Cetus）；2.5μｌのKentaqバッファー(Clontech)；0.25μｌの正方向オリゴ１；0.25μｌの逆方向オリゴ２；12.5μｌの蒸留水を含有する25μｌ容量におけるＰＣＲ反応のテンプレートとして使用した。正方向オリゴヌクレオチド１の配列は：

5'- TGTAAAACGACGGCCAGTTAAATAGACCTGCAATTATTAATCT-3'

（配列番号：１）であった。

逆方向オリゴヌクレオチド２の配列は：

5'-CAGGAAACAGCTATGACCACCTGCACACCTGCAAATCCATT-3'

（配列番号：2）であった。

次いで、ＰＣＲは以下の通り実施した：

ａ．	変性	92℃、 5分間
ｂ．次の３サイクル：	変性	92℃、30秒間
	アニール	59℃、30秒間
	伸長	72℃、60秒間
ｃ．次の３サイクル：	変性	92℃、30秒間
	アニール	57℃、30秒間
	伸長	72℃、60秒間
ｄ．次の２５サイクル：	変性	92℃、30秒間
	アニール	55℃、30秒間
	伸長	72℃、60秒間
ｅ．	保持	4℃

【０２２０】

下線を施した領域は、各々ＡＤＨプロモーター領域及びアミラーゼ領域にアニーリングされ、挿入物が存在しない場合はベクターｐＳＳＴ-ＡＭＹ．０からの３０７ｂｐ領域を増幅する。典型的には、これらのオリゴヌクレオチドの５’末端の最初の１８ヌクレオチドは、配列プライマーのアニーリング部位を含んでいた。即ち、空のベクターからのＰＣＲ反応の全生成物は３４３ｂｐであった。しかしながら、シグナル配列融合ｃＤＮＡは、かなり長いヌクレオチド配列をもたらした。

ＰＣＲに続いて、反応のアリコート（5μl）を、上掲のSambrook等に記載されたように1%アガロースゲル中でトリス-ボレート-ＥＤＴＡ（ＴＢＥ）緩衝系を用いたアガロースゲル電気泳動により試験した。４００ｂｐより大きな単一で強いＰＣＲ産物をもたらすクローンを、96 Qiaquick PCR 清浄化カラム（Qiagen Inc., Chatsworth, CA）での精製の後にＤＮＡ配列によりさらに分析した。

【実施例３】

【０２２１】

シグナルアルゴリズム分析を用いたｃＤＮＡクローンの単離

種々のポリペプチド-コード化核酸配列は、ジェネンテク，インク（South San Francisco, CA）によって開発された独自の配列発見アルゴリズムを、公的（例えば、GenBank）及び／又は私的（LIFESEQ(登録商標), Incyte Pharmaceuticals, Inc., Palo Alto, CA）データベースからのＥＳＴｓ並びに集団化及び構築されたＥＳＴ断片に適用することにより同定した。シグナル配列アルゴリズムは、考慮している配列又は配列断片の５'-末端の第１の、場合によっては第２のメチオニンコドン（ＡＴＧ）を取り囲むＤＮＡヌクレオチドの文字に基づく分泌シグナルスコアを計算する。第１のＡＴＧに続くヌクレオチドは、停止コドンを持たない少なくとも３５の不明瞭でないアミノ酸をコードしなければならない。第１のＡＴＧが必要なアミノ酸を有する場合、第２のものは試験しない。何れも要件を満たさない場合、候補配列にスコアをつけなかった。ＥＳＴ配列が真正のシグナル配列を含むか否かを決定するために、ＡＴＧコドンを取り囲むＤＮＡ及び対応するアミノ酸配列を、分泌シグナルに関連することが知られた７つのセンサー（評価パラメータ）の組を用いてスコアをつけた。このアルゴリズムの使用により、多くのポリペプチド-コード化核酸配列の同定がなされた。

【実施例４】

【０２２２】

ヒトＰＲＯ１７２をコードするｃＤＮＡクローンの単離

上記実施例１に記載したように、phrapを用いて他のＥＳＴに対してコンセンサスＤＮＡ配列を組み立てた。このコンセンサス配列を、ここでＤＮＡ２８７６５と命名する。ＤＮＡ２８７６５コンセンサス配列に基づいて、１）ＰＣＲにより対象とする配列を含むｃＤＮＡライブラリを同定するため、及び２）ＰＲＯ１７２の全長コード化配列のクローンを単離するプローブとして使用するために、オリゴヌクレオチドを合成した。

ＰＣＲプライマー（正及び逆）の対を合成した：

２８７６５.ｆ（ＯＬＩ６４４）：
5'-GGATCTCGAGAACAGCTACTCC-3'（配列番号：５）
２８７６５.ｒ（ＯＬＩ６４５）：
5'-TCGTCCACGTTGTCGTCACATG-3'（配列番号：６）
さらに、合成オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションプローブはＤＮＡ２８７６５配列から作成し、それは以下のヌクレオチド配列を持っていた：
２８７６５.ｐ（ＯＬＩ６４３）ハイブリダイゼーションプローブ：
5'-AAATCTGTGAATTGAGTGCCATGGACCTGTTGCGGACGGCCCTTGCTT-3'（配列番号：７）
全長クローンの供給源について幾つかのライブラリをスクリーニングするために、ライブラリからのＤＮＡを上で同定したＰＣＲプライマー対でＰＣＲ増幅した。次いで、ポジティブライブラリを、プローブオリゴヌクレオチド及びＰＣＲプライマー対の一方を用いてＰＲＯ１７２遺伝子をコードするクローンを単離するのに使用した。ｃＤＮＡライブラリー作成のためのＲＮＡはヒト胎児腎臓組織から単離した。
上記のように単離したクローンのＤＮＡ配列決定により、ＤＮＡ３５９１６－１１６１[図１、配列番号：３]の全長ＤＮＡ配列；及びＰＲＯ１７２の誘導タンパク質配列が得られた。

【０２２３】

ＤＮＡ３５９１６－１１６１の全ヌクレオチド配列を図１（配列番号：３）に示す。クローンＤＮＡ３５９１６－１１６１は、単一のオープンリーディングフレームを含み、ヌクレオチド位置３８－４０に見かけの翻訳開始部位、そしてヌクレオチド位置２２０７－２２０９の見かけの停止コドンを持つ。予測されるポリペプチド前駆体は７２３アミノ酸長である。図２（配列番号：４）に示した全長ＰＲＯ１７２配列の分析により、種々の重要なポリペプチドドメインの存在が明らかになり、それらの重要なポリペプチドドメインに与えられた位置は、およそ上記の通りである。図２に示した全長ＰＲＯ１７２ポリペプチドの分析により、以下の存在が明らかになった：約アミノ酸１～約アミノ酸２１のシグナル配列；約アミノ酸５４６～約アミノ酸５６６の膜貫通ドメイン；約アミノ酸４７７～約アミノ酸４８１のN-グリコシル化部位；約アミノ酸６６０～約アミノ酸６６４のｃＡＭＰ-及びｃＧＭＰ-依存性プロテインキナーゼリン酸化部位；約アミノ酸２～から約アミノ酸８、約アミノ酸３７～約アミノ酸４３、約アミノ酸４０～約アミノ酸４６、約アミノ酸９８～約アミノ酸１０４、約アミノ酸９９～約アミノ酸１０５、約アミノ酸２６２～約アミノ酸２６８、約アミノ酸２８１～約アミノ酸２８７、約アミノ酸２８２～約アミノ酸２８８、約アミノ酸３０１～約アミノ酸３０７、約アミノ酸３１０～約アミノ酸３１６、約アミノ酸３２８～約アミノ酸３３４、約アミノ酸３４０～約アミノ酸３４４、約アミノ酸３７８～約アミノ酸３８４、約アミノ酸３８７～約アミノ酸３９３、約アミノ酸５１２～約アミノ酸５１８、約アミノ酸６７６～約アミノ酸６８２、約アミノ酸６８３～約アミノ酸６８９、及び約アミノ酸６９５～約アミノ酸７０１のN-ミリストイル化部位；約アミノ酸３４３～約アミノ酸３５５、約アミノ酸４２０～約アミノ酸４３２、及び約アミノ酸４５８～約アミノ酸４７０のアスパラギン酸及びアスパラギンヒドロキシル化部位；約アミノ酸５５２～約アミノ酸５６３の原核生物膜リポタンパク脂質結合部位；及び約アミノ酸２４３～約アミノ酸２５５、約アミノ酸２７４～約アミノ酸２８６、約アミノ酸３１４～約アミノ酸３２６、約アミノ酸３５２～約アミノ酸３６４、約アミノ酸３９１～約アミノ酸４０３、約アミノ酸４２９～約アミノ酸４４１、約アミノ酸４６７～約アミノ酸４７９、約アミノ酸５０５～約アミノ酸５１７のＥＧＦ-様ドメインシステインパターンシグネーチャー。クローンＤＮＡ３５９１６－１１６１は１９９７年１０月２８日にＡＴＣＣに寄託され、ＡＴＣＣ寄託番号２０９４１９が付与された。
図２（配列番号：４）に示した全長配列のＢＬＡＳＴ及びＦａｓｔＡ配列アラインメント分析法に基づいて、ＰＲＯ１７２はデルタ-１マウスタンパク質と８９％のアミノ酸配列同一性を示す。

【実施例５】

【０２２４】

ヒトＰＲＯ１７８をコードするｃＤＮＡクローンの単離

発現配列タグ（ＥＳＴ）ＤＮＡデータベース（LIFESEQ(登録商標)、Incyte Pharmaceuticals、Palo Alto, CA）を検索し、ＴＩＥリガンドファミリーと相同性を示すＥＳＴを同定した。

ｃＤＮＡライブライの作成のためのＲＮＡはヒト胎児肺組織から単離した。ＰＲＯ１７８をコードするｃＤＮＡクローンを単離するために用いたｃＤＮＡライブラリーは、Invitrogen, San Diego, CA からのもの等の市販試薬を用いて標準的方法によって形成した。ｃＤＮＡは、ＮｏｔＩ部位を含むオリゴｄＴでプライムし、ＳａｌＩヘミキナーゼアダプターの平滑末端で結合させ、ＮｏｔＩで切断し、ゲル電気泳動で適当にサイズ分割をし、定まった方向で適当なクローニングベクター（ｐＲＫＢ又はｐＲＫＤ等；ｐＲＫ５Ｂは、ＳｆｉＩ部位を持たないｐＲＫ５Ｄの前駆体である；Holmes等, Science, 253:1278-1280 (1991)を参照されたい）に独特のＸｈｏｌ及びＮｏｔＩ部位においてクローン化した。

上述のＥＳＴ配列に基づいて、１）ＰＣＲにより対象とする配列を含むｃＤＮＡライブラリを同定するため、及び２）ＰＲＯ１７８の全長コード化配列のクローンを単離するプローブとして使用するために、オリゴヌクレオチドを合成した。正方向及び逆方向ＰＣＲプライマーは一般的に２０から３０ヌクレオチドの範囲であり、しばしば約１００－１０００ｂｐ長のＰＣＲ産物を与えるように設計される。プローブ配列は典型的には４０－５５ｂｐ長である。全長クローンについて幾つかのライブラリをスクリーニングするために、ライブラリからのＤＮＡを上掲のAusubel等, Current Protocols in Molecular Biologyに従って、ＰＣＲプライマー対でのＰＣＲ増幅によりスクリーニングした。次いでポジティブライブラリを、プローブオリゴヌクレオチド及びプライマー対の一方を用いた興味ある遺伝子をコードするクローンの単離に使用した。

用いたオリゴヌクレオチドプローブは以下の通り：

ＮＬ８.５-１：

5'-ACGTAGTTCCAGTATGGTGTGAGCAGCAACTGGA-3'（配列番号：１０）

ＮＬ８.３-１：

5'-AGTCCAGCCTCCACCCTCCAGTTGCT-3'（配列番号：１１）

ＮＬ８.３-１２

5'-CCCCAGTCCTCCAGGAGAACCAGCA-3'（配列番号：１２）

【０２２５】

全長クローン［ＤＮＡ２３３３９－１１３０］が同定され、それは単一のオープンリーディングフレームを含み、ヌクレオチド位置１１８－１２０に見かけの翻訳開始部位、そしてヌクレオチド位置１５２８－１５３０に停止コドンを持つ（図３、配列番号：８）。予測されるポリペプチド前駆体は４７０アミノ酸長であり、約５１,６９４ダルトンの算定分子量及び約８．８６の見積もりｐＩを持つ。図４（配列番号：９）に示した全長ＰＲＯ１７８配列の分析により、図４に示すような種々の重要なポリペプチドドメインの存在が明らかになり、それらの重要なポリペプチドドメインに与えられた位置は、およそ上記の通りである。図４に示した全長ＰＲＯ１７８ポリペプチドの分析により、以下の存在が明らかになった：約アミノ酸１～約アミノ酸２０のシグナルペプチド；約アミノ酸５８～約アミノ酸６２、約アミノ酸１４５～約アミノ酸１４９のN-グリコシル化部位；約アミノ酸９７～約アミノ酸１０１のｃＡＭＰ-及びｃＧＭＰ-依存性プロテインキナーゼリン酸化部位；約アミノ酸４４１～約アミノ酸４４８のチロシンキナーゼリン酸化部位；約アミノ酸１６～約アミノ酸２２、約アミノ酸２３～約アミノ酸２９、約アミノ酸８７～約アミノ酸９３、約アミノ酸１０８～約アミノ酸１１４、約アミノ酸１２１～約アミノ酸１２７、約アミノ酸１２５～約アミノ酸１３１、約アミノ酸１２９～約アミノ酸１３５、約アミノ酸１８７～約アミノ酸１９３、約アミノ酸２９３～約アミノ酸２９９、約アミノ酸３５３～約アミノ酸３５９、約アミノ酸３７８～約アミノ酸３８４、約アミノ酸４４５～約アミノ酸４５１、及び約アミノ酸４５３～約アミノ酸４５９のN-ミリストイル化部位；約アミノ酸３４０～約アミノ酸３４３の細胞接着部位；及び約アミノ酸４１８～約アミノ酸４３１のフィブリノーゲンベータ及びガンマ鎖Ｃ-末端ドメインシグネーチャー。クローン

ＤＮＡ２３３３９－１１３０は１９９７年９月１８日にＡＴＣＣに寄託され、ＡＴＣＣ寄託番号２０９２８２が付与された。

図４（配列番号：９）に示した全長配列のＢＬＡＳＴ及びＦａｓｔＡ配列アラインメント分析法に基づいて、ＰＲＯ１７８（ここでＮＬ８と命名する）はＴＩＥ２レセプターのリガンド１及びリガンド２の両方と２３％のアミノ酸配列同一性を示す。ＴＩＥ２レセプターのリガンド１及びリガンド２は、ＰＲＯ１７８に対して各々６４％同一及び４０－４３％同一である。「ＴＩＥ」という略語は、「チロシンキナーゼ含有Ｉｇ及びＥＧＦ相同ドメイン(tyrosine kinase containing Ig and EGF homology domains)」の頭文字を表し、レセプターチロシンキナーゼ類の新たなファミリーを指すのに作られた。

【実施例６】

【０２２６】

ヒトＰＲＯ１７９をコードするｃＤＮＡクローンの単離

上記実施例２に記載したようなアミラーゼスクリーニングにおいて単離されたｃＤＮＡ配列は、BLAST及びFastA配列アラインメントにより、アンギオポエチン(angiopoietin)タンパク質をコードするヌクレオチド配列と配列相同性を有することがわかった。このｃＤＮＡ配列を、ここでＤＮＡ１００２８及び／又はＤＮＡ２５２５０と命名する。配列相同性に基づいて、ＤＮＡ１００２８分子の配列からプローブを調製し、実施例２のパラグラフ１に記載したように調製したヒト胎児肝臓ライブラリ（LIB6）のスクリーニングに使用した。クローニングベクターはｐＲＫ５Ｂであり（ｐＲＫ５ＢはＳｆｉＩ部位を含まないｐＲＫ５Ｄの前駆体である；Holmes等, Science, 253: 1278-1280 (1991)参照）、ｃＤＮＡサイズカットは２８００ｂｐ未満であった。

全長クローンの供給源について幾つかのライブラリをスクリーニングするために、ライブラリからのＤＮＡを上で同定したＰＣＲプライマー対でＰＣＲ増幅した。次いで、ポジティブライブラリを、プローブオリゴヌクレオチド及びＰＣＲプライマー対の一方を用いてＰＲＯ１７９遺伝子をコードするクローンを単離するのに使用した。

【０２２７】

全長クローン［ＤＮＡ１６４５１－１３８８］が同定され、それは単一のオープンリーディングフレームを含み、ヌクレオチド位置３７－３９に見かけの翻訳開始部位、そしてヌクレオチド位置１４１７－１４１９に停止シグナルを持つ（図５、配列番号：１３）。予測されるポリペプチド前駆体は４６０アミノ酸長であり、約５３,６３７ダルトンの算定分子量及び約６．６１の見積もりｐＩを持つ。図６（配列番号：１４）に示した全長ＰＲＯ１７９配列の分析により、図６に示すような種々の重要なポリペプチドドメインの存在が明らかになり、それらの重要なポリペプチドドメインに与えられた位置は、およそ上記の通りである。図６に示した全長ＰＲＯ１７９ポリペプチドの分析により、以下の存在が明らかになった：約アミノ酸１～約アミノ酸１６のシグナルペプチド；約アミノ酸２３～約アミノ酸２７、約アミノ酸１１５～約アミノ酸１１９、約アミノ酸２９６～約アミノ酸３００、及び約アミノ酸３５７～約アミノ酸３６１のN-グリコシル化部位；約アミノ酸１００～約アミノ酸１０４、約アミノ酸２０４～約アミノ酸２０８のｃＡＭＰ-及びｃＧＭＰ-依存性プロテインキナーゼリン酸化部位；約アミノ酸３４２～約アミノ酸３５１のチロシンキナーゼリン酸化部位；約アミノ酸２７９～約アミノ酸２８５、約アミノ酸３５２～約アミノ酸３５８、及び約アミノ酸３６７～約アミノ酸３７３のN-ミリストイル化部位；及び約アミノ酸１２０～約アミノ酸１４２及び約アミノ酸１２７～約アミノ酸１４９のロイシンジッパーパターン。クローンＤＮＡ１６４５１－１３８８は１９９８年４月１４日にＡＴＣＣに寄託され、ＡＴＣＣ寄託番号２０９７７６が付与された。

図６（配列番号：１４）に示した全長ＰＲＯ１７９配列のアミノ酸配列の分析は、それがアンギオポエチンファミリーのタンパク質と有意な類似性を有し、よってＰＲＯ１７９が新規なアンギオポエチンファミリーのメンバーであることを示唆している。より詳細には、Dayhoffデータベース（ﾊﾞｰｼﾞｮﾝ35.45 Swiss Prot 35）の分析により、ＰＲＯ１７９と以下のDayhoff配列との有意な相同性が明らかになった：AF004326_1, P_R94605, HSU83508_1, P_R94603, P_R94317, AF025818_1, HSY16132_1, P_R65760, I37391及びHUM

RSC192_1。
【実施例７】
【０２２８】
ヒトＰＲＯ１８２をコードするｃＤＮＡクローンの単離
Incyte, Inc.からの発現配列タグ（ＥＳＴ）のヒト結腸ｃＤＮＡライブラリ（LIFESEQ(商品名)、Incyte Pharmaceuticals、Palo Alto, CA）における相同配列の検索に、インシュリンファミリーのタンパク質のメンバーであるリラキシンの核酸配列を用いた。２つのＥＳＴ、Incyte 番号INC2328985及びINC778319が得られ、各々リラキシン核酸配列の領域に約４０％の相同性を持ち、インシュリン-様ポリペプチド（ＩＬＰ）の遺伝子内の配列を表現している。
ｃＤＮＡライブラリは、Clontech Laboratories, Inc. Palo Alto, CA, カタログ番号6537-1から得たヒト子宮ｍＲＮＡから構築した。ＰＲＯ１８２の全長核酸配列は、上記のプラスミドｃＤＮＡライブラリのスクリーニングにより、Incyte, Inc.からのＥＳＴ配列（Incyte EST INC2328985及びEST INC778319）に基づいて設計したオリゴヌクレオチドを用いたコロニーハイブリダイゼーションにより得た。ＰＲＯ１７８をコードするｃＤＮＡクローンを単離するために用いたｃＤＮＡライブラリーは、Invitrogen, San Diego, CAからのもの等の市販試薬を用いて標準的方法によって形成した。ｃＤＮＡは、ＮｏｔＩ部位を含むオリゴｄＴでプライムし、ＳａｌＩヘミキナーゼアダプターの平滑末端で結合させ、ＮｏｔＩで切断し、ゲル電気泳動で適当にサイズ分割をし、定まった方向で適当なクローニングベクター（ｐＲＫＢ又はｐＲＫＤ等；ｐＲＫ５Ｂは、ＳｆｉＩ部位を持たないｐＲＫ５Ｄの前駆体である；Holmes等, Science, 253:1278-1280 (1991)を参照されたい）に独特のＸｈｏｌ及びＮｏｔＩ部位においてクローン化した。
上述のＥＳＴ配列に基づいて、１）ＰＣＲにより対象とする配列を含むｃＤＮＡライブラリを同定するため、及び２）ＰＲＯ１７８全長コード化配列のクローンを単離するプローブとして使用するために、オリゴヌクレオチドプローブを合成した。正方向及び逆方向ＰＣＲプライマーは一般的に２０から３０ヌクレオチドの範囲であり、しばしば約１００－１０００ｂｐ長のＰＣＲ産物を与えるように設計される。プローブ配列は典型的には４０－５５ｂｐ長である。全長クローンについて幾つかのライブラリをスクリーニングするために、ライブラリからのＤＮＡを上掲のAusubel等, Current Protocols in Molecular Biologyに従って、ＰＣＲプライマー対でのＰＣＲ増幅によりスクリーニングした。次いでポジティブライブラリを、プローブオリゴヌクレオチド及びプライマー対の一方を用いた興味ある遺伝子をコードするクローンの単離に使用した。
【０２２９】
用いたプライマーオリゴヌクレオチド配列は以下の通り：
5'-CACATTCAGTCCTCAGCAAAATGAA-3'（配列番号：１７）
5'-GAGAATAAAAACAGAGTGAAAATGGAGCCCTTCATTTTGC-3'（配列番号：１８）
5'-CTCAGCTTGCTGAGCTTGAGGGA-3'（配列番号：１９）
全長クローン［ＤＮＡ２７８６５－１０９１］が同定され、それは単一のオープンリーディングフレームを含み、ヌクレオチド位置３９－４１に見かけの翻訳開始部位、そしてヌクレオチド位置４４４－４４６に停止シグナルを持つ（図７、配列番号：１５）。予測されるポリペプチド前駆体は１３５アミノ酸長であり、約１５,３１９ダルトンの算定分子量及び約７．３９の見積もりｐＩを持つ。図８（配列番号：１６）に示した全長ＰＲＯ１８２配列の分析により、図８に示すような種々の重要なポリペプチドドメインの存在が明らかになり、それらの重要なポリペプチドドメインに与えられた位置は、およそ上記の通りである。図８に示した全長ＰＲＯ１８２ポリペプチドの分析により、以下の存在が明らかになった：約アミノ酸１～約アミノ酸１８のシグナルペプチド；約アミノ酸１０７～約アミノ酸１１１のｃＡＭＰ-及びｃＧＭＰ-依存性プロテインキナーゼリン酸化部位；約アミノ酸３～約アミノ酸９、約アミノ酸５２～約アミノ酸５８、約アミノ酸９６～約アミノ酸１０２、約アミノ酸１２５～約アミノ酸１３１のN-ミリストイル化部位；及び約アミノ酸１２１～約アミノ酸１３６のインシュリンファミリーシグネーチャー。クローンＤＮ

Ａ２７８６５－１０９１は１９９７年９月２３日にＡＴＣＣに寄託され、ＡＴＣＣ寄託番号２０９２９６が付与された。

図８（配列番号：１６）に示した全長配列の（ALIGNコンピュータプログラムを用いた）ＢＬＡＳＴ及びＦａｓｔＡ配列アラインメント分析法に基づいて、ＰＲＯ１８２は公知のポリペプチド分子と相同性だが明らかに相違しており、よってＰＲＯ１８２ポリペプチドはインシュリンファミリーのタンパク質の新たなメンバーを構成する。

【実施例８】

【０２３０】

ヒトＰＲＯ１８７をコードするｃＤＮＡクローンの単離

発現配列タグ（ＥＳＴ）ＤＮＡデータベース（LIFESEQ(登録商標)、Incyte Pharmaceuticals、Palo Alto, CA）を検索し、アンドロゲン誘導成長因子としても知られる線維芽細胞成長因子（ＦＧＦ-８）と相同性を示すＥＳＴ（番号IN843193）を同定した。

ｃＤＮＡライブライの作成のためのＲＮＡはヒト胎児肺組織から単離した。ＰＲＯ１８７をコードするｃＤＮＡクローンを単離するために用いたｃＤＮＡライブラリーは、Invitrogen, San Diego, CA からのもの等の市販試薬を用いて標準的方法によって形成した。ｃＤＮＡは、ＮｏｔＩ部位を含むオリゴｄＴでプライムし、ＳａｌＩヘミキナーゼアダプターの平滑末端で結合させ、ＮｏｔＩで切断し、ゲル電気泳動で適当にサイズ分割をし、定まった方向で適当なクローニングベクター（ｐＲＫＢ又はｐＲＫＤ等；ｐＲＫ５Ｂは、ＳｆｉＩ部位を持たないｐＲＫ５Ｄの前駆体である；Holmes等, Science, 253:1278-1280 (1991)を参照されたい）に独特のＸｈｏｌ及びＮｏｔＩ部位においてクローン化した。

上述のＥＳＴ配列に基づいて、１）ＰＣＲにより対象とする配列を含むｃＤＮＡライブラリを同定するため、及び２）ＰＲＯ１８７の全長コード化配列のクローンを単離するプローブとして使用するために、オリゴヌクレオチドプローブを合成した。正方向及び逆方向ＰＣＲプライマーは一般的に２０から３０ヌクレオチドの範囲であり、しばしば約１００－１０００ｂｐ長のＰＣＲ産物を与えるように設計される。プローブ配列は典型的には４０－５５ｂｐ長である。全長クローンについて幾つかのライブラリをスクリーニングするために、ライブラリからのＤＮＡを上掲のAusubel等, Current Protocols in Molecular Biologyに従って、ＰＣＲプライマー対でのＰＣＲ増幅によりスクリーニングした。次いでポジティブライブラリを、プローブオリゴヌクレオチド及びプライマー対の一方を用いた興味ある遺伝子をコードするクローンの単離に使用した。

種々の組織供給源からの幾つかのライブラリを以下のオリゴヌクレオチドプローブでのＰＣＲ増幅によりスクリーニングした：

ＩＮ８４３１９３.ｆ（ＯＬＩ３１５）：

5'-CAGTACGTGAGGGACCAGGGCGCCATGA-3'（配列番号：２２）

ＩＮ８４３１９３.ｒ（ＯＬＩ３１７）：

5'-CCGGTGACCTGCACGTGCTTGCCA-3'（配列番号：２３）

次いで、上記のオリゴヌクレオチドの一方と以下のオリゴヌクレオチドプローブを用いてＦＧＦ-８相同遺伝子をコードするクローンを単離するためにポジティブライブラリを用いた：

ＩＮ８４３１９３.ｐ（ＯＬＩ３１６）：

5'-GCGGATCTGCCGCCTGCTCANCTGGTCGGTCATGGCGCCCT-3'（配列番号：２４）

【０２３１】

全長クローン［ＤＮＡ２７８６４－１１５５］が同定され、それは単一のオープンリーディングフレームを含み、ヌクレオチド位置２６－２８に見かけの翻訳開始部位、そしてヌクレオチド位置６４１－６４３に停止コドンを持つ（図９、配列番号：２０）。予測されるポリペプチド前駆体は２０５アミノ酸長であり、約２３,６６９ダルトンの算定分子量及び約１０．７５の見積もりｐＩを持つ。図１０（配列番号：２１）に示した全長ＰＲＯ１８７配列の分析により、図１０に示すような種々の重要なポリペプチドドメインの存在が明らかになり、それらの重要なポリペプチドドメインに与えられた位置は、およそ上記の通りである。図１０に示した全長ＰＲＯ１８７ポリペプチドの分析により、以下の存

在が明らかになった：約アミノ酸１～約アミノ酸２２のシグナルペプチド；約アミノ酸９～約アミノ酸１３、及び約アミノ酸１２６～約アミノ酸１３０のN-グリコシル化部位；約アミノ酸６０～約アミノ酸６４のｃＡＭＰ-及びｃＧＭＰ-依存性プロテインキナーゼリン酸化部位；約アミノ酸３９～約アミノ酸４８、及び約アミノ酸８９～約アミノ酸９７のチロシンキナーゼリン酸化部位；約アミノ酸６９～約アミノ酸７５、約アミノ酸１８８～約アミノ酸１９４のN-ミリストイル化部位；約アミノ酸５８～約アミノ酸６２のアミド化部位；及び約アミノ酸１０３～約アミノ酸１２８のＨＢＧＦ／ＦＧＦファミリーシグネーチャー。クローンＤＮＡ２７８６４－１１５５は１９９７年１０月１６日にＡＴＣＣに寄託され、ＡＴＣＣ寄託番号２０９３７５が付与された。

図１０（配列番号：２１）に示した全長配列の（ALIGNコンピュータプログラムを用いた）ＢＬＡＳＴ及びＦａｓｔＡ配列アラインメント分析法に基づいて、ＰＲＯ１８７は、ヒト線維芽細胞成長因子（アンドロゲン誘導成長因子）と７４％のアミノ酸配列同一性を示す。

【実施例９】

【０２３２】

ヒトＰＲＯ１８８をコードするｃＤＮＡクローンの単離

発現配列タグ（ＥＳＴ）ＤＮＡデータベース（LIFESEQ(登録商標)、Incyte Pharmaceuticals、Palo Alto, CA）を検索し、ＴＩＥリガンドファミリーと相同性を示すＥＳＴを同定した。

ｃＤＮＡライブライの作成のためのＲＮＡはヒト胎児肺組織から単離した。ＰＲＯ１８８をコードするｃＤＮＡクローンを単離するために用いたｃＤＮＡライブラリーは、Invitrogen, San Diego, CA からのもの等の市販試薬を用いて標準的方法によって形成した。ｃＤＮＡは、ＮｏｔＩ部位を含むオリゴｄＴでプライムし、ＳａｌＩへミキナーゼアダプターの平滑末端で結合させ、ＮｏｔＩで切断し、ゲル電気泳動で適当にサイズ分割をし、定まった方向で適当なクローニングベクター（ｐＲＫＢ又はｐＲＫＤ等；ｐＲＫ５Ｂは、ＳｆｉＩ部位を持たないｐＲＫ５Ｄの前駆体である；Holmes等, Science, 253:1278-1280 (1991)を参照されたい）に独特のＸｈｏｌ及びＮｏｔＩ部位においてクローン化した。

上述のＥＳＴ配列に基づいて、１）ＰＣＲにより対象とする配列を含むｃＤＮＡライブラリを同定するため、及び２）ＰＲＯ１８８の全長コード化配列のクローンを単離するプローブとして使用するために、オリゴヌクレオチドを合成した。正方向及び逆方向ＰＣＲプライマーは一般的に２０から３０ヌクレオチドの範囲であり、しばしば約１００－１００ｂｐ長のＰＣＲ産物を与えるように設計される。プローブ配列は典型的には４０－５５ｂｐ長である。全長クローンについて幾つかのライブラリをスクリーニングするために、ライブラリからのＤＮＡを上掲のAusubel等, Current Protocols in Molecular Biologyに従って、ＰＣＲプライマー対でのＰＣＲ増幅によりスクリーニングした。次いでポジティブライブラリを、プローブオリゴヌクレオチド及びプライマー対の一方を用いた興味ある遺伝子をコードするクローンの単離に使用した。

用いたオリゴヌクレオチドプローブは以下の通り：

ＮＬ５.５-１：

5'-CAGGTTATCCCAGAGATTTAATGCCACCA-3'（配列番号：２７）

ＮＬ５.３-１：

5'-TTGGTGGGAGAAGTTGCCAGATCAGGTGGTGGCA-3'（配列番号：２８）

ＮＬ５.３-１２

5'-TTCACACCATAACTGCATTGGTCCA-3'（配列番号：２９）

【０２３３】

全長クローン［ＤＮＡ２８４９７－１１３０］が同定され、それは単一のオープンリーディングフレームを含み、ヌクレオチド位置４４９－４５１に見かけの翻訳開始部位、そしてヌクレオチド位置１９２２－１９２４に停止シグナルを持つ（図１１、配列番号：２５）。予測されるポリペプチド前駆体は４９１アミノ酸長であり、約５６,７２０ダルトンの算定分子量及び約８．５６の見積もりｐＩを持つ。図１２（配列番号：２６）に示し

た全長ＰＲＯ１８８配列の分析により、図１２に示すような種々の重要なポリペプチドドメインの存在が明らかになり、それらの重要なポリペプチドドメインに与えられた位置は、およそ上記の通りである。図１２に示した全長ＰＲＯ１８８ポリペプチドの分析により、以下の存在が明らかになった：約アミノ酸１～約アミノ酸２３のシグナルペプチド；約アミノ酸１６０～約アミノ酸１６４、約アミノ酸１８８～約アミノ酸１９２のN-グリコシル化部位；約アミノ酸１２０～約アミノ酸１２４のｃＡＭＰ-及びｃＧＭＰ-依存性プロテインキナーゼリン酸化部位；約アミノ酸１７３～約アミノ酸１８０、及び約アミノ酸３８７～約アミノ酸３９６のチロシンキナーゼリン酸化部位；約アミノ酸７０～約アミノ酸７６、約アミノ酸１１０～約アミノ酸１１６、約アミノ酸２３２～約アミノ酸２３８、約アミノ酸３４３～約アミノ酸３４９、約アミノ酸４００～約アミノ酸４０６、約アミノ酸４６７～約アミノ酸４７３、及び約アミノ酸４７５～約アミノ酸４８７のN-ミリストイル化部位；及び約アミノ酸４４０～約アミノ酸４５３のフィブリノーゲンベータ及びガンマ鎖Ｃ-末端ドメインシグネーチャー。クローンＤＮＡ２８４９７－１１５５は１９９７年９月１８日にＡＴＣＣに寄託され、ＡＴＣＣ寄託番号２０９２７９が付与された。

図１２（配列番号：２６）に示した全長配列のＢＬＡＳＴ及びＦａｓｔＡ配列アラインメント分析法に基づいて、ＰＲＯ１８８（ここでＮＬ５と命名する）はＴＩＥ２レセプターのリガンド１及びリガンド２の両方と２４％のアミノ酸配列同一性を示す。ＴＩＥ２レセプターのリガンド１及びリガンド２は、ＰＲＯ１８８に対して各々６４％同一及び４０－４３％同一である。「ＴＩＥ」という略語は、「チロシンキナーゼ含有Ｉｇ及びＥＧＦ相同ドメイン(tyrosine kinase containing Ig and EGF homology domains)」の頭文字を表し、レセプターチロシンキナーゼ類の新たなファミリーを指すのに作られた。

【実施例１０】

【０２３４】

ヒトＰＲＯ１９５をコードするｃＤＮＡクローンの単離

上記実施例２に記載したようなアミラーゼスクリーニングにおいて単離されたｃＤＮＡ配列は、ここでＤＮＡ１３１９９＿ＡＢＩ２と命名する。ＤＮＡ１３１９９＿ＡＢＩ２は、次いで、公的データベース（例えば、GenBank）を含む種々の発現タグ配列（ＥＳＴ）データベースと比較し、存在する相同性を同定した。相同性検索は、コンピュータプログラムBLAST又はBLAST2（Altschul及びGish, Methods in Enzymology 266: 460-480 (1996)）を用いて実施した。公知のタンパク質をコードせず、BLASTスコア７０（９０の場合もある）又はそれ以上を持つ比較は、プログラム「phrap」（Phil Green, University of Washington, Seattle, Washington）で集団化してコンセンサスＤＮＡ配列を構築した。同定したコンセンサス配列を、ここでＤＮＡ２２７７８と命名する。

ＤＮＡ１３１９９＿ＡＢＩ２配列及びＤＮＡ２２７７８配列に基づいて、オリゴヌクレオチドプローブを生成させ、上記実施例２のパラグラフ１に記載したように調製したヒト胎盤ライブラリ（LIB89）をスクリーニングするのに使用した。クローニングベクターはｐＲＫ５Ｂであり（ｐＲＫ５ＢはＳｆｉＩ部位を含まないｐＲＫ５Ｄの前駆体である；Holmes等, Science, 253: 1278-1280 (1991)参照）、ｃＤＮＡサイズカットは２８００ｂｐ未満であった。

ＰＣＲプライマー（正方向及び逆方向）を合成した：

正方向ＰＣＲプライマー（２２７７８.ｆ）：

5'-ACAAGCTGAGCTGCTGTGACAG-3'（配列番号：３２）

逆方向ＰＣＲプライマー（２２７７８.ｒ）：

5'-TGATTCTGGCAACCAAGATGGC-3'（配列番号：３３）

さらに、ＤＮＡ２２７７８コンセンサス配列から合成オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションプローブを作成し、それは以下のヌクレオチド配列を有していた：

ハイブリダイゼーションプローブ（２２７７８.ｐ）

5'-ATGGCCTTGGCCGGAGGTTCGGGGACCGCTTCGGCTGAAG-3'（配列番号：３４）

全長クローンの供給源について幾つかのライブラリをスクリーニングするために、ライブラリからのＤＮＡを上で同定したＰＣＲプライマー対でＰＣＲ増幅した。次いで、ポジ

ティブライブラリを、プローブオリゴヌクレオチド及びＰＣＲプライマー対の一方を用いてＰＲＯ１９５遺伝子をコードするクローンを単離するのに使用した。

【０２３５】

全長クローン［ＤＮＡ２６８４７－１３９５］が同定され、それは単一のオープンリーディングフレームを含み、ヌクレオチド位置７０－７２に見かけの翻訳開始部位、そしてヌクレオチド位置１０３９－１０４１に停止シグナルを持つ（図１３、配列番号：３０）。予測されるポリペプチド前駆体は３２３アミノ酸長であり、約３６,２２３ダルトンの算定分子量及び約５．０６の見積もりｐＩを持つ。図１４（配列番号：３１）に示した全長ＰＲＯ１９５配列の分析により、図１４に示すような種々の重要なポリペプチドドメインの存在が明らかになり、それらの重要なポリペプチドドメインに与えられた位置は、およそ上記の通りである。図１４に示した全長ＰＲＯ１９５ポリペプチドの分析により、以下の存在が明らかになった：約アミノ酸１～約アミノ酸３１のシグナルペプチド；約アミノ酸２４２～約アミノ酸２６２の膜貫通ドメイン、約アミノ酸９０～約アミノ酸９４のＮ-グリコシル化部位；約アミノ酸２８～約アミノ酸３４、約アミノ酸２９～約アミノ酸３５、約アミノ酸３１～約アミノ酸３７、及び約アミノ酸８６～約アミノ酸９２のＮ-ミリストイル化部位。クローンＤＮＡ２６８４７－１３９５は１９９８年４月１４日にＡＴＣＣに寄託され、ＡＴＣＣ寄託番号２０９７７２が付与された。

全長ＰＲＯ１９５ポリペプチド（図１４；配列番号：３１）のアミノ酸配列の分析は、それが公知のタンパク質と有意な類似性を持たないことを示唆している。しかし、Dayhoffデータベース（ﾊﾞｰｼﾞｮﾝ35.45 Swiss Prot 35）の分析により、ＰＲＯ１９５と以下のDayhoff配列との或る程度の相同性が明らかになった：P_P91380, AF035118_1, HUMTROPCS_1, NUOD_SALTY及びE70002。

【実施例１１】

【０２３６】

ヒトＰＲＯ２１２をコードするｃＤＮＡクローンの単離

実施例１に記載したように、phrapを用いて他のＥＳＴ配列（ジェネンテクが独自に開発したＥＳＴを含む）に対してコンセンサスＤＮＡ配列を構築した。構築したコンセンサス配列に基づいて、１）ＰＣＲにより対象とする配列を含むｃＤＮＡライブラリを同定するため、及び２）ＰＲＯ２１２の全長コード化配列のクローンを単離するプローブとして使用するために、オリゴヌクレオチドを合成した。

ＰＣＲプライマー（正方向及び逆方向）の対を合成した：

正方向ＰＣＲプライマー：

5'-CACGCTGGTTTCTGCTTGGAG-3'（配列番号：３７）

逆方向ＰＣＲプライマー：

5'-AGCTGGTGCACAGGGTGTCATG-3'（配列番号：３８）

さらに、コンセンサス配列から合成オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションプローブを作成し、それは以下のヌクレオチド配列を有していた：

ハイブリダイゼーションプローブ：

5'-CCCAGGCACCTTCTCAGCCAGCCAGCAGCTCCAGCTCAGAGCAGTGCCAGCCC-3'（配列番号：３９）

【０２３７】

全長クローンの供給源について幾つかのライブラリをスクリーニングするために、ライブラリからのＤＮＡを上で同定したＰＣＲプライマー対でＰＣＲ増幅した。次いで、ポジティブライブラリを、プローブオリゴヌクレオチド及びＰＣＲプライマー対の一方を用いてＰＲＯ２１２遺伝子をコードするクローンを単離するのに使用した。ｃＤＮＡライブラリの構築のためのＲＮＡはヒト胎児肺組織から単離した。

上記のように単離したクローンのＤＮＡ配列決定により、ＤＮＡ３０９４２－１１３４[図１５、配列番号：３５]）の全長ＤＮＡ配列；及びＰＲＯ２１２の誘導タンパク質配列が得られた。

ＤＮＡ３０９４２－１１３４の全コード化配列が図１５（配列番号：３５）に含まれる。クローンＤＮＡ３０９４２－１１３４は単一のオープンリーディングフレームを含み、

ヌクレオチド位置１０１－１０３に見かけの翻訳開始部位、そしてヌクレオチド位置１００１－１００３に見かけの停止コドンを持つ。予測されるポリペプチド前駆体は３００アミノ酸長である。図１６（配列番号：３６）に示した全長ＰＲＯ２１２配列の分析により、種々の重要なポリペプチドドメインの存在が明らかになり、それらの重要なポリペプチドドメインに与えられた位置は、およそ上記の通りである。図１６に示した全長ＰＲＯ２１２ポリペプチドの分析により、以下の存在が明らかになった：約アミノ酸１～約アミノ酸２３のシグナルペプチド；約アミノ酸１７３～約アミノ酸１７７のＮ-グリコシル化部位；約アミノ酸６３～約アミノ酸６７、及び約アミノ酸２５９～約アミノ酸２６３のｃＡＭＰ及びｃＧＭＰ依存性プロテインキナーゼリン酸化部位；約アミノ酸２８～約アミノ酸３７のチロシンキナーゼリン酸化部位；約アミノ酸１５６～約アミノ酸１６２、約アミノ酸１７８～約アミノ酸１８４、約アミノ酸２０７～約アミノ酸２１３、約アミノ酸２６６～約アミノ酸２７２、及び約アミノ酸２８７～約アミノ酸２９３のＮ-ミリストイル化部位。クローンＤＮＡ３０９４２－１１３４は１９９７年９月１６日にＡＴＣＣに寄託され、ＡＴＣＣ寄託番号２０９２５４が付与された。

図１６（配列番号：３６）に示した全長配列のBLAST及びFastA配列アラインメント分析に基づいて、ＰＲＯ２１２はＴＮＦＲ２に幾分のアミノ酸配列同一性を示した（２８．７％）。

【実施例１２】

【０２３８】

ヒトＰＲＯ２１４をコードするｃＤＮＡクローンの単離

実施例１に記載したように、phrapを用いて他のＥＳＴ配列に対してＥＧＦ様相同体をコードするコンセンサスＤＮＡ配列を構築した。このコンセンサス配列を、ここでＤＮＡ２８７４４と命名する。構築したＤＮＡ２８７４４コンセンサス配列に基づいて、１）ＰＣＲにより対象とする配列を含むｃＤＮＡライブラリを同定するため、及び２）ＰＲＯ２１４の全長コード化配列のクローンを単離するプローブとして使用するために、オリゴヌクレオチドを合成した。

ＰＣＲプライマー（正方向及び逆方向）の対を合成した：

正方向ＰＣＲプライマー（ＯＬＩ５５６）：

5'-ATTCTGCGTGAACACTGAGGGC-3'（配列番号：４２）

逆方向ＰＣＲプライマー（ＯＬＩ５５７）：

5'-ATCTGCTTGTAGCCCTCGGCAC-3'（配列番号：４３）

さらに、ＤＮＡ２８７４４コンセンサス配列から合成オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションプローブを作成し、それは以下のヌクレオチド配列を有していた：

ハイブリダイゼーションプローブ（ＯＬＩ５５５）：

5'-CCTGGCTATCAGCAGGTGGGCTCCAAGTGTCTCGATGTGGATGAGTGTGA-3'（配列番号：４４）

【０２３９】

全長クローンの供給源について幾つかのライブラリをスクリーニングするために、ライブラリからのＤＮＡを上で同定したＰＣＲプライマー対でＰＣＲ増幅した。次いで、ポジティブライブラリを、プローブオリゴヌクレオチド及びＰＣＲプライマー対の一方を用いてＰＲＯ２１４遺伝子をコードするクローンを単離するのに使用した。ｃＤＮＡライブラリの構築のためのＲＮＡはヒト胎児肺組織から単離した。

上記のように単離したクローンのＤＮＡ配列決定により、ＤＮＡ３２２８６－１１９１[図１７、配列番号：４０]）の全長ＤＮＡ配列；及びＰＲＯ２１４の誘導タンパク質配列が得られた。

ＤＮＡ３２２８６－１１９１の全コード化配列が図１７（配列番号：４０）に含まれる。クローンＤＮＡ３２２８６－１１９１は単一のオープンリーディングフレームを含み、ヌクレオチド位置１０３－１０５に見かけの翻訳開始部位、そしてヌクレオチド位置１３６３－１３６５に見かけの停止コドンを持つ。予測されるポリペプチド前駆体は４２０アミノ酸長である。図１８（配列番号：４１）に示した全長ＰＲＯ２１４配列の分析により、種々の重要なポリペプチドドメインの存在が明らかになり、それらの重要なポリペプチ

ドドメインに与えられた位置は、およそ上記の通りである。図１８に示した全長ＰＲＯ２１４ポリペプチドの分析により、以下の存在が明らかになった：約アミノ酸１～約アミノ酸２９のシグナルペプチド；約アミノ酸３４２～約アミノ酸３９２の膜貫通ドメイン；約アミノ酸７９～約アミノ酸８３、及び約アミノ酸２０５～約アミノ酸２０９のＮ-グリコシル化部位；約アミノ酸２９０～約アミノ酸２９４のｃＡＭＰ及びｃＧＭＰ依存性プロテインキナーゼリン酸化部位；約アミノ酸３２１～約アミノ酸３３３のアスパラギン酸及びアスパラギンヒドロキシル化部位；及び約アミノ酸１８１～約アミノ酸１９３のＥＧＦ様ドメインシステインパターンシグネーチャー。クローンＤＮＡ３２２８６－１１９１は１９９７年１０月１６日にＡＴＣＣに寄託され、ＡＴＣＣ寄託番号２０９３８５が付与された。

図１８（配列番号：４１）に示した全長配列のBLAST及びFastA配列アラインメント分析に基づいて、ＰＲＯ２１４はＨＴタンパク質及び／又はフィブリンにアミノ酸配列同一性を示した（各々４９％及び３８％）。

【実施例１３】

【０２４０】

ヒトＰＲＯ２１７をコードするｃＤＮＡクローンの単離

実施例１に記載したように、phrapを用いて他のＥＳＴ配列に対してコンセンサスＤＮＡ配列を構築した。このコンセンサス配列を、ここでＤＮＡ２８７６０と命名する。構築したＤＮＡ２８７６０コンセンサス配列に基づいて、１）ＰＣＲにより対象とする配列を含むｃＤＮＡライブラリを同定するため、及び２）ＰＲＯ２１７の全長コード化配列のクローンを単離するプローブとして使用するために、オリゴヌクレオチドを合成した。

ＰＣＲプライマー（正方向及び逆方向）の対を合成した：

正方向ＰＣＲプライマー：

5'-AAAGACGCATCTGCGAGTGTCC-3'（配列番号：４７）

逆方向ＰＣＲプライマー：

5'-TGCTGATTTCACACTGCTCTCCC-3'（配列番号：４８）

さらに、ＤＮＡ２８７６０コンセンサス配列から合成オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションプローブを作成し、それは以下のヌクレオチド配列を有していた：

ハイブリダイゼーションプローブ：

5'-CCCACGATGTATGAATGGTGGACTTTGTGTGACTCCTGGTTTCTGCATC-3'（配列番号：４９）

全長クローンの供給源について幾つかのライブラリをスクリーニングするために、ライブラリからのＤＮＡを上で同定したＰＣＲプライマー対でＰＣＲ増幅した。次いで、ポジティブライブラリを、プローブオリゴヌクレオチド及びＰＣＲプライマー対の一方を用いてＰＲＯ２１７遺伝子をコードするクローンを単離するのに使用した。ｃＤＮＡライブラリの構築のためのＲＮＡはヒト胎児肺組織から単離した。

上記のように単離したクローンのＤＮＡ配列決定により、ＤＮＡ３３０９４－１１３１[図１９、配列番号：４５]）の全長ＤＮＡ配列；及びＰＲＯ２１７の誘導タンパク質配列が得られた。

【０２４１】

ＤＮＡ３３０９４－１１３１の全コード化配列が図１９（配列番号：４５）に含まれる。クローンＤＮＡ３３０９４－１１３１は単一のオープンリーディングフレームを含み、ヌクレオチド位置１４６－１４８に見かけの翻訳開始部位、そしてヌクレオチド位置１２８３－１２８５に見かけの停止コドンを持つ。予測されるポリペプチド前駆体は３７９アミノ酸長であり、約４１,５２８ダルトンの算定分子量及び約７．９７の見積もりｐＩを持つ。図２０（配列番号：４６）に示した全長ＰＲＯ２１７配列の分析により、種々の重要なポリペプチドドメインの存在が明らかになり、それらの重要なポリペプチドドメインに与えられた位置は、およそ上記の通りである。図２０に示した全長ＰＲＯ２１７ポリペプチドの分析により、以下の存在が明らかになった：約アミノ酸１～約アミノ酸２８のシグナルペプチド；約アミノ酸８８～約アミノ酸９２及び約アミノ酸２４５～約アミノ酸２４９のＮ-グリコシル化部位；約アミノ酸３７０～約アミノ酸３７８のチロシンキナーゼ

リン酸化部位；約アミノ酸１８４～約アミノ酸１９０、約アミノ酸１８５～約アミノ酸１９１、約アミノ酸１８９～約アミノ酸１９５、及び約アミノ酸３１５～約アミノ酸３２１のＮ-ミリストイル化部位；約アミノ酸２８５～約アミノ酸２９３のＡＴＰ／ＧＴＰ結合部位モチーフＡ（Ｐ-ｌｏｏｐ）；及び約アミノ酸１９８～約アミノ酸２１０、約アミノ酸２３０～約アミノ酸２４２、約アミノ酸２６２～約アミノ酸２７４、約アミノ酸２９４～約アミノ酸３０６及び約アミノ酸３２６～約アミノ酸３３８のＥＧＦ様ドメインシステインパターンシグネーチャー。クローンＤＮＡ３３０９４－１１３１は１９９７年９月１６日にＡＴＣＣに寄託され、ＡＴＣＣ寄託番号２０９２５６が付与された。

図２０（配列番号：４６）に示した全長配列のBLAST及びFastA配列アラインメント分析に基づいて、ＰＲＯ２１７は新規なＥＧＦ様相同体であることが明らかになった。

【実施例１４】

【０２４２】

ヒトＰＲＯ２２４をコードするｃＤＮＡクローンの単離

実施例１に記載したように、phrapを用いて他のＥＳＴ配列に対してコンセンサスＤＮＡ配列を構築した。このコンセンサス配列を、ここでＤＮＡ３０８４５と命名する。構築したＤＮＡ３０８４５コンセンサス配列に基づいて、１）ＰＣＲにより対象とする配列を含むｃＤＮＡライブラリを同定するため、及び２）ＰＲＯ２２４の全長コード化配列のクローンを単離するプローブとして使用するために、オリゴヌクレオチドを合成した。

ＰＣＲプライマー（正方向及び逆方向）の対を合成した：

正方向ＰＣＲプライマー：

5'-AAGTTCCAGTGCCGCACCAGTGGC-3'（配列番号：５２）

逆方向ＰＣＲプライマー：

5'-TTGGTTCCACAGCCGAGCTCGTCG-3'（配列番号：５３）

さらに、ＤＮＡ３０８４５コンセンサス配列から合成オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションプローブを作成し、それは以下のヌクレオチド配列を有していた：

ハイブリダイゼーションプローブ：

5'-GAGGAGGAGTGCAGGATTGAGCCATGTACCCAGAAAGGGCAATGCCCACC-3'（配列番号：５４）

全長クローンの供給源について幾つかのライブラリをスクリーニングするために、ライブラリからのＤＮＡを上で同定したＰＣＲプライマー対でＰＣＲ増幅した。次いで、ポジティブライブラリを、プローブオリゴヌクレオチド及びＰＣＲプライマー対の一方を用いてＰＲＯ２２４遺伝子をコードするクローンを単離するのに使用した。ｃＤＮＡライブラリの構築のためのＲＮＡはヒト胎児肝臓組織から単離した。

上記のように単離したクローンのＤＮＡ配列決定により、ＤＮＡ３３２２１－１１３３[図２１、配列番号：５０]）の全長ＤＮＡ配列；及びＰＲＯ２２４の誘導タンパク質配列が得られた。

【０２４３】

ＤＮＡ３３２２１－１１３３の全コード化配列が図２１（配列番号：５０）に含まれる。クローンＤＮＡ３３２２１－１１３３は単一のオープンリーディングフレームを含み、ヌクレオチド位置３３－３５に見かけの翻訳開始部位、そしてヌクレオチド位置８７９－８８１に見かけの停止コドンを持つ。予測されるポリペプチド前駆体は２８２アミノ酸長であり、約２８,９９１ダルトンの算定分子量及び約４．６２の見積もりｐＩを持つ。図２２（配列番号：５１）に示した全長ＰＲＯ２２４配列の分析により、種々の重要なポリペプチドドメインの存在が明らかになり、それらの重要なポリペプチドドメインに与えられた位置は、およそ上記の通りである。図２２に示した全長ＰＲＯ２２４ポリペプチドの分析により、以下の存在が明らかになった：約アミノ酸１～約アミノ酸３０のシグナルペプチド；約アミノ酸２３１～約アミノ酸２４８の膜貫通ドメイン；約アミノ酸１２６～約アミノ酸１３０、約アミノ酸１９５～約アミノ酸１９９、及び約アミノ酸２１３～約アミノ酸２１７のＮ-グリコシル化部位；約アミノ酸３～約アミノ酸９、約アミノ酸１０～約アミノ酸１６、約アミノ酸２６～約アミノ酸３２、約アミノ酸３０～約アミノ酸３６、約アミノ酸１１２～約アミノ酸１１８、約アミノ酸１６６～約アミノ酸１７２、約アミノ酸

２１２～約アミノ酸２１８、約アミノ酸２２４～約アミノ酸２３０、約アミノ酸２３０～約アミノ酸２３６、及び約アミノ酸２６３～約アミノ酸２６９のN-ミリストイル化部位；約アミノ酸４４～約アミノ酸５５の原核生物膜リポタンパク脂質結合部位；及び約アミノ酸１７～約アミノ酸３９のロイシンジッパーパターン。クローンＤＮＡ３３２２１－１１３３は１９９７年９月１６日にＡＴＣＣに寄託され、ＡＴＣＣ寄託番号２０９２６３が付与された。

全長ＰＲＯ２２４配列のアミノ酸配列の分析は、それが極低密度リポタンパク質レセプター、アポリポプロテインＥレセプター及びニワトリ卵母細胞レセプターＰ９５に対して相同性を持つことを示唆している。図２２（配列番号：５１）に示した全長配列のBLAST及びFastA配列アラインメント分析に基づいて、ＰＲＯ２２４はこれらのタンパク質の一部に対して２８％～４５％の範囲のアミノ酸同一性を持ち、これらのタンパク質との全体的な同一性は約３３％であることが示された。

【実施例１５】

【０２４４】

ヒトＰＲＯ２３１をコードするｃＤＮＡクローンの単離

実施例１に記載したように、phrapを用いて他のＥＳＴ配列に対してコンセンサスＤＮＡ配列を構築した。このコンセンサス配列を、ここでＤＮＡ３０９３３と命名し、コードされるポリペプチドは推定酸ホスファターゼタンパク質と幾分の相同性を有する。構築したＤＮＡ３０９３３コンセンサス配列に基づいて、１）ＰＣＲにより対象とする配列を含むｃＤＮＡライブラリを同定するため、及び２）ＰＲＯ２３１の全長コード化配列のクローンを単離するプローブとして使用するために、オリゴヌクレオチドを合成した。

ＰＣＲプライマー（正方向及び逆方向）の対を合成した：

正方向ＰＣＲプライマー１：

5'-CCAACTACCAAAGCTGCTGGAGCC-3'（配列番号：５７）

正方向ＰＣＲプライマー２：

5'-GCAGCTCTATTACCACGGGAAGGA-3'（配列番号：５８）

逆方向ＰＣＲプライマー：

5'-TCCTTCCCGTGGTAATAGAGCTGC-3'（配列番号：５９）

さらに、ＤＮＡ３０９３３コンセンサス配列から合成オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションプローブを作成し、それは以下のヌクレオチド配列を有していた：

ハイブリダイゼーションプローブ：

5'-GGCAGAGAACCAGAGGCCGGAGGAGACTGCCTCTTTACAGCCAGG-3'（配列番号：６０）

全長クローンの供給源について幾つかのライブラリをスクリーニングするために、ライブラリからのＤＮＡを上で同定したＰＣＲプライマー対でＰＣＲ増幅した。次いで、ポジティブライブラリを、プローブオリゴヌクレオチド及びＰＣＲプライマー対の一方を用いてＰＲＯ２３１遺伝子をコードするクローンを単離するのに使用した。ｃＤＮＡライブラリの構築のためのＲＮＡはヒト胎児肝臓組織から単離した。

【０２４５】

上記のように単離したクローンのＤＮＡ配列決定により、ＤＮＡ３４４３４－１１３９[図２３、配列番号：５５]）の全長ＤＮＡ配列；及びＰＲＯ２３１の誘導タンパク質配列が得られた。

ＤＮＡ３４４３４－１１３９の全コード化配列が図２３（配列番号：５５）に含まれる。クローンＤＮＡ３４４３４－１１３９は単一のオープンリーディングフレームを含み、ヌクレオチド位置１７３－１７５に見かけの翻訳開始部位、そしてヌクレオチド位置１４５７－１４５９に見かけの停止コドンを持つ。予測されるポリペプチド前駆体は４２８アミノ酸長であり、約４８,８８６ダルトンの算定分子量及び約６．３９の見積もりｐＩを持つ。図２４（配列番号：５６）に示した全長ＰＲＯ２３１配列の分析により、種々の重要なポリペプチドドメインの存在が明らかになり、それらの重要なポリペプチドドメインに与えられた位置は、およそ上記の通りである。図２４に示した全長ＰＲＯ２３１ポリペプチドの分析により、以下の存在が明らかになった：約アミノ酸１～約アミノ酸２３のシ

グナルペプチド；約アミノ酸２１８～約アミノ酸２２２のｃＡＭＰ及びｃＧＭＰ依存性プロテインキナーゼリン酸化部位；約アミノ酸２８０～約アミノ酸２８８のチロシンキナーゼリン酸化部位；約アミノ酸１５～約アミノ酸２１、約アミノ酸１１７～約アミノ酸１２３、約アミノ酸１１８～約アミノ酸１２４、約アミノ酸１７９～約アミノ酸１８５、約アミノ酸２４０～約アミノ酸２４６、及び約アミノ酸３８７～約アミノ酸３９３のＮ-ミリストイル化部位；約アミノ酸２１６～約アミノ酸２２０のアミド化部位；約アミノ酸１０～約アミノ酸３２のロイシンジッパーパターン；及び約アミノ酸５０～約アミノ酸６５のヒスチジン酸ホスファターゼシグネーチャー。クローンＤＮＡ３４４３４－１１３９は１９９７年9月１６日にＡＴＣＣに寄託され、ＡＴＣＣ寄託番号２０９２５２が付与された。

全長ＰＲＯ２３１配列のアミノ酸配列の分析は、それがヒト及びラット前立腺の酸ホスファターゼ前駆体タンパク質と、各々３０％及び３１％のアミノ酸同一性を有することを示唆している。

【実施例１６】

【０２４６】

ヒトＰＲＯ２３５をコードするｃＤＮＡクローンの単離

実施例１に記載したように、phrapを用いて他のＥＳＴ配列に対してコンセンサスＤＮＡ配列を構築した。このコンセンサス配列を、ここでＤＮＡ３０９２７と命名する。構築したＤＮＡ３０９２７コンセンサス配列に基づいて、１）ＰＣＲにより対象とする配列を含むｃＤＮＡライブラリを同定するため、及び２）ＰＲＯ２３５の全長コード化配列のクローンを単離するプローブとして使用するために、オリゴヌクレオチドを合成した。

ＰＣＲプライマー（正方向及び逆方向）の対を合成した：

正方向ＰＣＲプライマー：

5'-TGGAATACCGCCTCCTGCAG-3'（配列番号：６３）

逆方向ＰＣＲプライマー：

5'-CTTCTGCCCTTTGGAGAAGATGGC-3'（配列番号：６４）

さらに、ＤＮＡ３０９２７コンセンサス配列から合成オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションプローブを作成し、それは以下のヌクレオチド配列を有していた：

ハイブリダイゼーションプローブ：

5'-GGACTCACTGGCCCAGGCCTTCAATATCACCAGCCAGGACGAT-3'（配列番号：６５）

全長クローンの供給源について幾つかのライブラリをスクリーニングするために、ライブラリからのＤＮＡを上で同定したＰＣＲプライマー対でＰＣＲ増幅した。次いで、ポジティブライブラリを、プローブオリゴヌクレオチド及びＰＣＲプライマー対の一方を用いてＰＲＯ２３５遺伝子をコードするクローンを単離するのに使用した。ｃＤＮＡライブラリの構築のためのＲＮＡはヒト胎児肝臓組織から単離した。

上記のように単離したクローンのＤＮＡ配列決定により、ＤＮＡ３５５５８－１１６７[図２５、配列番号：６１]）の全長ＤＮＡ配列；及びＰＲＯ２３５の誘導タンパク質配列が得られた。

【０２４７】

ＤＮＡ３５５５８－１１６７の全コード化配列が図２５（配列番号：６１）に含まれる。クローンＤＮＡ３５５５８－１１６７は単一のオープンリーディングフレームを含み、ヌクレオチド位置６６７－６６９に見かけの翻訳開始部位、そしてヌクレオチド位置２３２３－２３２５に見かけの停止コドンを持つ。予測されるポリペプチド前駆体は５５２アミノ酸長であり、約６１,６７４ダルトンの算定分子量及び約６．９５の見積もりｐＩを持つ。図２６（配列番号：６２）に示した全長ＰＲＯ２３５配列の分析により、種々の重要なポリペプチドドメインの存在が明らかになり、それらの重要なポリペプチドドメインに与えられた位置は、およそ上記の通りである。図２６に示した全長ＰＲＯ２３５ポリペプチドの分析により、以下の存在が明らかになった：約アミノ酸１～約アミノ酸３２のシグナルペプチド；約アミノ酸７１～約アミノ酸８６の膜貫通ドメイン；約アミノ酸１３０～約アミノ酸１３４、約アミノ酸１４５～約アミノ酸１４９、約アミノ酸２１７～約アミ

ノ酸２２１、約アミノ酸３８０～約アミノ酸３８５のＮ-グリコシル化部位；約アミノ酸２２０～約アミノ酸２２６、約アミノ酸３１９～約アミノ酸３２５、約アミノ酸３５３～約アミノ酸３５９、約アミノ酸４６０～約アミノ酸４６６、及び約アミノ酸５０３～約アミノ酸５０９のＮ-ミリストイル化部位。クローンＤＮＡ３５５５８－１１６７は１９９７年９月１６日にＡＴＣＣに寄託され、ＡＴＣＣ寄託番号２０９３７４が付与された。

図２６に示す全長ＰＲＯ２３５配列のアミノ酸配列の分析は、その一部がヒト、マウス及びアフリカツメガエルプレキシン(plexin)タンパク質と有意な相同性を有し、よってＰＲＯ２３５が新規なプレキシンタンパク質であることを示している。

【実施例１７】

【０２４８】

ヒトＰＲＯ２４５をコードするｃＤＮＡクローンの単離

実施例１に記載したように、phrapを用いて他のＥＳＴ配列に対してコンセンサスＤＮＡ配列を構築した。このコンセンサス配列を、ここでＤＮＡ３０９５４と命名し、当該ポリペプチドは、膜貫通タンパク質レセプターチロシンキナーゼタンパク質と幾分の構造的相同性を示した。構築したＤＮＡ３０９５４コンセンサス配列に基づいて、１）ＰＣＲにより対象とする配列を含むｃＤＮＡライブラリを同定するため、及び２）ＰＲＯ２４５の全長コード化配列のクローンを単離するプローブとして使用するために、オリゴヌクレオチドを合成した。

ＰＣＲプライマー（正方向及び逆方向）の対を合成した：

正方向ＰＣＲプライマー：

5'-ATCGTTGTGAAGTTAGTGCCCC-3'（配列番号：６８）

逆方向ＰＣＲプライマー：

5'-ACCTGCGATATCCAACAGAATTG-3'（配列番号：６９）

さらに、ＤＮＡ３０９５４コンセンサス配列から合成オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションプローブを作成し、それは以下のヌクレオチド配列を有していた：

ハイブリダイゼーションプローブ：

5'-GGAAGAGGATACAGTCACTCTGGAAGTATTAGTGGCTCCAGCAGTTCC-3'（配列番号：７０）

全長クローンの供給源について幾つかのライブラリをスクリーニングするために、ライブラリからのＤＮＡを上で同定したＰＣＲプライマー対でＰＣＲ増幅した。次いで、ポジティブライブラリを、プローブオリゴヌクレオチド及びＰＣＲプライマー対の一方を用いてＰＲＯ２４５遺伝子をコードするクローンを単離するのに使用した。ｃＤＮＡライブラリの構築のためのＲＮＡはヒト胎児肝臓組織から単離した。

上記のように単離したクローンのＤＮＡ配列決定により、ＤＮＡ３５６３８－１１４１[図２７、配列番号：６６]）の全長ＤＮＡ配列；及びＰＲＯ２４５の誘導タンパク質配列が得られた。

【０２４９】

ＤＮＡ３５６３８－１１４１の全コード化配列が図２７（配列番号：６６）に含まれる。クローンＤＮＡ３５６３８－１１４１は単一のオープンリーディングフレームを含み、ヌクレオチド位置８９－９１に見かけの翻訳開始部位、そしてヌクレオチド位置１０２５－１０２７に見かけの停止コドンを持つ。予測されるポリペプチド前駆体は３１２アミノ酸長であり、約３４,５５４ダルトンの算定分子量及び約９．３９の見積もりｐＩを持つ。図２８（配列番号：６７）に示した全長ＰＲＯ２４５配列の分析により、種々の重要なポリペプチドドメインの存在が明らかになり、それらの重要なポリペプチドドメインに与えられた位置は、およそ上記の通りである。図２８に示した全長ＰＲＯ２４５ポリペプチドの分析により、以下の存在が明らかになった：約アミノ酸１～約アミノ酸２０のシグナルペプチド；約アミノ酸２３７～約アミノ酸２５８の膜貫通ドメイン；約アミノ酸９８～約アミノ酸１０２、約アミノ酸１８７～約アミノ酸１９１、約アミノ酸２３６～約アミノ酸２４０、及び約アミノ酸２７７～約アミノ酸２８１のＮ-グリコシル化部位；約アミノ酸１８２～約アミノ酸１８８、約アミノ酸２３９～約アミノ酸２４５、約アミノ酸２５５～約アミノ酸２６１、約アミノ酸２５７～約アミノ酸２６３、及び約アミノ酸３０５～約

アミノ酸３１１のN-ミリストイル化部位；及び約アミノ酸２２６～約アミノ酸２３０のアミド化部位。クローンＤＮＡ３５６３８－１１４１は１９９７年９月１６日にＡＴＣＣに寄託され、ＡＴＣＣ寄託番号２０９２６５が付与された。

図２８（配列番号：６７）に示す全長ＰＲＯ２４５配列のアミノ酸配列の分析は、その一部がヒトｃ-ｍｙｂタンパク質と６０％のアミノ酸同一性を有し、よって膜貫通タンパク質レセプターチロシンキナーゼファミリーの新規なメンバーであることを示唆している。

【実施例１８】

【０２５０】

ヒトＰＲＯ２６１をコードするｃＤＮＡクローンの単離

実施例１に記載したように、phrapを用いて他のＥＳＴ配列に対してコンセンサスＤＮＡ配列を構築した。このコンセンサス配列を、ここでＤＮＡ３０８４３と命名する。構築したＤＮＡ３０８４３コンセンサス配列に基づいて、１）ＰＣＲにより対象とする配列を含むｃＤＮＡライブラリを同定するため、及び２）ＰＲＯ２６１の全長コード化配列のクローンを単離するプローブとして使用するために、オリゴヌクレオチドを合成した。

ＰＣＲプライマー（正方向及び逆方向）の対を合成した：

正方向ＰＣＲプライマー：

5'-AAAGGTGCGTACCCAGCTGTGCC-3'（配列番号：７３）

逆方向ＰＣＲプライマー：

5'-TCCAGTCGGCAGAAGCGGTTCTGG-3'（配列番号：７４）

さらに、ＤＮＡ３０８４３コンセンサス配列から合成オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションプローブを作成し、それは以下のヌクレオチド配列を有していた：

ハイブリダイゼーションプローブ：

5'-CCTGGTGCTGGATGGCTGTGGCTGCTGCCGGGTATGTGCACGGCGGCTGGG-3'（配列番号：７５）

全長クローンの供給源について幾つかのライブラリをスクリーニングするために、ライブラリからのＤＮＡを上で同定したＰＣＲプライマー対でＰＣＲ増幅した。次いで、ポジティブライブラリを、プローブオリゴヌクレオチド及びＰＣＲプライマー対の一方を用いてＰＲＯ２６１遺伝子をコードするクローンを単離するのに使用した。ｃＤＮＡライブラリの構築のためのＲＮＡはヒト胎児肝臓組織から単離した。

上記のように単離したクローンのＤＮＡ配列決定により、ＤＮＡ３３４７３－１１７６[図２９、配列番号：７１]）の全長ＤＮＡ配列；及びＰＲＯ２６１の誘導タンパク質配列が得られた。

【０２５１】

ＤＮＡ３３４７３－１１７６の全コード化配列が図２９（配列番号：７１）に含まれる。クローンＤＮＡ３３４７３－１１７６は単一のオープンリーディングフレームを含み、ヌクレオチド位置１０－１２に見かけの翻訳開始部位、そしてヌクレオチド位置７６０－７６２に見かけの停止コドンを持つ。予測されるポリペプチド前駆体は２５０アミノ酸長であり、約２６,８２５ダルトンの算定分子量及び約８．３６の見積もりｐＩを持つ。図３０（配列番号：７２）に示した全長ＰＲＯ２６１配列の分析により、種々の重要なポリペプチドドメインの存在が明らかになり、それらの重要なポリペプチドドメインに与えられた位置は、およそ上記の通りである。図３０に示した全長ＰＲＯ２６１ポリペプチドの分析により、以下の存在が明らかになった：約アミノ酸１～約アミノ酸２３のシグナルペプチド；約アミノ酸３～約アミノ酸９、約アミノ酸４９～約アミノ酸５５、約アミノ酸８１～約アミノ酸８７、約アミノ酸８５～約アミノ酸９１、約アミノ酸１２６～約アミノ酸１３２、約アミノ酸１６４～約アミノ酸１７０、約アミノ酸１６６～約アミノ酸１７２、約アミノ酸１６７～約アミノ酸１７３、約アミノ酸１８３～約アミノ酸１８９、及び約アミノ酸２０９～約アミノ酸２１５のN-ミリストイル化部位；約アミノ酸４９～約アミノ酸６５のインシュリン様成長因子結合タンパク質シグネーチャー；約アミノ酸１０７～約アミノ酸１２４のウィルブランドC1ドメイン；約アミノ酸２０１～約アミノ酸２１６のトロンボスポンジン１相同ブロック；及び約アミノ酸４９～約アミノ酸５８のＩＧＦ結合タ

ンパク質部位。クローンＤＮＡ３３４７３－１１７６は１９９７年１０月１７日にＡＴＣＣに寄託され、ＡＴＣＣ寄託番号２０９３９１が付与された。

図３０（配列番号：７２）に示す全長ＰＲＯ２６１配列のアミノ酸配列の分析は、その一部がＣＴＧＦと有意な相同性を有し、よってＰＲＯ２６１が新規な成長因子であることを示唆している。

【実施例１９】

【０２５２】

ヒトＰＲＯ２６９をコードするｃＤＮＡクローンの単離

実施例１に記載したように、phrapを用いて他のＥＳＴ配列に対してコンセンサスＤＮＡ配列を構築した。このコンセンサス配列を、ここでＤＮＡ３５７０５と命名する。構築したＤＮＡ３５７０５コンセンサス配列に基づいて、１）ＰＣＲにより対象とする配列を含むｃＤＮＡライブラリを同定するため、及び２）ＰＲＯ２６９の全長コード化配列のクローンを単離するプローブとして使用するために、オリゴヌクレオチドを合成した。

ＰＣＲプライマー（正方向及び逆方向）の対を合成した：

正方向ＰＣＲプライマー１：

5'-TGGAAGGAGATGCGATGCCACCTG-3'（配列番号：７８）

正方向ＰＣＲプライマー２：

5'-TGACCAGTGGGGAAGGACAG-3'（配列番号：７９）

正方向ＰＣＲプライマー３：

5'-ACAGAGCAGAGGGTGCCTTG-3'（配列番号：８０）

逆方向ＰＣＲプライマー１：

5'-TCAGGGACAAGTGGTGTCTCTCCC-3'（配列番号：８１）

逆方向ＰＣＲプライマー２：

5'-TCAGGGAAGGAGTGTGCAGTTCTG-3'（配列番号：８２）

さらに、ＤＮＡ３５７０５コンセンサス配列から合成オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションプローブを作成し、それは以下のヌクレオチド配列を有していた：

ハイブリダイゼーションプローブ：

5'-ACAGCTCCCGATCTCAGTTACTTGCATCGCGGACGAAATCGGCGCTCGCT-3'（配列番号：８３）

全長クローンの供給源について幾つかのライブラリをスクリーニングするために、ライブラリからのＤＮＡを上で同定したＰＣＲプライマー対でＰＣＲ増幅した。次いで、ポジティブライブラリを、プローブオリゴヌクレオチド及びＰＣＲプライマー対の一方を用いてＰＲＯ２６９遺伝子をコードするクローンを単離するのに使用した。ｃＤＮＡライブラリの構築のためのＲＮＡはヒト胎児腎臓組織から単離した。

上記のように単離したクローンのＤＮＡ配列決定により、ＤＮＡ３８２６０－１１８０[図３１、配列番号：７６］の全長ＤＮＡ配列；及びＰＲＯ２６９の誘導タンパク質配列が得られた。

【０２５３】

ＤＮＡ３８２６０－１１８０の全コード化配列が図３１（配列番号：７６）に含まれる。クローンＤＮＡ３８２６０－１１８０は単一のオープンリーディングフレームを含み、ヌクレオチド位置３１４－３１６に見かけの翻訳開始部位、そしてヌクレオチド位置１７８４－１７８６に見かけの停止コドンを持つ。予測されるポリペプチド前駆体は４９０アミノ酸長であり、約５１,６３６ダルトンの算定分子量及び約６．２９の見積もりｐＩを持つ。図３２（配列番号：７７）に示した全長ＰＲＯ２６９配列の分析により、種々の重要なポリペプチドドメインの存在が明らかになり、それらの重要なポリペプチドドメインに与えられた位置は、およそ上記の通りである。図３２に示した全長ＰＲＯ２６９ポリペプチドの分析により、以下の存在が明らかになった：約アミノ酸１～約アミノ酸１６のシグナルペプチド；約アミノ酸３９７～アミノ酸４１８の膜貫通ドメイン；約アミノ酸１８９～約アミノ酸１９３、及び約アミノ酸３８１～約アミノ酸３８５のN-グリコシル化部位；約アミノ酸２８９～約アミノ酸２９３のグリコサミノグリカン接着部位；約アミノ酸９８～約アミノ酸１０２及び約アミノ酸４３４～約アミノ酸４３８のｃＡＭＰ及びｃＧＭ

Ｐ依存性プロテインキナーゼリン酸化部位；約アミノ酸３０～約アミノ酸３６、約アミノ酸３５～約アミノ酸４１、約アミノ酸５８～約アミノ酸６４、約アミノ酸５９～約アミノ酸６５、約アミノ酸１２１～約アミノ酸１２７、約アミノ酸１５１～約アミノ酸１５７、約アミノ酸１８５～約アミノ酸１９１、約アミノ酸２０９～約アミノ酸２１５、約アミノ酸２６７～約アミノ酸２７３、約アミノ酸３５０～約アミノ酸３５６、約アミノ酸３７４～約アミノ酸３８０、約アミノ酸４５３～約アミノ酸４５９、約アミノ酸４６３～約アミノ酸４６９、約アミノ酸４７７～約アミノ酸４８３のＮ-ミリストイル化部位；約アミノ酸２６２～約アミノ酸２７４のアスパラギン及びアスパラギン酸ヒドロキシル化部位。クローンＤＮＡ３８２６０－１１８０は１９９７年１０月１７日にＡＴＣＣに寄託され、ＡＴＣＣ寄託番号２０９３９７が付与された。

図３２（配列番号：７７）に示す全長ＰＲＯ２６９配列のアミノ酸配列の分析は、その一部がヒトのトロンボモジュリンタンパク質と有意な相同性を有し、よってＰＲＯ２６９が一又は複数のトロンボモジュリン様ドメインを有することを示している。

【実施例２０】

【０２５４】

ヒトＰＲＯ２８７をコードするｃＤＮＡクローンの単離

実施例１に記載したように、phrapを用いて他のＥＳＴ配列に対してコンセンサスＤＮＡ配列を構築した。このコンセンサス配列を、ここでＤＮＡ２８７２８と命名する、又はＰＲＯ２８７をコードする延長したコンセンサス配列を構築し、それはＩ型プロコラーゲンＣ-プロテイナーゼエンハンサータンパク質及びＩ型プロコラーゲンＣ-プロテイナーゼエンハンサータンパク質前駆体に対して類似性を示した。構築したＤＮＡ２８７２８コンセンサス配列に基づいて、１）ＰＣＲにより対象とする配列を含むｃＤＮＡライブラリを同定するため、及び２）ＰＲＯ２８７の全長コード化配列のクローンを単離するプローブとして使用するために、オリゴヌクレオチドを合成した。

ＰＣＲプライマー（正方向及び逆方向）の対を合成した：

正方向ＰＣＲプライマー：

5'-CCGATTCATAGACCTCGAGAGT-3'（配列番号：８６）

逆方向ＰＣＲプライマー：

5'-GTCAAGGAGTCCTCCACAATAC-3'（配列番号：８７）

さらに、ＤＮＡ２８７２８コンセンサス配列から合成オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションプローブを作成し、それは以下のヌクレオチド配列を有していた：

ハイブリダイゼーションプローブ：

5'-GTGTACAATGGCCATGCCAATGGCCAGCGCATTGGCCGCTTCTGT-3'（配列番号：８８）

全長クローンの供給源について幾つかのライブラリをスクリーニングするために、ライブラリからのＤＮＡを上で同定したＰＣＲプライマー対でＰＣＲ増幅した。次いで、ポジティブライブラリを、プローブオリゴヌクレオチド及びＰＣＲプライマー対の一方を用いてＰＲＯ２８７遺伝子をコードするクローンを単離するのに使用した。ｃＤＮＡライブラリの構築のためのＲＮＡはヒト胎児腎臓組織から単離した。

上記のように単離したクローンのＤＮＡ配列決定により、ＤＮＡ３９９６９－１１８５[図３３、配列番号：８４］の全長ＤＮＡ配列；及びＰＲＯ２８７の誘導タンパク質配列が得られた。

【０２５５】

ＤＮＡ３９９６９－１１８５の全コード化配列が図３３（配列番号：８４）に含まれる。クローンＤＮＡ３９９６９－１１８５は単一のオープンリーディングフレームを含み、ヌクレオチド位置３０７－３０９に見かけの翻訳開始部位、そしてヌクレオチド位置１５５２－１５５４に見かけの停止コドンを持つ。予測されるポリペプチド前駆体は４１５アミノ酸長であり、約４５,７１６ダルトンの算定分子量及び約８．８９の見積もりｐＩを持つ。図３４（配列番号：８５）に示した全長ＰＲＯ２８７配列の分析により、種々の重要なポリペプチドドメインの存在が明らかになり、それらの重要なポリペプチドドメインに与えられた位置は、およそ上記の通りである。図３４に示した全長ＰＲＯ２８７ポリペ

プチドの分析により、以下の存在が明らかになった：約アミノ酸１～約アミノ酸２３のシグナルペプチド；約アミノ酸３５５～アミノ酸３５９のＮ-グリコシル化部位；約アミノ酸１９９～約アミノ酸２０８のチロシンキナーゼリン酸化部位；約アミノ酸３４～約アミノ酸４０、約アミノ酸３５～約アミノ酸４１、約アミノ酸１００～約アミノ酸１０６、約アミノ酸１１３～約アミノ酸１１９、約アミノ酸２１８～約アミノ酸２２４、約アミノ酸２８９～約アミノ酸２９５、約アミノ酸３０５～約アミノ酸３１１、約アミノ酸３０９～約アミノ酸３１５、約アミノ酸３２０～約アミノ酸３２６、及び約アミノ酸３３０～約アミノ酸３３６のＮ-ミリストイル化部位；及び約アミノ酸１４９～約アミノ酸１５２の細胞接着配列。クローンＤＮＡ３９９６９－１１８５は１９９７年１０月１７日にＡＴＣＣに寄託され、ＡＴＣＣ寄託番号２０９４００が付与された。

図３４（配列番号：８５）に示す全長ＰＲＯ２８７配列のアミノ酸配列の分析は、それが一又は複数のプロコラーゲンＣ-プロテイナーゼエンハンサータンパク質前駆体又はプロコラーゲンＣ-プロテイナーゼエンハンサータンパク質様ドメインを有することを示唆している。全長配列のBLAST及びFastA配列アラインメント分析に基づいて、ＰＲＯ２８７は、プロコラーゲンＣ-プロテイナーゼエンハンサータンパク質前駆体及びプロコラーゲンＣ-プロテイナーゼエンハンサータンパク質とアミノ酸配列同一性を示す（各々、４７％及び５４％）。

【実施例２１】

【０２５６】

ヒトＰＲＯ３０１をコードするｃＤＮＡクローンの単離

実施例１に記載したように、phrapを用いて他のＥＳＴ配列に対してコンセンサスＤＮＡ配列を構築した。このコンセンサス配列を、ここでＤＮＡ３５９３６と命名する。構築したＤＮＡ３５９３６コンセンサス配列に基づいて、１）ＰＣＲにより対象とする配列を含むｃＤＮＡライブラリを同定するため、及び２）ＰＲＯ３０１の全長コード化配列のクローンを単離するプローブとして使用するために、オリゴヌクレオチドを合成した。

ＰＣＲプライマー（正方向及び逆方向）の対を合成した：

正方向ＰＣＲプライマー１：

5'-TCGCGGAGCTGTGTTCTGTTTCCC-3'（配列番号：９１）

正方向ＰＣＲプライマー２：

5'-ACACCTGGTTCAAAGATGGG-3'（配列番号：９２）

正方向ＰＣＲプライマー２：

5'-TTGCCTTACTCAGGTGCTAC-3'（配列番号：９３）

逆方向ＰＣＲプライマー１：

5'-TAGGAAGAGTTGCTGAAGGCACGG-3'（配列番号：９４）

逆方向ＰＣＲプライマー２：

5'-ACTCAGCAGTGGTAGGAAAG-3'（配列番号：９５）

さらに、ＤＮＡ３５９３６コンセンサス配列から合成オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションプローブを作成し、それは以下のヌクレオチド配列を有していた：

ハイブリダイゼーションプローブ：

5'-TGATCGCGATGGGGACAAAGGCGCAAGCTCGAGAGGAAACTGTTGTGCCT-3'（配列番号：９６）

全長クローンの供給源について幾つかのライブラリをスクリーニングするために、ライブラリからのＤＮＡを上で同定したＰＣＲプライマー対でＰＣＲ増幅した。次いで、ポジティブライブラリを、プローブオリゴヌクレオチド及びＰＣＲプライマー対の一方を用いてＰＲＯ３０１遺伝子をコードするクローンを単離するのに使用した。ｃＤＮＡライブラリの構築のためのＲＮＡはヒト胎児腎臓組織から単離した。

上記のように単離したクローンのＤＮＡ配列決定により、ＤＮＡ４０６２８－１２１６[図３５、配列番号：８９］の全長ＤＮＡ配列；及びＰＲＯ３０１の誘導タンパク質配列が得られた。

【０２５７】

ＤＮＡ４０６２８－１２１６の全コード化配列が図３５（配列番号：８９）に含まれる

。クローンＤＮＡ４０６２８－１２１６は単一のオープンリーディングフレームを含み、ヌクレオチド位置５２－５４に見かけの翻訳開始部位、そしてヌクレオチド位置９４９－９５１に見かけの停止コドンを持つ。予測されるポリペプチド前駆体は２９９アミノ酸長であり、約３２,５８３ダルトンの算定分子量及び約８．２９の見積もりｐＩを持つ。図３６（配列番号：９０）に示した全長ＰＲＯ３０１配列の分析により、種々の重要なポリペプチドドメインの存在が明らかになり、それらの重要なポリペプチドドメインに与えられた位置は、およそ上記の通りである。図３６に示した全長ＰＲＯ３０１ポリペプチドの分析により、以下の存在が明らかになった：約アミノ酸１～約アミノ酸２７のシグナルペプチド；約アミノ酸２３５～アミノ酸２５６の膜貫通ドメイン；約アミノ酸１８５～約アミノ酸１８９のN-グリコシル化部位；約アミノ酸２７０～約アミノ酸２７４のｃＡＭＰ及びｃＧＭＰ依存性プロテインキナーゼリン酸化部位；約アミノ酸１０５～約アミノ酸１１１、約アミノ酸１１６～約アミノ酸１２２、約アミノ酸１５８～約アミノ酸１６４、約アミノ酸２１９～約アミノ酸２２５、約アミノ酸２３７～約アミノ酸２４３、及び約アミノ酸２５６～約アミノ酸２６２のN-ミリストイル化部位。クローンＤＮＡ４０６２８－１２１６は１９９７年１１月７日にＡＴＣＣに寄託され、ＡＴＣＣ寄託番号２０９４３２が付与された。

図３６（配列番号：９０）に示す全長ＰＲＯ３０１配列のBLAST及びFastA配列アラインメント分析は、ＰＲＯ３０１がＡ３３抗原前駆体（３０％）及びコクサッキー及びアデノウイルスレセプタータンパク質（２９％）とアミノ酸配列同一性を示した。

【実施例２２】

【０２５８】

ヒトＰＲＯ３２３をコードするｃＤＮＡクローンの単離

実施例１に記載したように、phrapを用いて他のＥＳＴ配列に対してコンセンサスＤＮＡ配列を構築した。このコンセンサス配列を、ここでＤＮＡ３０８７５と命名する。構築したＤＮＡ３０８７５コンセンサス配列に基づいて、１）ＰＣＲにより対象とする配列を含むｃＤＮＡライブラリを同定するため、及び２）ＰＲＯ３２３の全長コード化配列のクローンを単離するプローブとして使用するために、オリゴヌクレオチドを合成した。

ＰＣＲプライマー（正方向及び逆方向）の対を合成した：

正方向ＰＣＲプライマー１：

5'-AGTTCTGGTCAGCCTATGTGCC-3'（配列番号：９９）

正方向ＰＣＲプライマー２：

5'-CGTGATGGTGTCTTTGTCCATGGG-3'（配列番号：１００）

逆方向ＰＣＲプライマー１：

5'-CTCCACCAATCCCGATGAACTTGG-3'（配列番号：１０１）

さらに、ＤＮＡ３０８７５コンセンサス配列から合成オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションプローブを作成し、それは以下のヌクレオチド配列を有していた：

ハイブリダイゼーションプローブ：

5'-GAGCAGATTGACCTCATACGCCGCATGTGTGCCTCCTATTCTGAGCTGGA-3'（配列番号：１０２）

全長クローンの供給源について幾つかのライブラリをスクリーニングするために、ライブラリからのＤＮＡを上で同定したＰＣＲプライマー対でＰＣＲ増幅した。次いで、ポジティブライブラリを、プローブオリゴヌクレオチド及びＰＣＲプライマー対の一方を用いてＰＲＯ３２３遺伝子をコードするクローンを単離するのに使用した。ｃＤＮＡライブラリの構築のためのＲＮＡはヒト胎児肝臓組織（LIB6）から単離した。

上記のように単離したクローンのＤＮＡ配列決定により、ＤＮＡ３５５９５－１２２８[図３７、配列番号：９７］の全長ＤＮＡ配列；及びＰＲＯ３２３の誘導タンパク質配列が得られた。ＤＮＡ３５５９５配列の特徴付けで使用するため及び他のｃＤＮＡライブラリをスクリーニングするためにＤＮＡ３５５９５配列から以下のような付加的プローブを作成した：

正方向ＰＣＲプライマー：

5'-TGCTGCTGCTCCAGCCTGTAACC-3'（配列番号：１０３）

逆方向ＰＣＲプライマー：
5'-CTGGCCGTAGCTGAAATTGCGC-3'（配列番号：１０４）
ハイブリダイゼーションプローブ：
5'-ACTCAGTAGTCCCAGCACCCAGGGCCTGCAAGAGCAGGCACGG-3'（配列番号：１０５）
【０２５９】
ＤＮＡ３５５９５－１２２８の全コード化配列が図３７（配列番号：９７）に含まれる。クローンＤＮＡ３５５９５－１２２８は単一のオープンリーディングフレームを含み、ヌクレオチド位置１１０－１１２に見かけの翻訳開始部位、そしてヌクレオチド位置１４０９－１４１１に見かけの停止コドンを持つ。予測されるポリペプチド前駆体は４３３アミノ酸長であり、約４７,７８７ダルトンの算定分子量及び約６．１１の見積もりｐＩを持つ。図３８（配列番号：９８）に示した全長ＰＲＯ３２３配列の分析により、種々の重要なポリペプチドドメインの存在が明らかになり、それらの重要なポリペプチドドメインに与えられた位置は、およそ上記の通りである。図３８に示した全長ＰＲＯ３２３ポリペプチドの分析により、以下の存在が明らかになった：約アミノ酸５８～約アミノ酸６２、約アミノ酸１２３～アミノ酸１２７、約アミノ酸１８２～約アミノ酸１８５、約アミノ酸２７３～約アミノ酸２７７のＮ-グリコシル化部位；約アミノ酸７２～約アミノ酸７８、約アミノ酸１３３～約アミノ酸１３９、約アミノ酸２３４～約アミノ酸２４０、約アミノ酸２６４～約アミノ酸２７０、約アミノ酸３３４～約アミノ酸３４０、及び約アミノ酸３８９～約アミノ酸３９５のＮ-ミリストイル化部位；約アミノ酸１３４～約アミノ酸１５７の腎臓ジペプチダーゼ活性部位。クローンＤＮＡ３５５９５－１２２８は１９９７年１２月１０日にＡＴＣＣに寄託され、ＡＴＣＣ寄託番号２０９５２８が付与された。
図３８（配列番号：９８）に示す全長ＰＲＯ３２３配列のアミノ酸配列分析は、その一部が種々のジペプチダーゼタンパク質と有意な相同性を有することを示唆し、よってＰＲＯ３２３が新規なジペプチダーゼタンパク質であることを示している。
【実施例２３】
【０２６０】
ヒトＰＲＯ３３１をコードするｃＤＮＡクローンの単離
実施例１に記載したように、phrapを用いて他のＥＳＴ配列に対してコンセンサスＤＮＡ配列を構築した。構築したコンセンサス配列に基づいて、１）ＰＣＲにより対象とする配列を含むｃＤＮＡライブラリを同定するため、及び２）ＰＲＯ３３１の全長コード化配列のクローンを単離するプローブとして使用するために、オリゴヌクレオチドを合成した。
ＰＣＲプライマー（正方向及び逆方向）の対を合成した：
正方向ＰＣＲプライマー：
5'-GCCTTTGACAACCTTCAGTCACTAGTGG-3'（配列番号：１０８）
逆方向ＰＣＲプライマー：
5'-CCCCATGTGTCCATGACTGTTCCC-3'（配列番号：１０９）
さらに、ＤＮＡコンセンサス配列から合成オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションプローブを作成し、それは以下のヌクレオチド配列を有していた：
ハイブリダイゼーションプローブ：
5'-TACTGCCTCATGACCTCTTCACTCCCTTGCATCATCTTAGAGCGG-3'（配列番号：１１０）
全長クローンの供給源について幾つかのライブラリをスクリーニングするために、ライブラリからのＤＮＡを上で同定したＰＣＲプライマー対でＰＣＲ増幅した。次いで、ポジティブライブラリを、プローブオリゴヌクレオチド及びＰＣＲプライマー対の一方を用いてＰＲＯ３３１遺伝子をコードするクローンを単離するのに使用した。ｃＤＮＡライブラリの構築のためのＲＮＡはヒト胎児脳組織から単離した。
上記のように単離したクローンのＤＮＡ配列決定により、ＤＮＡ４０９８１－１２３４[図３９、配列番号：１０６］の全長ＤＮＡ配列；及びＰＲＯ３３１の誘導タンパク質配列が得られた。
【０２６１】

ＤＮＡ４０９８１－１２３４の全コード化配列が図３９（配列番号：１０６）に含まれる。クローンＤＮＡ４０９８１－１２３４は単一のオープンリーディングフレームを含み、ヌクレオチド位置８１２－８１４に見かけの翻訳開始部位、そしてヌクレオチド位置２７３２－２７３４見かけの停止コドンを持つ。予測されるポリペプチド前駆体は６４０アミノ酸長であり、約７１,９５０ダルトンの算定分子量及び約７．１２の見積もりｐＩを持つ。図４０（配列番号：１０７）に示した全長ＰＲＯ３３１配列の分析により、種々の重要なポリペプチドドメインの存在が明らかになり、それらの重要なポリペプチドドメインに与えられた位置は、およそ上記の通りである。図４０に示した全長ＰＲＯ３３１ポリペプチドの分析により、以下の存在が明らかになった：約アミノ酸１～約アミノ酸４４のシグナルペプチド；約アミノ酸５２８～アミノ酸５４３の膜貫通ドメイン；約アミノ酸２７８～約アミノ酸２８２、約アミノ酸３６４～約アミノ酸３６８、約アミノ酸３９０～約アミノ酸３９４、約アミノ酸４１２～約アミノ酸４１６、約アミノ酸４１５～約アミノ酸４１９、約アミノ酸４３４～約アミノ酸４３８、約アミノ酸４４２～約アミノ酸４４６、約アミノ酸４８８～約アミノ酸４９２、約アミノ酸６０６～約アミノ酸６１０のN-グリコシル化部位；約アミノ酸１８３～約アミノ酸１８７のｃＡＭＰ及びｃＧＭＰ依存性プロテインキナーゼリン酸化部位；約アミノ酸４０～約アミノ酸４６、約アミノ酸７３～約アミノ酸７９、約アミノ酸１１８～約アミノ酸１２４、約アミノ酸１９１～約アミノ酸１９７、約アミノ酸２２８～約アミノ酸２３４、約アミノ酸２３７～約アミノ酸２４３、約アミノ酸３９１～約アミノ酸３９７、約アミノ酸４２２～約アミノ酸４２８、約アミノ酸４３３～約アミノ酸４３９及び約アミノ酸５３１～約アミノ酸５３７のN-ミリストイル化部位。クローンＤＮＡ４０９８１－１２３４は１９９７年１１月７日にＡＴＣＣに寄託され、ＡＴＣＣ寄託番号２０９４３９が付与された。

図４０（配列番号：１０７）に示す全長ＰＲＯ３３１配列のアミノ酸配列分析は、その一部がＬＩＧ-Ｉタンパク質と有意な相同性を有することを示唆し、よってＰＲＯ３３１が新規なＬＩＧ-Ｉ関連タンパク質であることを示している。

【実施例２４】

【０２６２】

ヒトＰＲＯ３５６をコードするｃＤＮＡクローンの単離

発現配列タグ（ＥＳＴ）ＤＮＡデータベース（LIFESEQ(登録商標)、Incyte Pharmaceuticals、Palo Alto, CA）を検索し、ＴＩＥリガンドファミリーと相同性を示すＥＳＴ（#2939340）を同定した。ＰＲＯ３５６をクローン化するために、Clontech, Inc., (Palo Alto, CA)から購入したｍＲＮＡ、カタログ番号#6528-1から調製したヒト胎児肺ライブラリを、製造者の指示に従って使用した。

ＰＲＯ３５６をコードするｃＤＮＡクローンを単離するために用いたｃＤＮＡライブラリは、Invitrogen, San Diego, CA からのもの等の市販試薬を用いて標準的方法によって形成した。ｃＤＮＡは、ＮｏｔＩ部位を含むオリゴｄＴでプライムし、ＳａｌＩへミキナーゼアダプターの平滑末端で結合させ、ＮｏｔＩで切断し、ゲル電気泳動で適当にサイズ分割をし、定まった方向で適当なクローニングベクター（ｐＲＫＢ又はｐＲＫＤ等；ｐＲＫ５Ｂは、ＳｆｉＩ部位を持たないｐＲＫ５Ｄの前駆体である；Holmes等, Science, 253:1278-1280 (1991)を参照されたい）に独特のＸｈｏｌ及びＮｏｔＩ部位においてクローン化した。

上述のＥＳＴ配列に基づいて、１）ＰＣＲにより対象とする配列を含むｃＤＮＡライブラリを同定するため、及び２）ＰＲＯ３５６の全長コード化配列のクローンを単離するプローブとして使用するために、オリゴヌクレオチドを合成した。正方向及び逆方向ＰＣＲプライマーは一般的に２０から３０ヌクレオチドの範囲であり、しばしば約１００－１０００ｂｐ長のＰＣＲ産物を与えるように設計される。プローブ配列は典型的には４０－５５ｂｐ長である。全長クローンについて幾つかのライブラリをスクリーニングするために、ライブラリからのＤＮＡを上掲のAusubel等, Current Protocols in Molecular Biologyに従って、ＰＣＲプライマー対でのＰＣＲ増幅によりスクリーニングした。次いでポジティブライブラリを、プローブオリゴヌクレオチド及びプライマー対の一方を用いた興味

ある遺伝子をコードするクローンの単離に使用した。
用いたオリゴヌクレオチド配列は以下の通り：
5'-TTCAGCACCAAGGACAAGGACAATGACAACT-3'（配列番号：１１３）
5'-TGTGCACACTTGTCCAAGCAGTTGTCATTGTC-3'（配列番号：１１４）
5'-GTAGTACACTCCATTGAGGTTGG-3'（配列番号：１１５）
ｃＤＮＡクローンが同定され、全体が配列決定された。ＤＮＡ４７４７０－１１３０－Ｐ１の全ヌクレオチド配列を図４１（配列番号：１１１）に示す。クローンＤＮＡ４７４７０－１１３０－Ｐ１は単一のオープンリーディングフレームを含み、ヌクレオチド位置２１５－２１７に見かけの翻訳開始部位、そしてヌクレオチド位置１２５３－１２５５に停止コドンを持つ（図４１、配列番号：１１１）。予測されるポリペプチド前駆体は３４６アミノ酸長である。全長ＰＲＯ３５６反を図４２（配列番号：１１２）に示す。
【０２６３】
図４２（配列番号：１１２）に示した全長ＰＲＯ３５６配列の分析により、図４２に示すような種々の重要なポリペプチドドメインの存在が明らかになり、それらの重要なポリペプチドドメインに与えられた位置は、およそ上記の通りである。全長ＰＲＯ３５６配列（図４２；配列番号：１１２）の分析により、以下の存在が明らかになった：約アミノ酸１～約アミノ酸２６のシグナルペプチド；約アミノ酸５８～約アミノ酸６２、約アミノ酸２５３～約アミノ酸２５７、約アミノ酸２６７～約アミノ酸２７１のＮ-グリコシル化部位；約アミノ酸１６７～約アミノ酸１７１のグリコサミノグリカン接着部位；約アミノ酸１７６～約アミノ酸１８０のｃＡＭＰ-及びｃＧＭＰ-依存性プロテインキナーゼリン酸化部位；約アミノ酸１６８～約アミノ酸１７４、約アミノ酸１９６～約アミノ酸２０２、約アミノ酸２４１～約アミノ酸２４７、約アミノ酸２５２～約アミノ酸２５８、約アミノ酸２５６～約アミノ酸２６２及び約アミノ酸３２７～約アミノ酸３３３のN-ミリストイル化部位；約アミノ酸１９９～約アミノ酸２０２の細胞接着部位。
クローンＤＮＡ４７４７０－１１３０－Ｐ１は１９９７年１０月２８日にＡＴＣＣに寄託され、ＡＴＣＣ寄託番号２０９４２２が付与された。寄託されたクローンは、ここに提供する表示ではなく実際の正しい配列を有すると理解される。
図４２（配列番号：１１２）に示した全長配列のALIGN-2配列アラインメント分析法を用いたDayhoffデータベース（ﾊﾞｰｼﾞｮﾝ35.45 SwissProt 35）の分析により、ＰＲＯ３５６アミノ酸配列とＴＩＥ-２Ｌ１（３２％）及びＴＩＥ-２Ｌ２（３４％）の両方との間のアミノ酸配列同一性が示された。「ＴＩＥ」という略語は、「チロシンキナーゼ含有Ｉｇ及びＥＧＦ相同ドメイン(tyrosine kinase containing Ig and EGF homology domains)」の頭文字を表し、レセプターチロシンキナーゼ類の新たなファミリーを指すのに作られた。
【実施例２５】
【０２６４】
ヒトＰＲＯ３６４をコードするｃＤＮＡクローンの単離
発現配列タグ（ＥＳＴ）ＤＮＡデータベース（LIFESEQ(登録商標)、Incyte Pharmaceuticals、Palo Alto, CA）を検索し、腫瘍壊死因子レセプター（ＴＮＦＲ）ファミリーのポリペプチドのメンバーと相同性を示すポリペプチドをコードしたＥＳＴ（Incyte EST no. 3003460）を同定した。
BLAST（Altschul等, Methods in Enzymology 266: 460-480 (1996)）及び「phrap」（Phil Green, University of Washington, Seattle, Washington）の繰り返しサイクルを用いてIncyte EST no. 3003460及び他のＥＳＴ配列に対してコンセンサスＤＮＡ配列を構築した。コンセンサス配列を、ここで「<concen01>」と命名し、またここでＤＮＡ４４８２５とも呼ぶ。ＤＮＡ４４８２５及び「<concen01>」コンセンサス配列に基づいて、１）ＰＣＲにより対象とする配列を含むｃＤＮＡライブラリを同定するため、及び２）ＰＲＯ３６４の全長コード化配列のクローンを単離するプローブとして使用するために、オリゴヌクレオチドプローブを合成した。正方向及び逆方向ＰＣＲプライマーは一般的に２０から３０ヌクレオチドの範囲であり、しばしば約１００－１０００ｂｐ長のＰＣＲ産物を与え

るように設計される。プローブ配列は典型的には４０－５５ｂｐ長である。全長クローンについて幾つかのライブラリをスクリーニングするために、ライブラリからのＤＮＡを上掲のAusubel等, Current Protocols in Molecular Biologyに従って、ＰＣＲプライマー対でのＰＣＲ増幅によりスクリーニングした。次いでポジティブライブラリを、プローブオリゴヌクレオチド及びプライマー対の一方を用いた興味ある遺伝子をコードするクローンの単離に使用した。

用いたオリゴヌクレオチド配列は以下の通り：

正方向ＰＣＲプライマー（４４８２５.ｆ１）：
5'-CACAGCACGGGGCGATGGG-3'（配列番号：１１８）
正方向ＰＣＲプライマー（４４８２５.ｆ２）：
5'-GCTCTGCGTTCTGCTCTG-3'（配列番号：１１９）
正方向ＰＣＲプライマー（４４８２５.ＧＩＴＲ.ｆ）：
5'-GGCACAGCACGGGGCGATGGGCGCGTTT-3'（配列番号：１２０）
逆方向ＰＣＲプライマー（４４８２５.ｒ１）：
5'-CTGGTCACTGCCACCTTCCTGCAC-3'（配列番号：１２１）
逆方向ＰＣＲプライマー（４４８２５.ｒ２）：
5'-CGCTGACCCAGGCTGAG-3'（配列番号：１２２）
正方向ＰＣＲプライマー（４４８２５.ＧＩＴＲ.ｒ）：
5'-GAAGGTCCCCGAGGCACAGTCGATACA-3'（配列番号：１２３）

さらに、ＤＮＡ４４８２５コンセンサス配列から合成オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションプローブを作成し、それは以下のヌクレオチド配列を有していた：

ハイブリダイゼーションプローブ（４４８２５.ｐ１）：
5'-GAGGAGTGCTGTTCCGAGTGGGACTGCATGTGTGTCCAGC-3'（配列番号：１２４）
ハイブリダイゼーションプローブ（４４８２５.ＧＩＴＲ.ｐ）：
5'-AGCCTGGGTCAGCGCCCCACCGGGGGTCCCGGGTGCGGCC-3'（配列番号：１２５）

全長クローンの供給源について幾つかのライブラリをスクリーニングするために、ライブラリからのＤＮＡを上で同定したＰＣＲプライマー対でＰＣＲ増幅した。次いで、ポジティブライブラリを、プローブオリゴヌクレオチド及びＰＣＲプライマー対の一方を用いてＰＲＯ３６４遺伝子をコードするクローンを単離するのに使用した。

【０２６５】

ｃＤＮＡライブラリの構築のためのＲＮＡはヒト小腸組織（LIB231）から単離した。ｃＤＮＡクローンを単離するために用いたｃＤＮＡライブラリーは、Invitrogen, San Diego, CA からのもの等の市販試薬を用いて標準的方法によって形成した。ｃＤＮＡは、ＮｏｔＩ部位を含むオリゴｄＴでプライムし、ＳａｌＩヘミキナーゼアダプターの平滑末端で結合させ、ＮｏｔＩで切断し、ゲル電気泳動で適当にサイズ分割をし、定まった方向で適当なクローニングベクター（ｐＲＫＢ又はｐＲＫＤ等；ｐＲＫ５Ｄは、ＳｆｉＩ部位を持たないｐＲＫ５Ｄの前駆体である；Holmes等, Science, 253:1278-1280 (1991)を参照されたい）に独特のＸｈｏｌ及びＮｏｔＩ部位においてクローン化した。

上記のように単離したクローンのＤＮＡ配列決定により、ＰＲＯ３６４の全長ＤＮＡ配列が与えられた［ここで、ＤＮＡ４７３６５－１２０６と命名する］。ＤＮＡ４７３６５－１２０６の全ヌクレオチド配列を図４３（配列番号：１１６）に示す。クローンＤＮＡ４７３６５－１２０６は単一のオープンリーディングフレームを含み、ヌクレオチド位置１２１－１２３に見かけの翻訳開始部位、そしてヌクレオチド位置８４４－８４６に停止コドンを持つ（図４３；配列番号：１１６）。予測されるポリペプチド前駆体は２４１アミノ酸長であり、約２６,０００ダルトンの算定分子量及び約６．３４の見積もりｐＩを持つ。全長ＰＲＯ３６４タンパク質を図４４（配列番号：１１７）に示す。

図４４（配列番号：１１７）に示した全長ＰＲＯ３６４配列の分析により、図４４に示すような種々の重要なポリペプチドドメインの存在が明らかになり、それらの重要なポリペプチドドメインに与えられた位置は、およそ上記の通りである。全長ＰＲＯ３６４配列（図４４；配列番号：１１７）の分析により、以下の存在が明らかになった：約アミノ酸

１～約アミノ酸２５のシグナルペプチド；約アミノ酸１６３～アミノ酸１８３の膜貫通ドメイン；約アミノ酸１４６～約アミノ酸１５０のＮ-グリコシル化部位；約アミノ酸５～約アミノ酸１１、約アミノ酸８～約アミノ酸１４、約アミノ酸２５～約アミノ酸３１、約アミノ酸３０～約アミノ酸３６、約アミノ酸３３～約アミノ酸３９、約アミノ酸１１８～約アミノ酸１２４、約アミノ酸１２２～約アミノ酸１２８、約アミノ酸１５６～約アミノ酸１６２のＮ-ミリストイル化部位；約アミノ酸１６６～約アミノ酸１７７の原核生物膜タンパク脂質結合部位；及び約アミノ酸１７１～約アミノ酸１９３のロイシンジッパーパターン。クローンＤＮＡ４７３６５－１２０６は１９９７年１１月７日にＡＴＣＣに寄託され、ＡＴＣＣ寄託番号２０９４３６が付与された。

図４４（配列番号：１１７）に示す全長ＰＲＯ３６４配列の分析は、その一部が腫瘍壊死因子レセプターファミリーのメンバーと有意な相同性を有することを示唆し、よってＰＲＯ３６４が腫瘍壊死因子レセプターファミリーの新規なメンバーであることを示している。

全長ＰＲＯ３６４ポリペプチドのアミノ酸配列及び当該アミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列の詳細な検査により、Nocenti等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94: 6216-6221 (1997)に報告されたマウスＧＩＴＲタンパク質との配列相同性が明らかになった。従って、ＰＲＯ３６４はNocentini等に報告されたマウスＧＩＴＲタンパク質のヒト対応物を代表する。

【実施例２６】

【０２６６】

ヒトＰＲＯ５２６をコードするｃＤＮＡクローンの単離

実施例１に記載したように、phrapを用いて他のＥＳＴ配列に対してコンセンサスＤＮＡ配列を構築した。最初のコンセンサスＤＮＡ配列を同定し、ここでＤＮＡ３９６２６.initと命名した。最初のコンセンサス配列をBLAST及びphrapの繰り返しサイクルを用いて延長させ、最初のコンセンサス配列を上述のＥＳＴ配列の供給源を用いて可能な限り延長させた。延長した構築配列をここで<comsen01>と命名する。構築した<concen01>ＤＮＡコンセンサス配列に基づいて、１）ＰＣＲにより対象とする配列を含むｃＤＮＡライブラリを同定するため、及び２）ＰＲＯ３６４の全長コード化配列のクローンを単離するプローブとして使用するために、オリゴヌクレオチドを合成した。

ＰＣＲプライマー（正方向及び逆方向）の対を合成した：

正方向ＰＣＲプライマー：

5'-TGGCTGCCCTGCAGTACCTCTACC-3'（配列番号：１２８）

逆方向ＰＣＲプライマー：

5'-CCCTGCAGGTCATTGGCAGCTAGG-3'（配列番号：１２９）

さらに、ＤＮＡコンセンサス配列から合成オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションプローブを作成し、それは以下のヌクレオチド配列を有していた：

ハイブリダイゼーションプローブ：

5'-AGGCACTGCCTGATGACACCTTCCGCGACCTGGGCAACCTCACAC-3'（配列番号：１３０）

【０２６７】

全長クローンの供給源について幾つかのライブラリをスクリーニングするために、ライブラリからのＤＮＡを上で同定したＰＣＲプライマー対でＰＣＲ増幅した。次いで、ポジティブライブラリを、プローブオリゴヌクレオチド及びＰＣＲプライマー対の一方を用いてＰＲＯ５２６遺伝子をコードするクローンを単離するのに使用した。ｃＤＮＡライブラリの構築のためのＲＮＡはヒト胎児肝臓組織（LIB228）から単離した。

上記のように単離したクローンのＤＮＡ配列決定により、ＤＮＡ４４１８４－１３１９[図４５、配列番号：１２６]の全長ＤＮＡ配列；及びＰＲＯ５２６の誘導タンパク質配列が得られた。

ＤＮＡ４４１８４－１３１９の全コード化配列が図４５（配列番号：１２６）に含まれる。クローンＤＮＡ４４１８４－１３１９は単一のオープンリーディングフレームを含み、ヌクレオチド位置５１４－５１６に見かけの翻訳開始部位、そしてヌクレオチド位置１

９３３－１９３５に見かけの停止コドンを持つ。予測されるポリペプチド前駆体は４７３アミノ酸長であり、約５０,７０８ダルトンの算定分子量及び約９．２８の見積もりｐＩを持つ。図４６（配列番号：１２７）に示した全長ＰＲＯ５２６配列の分析により、種々の重要なポリペプチドドメインの存在が明らかになり、それらの重要なポリペプチドドメインに与えられた位置は、およそ上記の通りである。図４６に示した全長ＰＲＯ５２６ポリペプチドの分析により、以下の存在が明らかになった：約アミノ酸１～約アミノ酸２６のシグナルペプチド；約アミノ酸１３５～アミノ酸１５７のロイシンジッパーパターン；約アミノ酸４３６～約アミノ酸４４０のグリコサミノグリカン接着部位；約アミノ酸８２～約アミノ酸８６、約アミノ酸１７９～約アミノ酸１８３、約アミノ酸２３７～約アミノ酸２４１、約アミノ酸３７２～約アミノ酸３７６、約アミノ酸４２３～約アミノ酸４２７のＮ-グリコシル化部位；約アミノ酸４１１～約アミノ酸４２７のフォン・ウィルブランド因子C型ドメイン。クローンＤＮＡ４４１８４－１３１９は１９９８年4月２６日にＡＴＣＣに寄託され、ＡＴＣＣ寄託番号２０９７０４が付与された。

図４６（配列番号：１２７）に示す全長ＰＲＯ５２６配列のアミノ酸配列分析は、その一部が、ＡＬＳ、ＳＬＩＴ、カルボキシペプチダーゼ及び血小板糖タンパク質Ｖを含むロイシンリピートリッチタンパク質と有意な相同性を有することを示唆し、よってＰＲＯ５２６がタンパク質-タンパク質相互作用に含まれる新規なタンパク質であることを示している。

【実施例２７】

【０２６８】

ヒトＰＲＯ５３８をコードするｃＤＮＡクローンの単離

発現配列タグ（ＥＳＴ）ＤＮＡデータベース（LIFESEQ(登録商標)、Incyte Pharmaceuticals、Palo Alto, CA）を検索し、マウスＧＦＲα３（「グリア細胞系誘導神経栄養性因子ファミリーレセプターアルファア」）と６１％の同一性を有するIncyte ＥＳＴ（INC3574209）を同定した。ＰＲＯ５３８の対応する全長ｃＤＮＡをクローニングするためにｃＤＮＡのパネルを以下のプライマーでスクリーニングした：

ｎｅｗａ３.Ｆ：

5'-GCCTCTCGCAGCCGGAGACC-3'（配列番号：１３３）

ｎｅｗａ３.Ｒ：

5'-CAGGTGGGATCAGCCTGGCAC-3'（配列番号：１３４）

ライブラリからのＤＮＡを、Ausubel等, Current Protocols in Molecular Biology (1995)に従って、ＰＣＲプライマー対でのＰＣＲ増幅によりスクリーニングした。強いＰＣＲ産物が分析した全てのライブラリで同定された（胎児肺、胎児腎臓、及び胎盤）。

このタンパク質をコードするｃＤＮＡクローンを単離するために、ヒト胎児肺-ｐＲＫ５ベクターを選択し、ｎｅｗａ３.Ｒプライマーを用いたダグ／バング（dug-/bung-）宿主で増殖させたプラスミドライブラリからの一本鎖ＤＮＡの延長によりポジティブｃＤＮＡクローンについて濃縮した。ｃＤＮＡライブラリの構築のためのＲＮＡはヒト胎児肺組織から単離した。

【０２６９】

ＰＲＯ５３８をコードするｃＤＮＡクローンを単離するために用いたｃＤＮＡライブラリーは、Invitrogen, San Diego, CA からのもの等の市販試薬を用いて標準的方法によって形成した。ｃＤＮＡは、ＮｏｔＩ部位を含むオリゴｄＴでプライムし、ＳａｌＩヘミキナーゼアダプターの平滑末端で結合させ、ＮｏｔＩで切断し、ゲル電気泳動で適当にサイズ分割をし、定まった方向で適当なクローニングベクター（ｐＲＫＢ又はｐＲＫＤ等；ｐＲＫ５Ｂは、ＳｆｉＩ部位を持たないｐＲＫ５Ｄの前駆体である；Holmes等, Science, 253:1278-1280 (1991)を参照）に独特のＸｈｏｌ及びＮｏｔＩ部位においてクローン化した。ポジティブｃＤＮＡクローンを濃縮するために、プライマー延長反応は、加熱開始した後に添加した10μｌの10xＰＣＲバッファ（Perkin Elmer）、1μｌのｄＮＴＰ（20mM）、1μｌのライブラリＤＮＡ（200ng）、1μｌのプライマー、86.5μｌのH_2O及び1μｌのAmplitaq(Perkin Elmer, USA）を含む。反応は９５℃で１分間変性させ、６０℃で１分間アニ

ールし、次いで７２℃で２０分間伸展させた。ＤＮＡをフェノール／クロロホルムで抽出し、エタノールで沈殿させ、次いでエレクトロポレーションによりＤＨ１０Ｂ宿主細菌に移行させた。全形質転換混合物の１０プレートに蒔いてコロニーを形成させた。コロニーをナイロン膜上に載せ、IncyteＥＳＴから誘導されたオリゴプローブでスクリーニングした：

ｎｅｗａ３.プローブ：

5'-TCTCGCAGCCGGAGACCCCCTTCCCACAGAAAGCCGACTCA-3'（配列番号：１３５）

５つのポジティブクローンが同定された。コロニー精製及び２回目のスクリーニングの後に純粋なポジティブクローンが得られた。単離したクローンのうち２つを配列決定し、ここでＤＮＡ４８６１３及びＤＮＡ４８６１４（又はＤＮＡ４８６１３のスプライシング形態）と命名する。

【０２７０】

ＤＮＡ４８６１３－１２６８の全ヌクレオチド配列を図４７（配列番号：１３１）に示す。クローンＤＮＡ４８６１３－１２６８は単一のオープンリーディングフレームを含み、ヌクレオチド位置３８－４０に見かけの翻訳開始部位、そしてヌクレオチド位置１２３８－１２４０に停止コドンを持つ（図４７；配列番号：１３１）。予測されるポリペプチド前駆体は４００アミノ酸長であり、約４４,５１１ダルトンの算定分子量及び約８．１５の見積もりｐＩを持つ。全長ＰＲＯ５３８タンパク質を図４８（配列番号：１３２）に示す。

図４８（配列番号：１３２）に示した全長ＰＲＯ５３８配列の分析により、図４８に示すような種々の重要なポリペプチドドメインの存在が明らかになり、それらの重要なポリペプチドドメインに与えられた位置は、およそ上記の通りである。全長ＰＲＯ５３８配列（図４８；配列番号：１３２）の分析により、以下の存在が明らかになった：約アミノ酸１～約アミノ酸２６のシグナルペプチド；約アミノ酸９５～アミノ酸９９、約アミノ酸１４８～約アミノ酸１５２、約アミノ酸３０９～アミノ酸３１３のN-グリコシル化部位；約アミノ酸２３１～約アミノ酸２３５のｃＡＭＰ及びｃＧＭＰ依存性プロテインキナーゼリン酸化部位；約アミノ酸２７９～約アミノ酸２８５、約アミノ酸２９４～約アミノ酸３００のN-ミリストイル化部位；及び約アミノ酸３０６～約アミノ酸３１７及び約アミノ酸３７９～約アミノ酸３９０の原核生物膜タンパク脂質結合部位。クローンＤＮＡ４８６１３－１２６８は１９９８年４月７日にＡＴＣＣに寄託され、ＡＴＣＣ寄託番号２０９７５２が付与された。

【０２７１】

以下に議論するように、ＤＮＡ４８６１３にコードされるタンパク質とＧＦＲα１及びＧＦＲα２との配列比較により、ヒトタンパク質ＰＲＯ５３８はＧＦＲαレセプターファミリーの新規なメンバーであり、マウスＧＦＲα３のヒト相同体であることが示された。従って、ＤＮＡ４８６１３－１２６８はヒトＧＦＲα３と称されるタンパク質をコードし、ＤＮＡ４８６１４はそのスプライシング変異体をコードする。

全長ＰＲＯ５３８ポリペプチド（図４８；配列番号：１３２に示す）のBLAST-2及びFastA配列アラインメント分析に基づくＧＦＲαファミリー間のアミノ酸配列比較を以下に提供する。

ＧＦＲαファミリーメンバー間の配列同一性

比較されるタンパク質			同一パーセント
rGFRα1	対	hGFRα1	92%
rGFRα2	対	hGFRα2	94%
mGFRα3	対	hGFRα3	77%
hGFRα3	対	hGFRα1	34%
hGFRα3	対	hGFRα2	34%
hGFRα1	対	hGFRα2	48%

配列比較から、ヒトＧＦＲα３は、ＧＦＲα１又はＧＦＲα２のいずれよりも、その齧歯類相同体との関係が少ないことがわかる。ＧＦＲα３は、ＧＦＲα１とＧＦＲα２相互間よりもＧＦＲα１及びＧＦＲα２に対して関係が薄いことがわかる。

【実施例２８】

【０２７２】

ヒトＰＲＯ７１３をコードするｃＤＮＡクローンの単離

発現配列タグ（ＥＳＴ）ＤＮＡデータベース（LIFESEQ(登録商標)、Incyte Pharmaceuticals、Palo Alto, CA）を検索し、ＶＥＧＦと相同性を示すポリペプチドをコードするＥＳＴ（Incyte EST no. 1302516）を同定した。Incyte EST no. 1302516の基づくプローブを、ヒト神経膠腫細胞系Ｇ６１から誘導されたｃＤＮＡライブラリのスクリーニングに使用した。特にINC1302516は以下の４つのプローブを作成するのに使用した：

5'-ACTTCTCAGTGTCCATAAGGG-3'（配列番号：１３８）

5'-GAACTAAAGAGAACCGATACCATTTTCTGGCCAGGTTGTC-3'（配列番号：１３９）

5'-CACCACAGCGTTTAACCAGG-3'（配列番号：１４０）

5'-ACAACAGGCACAGTTCCCAC-3'（配列番号：１４１）

９つのポジティブが同定され特徴づけられた。３つのクローンは全コード化領域を含み配列中に同定された。また、部分的クローンも胎児肺ライブラリから同定され、コード化アミノ酸は変化させない１つのヌクレオチド変化を除いて神経膠腫誘導配列と一致した。

【０２７３】

上記のように単離したクローンのＤＮＡ配列決定により、ＰＲＯ７１３の全長ＤＮＡ配列が与えられた［ここで、ＤＮＡ２９１０１－１１２２と命名する］。ＤＮＡ２９１０１－１１２２の全ヌクレオチド配列を図４９（配列番号：１３６）に示す。クローンＤＮＡ２９１０１－１１２２は単一のオープンリーディングフレームを含み、ヌクレオチド位置２８５－２８７に見かけの翻訳開始部位、そしてヌクレオチド位置１３２０－１３２２に停止コドンを持つ（図４９；配列番号：１３６）。予測されるポリペプチド前駆体は３４５アミノ酸長であり、約３９,０２９ダルトンの算定分子量及び約６．０６の見積もりｐＩを持つ。全長ＰＲＯ７１３タンパク質を図５０（配列番号：１３７）に示す。

図５０（配列番号：１３７）に示した全長ＰＲＯ７１３配列の分析により、図５０に示すような種々の重要なポリペプチドドメインの存在が明らかになり、それらの重要なポリペプチドドメインに与えられた位置は、およそ上記の通りである。全長ＰＲＯ７１３配列（図５０；配列番号：１３７）の分析により、以下の存在が明らかになった：約アミノ酸１～約アミノ酸１４のシグナルペプチド；約アミノ酸２５～アミノ酸２９、約アミノ酸５５～約アミノ酸５９、約アミノ酸２５４～約アミノ酸２５８のN-グリコシル化部位；約アミノ酸１５～約アミノ酸２１、約アミノ酸１１７～約アミノ酸１２３、約アミノ酸１２

７～約アミノ酸１３３、約アミノ酸２８１～約アミノ酸２８７、約アミノ酸２８２～約アミノ酸２８８、約アミノ酸３１９～約アミノ酸３２５のＮ-ミリストイル化部位；及び約アミノ酸２２９～約アミノ酸２３３のアミド化部位。クローンＤＮＡ２９１０１－１１２２は１９９８年3月5日にＡＴＣＣに寄託され、ＡＴＣＣ寄託番号２０９６５３が付与された。

図５０（配列番号：１３７）に示す全長ＰＲＯ７１３配列の分析は、それが新規なＶＥＧＦ関連タンパク質（ＶＥＧＦ-Ｅ）であることを示唆している。

【実施例２９】

【０２７４】

ヒトＰＲＯ７１９をコードするｃＤＮＡクローンの単離

実施例１に記載したように、phrapを用いて他のＥＳＴ配列に対してＥＧＦ様相同体をコードするコンセンサスＤＮＡ配列を構築した。このコンセンサス配列を、ここでＤＮＡ４４８５１と命名し、それはまた、IncyteＥＳＴクローン番号179903と完全に対応する。ＤＮＡ４４８５１コンセンサス配列に基づいて、１）ＰＣＲにより対象とする配列を含むｃＤＮＡライブラリを同定するため、及び２）ＰＲＯ７１９の全長コード化配列のクローンを単離するプローブとして使用するために、オリゴヌクレオチドを合成した。

ＰＣＲプライマー（正方向及び逆方向）の対を合成した：

正方向ＰＣＲプライマー（４４８５１.ｆ１）：

5'-GTGAGCATGAGCGAGCCGTCCAC-3'（配列番号：１４４）

逆方向ＰＣＲプライマー（４４８５１.ｒ１）：

5'-GCTATTACAACGGTTCTTGCGGCAGC-3'（配列番号：１４５）

さらに、ＤＮＡ４４８５１コンセンサス配列から合成オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションプローブを作成し、それは以下のヌクレオチド配列を有していた：

ハイブリダイゼーションプローブ（４４８５１.ｐ１）：

5'-TTGACTCTCTGGTGAATCAGGACAAGCCGAGTTTTGCCTTCCAG-3'（配列番号：１４６）

全長クローンの供給源について幾つかのライブラリをスクリーニングするために、ライブラリからのＤＮＡを上で同定したＰＣＲプライマー対でＰＣＲ増幅した。次いで、ポジティブライブラリを、プローブオリゴヌクレオチド及びＰＣＲプライマー対の一方を用いてＰＲＯ７１９遺伝子をコードするクローンを単離するのに使用した。ｃＤＮＡライブラリの構築のためのＲＮＡはヒト胎盤組織（LIB90）から単離した。

上記のように単離したクローンのＤＮＡ配列決定により、ＤＮＡ４９６４６－１３２７[図５１、配列番号：１４２]）の全長ＤＮＡ配列；及びＰＲＯ７１９の誘導タンパク質配列が得られた。

【０２７５】

ＤＮＡ４９６４６－１３２７の全コード化配列が図５１（配列番号：１４２）に含まれる。クローンＤＮＡ４９６４６－１３２７は単一のオープンリーディングフレームを含み、ヌクレオチド位置２２３－２２５に見かけの翻訳開始部位、そしてヌクレオチド位置１２８５－１２８７に見かけの停止コドンを持つ。予測されるポリペプチド前駆体は３５４アミノ酸長であり、約３９,３６２ダルトンの見積もり分子量及び約８．３５のｐＩを持つ。図５２（配列番号：１４３）に示した全長ＰＲＯ７１９配列の分析により、種々の重要なポリペプチドドメインの存在が明らかになり、それらの重要なポリペプチドドメインに与えられた位置は、およそ上記の通りである。図５２に示した全長ＰＲＯ７１９ポリペプチドの分析により、以下の存在が明らかになった：約アミノ酸１～約アミノ酸１６のシグナルペプチド；約アミノ酸８０～約アミノ酸８４及び約アミノ酸１３６～約アミノ酸１４０のＮ-グリコシル化部位；約アミノ酸２０６～約アミノ酸２１０及び約アミノ酸３２９～約アミノ酸３３３のｃＡＭＰ及びｃＧＭＰ依存性プロテインキナーゼリン酸化部位；約アミノ酸６３～約アミノ酸６９、約アミノ酸９６～約アミノ酸１０２、約アミノ酸１７１～約アミノ酸１７７、約アミノ酸１９１～約アミノ酸１９７、約アミノ酸２２７～約アミノ酸２３３、約アミノ酸２５１～約アミノ酸２５７、約アミノ酸３０６～約アミノ酸３１２、及び約アミノ酸３４６～約アミノ酸３５２のＮ-ミリストイル化部位；及び約アミ

ノ酸１６３～約アミノ酸１７３のリパーゼ、セリン活性部位。クローンＤＮＡ４９６４６－１３２７は１９９８年3月２６日にＡＴＣＣに寄託され、ＡＴＣＣ寄託番号２０９７０５が付与された。

全長ＰＲＯ７１９ポリペプチドのアミノ酸配列の分析により、それがリポタンパク質リパーゼHプロテインと有意な配列相同性を有することが示唆され、よってＰＲＯ７１９が新規なリポタンパク質リパーゼ相同体であることが示された。より詳細には、Dayhoffデータベース（ﾊﾞｰｼﾞｮﾝ35.45 Swiss Prot 35）の分析により、ＰＲＯ７１９アミノ酸配列と以下のDayhoff配列との間の有意な相同性が明らかになった：LIPL_HUMAN, LIPH_HUMAN, D83548_1, A24059_1, P_R30740, D88666_1, A43357, A46696, B43357及びA49488。

【実施例３０】

【０２７６】

ヒトＰＲＯ７７１をコードするｃＤＮＡクローンの単離

実施例１に記載したように、phrapを用いて他のＥＳＴ配列に対してコンセンサスＤＮＡ配列を構築した。このコンセンサス配列を、ここで<consen01>と命名する。<concen01>ＤＮＡコンセンサス配列に基づいて、１）ＰＣＲにより対象とする配列を含むｃＤＮＡライブラリを同定するため、及び２）ＰＲＯ７１３の全長コード化配列のクローンを単離するプローブとして使用するために、オリゴヌクレオチドを合成した。

ＰＣＲプライマー（正方向及び逆方向）の対を合成した：

正方向ＰＣＲプライマー：

5'-CAGCAATATTCAGAAGCGGCAAGGG-3'（配列番号：１４９）

逆方向ＰＣＲプライマー：

5'-CATCATGGTCATCACCACCATCATCATC-3'（配列番号：１５０）

さらに、<consen01>ＤＮＡコンセンサス配列から合成オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションプローブを作成し、それは以下のヌクレオチド配列を有していた：

ハイブリダイゼーションプローブ：

5'-GGTTACTACAAGCCAACACAATGTCATGGCAGTGTTGGACAGTGCTGG-3'（配列番号：１５１）

全長クローンの供給源について幾つかのライブラリをスクリーニングするために、ライブラリからのＤＮＡを上で同定したＰＣＲプライマー対でＰＣＲ増幅した。次いで、ポジティブライブラリを、プローブオリゴヌクレオチド及びＰＣＲプライマー対の一方を用いてＰＲＯ７７１遺伝子をコードするクローンを単離するのに使用した。ｃＤＮＡライブラリの構築のためのＲＮＡはヒト胎児腎臓組織（LIB28）から単離した。

【０２７７】

上記のように単離したクローンのＤＮＡ配列決定により、ＤＮＡ４９８２９－１３４６[図５３、配列番号：１４７]の全長ＤＮＡ配列；及びＰＲＯ７７１の誘導タンパク質配列が得られた。

ＤＮＡ４９８２９－１３４６の全コード化配列が図５３（配列番号：１４７）に含まれる。クローンＤＮＡ４９８２９－１３４６は単一のオープンリーディングフレームを含み、ヌクレオチド位置１３４－１３６に見かけの翻訳開始部位、そしてヌクレオチド位置１４４２－１４４４に見かけの停止コドンを持つ。予測されるポリペプチド前駆体は４３６アミノ酸長であり、約４９,４２９ダルトンの算定分子量及び約４．８０の見積もりｐＩを持つ。図５４（配列番号：１４８）に示した全長ＰＲＯ７７１配列の分析により、種々の重要なポリペプチドドメインの存在が明らかになり、それらの重要なポリペプチドドメインに与えられた位置は、およそ上記の通りである。図５４に示した全長ＰＲＯ７７１ポリペプチドの分析により、以下の存在が明らかになった：約アミノ酸１～約アミノ酸１６のシグナルペプチド；約アミノ酸１１５～アミノ酸１１９のｃＡＭＰ及びｃＧＭＰ依存性プロテインキナーゼリン酸化部位；約アミノ酸６２～約アミノ酸７０のチロシンキナーゼリン酸化部位；約アミノ酸３５７～約アミノ酸３６３、約アミノ酸３７１～約アミノ酸３７７、及び約アミノ酸３７６～約アミノ酸３８２のN-ミリストイル化部位；約アミノ酸２４６～約アミノ酸２６８のロイシンジッパーパターン。クローンＤＮＡ４９８２９－１

３４６は１９９８年４月７日にＡＴＣＣに寄託され、ＡＴＣＣ寄託番号２０９７４９が付与された。

全長ＰＲＯ７７１ポリペプチドのアミノ酸配列分析は、それがテスチカン(testican)タンパク質と有意な相同性を有することを示唆し、よってＰＲＯ７７１が新規なテスチカン相同体であることを示している。

【実施例３１】

【０２７８】

ヒトＰＲＯ７８８をコードするｃＤＮＡクローンの単離

実施例１に記載したように、phrapを用いて他のＥＳＴ配列に対してコンセンサスＤＮＡ配列を構築した。このコンセンサス配列を、ここで「<consen01>」と命名する。ここに提供するデータに基づいて、ＡＲＳ及びＥ４８抗原と相同性を示すIncyte EST 2777282を同定した。構築した「<consen01>」配列及びここに提供する他のデータに基づいて、Incyte EST 2777282を得て全体を配列決定し、ここでＤＮＡ５６４０５－１３５７（図５５、配列番号：１５２）と称されるＰＲＯ７８８の全長ＤＮＡ配列；及びＰＲＯ７８８の誘導タンパク質配列を得た。

ＤＮＡ５６４０５－１３５７の全コード化配列が図５５（配列番号：１５２）に含まれる。クローンＤＮＡ５６４０５－１３５７は単一のオープンリーディングフレームを含み、ヌクレオチド位置８４－８６に見かけの翻訳開始部位、そしてヌクレオチド位置４５９－４６１に見かけの停止コドンを持つ。予測されるポリペプチド前駆体は１２５アミノ酸長であり、約１３,１１５ダルトンの見積もり分子量及び約５．９０のｐＩを持つ。図５６（配列番号：１５３）に示した全長ＰＲＯ７８８配列の分析により、種々の重要なポリペプチドドメインの存在が明らかになり、それらの重要なポリペプチドドメインに与えられた位置は、およそ上記の通りである。図５６に示した全長ＰＲＯ７８８ポリペプチドの分析により、以下の存在が明らかになった：約アミノ酸１～約アミノ酸１７及び約アミノ酸４６～約アミノ酸５０のシグナルペプチド；約アミノ酸３～アミノ酸９、約アミノ酸３３～約アミノ酸３９、及び約アミノ酸８４～約アミノ酸９０のN-ミリストイル化部位；及び約アミノ酸６～約アミノ酸１７の原核生物膜リポタンパク脂質結合部位。クローンＤＮＡ５６４０５－１３５７は１９９８年5月６日にＡＴＣＣに寄託され、ＡＴＣＣ寄託番号２０９８４９が付与された。

【実施例３２】

【０２７９】

ヒトＰＲＯ７９２をコードするｃＤＮＡクローンの単離

実施例１に記載したように、phrapを用いて他のＥＳＴ配列に対してコンセンサスＤＮＡ配列を構築した。このコンセンサス配列を、ここでＤＮＡ３８１０６と命名し、それはまた、Incyte ESTクローン番号1988930に完全に対応している。ＤＮＡ３８１０６コンセンサス配列に基づいて、１）ＰＣＲにより対象とする配列を含むｃＤＮＡライブラリを同定するため、及び２）ＰＲＯ７９２の全長コード化配列のクローンを単離するプローブとして使用するために、オリゴヌクレオチドを合成した。

ＰＣＲプライマー（正方向及び逆方向）の対を合成した：

正方向ＰＣＲプライマー：

5'-GCGAGAACTGTGTCATGATGCTGC-3'（配列番号：１５６）

逆方向ＰＣＲプライマー：

5'-GTTTCTGAGACTCAGCAGCGGTGG-3'（配列番号：１５７）

さらに、３８１０６ＤＮＡコンセンサス配列から合成オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションプローブを作成し、それは以下のヌクレオチド配列を有していた：

ハイブリダイゼーションプローブ：

5'-CACCGTGTGACAGCGAGAAGGACGGCTGGATCTGTGAGAAAAGGCACAAC-3'（配列番号：１５８）

全長クローンの供給源について幾つかのライブラリをスクリーニングするために、ライブラリからのＤＮＡを上で同定したＰＣＲプライマー対でＰＣＲ増幅した。次いで、ポジティブライブラリを、プローブオリゴヌクレオチド及びＰＣＲプライマー対の一方を用い

てＰＲＯ７９２遺伝子をコードするクローンを単離するのに使用した。ｃＤＮＡライブラリの構築のためのＲＮＡはヒト骨髄組織（LIB255）から単離した。

上記のように単離したクローンのＤＮＡ配列決定により、ＤＮＡ５６３５２－１３５８[図５７、配列番号：１５４］の全長ＤＮＡ配列；及びＰＲＯ７９２の誘導タンパク質配列が得られた。

【０２８０】

ＤＮＡ５６３５２－１３５８の全コード化配列が図５７（配列番号：１５４）に含まれる。クローンＤＮＡ５６３５２－１３５８は単一のオープンリーディングフレームを含み、ヌクレオチド位置６７－６９に見かけの翻訳開始部位、そしてヌクレオチド位置９４６－９４８に見かけの停止コドンを持つ。予測されるポリペプチド前駆体は２９３アミノ酸長であり、約３２,５６２ダルトンの見積もり分子量及び約６．５３のｐＩを持つ。図５８（配列番号：１５５）に示した全長ＰＲＯ７９２配列の分析により、種々の重要なポリペプチドドメインの存在が明らかになり、それらの重要なポリペプチドドメインに与えられた位置は、およそ上記の通りである。図５８に示した全長ＰＲＯ７９２ポリペプチドの分析により、以下の存在が明らかになった：約アミノ酸１～約アミノ酸４６のシグナルペプチド；約アミノ酸３１～アミノ酸５４の可能なＩＩ型膜貫通ドメイン；約アミノ酸７３～約アミノ酸７７及び約アミノ酸１５９～約アミノ酸１６３のN-グリコシル化部位；約アミノ酸１８～約アミノ酸２４、約アミノ酸１３３～約アミノ酸１３９及び約アミノ酸２４２～約アミノ酸２４８のN-ミリストイル化部位；約アミノ酸２６４～約アミノ酸２８８のＣ型レクチンドメインシグネーチャー；及び約アミノ酸１０２～約アミノ酸１２４のロイシンジッパーパターン。クローンＤＮＡ５６３５２－１３５８は１９９８年5月6日にＡＴＣＣに寄託され、ＡＴＣＣ寄託番号２０９８４６が付与された。

全長ＰＲＯ７９２ポリペプチドのアミノ酸配列分析は、それがＣＤ２３タンパク質タンパク質と有意な配列類似性を有することを示唆し、よってＰＲＯ７９２が新規なＣＤ２３相同体であることを示している。より詳細には、Dayhoffデータベース（ﾊﾞｰｼﾞｮﾝ35.45 Swiss Prot 35）の分析により、ＰＲＯ７９２アミノ酸配列と以下のDayhoff配列との間の有意な相同性が明らかになった：S34198, A07100-1, A05303_1, P_R41689, P_P82839, A10871_1, P_R12796, P_R47199, A46274及びP_R32188。

【実施例３３】

【０２８１】

ヒトＰＲＯ８１２をコードするｃＤＮＡクローンの単離

上記の実施例3に記載した企業のシグナル配列発見アルゴリズムを適用してＤＮＡ５９２０５－１４２１を同定した。上述のシグナル配列アルゴリズムの使用により、IncyteＥＳＴクラスター番号170079と命名されるLIFESEQ(商品名)からのＥＳＴクラスター配列の同定が可能となった。次いでこのＥＳＴクラスター配列を、公的データベース（例えば、GenBank）及び企業のＥＳＴ ＤＮＡデータベース（LIFESEQ(商品名)、Incyte Pharmaceuticals、Palo Alto, CA）を含む種々の発現配列タグ（ＥＳＴ）データベースと比較して、存在する相同性を同定した。相同体検索は、コンピュータプログラムBLAST又はBLAST2（Altschul等, Methods in Enzymology 266: 460-480 (1996)）を用いて実施した。既知のタンパク質をコードせず、BLASTスコア７０（９０の場合もある）又はそれ以上を持つ比較物は、プログラム「phrap」（Phil Green, University of Washington, Seattle, Washington）で集団化してコンセンサスＤＮＡ配列を構築した。そこから得られたコンセンサス配列を、ここでＤＮＡ５５７２１と命名する。

ＤＮＡ５５７２１配列とIncyteＥＳＴ番号388964との間の配列相同性に鑑みて、IncyteＥＳＴ番号388964を購入し、ｃＤＮＡ挿入物を得て配列決定した。このｃＤＮＡ挿入物の配列を図５９（配列番号：１５９）に示し、ここでＤＮＡ５９２０５－１４２１と命名する。

【０２８２】

ＤＮＡ５９２０５－１４２１の全コード化配列が図５９（配列番号：１５９）に含まれる。クローンＤＮＡ５９２０５－１４２１は単一のオープンリーディングフレームを含み

、ヌクレオチド位置５５－５７に見かけの翻訳開始部位を持ち、そしてヌクレオチド位置３０４－３０６の停止コドンで終端する（図５９）。予測されるポリペプチド前駆体は８３アミノ酸長である（図６０；配列番号：１６０）。図６０に示す全長ＰＲＯ８１２タンパク質は、約９，２０１の見積もり分子量及び約９．３０のｐＩを有する。図６０（配列番号：１６０）に示した全長ＰＲＯ８１２配列の分析により、種々の重要なポリペプチドドメインの存在が明らかになり、それらの重要なポリペプチドドメインに与えられた位置は、およそ上記の通りである。図６０に示した全長ＰＲＯ８１２ポリペプチドの分析により、以下の存在が明らかになった：約アミノ酸１～約アミノ酸１５のシグナルペプチド；約アミノ酸７３～アミノ酸７７のｃＡＭＰ及びｃＧＭＡ依存性プロテインキナーゼリン酸化部位。クローンＤＮＡ５９２０５－１４２１は１９９８年６月２３日にＡＴＣＣに寄託され、ＡＴＣＣ寄託番号２０３００９が付与された。

図６０（配列番号：１６０）に示した全長配列のWU-BLAST-2配列アラインメント分析を用いたDayhoffデータベース（バージョン35.45 SwissProt 35）の分析により、ＰＲＯ８１２アミノ酸配列と以下のDayhoff配列との間の有意な相同性が明らかになった：P_W35802, P_W35803, PSCI_RAT, S68231, GEN13917, PSC2_RAT, CC10_HUMAN, UTER_RABIT, AF008595_1,及びA56413。

【実施例３４】

【０２８３】

ヒトＰＲＯ８６５をコードするｃＤＮＡクローンの単離

上記実施例２に記載したようなアミラーゼスクリーニングにおいて単離されたｃＤＮＡ配列を、ここでＤＮＡ３７６４２又はＤＮＡ３７６４２.initと命名する。ＤＮＡ３７６４２配列は、次いで、公的データベース（例えば、GenBank）及び企業のＥＳＴ ＤＮＡデータベース（LIFESEQ(商品名)、Incyte Pharmaceuticals、Palo Alto, CA）を含む種々の発現配列タグ（ＥＳＴ）データベースと比較し、それらの間の相同性を同定した。相同性検索は、コンピュータプログラムBLAST又はBLAST2（Altschul及びGish, Methods in Enzymology 266: 460-480 (1996)）を用いて実施した。公知のタンパク質をコードせず、BLASTスコア７０（９０の場合もある）又はそれ以上を持つ比較は、プログラム「phrap」（Phil Green, University of Washington, Seattle, Washington）で集団化してコンセンサスＤＮＡ配列を構築した。得られた構築物及びコンセンサス配列を、ここでＤＮＡ４８６１５と命名する。

ＤＮＡ４８６１５コンセンサス配列に基づいて、ＤＮＡ４８６１５分子の配列からオリゴヌクレオチドプローブを生成させ、上記実施例２のパラグラフ１に記載したように調製したヒト腎臓ライブラリ（LIB227）をスクリーニングするのに使用した。クローニングベクターはｐＲＫ５Ｂであり（ｐＲＫ５ＢはＳｆｉＩ部位を含まないｐＲＫ５Ｄの前駆体である；Holmes等, Science, 253: 1278-1280 (1991)参照）、ｃＤＮＡサイズカットは２８００ｂｐ未満であった。

ＰＣＲプライマー（正方向及び逆方向）を合成した：

正方向ＰＣＲプライマー（４８６１５.ｆ１）：

5'-AAGCTGCCGGAGCTGCAATG-3'（配列番号：１６３）

正方向ＰＣＲプライマー（４８６１５.ｆ２）：

5'-TTGCTTCTTAATCCTGAGCGC-3'（配列番号：１６４）

正方向ＰＣＲプライマー（４８６１５.ｆ３）：

5'-AAAGGAGGACTTTCGACTGC-3'（配列番号：１６５）

逆方向ＰＣＲプライマー（４８６１５.ｒ１）：

5'-AGAGATTCATCCACTGCTCCAAGTCG-3'（配列番号：１６６）

逆方向ＰＣＲプライマー（４８６１５.ｒ１）：

5'-TGTCCAGAAACAGGCACATATCAGC-3'（配列番号：１６７）

さらに、コンセンサスＤＮＡ４８６１５配列から合成オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションプローブを作成し、それは以下のヌクレオチド配列を有していた：

ハイブリダイゼーションプローブ（４８６１５.ｐ１）：

5'-AGACAGCGGCACAGAGGTGCTTCTGCCAGGTTAGTGGTTACTTGGATGAT-3'（配列番号：１６８）

【０２８４】

全長クローンの供給源について幾つかのライブラリをスクリーニングするために、ライブラリからのＤＮＡを上で同定したＰＣＲプライマー対でＰＣＲ増幅した。次いで、ポジティブライブラリを、プローブオリゴヌクレオチド及びＰＣＲプライマー対の一方を用いてＰＲＯ８６５遺伝子をコードするクローンを単離するのに使用した。

全長クローン［ＤＮＡ５３９７４－１４０１］が同定され、それは単一のオープンリーディングフレームを含み、ヌクレオチド位置１７３－１７５に見かけの翻訳開始部位、そしてヌクレオチド位置１５７７－１５７９に停止シグナルを持つ（図６１、配列番号：１６１）。予測されるポリペプチド前駆体は４６８アミノ酸長であり、約５４,３９３ダルトンの算定分子量及び約５．６３の見積もりｐＩを持つ。図６２（配列番号：１６２）に示した全長ＰＲＯ８６５配列の分析により、図６２に示すような種々の重要なポリペプチドドメインの存在が明らかになり、それらの重要なポリペプチドドメインに与えられた位置は、およそ上記の通りである。図６２に示した全長ＰＲＯ８６５ポリペプチドの分析により、以下の存在が明らかになった：約アミノ酸１～約アミノ酸２３のシグナルペプチド；約アミノ酸２８０～約アミノ酸２８４、約アミノ酸３８４～約アミノ酸３８８のＮ-グリコシル化部位；約アミノ酸９４～約アミノ酸９８のアミド化部位；約アミノ酸２０～約アミノ酸２４及び約アミノ酸２２３～約アミノ酸２２７のグリコサミノグリカン接着部位；約アミノ酸２１６～約アミノ酸２２３のアミノトランスフェラーゼクラス-Ｖピリドキサルリン酸部位；及び約アミノ酸３３８～約アミノ酸３４４のインターロイキン-７反部位。クローンＤＮＡ５３９７４－１４０１は１９９８年４月１４日にＡＴＣＣに寄託され、ＡＴＣＣ寄託番号２０９７７４が付与された。

全長ＰＲＯ８６５ポリペプチド（図６２；配列番号：１６２）のアミノ酸配列の分析は、それが公知のタンパク質と有意な類似性を持たないことを示唆している。しかし、Dayhoffデータベース（ﾊﾞｰｼﾞｮﾝ35.45 Swiss Prot 35）の分析により、ＰＲＯ８６５と以下のDayhoff配列との或る程度の相同性が明らかになった：YMNO_YEAST, ATFCA4_43, S44168, P_W14549及びRABTCRG4_1。

【実施例３５】

【０２８５】

ヒトＰＲＯ１０７５をコードするｃＤＮＡクローンの単離

実施例１に記載したように、phrapを用いて他のＥＳＴ配列に対してコンセンサスＤＮＡ配列を構築した。このコンセンサス配列を、ここでＤＮＡ３４３６３と命名した。コンセンサス構築には、ジェネンテクが独自に開発したＥＳＴを用いた。ジェネンテクＥＳＴは、ここでＤＮＡ１３０５９及びＤＮＡ１９４６３と命名する。ＤＮＡ３４３６３コンセンサス配列に基づいて、１）ＰＣＲにより対象とする配列を含むｃＤＮＡライブラリを同定するため、及び２）ＰＲＯ１０７５の全長コード化配列のクローンを単離するプローブとして使用するために、オリゴヌクレオチドを合成した。

ＰＣＲプライマー（正方向及び逆方向）の対を合成した：

正方向ＰＣＲプライマー（３４３６３.ｆ１）：

5'-TGAGAGGCCTCTCTGGAAGTTG-3'（配列番号：１７１）

正方向ＰＣＲプライマー（３４３６３.ｆ２）：

5'-GTCAGCGATCAGTGAAAGC-3'（配列番号：１７２）

正方向ＰＣＲプライマー（３４３６３.ｆ３）：

5'-CCAGAATGAAGTAGCTCGGC-3'（配列番号：１７３）

正方向ＰＣＲプライマー（３４３６３.ｆ４）：

5'-CCGACTCAAAATGCATTGTC-3'（配列番号：１７４）

正方向ＰＣＲプライマー（３４３６３.ｆ５）：

5'-CATTTGGCAGGAATTGTCC-3'（配列番号：１７５）

正方向ＰＣＲプライマー（３４３６３.ｆ６）：

5'-GGTGCTATAGGCCAAGGG-3'（配列番号：１７６）

逆方向ＰＣＲプライマー（３４３６３.ｒ１）：
5'-CTGTATCTCTGGGCTATGTCAGAG-3'（配列番号：１７７）
逆方向ＰＣＲプライマー（３４３６３.ｒ２）：
5'-CTACATATAATGGCACATGTCAGCC-3'（配列番号：１７８）
さらに、３４３６３ＤＮＡコンセンサス配列から合成オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションプローブを作成し、それは以下のヌクレオチド配列を有していた：
ハイブリダイゼーションプローブ（３４３６３.ｐ１）：
5'-CGTCTTCCTATCCTTACCCGACCTCAGATGCTCCCTTCTGCTCCTG-3'（配列番号：１７９）
【０２８６】
全長クローンの供給源について幾つかのライブラリをスクリーニングするために、ライブラリからのＤＮＡを上で同定したＰＣＲプライマー対でＰＣＲ増幅した。次いで、ポジティブライブラリを、プローブオリゴヌクレオチド及びＰＣＲプライマー対の一方を用いてＰＲＯ１０７５遺伝子をコードするクローンを単離するのに使用した。ｃＤＮＡライブラリの構築のためのＲＮＡはヒト皮膚腫瘍組織（LIB324）から単離した。
上記のように単離したクローンのＤＮＡ配列決定により、ＤＮＡ５７６８９－１３８５[図６３、配列番号：１６９］の全長ＤＮＡ配列；及びＰＲＯ１０７５の誘導タンパク質配列が得られた。
ＤＮＡ５７６８９－１３８５の全コード化配列が図６３（配列番号：１６９）に含まれる。クローンＤＮＡ５７６８９－１３８５は単一のオープンリーディングフレームを含み、ヌクレオチド位置１３７－１３９に見かけの翻訳開始部位、そしてヌクレオチド位置１３５５－１３５７に見かけの停止コドンを持つ。予測されるポリペプチド前駆体は４０６アミノ酸長であり、約４６,９２７ダルトンの見積もり分子量及び約５．２１のｐＩを持つ。図６４（配列番号：１７０）に示した全長ＰＲＯ１０７５配列の分析により、種々の重要なポリペプチドドメインの存在が明らかになり、それらの重要なポリペプチドドメインに与えられた位置は、およそ上記の通りである。図６４に示した全長ＰＲＯ１０７５ポリペプチドの分析により、以下の存在が明らかになった：約アミノ酸１～約アミノ酸２９のシグナルペプチド；約アミノ酸２０３～アミノ酸２１２のチロシンキナーゼリン酸化部位；約アミノ酸２２５～約アミノ酸２３１のN-グリコシル化部位；約アミノ酸４０３～約アミノ酸４０８の小胞体標的化配列。クローンＤＮＡ５７６８９－１３８５は１９９８年５月１４日にＡＴＣＣに寄託され、ＡＴＣＣ寄託番号２０９８６９が付与された。
全長ＰＲＯ１０７５ポリペプチドのアミノ酸配列分析は、それがプロテインジスルフィドイソメラーゼと有意な配列類似性を有することを示唆し、よってＰＲＯ１０７５が新規なプロテインジスルフィドイソメラーゼであることを示している。より詳細には、Dayhoffデータベース（ﾊﾞｰｼﾞｮﾝ35.45 Swiss Prot 35）の分析により、ＰＲＯ１０７５アミノ酸配列と以下のDayhoff配列との間の有意な相同性が明らかになった：CELC30H7_2, CELC06A6_3, CELF42G8_3, S57942, ER72_CAEEL, CELC07A12_3, CEH06001_4及びP_R51696。
【実施例３６】
【０２８７】
ヒトＰＲＯ１１２６をコードするｃＤＮＡクローンの単離
上記の実施例３に記載した企業のシグナル配列発見アルゴリズムを適用してＤＮＡ６０６１５－１４８３を同定した。上述のシグナル配列アルゴリズムの使用により、IncyteＥＳＴクラスター番号121249と命名されるLIFESEQ(商品名)からのＥＳＴクラスター配列の同定が可能となった。次いでこのＥＳＴクラスター配列を、公的データベース（例えば、GenBank）及び企業のＥＳＴ ＤＮＡデータベース（LIFESEQ(商品名)、Incyte Pharmaceuticals、Palo Alto, CA）を含む種々の発現配列タグ（ＥＳＴ）データベースと比較して、存在する相同性を同定した。相同体検索は、コンピュータプログラムBLAST又はBLAST2（Altschul等, Methods in Enzymology 266: 460-480 (1996)）を用いて実施した。既知のタンパク質をコードせず、BLASTスコア７０（９０の場合もある）又はそれ以上を持つ比較物は、プログラム「phrap」（Phil Green, University of Washington, Seattle, Washington）で集団化してコンセンサスＤＮＡ配列を構築した。そこから得られたコンセンサス

配列を、ここでＤＮＡ５６２５０と命名する。
ＤＮＡ５６２５０配列IncyteＥＳＴクローン番号1437250との間の配列相同性に鑑みて、IncyteＥＳＴ番号1437250を購入し、ｃＤＮＡ挿入物を得て配列決定した。このｃＤＮＡ挿入物の配列を図６５（配列番号：１８０）に示し、ここでＤＮＡ６０６１５－１４８３と命名する。
【０２８８】
ＤＮＡ６０６１５－１４８３の全コード化配列が図６５（配列番号：１８０）に含まれる。クローンＤＮＡ６０６１５－１４８３は単一のオープンリーディングフレームを含み、ヌクレオチド位置１１０－１１２に見かけの翻訳開始部位を持ち、そしてヌクレオチド位置１３１６－１３１８の停止コドンで終端する（図６５）。予測されるポリペプチド前駆体は４０２アミノ酸長である（図６６；配列番号：１８１）。図６６に示す全長ＰＲＯ１１２６タンパク質は、約４５，９２１の見積もり分子量及び約８．６０のｐＩを有する。図６６（配列番号：１８１）に示した全長ＰＲＯ１１２６配列の分析により、種々の重要なポリペプチドドメインの存在が明らかになり、それらの重要なポリペプチドドメインに与えられた位置は、およそ上記の通りである。図６６に示した全長ＰＲＯ１１２６ポリペプチドの分析により、以下の存在が明らかになった：約アミノ酸１～約アミノ酸２５のシグナルペプチド；約アミノ酸６６～アミノ酸７０、約アミノ酸１３８～約アミノ酸１４２及び約アミノ酸１８３～約アミノ酸１８７のN-グリコシル化部位。クローンＤＮＡ６０６１５－１４８３は１９９８年6月１６日にＡＴＣＣに寄託され、ＡＴＣＣ寄託番号２０９９８０が付与された。
図６６（配列番号：１８１）に示した全長配列のWU-BLAST-2配列アラインメント分析を用いたDayhoffデータベース（バージョン35.45 SwissProt 35）の分析により、ＰＲＯ１１２６アミノ酸配列と以下のDayhoff配列との間の有意な相同性が明らかになった：NOMR_HUMAN, MMUSMYOC3_1, HS454G6_1, P_R98225, RNU78105_1, RNU72487_1, AF035301_1, CEELC48E7_4及びCEF11C3_3。
【実施例３７】
【０２８９】
ヒトＰＲＯ１１３０をコードするｃＤＮＡクローンの単離
実施例１に記載したように、phrapを用いて他のＥＳＴ配列に対してコンセンサスＤＮＡ配列を構築した。このコンセンサス配列を、ここでＤＮＡ３４３６０と命名する。ＤＮＡ３４３６０コンセンサス配列に基づいて、１）ＰＣＲにより対象とする配列を含むｃＤＮＡライブラリを同定するため、及び２）ＰＲＯ１１３０の全長コード化配列のクローンを単離するプローブとして使用するために、オリゴヌクレオチドを合成した。
ＰＣＲプライマー（正方向及び逆方向）の対を合成した：
正方向ＰＣＲプライマー（３４３６０．ｆ１）：
5'-GCCATAGTCACGACATGGATG-3'（配列番号：１８４）
正方向ＰＣＲプライマー（３４３６０．ｆ２）：
5'-GGATGGCCAGAGCTGCTG-3'（配列番号：１８５）
正方向ＰＣＲプライマー（３４３６０．ｆ３）：
5'-AAAGTACAAGTGTGGCCTCATCAAGC-3'（配列番号：１８６）
逆方向ＰＣＲプライマー（３４３６０．ｒ１）：
5'-TCTGACTCCTAAGTCAGGCAGGAG-3'（配列番号：１８７）
逆方向ＰＣＲプライマー（３４３６３．ｒ２）：
5'-ATTCTCTCCACAGACAGCTGGTTC-3'（配列番号：１８８）
さらに、３４３６０ＤＮＡコンセンサス配列から合成オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションプローブを作成し、それは以下のヌクレオチド配列を有していた：
ハイブリダイゼーションプローブ（３４３６０．ｐ１）：
5'-GTACAAGTGTGGCCTCATCAAGCCCTGCCCAGCCAACTACTTTGCG-3'（配列番号：１８９）
【０２９０】
全長クローンの供給源について幾つかのライブラリをスクリーニングするために、ライ

ブラリからのＤＮＡを上で同定したＰＣＲプライマー対でＰＣＲ増幅した。次いで、ポジティブライブラリを、プローブオリゴヌクレオチド及びＰＣＲプライマー対の一方を用いてＰＲＯ１１３０遺伝子をコードするクローンを単離するのに使用した。ｃＤＮＡライブラリの構築のためのＲＮＡはヒト大動脈内皮細胞組織から単離した。

上記のように単離したクローンのＤＮＡ配列決定により、ＤＮＡ５９８１４－１４８６[図６７、配列番号：１８２］の全長ＤＮＡ配列；及びＰＲＯ１１３０の誘導タンパク質配列が得られた。

ＤＮＡ５９８１４－１４８６の全コード化配列が図６７（配列番号：１８２）に含まれる。クローンＤＮＡ５９８１４－１４８６は単一のオープンリーディングフレームを含み、ヌクレオチド位置３１２－３１４に見かけの翻訳開始部位、そしてヌクレオチド位置９８４－９８６に見かけの停止コドンを持つ。予測されるポリペプチド前駆体は２２４アミノ酸長であり、約２４,９６３ダルトンの見積もり分子量及び約９．６４のｐＩを持つ。図６８（配列番号：１８３）に示した全長ＰＲＯ１１３０配列の分析により、種々の重要なポリペプチドドメインの存在が明らかになり、それらの重要なポリペプチドドメインに与えられた位置は、およそ上記の通りである。図６８に示した全長ＰＲＯ１１３０ポリペプチドの分析により、以下の存在が明らかになった：約アミノ酸１～約アミノ酸１５のシグナルペプチド；約アミノ酸１８４～アミノ酸１９２のＡＴＰ／ＧＴＰ-結合部位モチーフＡ（Ｐ-ｌｏｏｐ）；及び約アミノ酸１０７～約アミノ酸１１１のＮ-グリコシル化部位。クローンＤＮＡ５９８１４－１４８６は１９９８年１０月２８日にＡＴＣＣに寄託され、ＡＴＣＣ寄託番号２０３３５９が付与された。

図６８（配列番号：１８３）に示した全長配列のWU-BLAST2配列アラインメント分析を用いたDayhoffデータベース（ﾊﾞｰｼﾞｮﾝ35.45 Swiss Prot 35）の分析により、ＰＲＯ１１３０アミノ酸配列と以下のDayhoff配列との間の有意な相同性が明らかになった：P_W06547, 216_HUMAN, D87120_1, MMU72677_1, LAU04889_1, 及びD69319。

【実施例３８】

【０２９１】

ヒトＰＲＯ１１５４をコードするｃＤＮＡクローンの単離

上記の実施例３に記載した企業のシグナル配列発見アルゴリズムを適用してＤＮＡ５９８４６－１５０３を同定した。上述のシグナル配列アルゴリズムの使用により、LIFESEQ(商品名)からのＥＳＴクラスター配列の同定が可能となった。次いでこのＥＳＴクラスター配列を、公的データベース（例えば、GenBank）及び企業のＥＳＴ ＤＮＡデータベース（LIFESEQ(商品名)、Incyte Pharmaceuticals、Palo Alto, CA）を含む種々の発現配列タグ（ＥＳＴ）データベースと比較して、存在する相同性を同定した。相同体検索は、コンピュータプログラムBLAST又はBLAST2（Altschul等, Methods in Enzymology 266: 460-480 (1996)）を用いて実施した。既知のタンパク質をコードせず、BLASTスコア７０（９０の場合もある）又はそれ以上を持つ比較物は、プログラム「phrap」（Phil Green, University of Washington, Seattle, Washington）で集団化してコンセンサスＤＮＡ配列を構築した。そこから得られたコンセンサス配列を、ここでＤＮＡ５６２５０と命名する。

ここに提供する開示に鑑みて、ＥＳＴ2169375（微小血管内皮細胞ライブラリからのライブラリ３０９-ENDCNOT03-）を含むIncyteクローンを購入し、さらに試験して配列決定した。このｃＤＮＡ挿入物の配列を図６９（配列番号：１９０）に示し、ここでＤＮＡ５９８４６－１５０３と命名する。

【０２９２】

ＤＮＡ５９８４６－１５０３の全コード化配列が図６９（配列番号：１９０）に含まれる。クローンＤＮＡ５９８４６－１５０３は単一のオープンリーディングフレームを含み、ヌクレオチド位置８６－８８に見かけの翻訳開始部位を持ち、そしてヌクレオチド位置２９０９－２９１１の停止コドンで終端する（図６９）。予測されるポリペプチド前駆体は９４１アミノ酸長である（図７０；配列番号：１９１）。図７０に示す全長ＰＲＯ１１５４タンパク質は、約１０７，１４４の見積もり分子量及び約６．２６のｐＩを有する。図７０（配列番号：１９１）に示した全長ＰＲＯ１１５４配列の分析により、種々の重要

なポリペプチドドメインの存在が明らかになり、それらの重要なポリペプチドドメインに与えられた位置は、およそ上記の通りである。図７０に示した全長ＰＲＯ１１５４ポリペプチドの分析により、以下の存在が明らかになった：約アミノ酸１～約アミノ酸３４のシグナルペプチド；約アミノ酸７０～アミノ酸７４、約アミノ酸１５４～約アミノ酸１５８、約アミノ酸４１４～約アミノ酸４１８、約アミノ酸７６０～約アミノ酸７６４、及び約アミノ酸９０１～約アミノ酸９０５のN-グリコシル化部位；約アミノ酸３５０～約アミノ酸３６０の中性亜鉛メタロペプチダーゼ、亜鉛-結合領域シグネーチャー。クローンＤＮＡ５９８４６－１５０３は１９９８年6月１６日にＡＴＣＣに寄託され、ＡＴＣＣ寄託番号２０９９７８が付与された。

図７０（配列番号：１９１）に示した全長配列のWU-BLAST-2配列アラインメント分析を用いたDayhoffデータベース（バージョン35.45 SwissProt 35）の分析により、ＰＲＯ１１５４アミノ酸配列と以下のDayhoff配列との間の有意な相同性が明らかになった：AB011097_1, AMPN_HUMAN, RNU76997_1, I59331, GEN14047, HSU62768_1, P_R51281, CET07F10_1, SSU66371_1, 及びAMPRE_HUMAN。

【実施例３９】

【０２９３】

ヒトＰＲＯ１２４４をコードするｃＤＮＡクローンの単離

上記の実施例3に記載した企業のシグナル配列発見アルゴリズムを適用してＤＮＡ６４８８３－１５２６を同定した。上述のシグナル配列アルゴリズムの使用により、IncyteＥＳＴクラスター番号7874と称されるＥＳＴクラスター配列のLIFESEQ(商品名)からの同定が可能となった。次いでこのＥＳＴクラスター配列を、公的データベース（例えば、GenBank）及び企業のＥＳＴ ＤＮＡデータベース（LIFESEQ(商品名)、Incyte Pharmaceuticals、Palo Alto, CA）を含む種々の発現配列タグ（ＥＳＴ）データベースと比較して、存在する相同性を同定した。海綿体の組織から構築したライブラリから一又は複数のＥＳＴを誘導した。相同体検索は、コンピュータプログラムBLAST又はBLAST2（Altschul等, Methods in Enzymology 266: 460-480 (1996)）を用いて実施した。既知のタンパク質をコードせず、BLASTスコア７０（９０の場合もある）又はそれ以上を持つ比較物は、プログラム「phrap」（Phil Green, University of Washington, Seattle, Washington）で集団化してコンセンサスＤＮＡ配列を構築した。構築物は、「ＤＮＡ１８３１３」、「ＤＮＡ２２８１２」及びIncyte EST番号3202349と称するＥＳＴ配列を含んでいた。そこから得られたコンセンサス配列を、ここでＤＮＡ５６０１１と命名する。

ＤＮＡ５６０１１とIncyte EST番号3202349との間の相同性に鑑みて、Incyte EST番号3202349を購入し、ｃＤＮＡ挿入物を得て配列決定した。このｃＤＮＡ挿入物の配列を図７１（配列番号：１９２）に示し、ここでＤＮＡ６４８８３－１５２６と命名する。

【０２９４】

ＤＮＡ６４８８３－１５２６の全コード化配列が図７１（配列番号：１９２）に含まれる。クローンＤＮＡ６４８８３－１５２６は単一のオープンリーディングフレームを含み、ヌクレオチド位置９－１１に見かけの翻訳開始部位を持ち、そしてヌクレオチド位置１０１４－１０１６の停止コドンで終端する（図７１）。予測されるポリペプチド前駆体は３３５アミノ酸長である（図７２；配列番号：１９３）。図７２に示す全長ＰＲＯ１２４４タンパク質は、約３８，０３７の見積もり分子量及び約９．８７のｐＩを有する。図７２（配列番号：１９３）に示した全長ＰＲＯ１２４４配列の分析により、種々の重要なポリペプチドドメインの存在が明らかになり、それらの重要なポリペプチドドメインに与えられた位置は、およそ上記の通りである。図７２に示した全長ＰＲＯ１２４４ポリペプチドの分析により、以下の存在が明らかになった：約アミノ酸１～約アミノ酸２９のシグナルペプチド；約アミノ酸１８３～約アミノ酸２０５、約アミノ酸２１７～約アミノ酸２３７、約アミノ酸２１７～約アミノ酸２８７、及び約アミノ酸３０１～約アミノ酸３２１の膜貫通ドメイン；約アミノ酸７１～約アミノ酸７５及び約アミノ酸２１５～約アミノ酸２１９のN-グリコシル化部位；約アミノ酸１５０～約アミノ酸１５３の細胞接着配列。クローンＤＮＡ６４８８３－１５２６は１９９８年９月９日にＡＴＣＣに寄託され、ＡＴＣ

Ｃ寄託番号２０３２５３が付与された。
図７２（配列番号：１９３）に示した全長配列のWU-BLAST-2配列アラインメント分析を用いたDayhoffデータベース（バージョン35.45 SwissProt 35）の分析により、ＰＲＯ１２４４アミノ酸配列と以下のDayhoff配列との間の有意な相同性が明らかになった：AF008554_1, P_485334, G02297, HUMN33S11_1, HUMN33S10_1, YO13_CAEEL, GEN13255, S49758, E70107, 及びERP5_MEDSA。
【実施例４０】
【０２９５】
ヒトＰＲＯ１２４６をコードするｃＤＮＡクローンの単離
上記の実施例３に記載した企業のシグナル配列発見アルゴリズムを適用してＤＮＡ６４８８５－１５２９を同定した。上述のシグナル配列アルゴリズムの使用により、IncyteＥＳＴクラスター番号56853と命名されるLIFESEQ(商品名)からのＥＳＴクラスター配列の同定が可能となった。次いでこのＥＳＴクラスター配列を、公的データベース（例えば、GenBank）及び企業のＥＳＴ ＤＮＡデータベース（LIFESEQ(商品名)、Incyte Pharmaceuticals、Palo Alto, CA）を含む種々の発現配列タグ（ＥＳＴ）データベースと比較して、存在する相同性を同定した。相同体検索は、コンピュータプログラムBLAST又はBLAST2（Altschul等, Methods in Enzymology 266: 460-480 (1996)）を用いて実施した。既知のタンパク質をコードせず、BLASTスコア７０（９０の場合もある）又はそれ以上を持つ比較物は、プログラム「phrap」（Phil Green, University of Washington, Seattle, Washington）で集団化してコンセンサスＤＮＡ配列を構築した。そこから得られたコンセンサス配列を、ここでＤＮＡ５６０２１と命名する。
ＤＮＡ５６０２１配列IncyteＥＳＴ番号2481345との間の配列相同性に鑑みて、IncyteＥＳＴ番号2481345を購入し、ｃＤＮＡ挿入物を得て配列決定した。このｃＤＮＡ挿入物の配列を図７３（配列番号：１９４）に示し、ここでＤＮＡ６４８８５－１５２９と命名する。
【０２９６】
ＤＮＡ６４８８５－１５２９の全コード化配列が図７３（配列番号：１９４）に含まれる。クローンＤＮＡ６４８８５－１５２９は単一のオープンリーディングフレームを含み、ヌクレオチド位置１１９－１２１に見かけの翻訳開始部位を持ち、そしてヌクレオチド位置１７２７－１７２９の停止コドンで終端する（図７３）。予測されるポリペプチド前駆体は５３６アミノ酸長である（図７４；配列番号：１９５）。図７４に示す全長ＰＲＯ１２４６タンパク質は、約６１,４５０の見積もり分子量及び約９．１７のｐＩを有する。図７４（配列番号：１９５）に示した全長ＰＲＯ１２４６配列の分析により、種々の重要なポリペプチドドメインの存在が明らかになり、それらの重要なポリペプチドドメインに与えられた位置は、およそ上記の通りである。図７４に示した全長ＰＲＯ１２４６ポリペプチドの分析により、以下の存在が明らかになった：約アミノ酸１～約アミノ酸１５のシグナルペプチド；約アミノ酸１０８～アミノ酸１１２、約アミノ酸１６６～約アミノ酸１７０、約アミノ酸１９３～約アミノ酸１９７、約アミノ酸２６２～約アミノ酸２６６、約アミノ酸３７５～約アミノ酸３７９、約アミノ酸４１３～約アミノ酸４１７、及び約アミノ酸４９８～約アミノ酸５０２のN-グリコシル化部位；約アミノ酸２８６～約アミノ酸３１７、約アミノ酸３５９～約アミノ酸３７０、及び約アミノ酸７８～約アミノ酸９８のスルファターゼタンパク質相同ブロック。クローンＤＮＡ６４８８５－１５２９は１９９８年１１月３日にＡＴＣＣに寄託され、ＡＴＣＣ寄託番号２０３４５７が付与された。
図７４（配列番号：１９５）に示した全長配列のWU-BLAST-2配列アラインメント分析を用いたDayhoffデータベース（バージョン35.45 SwissProt 35）の分析により、ＰＲＯ１２４６アミノ酸配列と以下のDayhoff配列との間の有意な相同性が明らかになった：P_R51355, CELK09C4_1, BCU44852_1.1DS_HUMAN, G65169, E64903, ARSA_HUMAN, GL6S_HUMAN, HSARSF_1, 及びGEN12648。
【実施例４１】
【０２９７】

ヒトＰＲＯ１２７４をコードするｃＤＮＡクローンの単離
新規な分泌分子であるＤＮＡ５７７００を、Incyteの企業データベース（LIFESEQ(商品名)、Incyte Pharmaceuticals、Palo Alto, CA）及びGenBankの公的データベースに対するBLAST法に使用した。ポジティブクローンを同定してseqextプログラムにより構築物ファイルの作成に使用した。相同体検索は、コンピュータプログラムBLAST又はBLAST2（Altschul等, Methods in Enzymology 266: 460-480 (1996)）を用いて実施した。既知のタンパク質をコードせず、BLASTスコア７０（９０の場合もある）又はそれ以上を持つ比較物は、プログラム「phrap」（Phil Green, University of Washington, Seattle, Washington）で集団化してコンセンサスＤＮＡ配列を構築した。そこから得られたコンセンサス配列を、ここでＤＮＡ５９５７３と命名する。
ＤＮＡ５９５７３配列及びその構築物で同定された配列に対する関係に基づいて構築物中の配列の一つを含むクローンの一つ（IncyteＥＳＴクローン番号2623992）を購入し、ｃＤＮＡ挿入物を得て配列決定した。Incyteクローン2623992は乳房表皮ケラチノサイトからのＲＮＡで構成されたライブラリからのものである。このｃＤＮＡ挿入物の配列を図７５（配列番号：１９６）に示し、ここでＤＮＡ６４８８９－１５４１と命名する。
ＤＮＡ６４８８９－１５４１の全コード化配列が図７５（配列番号：１９６）に含まれる。クローンＤＮＡ６４８８９－１５４１は単一のオープンリーディングフレームを含み、ヌクレオチド位置２４－２６に見かけの翻訳開始部位を持ち、そしてヌクレオチド位置３５４－３５６の停止コドンで終端する（図７５）。予測されるポリペプチド前駆体は１１０アミノ酸長である（図７６；配列番号：１９７）。図６０に示す全長ＰＲＯ１２７４タンパク質は、約１２，３６３の見積もり分子量及び約８．３１のｐＩを有する。図７６（配列番号：１９７）に示した全長ＰＲＯ１２７４配列の分析により、種々の重要なポリペプチドドメインの存在が明らかになり、それらの重要なポリペプチドドメインに与えられた位置は、およそ上記の通りである。図７６に示した全長ＰＲＯ１２７４ポリペプチドの分析により、以下の存在が明らかになった：約アミノ酸１～約アミノ酸２４のシグナルペプチド；約アミノ酸７１～アミノ酸７５のN-グリコシル化部位；約アミノ酸７６～約アミノ酸９６、及び約アミノ酸４２～約アミノ酸６１のインシュリンファミリータンパク質相同ブロック。クローンＤＮＡ６４８８９－１５４１は１９９８年9月9日にＡＴＣＣに寄託され、ＡＴＣＣ寄託番号２０３２５０が付与された。
図７６（配列番号：１９７）に示した全長配列のWU-BLAST-2配列アラインメント分析を用いたDayhoffデータベース（バージョン35.45 SwissProt 35）の分析により、ＰＲＯ１２７４アミノ酸配列と以下のDayhoff配列との間の有意な相同性が明らかになった：CEW05B2_9, AF016922_1（インシュリン様成長因子１）, B48151, A53640, BTIGF2REC_1（インシュリン様成長因子２）, HSNFIGEN12_1, TXA3_RADMA（ニューロトキシン３）, CXM1_CONGE, P_P61301, TXA4_RADMA（ニューロトキシン４）。
【実施例４２】
【０２９８】
ヒトＰＲＯ１２８６をコードするｃＤＮＡクローンの単離
上記の実施例３に記載した企業のシグナル配列発見アルゴリズムを適用してＤＮＡ６４９０３－１５５３を同定した。上述のシグナル配列アルゴリズムの使用により、IncyteＥＳＴクラスター番号86809と命名されるLIFESEQ(商品名)からのＥＳＴクラスター配列の同定が可能となった。次いでこのＥＳＴクラスター配列を、公的データベース（例えば、GenBank）及び企業のＥＳＴ ＤＮＡデータベース（LIFESEQ(商品名)、Incyte Pharmaceuticals、Palo Alto, CA）を含む種々の発現配列タグ（ＥＳＴ）データベースと比較して、存在する相同性を同定した。相同体検索は、コンピュータプログラムBLAST又はBLAST2（Altschul等, Methods in Enzymology 266: 460-480 (1996)）を用いて実施した。既知のタンパク質をコードせず、BLASTスコア７０（９０の場合もある）又はそれ以上を持つ比較物は、プログラム「phrap」（Phil Green, University of Washington, Seattle, Washington）で集団化してコンセンサスＤＮＡ配列を構築した。構築物中のＥＳＴは、腫瘍、細胞

系、又は疾患細胞から同定されたものを含んでいた。一又は複数のＥＳＴは、疾患結腸組織から単離下ＲＮＡから構築したｃＤＮＡライブラリから得た。そこから得られたコンセンサス配列を、ここでＤＮＡ５８８２２と命名する。

ＤＮＡ５８８２２配列IncyteＥＳＴ番号1695434との間の配列相同性に鑑みて、IncyteＥＳＴ番号1695434を購入し、ｃＤＮＡ挿入物を得て配列決定した。このｃＤＮＡ挿入物の配列を図７７（配列番号：１９８）に示し、ここでＤＮＡ６４９０３－１５５３と命名する。

【０２９９】

ＤＮＡ６４９０３－１５５３の全コード化配列が図７７（配列番号：１９８）に含まれる。クローンＤＮＡ６４９０３－１５５３は単一のオープンリーディングフレームを含み、ヌクレオチド位置９３－９５に見かけの翻訳開始部位を持ち、そしてヌクレオチド位置３７２－３７４の停止コドンで終端する（図７７）。予測されるポリペプチド前駆体は９３アミノ酸長である（図７８；配列番号：１９９）。図７８に示す全長ＰＲＯ１２８６タンパク質は、約１０，１１１の見積もり分子量及び約９．７０のｐＩを有する。図７８（配列番号：１９９）に示した全長ＰＲＯ１２８６配列の分析により、種々の重要なポリペプチドドメインの存在が明らかになり、それらの重要なポリペプチドドメインに与えられた位置は、およそ上記の通りである。図７８に示した全長ＰＲＯ１２８６ポリペプチドの分析により、以下の存在が明らかになった：約アミノ酸１～約アミノ酸１８のシグナルペプチド；約アミノ酸１５～アミノ酸２１、約アミノ酸１７～約アミノ酸２３、約アミノ酸１９～約アミノ酸２５、約アミノ酸８３～約アミノ酸８９、及び約アミノ酸８６～約アミノ酸９２のN-ミリストイル化部位。クローンＤＮＡ６４９０３－１５５３は１９９８年９月１５日にＡＴＣＣに寄託され、ＡＴＣＣ寄託番号２０３２２３が付与された。

図７８（配列番号：１９９）に示した全長配列のWU-BLAST-2配列アラインメント分析を用いたDayhoffデータベース（バージョン35.45 SwissProt 35）の分析により、ＰＲＯ１２８６アミノ酸配列と以下のDayhoff配列との間の有意な相同性が明らかになった：SR5C_ARATH, CELC17H12_11, MCPD_ENTAE, JQ2283, INVO_LEMCA, P_R07309, ADEVBCAGN_4, AF20947_1, CELT23H2_1, 及びMDH_STRAR。

【実施例４３】

【０３００】

ヒトＰＲＯ１２９４をコードするｃＤＮＡクローンの単離

上記の実施例３に記載した企業のシグナル配列発見アルゴリズムを適用してＤＮＡ６４９０５－１５５８を同定した。上述のシグナル配列アルゴリズムの使用により、IncyteＥＳＴクラスター番号10559と命名されるLIFESEQ(商品名)からのＥＳＴクラスター配列の同定が可能となった。次いでこのＥＳＴクラスター配列を、公的データベース（例えば、GenBank）及び企業のＥＳＴ ＤＮＡデータベース（LIFESEQ(商品名)、Incyte Pharmaceuticals、Palo Alto, CA）を含む種々の発現配列タグ（ＥＳＴ）データベースと比較して、存在する相同性を同定した。相同体検索は、コンピュータプログラムBLAST又はBLAST2（Altschul等, Methods in Enzymology 266: 460-480 (1996)）を用いて実施した。既知のタンパク質をコードせず、BLASTスコア７０（９０の場合もある）又はそれ以上を持つ比較物は、プログラム「phrap」（Phil Green, University of Washington, Seattle, Washington）で集団化してコンセンサスＤＮＡ配列を構築した。そこから得られたコンセンサス配列を、ここでＤＮＡ５７２０３と命名する。

ＤＮＡ５７２０３配列とIncyteＥＳＴクローン番号3037763との間の配列相同性に鑑みて、IncyteＥＳＴ番号3037763を購入し、ｃＤＮＡ挿入物を得て配列決定した。このｃＤＮＡ挿入物の配列を図７９（配列番号：２００）に示し、ここでＤＮＡ６４９０５－１５５８と命名する。

【０３０１】

ＤＮＡ６４９０５－１５５８の全コード化配列が図７９（配列番号：２００）に含まれる。クローンＤＮＡ６４９０５－１５５８は単一のオープンリーディングフレームを含み、ヌクレオチド位置１１０－１１２に見かけの翻訳開始部位を持ち、そしてヌクレオチド

位置１３２８－１３３０の停止コドンで終端する（図７９）。予測されるポリペプチド前駆体は４０６アミノ酸長である（図８０；配列番号：２０１）。図８０に示す全長ＰＲＯ１２９４タンパク質は、約４６，０３８の見積もり分子量及び約６．５０のｐＩを有する。図８０（配列番号：２０１）に示した全長ＰＲＯ１２９４配列の分析により、種々の重要なポリペプチドドメインの存在が明らかになり、それらの重要なポリペプチドドメインに与えられた位置は、およそ上記の通りである。図８０に示した全長ＰＲＯ１２９４ポリペプチドの分析により、以下の存在が明らかになった：約アミノ酸１～約アミノ酸２１のシグナルペプチド；約アミノ酸１７７～約アミノ酸１８１及び約アミノ酸２４８～約アミノ酸２５２のN-グリコシル化部位；約アミノ酸１９６～約アミノ酸２００のｃＡＭＰ及びｃＧＭＡ依存性プロテインキナーゼリン酸化部位；約アミノ酸８９～約アミノ酸９７のチロシンキナーゼリン酸化部位；約アミノ酸１１５～約アミノ酸１２１、約アミノ酸１５２～約アミノ酸１５８、及び約アミノ酸３７０～約アミノ酸３７６のN-ミリストイル化部位；及び約アミノ酸１２２～約アミノ酸１２６のアミド化部位。クローンＤＮＡ６４９０５－１５５８は１９９８年9月１５日にＡＴＣＣに寄託され、ＡＴＣＣ寄託番号２０３２３３が付与された。

図８０（配列番号：２０１）に示した全長配列のWU-BLAST-2配列アラインメント分析を用いたDayhoffデータベース（バージョン35.45 SwissProt 35）の分析により、ＰＲＯ１２９４アミノ酸配列と以下のDayhoff配列との間の有意な相同性が明らかになった：173636, AF028740_1, AB006686S3_1, P_R98225, RNU78105_1, CELC48E7_4, CEF11C3_3, SCP1_MESAU, TPM3_HUMAN, 及びCELK05B2_3。

【実施例４４】

【０３０２】

ヒトＰＲＯ１３０３をコードするｃＤＮＡクローンの単離

実施例１に記載したように、phrapを用いて他のＥＳＴ配列に対してコンセンサスＤＮＡ配列を構築した。このコンセンサス配列を、ここでＤＮＡ４７３４７と命名する。ＤＮＡ４７３４７コンセンサス配列及びＤＮＡ４７３４７が誘導された構築物のIncyteＥＳＴに対するその相同性に基づいて、Incyteクローン1430305を購入して全体を配列決定した。それによりＰＲＯ１３０３をコードする配列を同定した。

【０３０３】

ＤＮＡ６５４０９－１５６６の全コード化配列が図８１（配列番号：２０２）に含まれる。クローンＤＮＡ６５４０９－１５６６は単一のオープンリーディングフレームを含み、ヌクレオチド位置１２１－１２３に見かけの翻訳開始部位、そしてヌクレオチド位置８６５－８６７に見かけの停止コドンを持つ。予測されるポリペプチド前駆体は２４８アミノ酸長であり、約２６,７３４ダルトンの見積もり分子量及び約７．９０のｐＩを持つ。図８２（配列番号：２０３）に示した全長ＰＲＯ１３０３配列の分析により、種々の重要なポリペプチドドメインの存在が明らかになり、それらの重要なポリペプチドドメインに与えられた位置は、およそ上記の通りである。図８２に示した全長ＰＲＯ１３０３ポリペプチドの分析により、以下の存在が明らかになった：約アミノ酸１～約アミノ酸１７のシグナルペプチド；約アミノ酸２４～アミノ酸２８、及び約アミノ酸１６３～約アミノ酸１６７のN-グリコシル化部位；約アミノ酸５８～約アミノ酸６４のセリンプロテアーゼ、トリプシンファミリー、ヒスチジン活性部位；約アミノ酸４７～約アミノ酸６４、約アミノ酸１９６～約アミノ酸２０７、約アミノ酸２１８～約アミノ酸２４２のセリンプロテアーゼ、トリプシンファミリー、ヒスチジンタンパク質ドメイン；約アミノ酸１９４～約アミノ酸２０７及び約アミノ酸４７～約アミノ酸６５のクリングル(kringle)ドメインタンパク質相同ブロック；及び約アミノ酸２２０～約アミノ酸２４８のアップルドメイン。クローンＤＮＡ６５４０９－１５６６は１９９８年9月１５日にＡＴＣＣに寄託され、ＡＴＣＣ寄託番号２０３２３２が付与された。

図８２（配列番号：２０３）に示した全長配列のWU-BLAST-2配列アラインメント分析を用いたDayhoffデータベース（バージョン35.45 SwissProt 35）の分析により、ＰＲＯ１３０３アミノ酸配列と以下のDayhoff配列との間の有意な相同性が明らかになった：AB009

849_1, P_W08475, AF024605_1, A42048_1, TRY3_RAT, MMAE00066414, TRY1_RAT, MMAE000663_4, MMAE000665_2, 及びMMAE00066412。

【実施例４５】

【０３０４】

ヒトＰＲＯ１３０４をコードするｃＤＮＡクローンの単離

実施例１に記載したように、phrapを用いて他のＥＳＴ配列に対してコンセンサスＤＮＡ配列を構築した。このコンセンサス配列を、ここでＤＮＡ３５７４５と命名する。ＤＮＡ３５７４５コンセンサス配列に基づいて、１）ＰＣＲにより対象とする配列を含むｃＤＮＡライブラリを同定するため、及び２）ＰＲＯ１３０４の全長コード化配列のクローンを単離するプローブとして使用するために、オリゴヌクレオチドを合成した。

ＰＣＲプライマー（正方向及び逆方向）の対を合成した：

正方向ＰＣＲプライマー（３５７４５.ｆ１）：

5'-GTGTTCTGCTGGAGCCGATGCC-3'（配列番号：２０６）

正方向ＰＣＲプライマー（３５７４５.ｆ２）：

5'-GACATGGACAATGACAGG-3'（配列番号：２０７）

正方向ＰＣＲプライマー（３５７４５.ｆ３）：

5'-CCTTTCAGGATGTAGGAG-3'（配列番号：２０８）

正方向ＰＣＲプライマー（３５７４５.ｆ４）：

5'-GATGTCTGCCACCCCAAG-3'（配列番号：２０９）

逆方向ＰＣＲプライマー（３５７４５.ｒ１）：

5'-GCATCCTGATATGACTTGTCACGTGGC-3'（配列番号：２１０）

逆方向ＰＣＲプライマー（３５７４５.ｒ２）：

5'-TACAAGAGGGAAGAGGAGTTGCAC-3'（配列番号：２１１）

さらに、ＤＮＡ３５７４５コンセンサス配列から合成オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションプローブを作成し、それは以下のヌクレオチド配列を有していた：

ハイブリダイゼーションプローブ（３５７４５.ｐ１）：

5'-GCCCATTATGACGGCTACCTGGCTAAAGACGGCTCGAAATTCTACTGCAGCC-3'（配列番号：２１２）

全長クローンの供給源について幾つかのライブラリをスクリーニングするために、ライブラリからのＤＮＡを上で同定したＰＣＲプライマー対でＰＣＲ増幅した。次いで、ポジティブライブラリを、プローブオリゴヌクレオチド及びＰＣＲプライマー対の一方を用いてＰＲＯ１３０４遺伝子をコードするクローンを単離するのに使用した。ｃＤＮＡライブラリの構築のためのＲＮＡはヒト骨髄組織（LIB255）から単離した。

上記のように単離したクローンのＤＮＡ配列決定により、ＤＮＡ６５４０６－１５６７[図８３、配列番号：２０４]の全長ＤＮＡ配列；及びＰＲＯ１３０４の誘導タンパク質配列が得られた。

【０３０５】

ＤＮＡ６５４０６－１５６７の全コード化配列が図８３（配列番号：２０４）に含まれる。クローンＤＮＡ６５４０６－１５６７は単一のオープンリーディングフレームを含み、ヌクレオチド位置２３－２５に見かけの翻訳開始部位、そしてヌクレオチド位置６８９－６９１に見かけの停止コドンを持つ。予測されるポリペプチド前駆体は２２２アミノ酸長であり、約２５,７９４ダルトンの見積もり分子量及び約６．２４のｐＩを持つ。図８４（配列番号：２０５）に示した全長ＰＲＯ１３０４配列の分析により、種々の重要なポリペプチドドメインの存在が明らかになり、それらの重要なポリペプチドドメインに与えられた位置は、およそ上記の通りである。図８４に示した全長ＰＲＯ１３０４ポリペプチドの分析により、以下の存在が明らかになった：約アミノ酸２１９～約アミノ酸２２４の小胞体標的化配列；約アミノ酸４５～アミノ酸４９のN-グリコシル化部位；約アミノ酸８７～約アミノ酸１２４、及び約アミノ酸１２９～約アミノ酸１４３のＦＫＢＰ型ペプチジル-プロリルシス-トランスイソメラーゼ相同ブロック；約アミノ酸２０２～約アミノ酸２１５のＥＦ-ハンドカルシウム結合タンパク質相同ブロック。クローンＤＮＡ６５４０６－１５６７は１９９８年９月１５日にＡＴＣＣに寄託され、ＡＴＣＣ寄託番号２０３２

１９が付与された。
図８４（配列番号：２０５）に示した全長配列のWU-BLAST-2配列アラインメント分析を用いたDayhoffデータベース（バージョン35.45 SwissProt 35）の分析により、ＰＲＯ１３０４アミノ酸配列と以下のDayhoff配列との間の有意な相同性が明らかになった：AF040252_1, P_R28980, S71238, CELC05C8_1, VFU52045_1, S75144, FKB3_BOVIN, CELC50F2_6, CELB0511_12, 及びP_R41781。
ＤＮＡ６５４０６－１５６７配列は、IncyteESTクローン番号2813577の挿入物の単離及び配列決定によっても得られた。
【実施例４６】
【０３０６】
ヒトＰＲＯ１３１２をコードするｃＤＮＡクローンの単離
ＤＮＡ５５７７３を、ヒト胎児腎臓ｃＤＮＡライブラリにおいて、酵母スクリーニングによって単離し、それは好ましくは一次ｃＤＮＡクローンの5'末端を表現する。
全長クローン［ＤＮＡ６１８７３－１５７４］が単離され、それは単一のオープンリーディングフレームを含み、ヌクレオチド位置７－９に見かけの翻訳開始部位、そしてヌクレオチド位置６４３－６４５に見かけの停止コドンを持つ（図８５；配列番号：２１３）。予測されるポリペプチド前駆体は２１２アミノ酸長であり、約２４,０２４ダルトンの算定分子量及び約６．２６の見積もりｐＩを持つ。図８６（配列番号：２１４）に示した全長ＰＲＯ１３１２配列の分析により、図８６に示すような種々の重要なポリペプチドドメインの存在が明らかになり、それらの重要なポリペプチドドメインに与えられた位置は、およそ上記の通りである。図８６に示した全長ＰＲＯ１３１２ポリペプチドの分析により、以下の存在が明らかになった：約アミノ酸１～約アミノ酸１４のシグナルペプチド；約アミノ酸１４１～アミノ酸１６０の膜貫通ドメイン；及び約アミノ酸７６～約アミノ酸８０、及び約アミノ酸９３～約アミノ酸９７のＮ-グリコシル化部位。クローンＤＮＡ６１８７３－１５７４は１９９８年８月１８日にＡＴＣＣに寄託され、ＡＴＣＣ寄託番号２０３１３２が付与された。
図８６（配列番号：２１４）に示した全長配列のWU-BLAST-2配列アラインメント分析を用いたDayhoffデータベース（バージョン35.45 SwissProt 35）の分析により、ＰＲＯ１３１２アミノ酸配列と以下のDayhoff配列との間の有意な相同性が明らかになった：GCINTALPH_1, GIBMUC1A_1, P_R96298, AF001406_1, PVU88874_1, P_R85151, AF041409_1, CELC50F2_7, C45875, 及びAB009510_21。
【実施例４７】
【０３０７】
ヒトＰＲＯ１３１３をコードするｃＤＮＡクローンの単離
実施例１に記載したように、phrapを用いて他のＥＳＴ配列に対してコンセンサスＤＮＡ配列を構築した。このコンセンサス配列を、ここでＤＮＡ６４８７６と命名する。ＤＮＡ６４８７６コンセンサス配列、及びＤＮＡ５７７１１と称されるジェネンテクが独自に開発したＥＳＴ配列との配列相同性の検索にに基づいて、Merck／ワシントン大学EST配列（R80613と称する）が、ＤＮＡ６４８７６及びＤＮＡ５７７１１と有意な相同性を持つことがわかった。従って、Merck／ワシントン大学ESTクローン番号R80613を購入し、その挿入物を得て配列決定することによりＰＲＯ１３１３のタンパク質配列を誘導した。
ＤＮＡ６４９６６－１５７５の全コード化配列が図８７（配列番号：２１５）に含まれる。クローンＤＮＡ６４９６６－１５７５は単一のオープンリーディングフレームを含み、ヌクレオチド位置１１５－１１７に見かけの翻訳開始部位、そしてヌクレオチド位置１０３６－１０３８に見かけの停止コドンを持つ。予測されるポリペプチド前駆体は３０７アミノ酸長であり、約３５,０９８ダルトンの見積もり分子量及び約８．１１のｐＩを持つ。図８８（配列番号：２１６）に示した全長ＰＲＯ１３１３配列の分析により、種々の重要なポリペプチドドメインの存在が明らかになり、それらの重要なポリペプチドドメインに与えられた位置は、およそ上記の通りである。図８８に示した全長ＰＲＯ１３１３ポリペプチドの分析により、以下の存在が明らかになった：約アミノ酸１０６～約アミノ酸

１２１、約アミノ酸１３６～アミノ酸１５２、約アミノ酸１７２～約アミノ酸１８８、約アミノ酸２３０～約アミノ酸２４５及び約アミノ酸２７２～約アミノ酸２８５の膜貫通ドメイン；約アミノ酸３４～約アミノ酸３８、約アミノ酸１３５～約アミノ酸１３９及び約アミノ酸２０３～約アミノ酸２０７のＮ-グリコシル化部位；約アミノ酸１６５～約アミノ酸１７１、約アミノ酸１９６～約アミノ酸２０２、約アミノ酸２４０～約アミノ酸２４６、約アミノ酸２４７～約アミノ酸２５３のＮ-ミリストイル化部位；約アミノ酸５３～約アミノ酸６１のＡＴＰ／ＧＴＰ結合部位モチーフＡ(Ｐ-ｌｏｏｐ)。クローンＤＮＡ６４９６６－１５７５は１９９９年1月１２日にＡＴＣＣに寄託され、ＡＴＣＣ寄託番号２０３５７５が付与された。

図８８（配列番号：２１６）に示した全長配列のWU-BLAST-2配列アラインメント分析を用いたDayhoffデータベース（バージョン35.45 SwissProt 35）の分析により、ＰＲＯ１３１３アミノ酸配列と以下のDayhoff配列との間の有意な相同性が明らかになった：CELT27A1_3, CEF09C06_7, U93688_9, H64896, YDCX_ECOLI, 及びRNU06101_1。

【実施例４８】

【０３０８】

ヒトＰＲＯ１３７６をコードするｃＤＮＡクローンの単離

Merck／ワシントン大学を検索し、配列を登録番号W39620として同定した（ソアレス副甲状腺腫瘍タンパク質として同定）。この配列をデータベースに入れ、他の配列と比較して他の配列と整列されることができた。

実施例１に記載したように、phrapを用いて他のＥＳＴ配列に対してコンセンサスＤＮＡ配列を構築した。このコンセンサス配列を、ここでＤＮＡ６７２２１と命名した。

MerckのW39620をコードするクローンを購入して全体を配列決定した。上記のように単離したクローンのＤＮＡ配列決定により、ＤＮＡ６７３００－１６０５[図８９、配列番号：２１７］の全長ＤＮＡ配列；及びＰＲＯ１３７６の誘導タンパク質配列が得られた。

ＤＮＡ６７３００－１６０５の全コード化配列が図８９（配列番号：２１７）に含まれる。クローンＤＮＡ６７３００－１６０５は単一のオープンリーディングフレームを含み、ヌクレオチド位置１０７－１０９に見かけの翻訳開始部位、そしてヌクレオチド位置６２３－６２５に見かけの停止コドンを持つ。予測されるポリペプチド前駆体は１７２アミノ酸長であり、約１９,２０６ダルトンの見積もり分子量及び約５．３６のｐＩを持つ。図９０（配列番号：２１８）に示した全長ＰＲＯ１３７６配列の分析により、種々の重要なポリペプチドドメインの存在が明らかになり、それらの重要なポリペプチドドメインに与えられた位置は、およそ上記の通りである。図９０に示した全長ＰＲＯ１３７６ポリペプチドの分析により、以下の存在が明らかになった：約アミノ酸１～約アミノ酸２３のシグナルペプチド；及び約アミノ酸５８～アミノ酸７５のチオレドキシンファミリータンパク質相同ブロック。クローンＤＮＡ６７３００－１６０５は１９９８年8月２５日にＡＴＣＣに寄託され、ＡＴＣＣ寄託番号２０３１６３が付与された。

図９０（配列番号：２１８）に示した全長配列のWU-BLAST-2配列アラインメント分析を用いたDayhoffデータベース（バージョン35.45 SwissProt 35）の分析により、ＰＲＯ１３７６アミノ酸配列と以下のDayhoff配列との間の有意な相同性が明らかになった：XAG_XENLA, AF025474_1, NP77_XENLA, D69100, S75124, ER60_SCHMA, H69466, A57254, AB002234_1, 及びTATHIORDH_1。

【実施例４９】

【０３０９】

ヒトＰＲＯ１３８７をコードするｃＤＮＡクローンの単離

上記の実施例３に記載した企業のシグナル配列発見アルゴリズムを適用してＤＮＡ６８８７２－１６２０を同定した。上述のシグナル配列アルゴリズムの使用により、IncyteＥＳＴクラスター番号10298と命名されるLIFESEQ(商品名)からのＥＳＴクラスター配列の同定が可能となった。次いでこのＥＳＴクラスター配列を、公的データベース（例えば、GenBank）及び企業のＥＳＴ ＤＮＡデータベース（LIFESEQ(商品名)、Incyte Pharmaceuticals、Palo Alto, CA）を含む種々の発現配列タグ（ＥＳＴ）データベースと比較して、存

在する相同性を同定した。相同体検索は、コンピュータプログラムBLAST又はBLAST2（Altschul等，Methods in Enzymology 266: 460-480 (1996)）を用いて実施した。既知のタンパク質をコードせず、BLASTスコア７０（９０の場合もある）又はそれ以上を持つ比較物は、プログラム「phrap」（Phil Green, University of Washington, Seattle, Washington）で集団化してコンセンサスＤＮＡ配列を構築した。そこから得られたコンセンサス配列を、ここでＤＮＡ５６２５９と命名する。ジェネンテクが独自に開発したEST配列を構築に使用し、ここでＤＮＡ３９５１６と命名する。

ＤＮＡ５６２５９配列とIncyteＥＳＴクローン番号3507924との間の配列相同性に鑑みて、IncyteＥＳＴ番号3507924を購入し、ｃＤＮＡ挿入物を得て配列決定した。このｃＤＮＡ挿入物の配列を図９１（配列番号：２１９）に示し、ここでＤＮＡ６８８７２－１６２０と命名する。

【０３１０】

ＤＮＡ６８８７２－１６２０の全コード化配列が図９１（配列番号：２１９）に含まれる。クローンＤＮＡ６８８７２－１６２０は単一のオープンリーディングフレームを含み、ヌクレオチド位置８５－８７に見かけの翻訳開始部位を持ち、そしてヌクレオチド位置１２６７－１２６９の停止コドンで終端する（図９１）。予測されるポリペプチド前駆体は３９４アミノ酸長である（図９２；配列番号：２２０）。図９２に示す全長ＰＲＯ１３８７タンパク質は、約４４，３３９の見積もり分子量及び約７．１０のｐＩを有する。図９２（配列番号：２２０）に示した全長ＰＲＯ１３８７配列の分析により、種々の重要なポリペプチドドメインの存在が明らかになり、それらの重要なポリペプチドドメインに与えられた位置は、およそ上記の通りである。図９２に示した全長ＰＲＯ１３８７ポリペプチドの分析により、以下の存在が明らかになった：約アミノ酸１～約アミノ酸１９のシグナルペプチド；約アミノ酸２７５～約アミノ酸２９６の膜貫通ドメイン；約アミノ酸７６～約アミノ酸８０、約アミノ酸２３１～約アミノ酸２３５、約アミノ酸３０２～約アミノ酸３０６、約アミノ酸３０７～約アミノ酸３１１、及び約アミノ酸３７６～約アミノ酸３８０のN-グリコシル化部位；約アミノ酸２１０～約アミノ酸２４０及び約アミノ酸９２～約アミノ酸１２２のミエリンＰ０タンパク質相同ブロック。クローンＤＮＡ６８８７２－１６２０は１９９８年8月２５日にＡＴＣＣに寄託され、ＡＴＣＣ寄託番号２０３１６０が付与された。

図９２（配列番号：２２０）に示した全長配列のWU-BLAST-2配列アラインメント分析を用いたDayhoffデータベース（バージョン35.45 SwissProt 35）の分析により、ＰＲＯ１３８７アミノ酸配列と以下のDayhoff配列との間の有意な相同性が明らかになった：P_W36955, MYP0_HETFR, HS46KDA_1, AF049498_1, MYO0_HUMAN, AF030454_1, A53268, SHPTCRA_1, P_W14146, 及びGEN12838。

【実施例５０】

【０３１１】

ヒトＰＲＯ１５６１をコードするｃＤＮＡクローンの単離

実施例１に記載したように、phrapを用いて他のＥＳＴ配列に対してコンセンサスＤＮＡ配列を構築した。このコンセンサス配列を、ここでＤＮＡ４０６３０と命名する。独自に開発したジェネンテクＥＳＴ配列をコンセンサス構築に用い、ここでＤＮＡ４０７５３と命名する。ＤＮＡ４０６３０コンセンサス配列に基づいて、１）ＰＣＲにより対象とする配列を含むｃＤＮＡライブラリを同定するため、及び２）ＰＲＯ１５６１の全長コード化配列のクローンを単離するプローブとして使用するために、オリゴヌクレオチドを合成した。

ＰＣＲプライマー（正方向及び逆方向）の対を合成した：

正方向ＰＣＲプライマー（４９６３０．ｆ１）：

5'-CTGCCTCCACTGCTCTGTGCTGGG-3'（配列番号：２２３）

逆方向ＰＣＲプライマー（４９６３０．ｒ１）：

5'-CAGAGCAGTGGATGTTCCCCTGGG-3'（配列番号：２２４）

さらに、４０６３０ＤＮＡコンセンサス配列から合成オリゴヌクレオチドハイブリダイゼ

ーションプローブを作成し、それは以下のヌクレオチド配列を有していた：
ハイブリダイゼーションプローブ（４９６３０.ｐ１）：
5'-CTGAACAAGATGGTCAAGCAAGTGACTGGGAAAATGCCCATCCTC-3'（配列番号：２２５）
全長クローンの供給源について幾つかのライブラリをスクリーニングするために、ライブラリからのＤＮＡを上で同定したＰＣＲプライマー対でＰＣＲ増幅した。次いで、ポジティブライブラリを、プローブオリゴヌクレオチド及びＰＣＲプライマー対の一方を用いてＰＲＯ１５６１遺伝子をコードするクローンを単離するのに使用した。ｃＤＮＡライブラリの構築のためのＲＮＡはヒト乳房腫瘍組織から単離した。
上記のように単離したクローンのＤＮＡ配列決定により、ＤＮＡ７６５３８－１６７０[図９３、配列番号：２２１］の全長ＤＮＡ配列；及びＰＲＯ１５６１の誘導タンパク質配列が得られた。
【０３１２】
ＤＮＡ７６５３８－１６７０の全コード化配列が図９３（配列番号：２２１）に含まれる。クローンＤＮＡ７６５３８－１６７０は単一のオープンリーディングフレームを含み、ヌクレオチド位置２９－３１に見かけの翻訳開始部位、そしてヌクレオチド位置３７７－３７９に見かけの停止コドンを持つ。予測されるポリペプチド前駆体は１１６アミノ酸長であり、約１２,９１０ダルトンの見積もり分子量及び約６．４１のｐＩを持つ。図９４（配列番号：２２２）に示した全長ＰＲＯ１５６１配列の分析により、種々の重要なポリペプチドドメインの存在が明らかになり、それらの重要なポリペプチドドメインに与えられた位置は、およそ上記の通りである。図９４に示した全長ＰＲＯ１５６１ポリペプチドの分析により、以下の存在が明らかになった：約アミノ酸１～約アミノ酸１７のシグナルペプチド；約アミノ酸８６～アミノ酸９０のN-グリコシル化部位；約アミノ酸２０～約アミノ酸２６及び約アミノ酸４５～約アミノ酸５１のN-ミリストイル化部位；約アミノ酸６３～約アミノ酸７１のホスホリパーゼＡ２ヒスチジン活性部位。クローンＤＮＡ７６５３８－１６７０は１９９８年１０月６日にＡＴＣＣに寄託され、ＡＴＣＣ寄託番号２０３３１３が付与された。
図９４（配列番号：２２２）に示した全長配列のWU-BLAST-2配列アラインメント分析を用いたDayhoffデータベース（バージョン35.45 SwissProt 35）の分析により、ＰＲＯ１５６１アミノ酸配列と以下のDayhoff配列との間の有意な相同性が明らかになった：P_R63053, P_R25416, P_R63055, P_P93363, P_R63046, PA2A_VIPAA, P_W58476, GEN13747, PA2X_HUMAN, 及びPA2A_CRODU。
上記に加えて、配列相同性検索により、ＤＮＡ４０６３０コンセンサス配列とIncyteESTクローン番号1921092との間の有意な相同性が明らかになった。従って、IncyteESｔクローン番号1921092を購入し、挿入物を得て配列決定することにより、図９３（配列番号：２２１）に示すＤＮＡ７６５３８－１６７０を得た。
【実施例５１】
【０３１３】
ヒトＰＲＯ２１６をコードするｃＤＮＡクローンの単離
Swiss-Prot公的データベースからの約９５０の既知の分泌タンパク質からの細胞外ドメイン（ＥＣＤ）配列（あるとすれば分泌シグナル配列を含む）をＥＳＴデータベースの検索に使用した。ＥＳＴデータベースは公的なＥＳＴデータベース（例えばGenBank）及び企業のＥＳＴデータベース（LIFESEQ(商品名)、Incyte Pharmaceuticals、Palo Alto, CA）を含んでいた。検索は、コンピュータプログラムBLAST又はBLAST2［Altschul等, Methods in Enzymology, 266: 460-480(1996)］を用い、ＥＳＴ配列の６フレーム翻訳に対するＥＣＤタンパク質配列の比較として実施した。既知のタンパク質をコードせず、BLASTスコアが７０（９０の場合もある）又はそれ以上となる比較物を、プログラム「phrap」（Phil Green, University of Washington, Seattle, Washington）でコンセンサスＤＮＡ配列に集団化して構築した。
ＤＮＡ３３０８７の完全なｃＤＮＡ配列が登録番号AB000114_1及びAB009589_1（ヒトオステオモジュリン(osteomodulin)）としてGenBankに開示されている。関連しているが異

なるタンパク質、角膜ケラチンリン酸は、Funderburgh等, J. Biol. Chem., 271: 31431-31436 (1996)に開示されている。

コンセンサスＤＮＡ配列は、上記ようにphrapを使用して他のＥＳＴ配列に対して構築した。このコンセンサス配列をここでＤＮＡ２８７５４と命名する。幾つかの場合には、コンセンサス配列はBLAST及びphrapの繰り返しサイクルを用いて伸長させ、上で検討したＥＳＴ配列の供給源を用いて可能な限り伸長させた中間コンセンサスＤＮＡ配列から取り出された

ＤＮＡ２８７５４コンセンサス配列に基づいて、１）ＰＣＲにより対象とする配列を含むｃＤＮＡライブラリを同定するため、及び２）ＰＲＯ２１６の全長コード化配列のクローンを単離するプローブとして使用するために、オリゴヌクレオチドを合成した。正方向及び逆方向ＰＣＲプライマーの対は、一般に２０～３０ヌクレオチドの範囲であり、しばしばおよそ１００－１０００ｂｐ長のＰＣＲ産物を与えるように設計される。プローブ配列は典型的には４０－５５ｂｐ長である。幾つかの場合には、コンセンサス配列が約１－１．５ｋｂｐより大きな場合に更なるオリゴヌクレオチドを合成する。全長クローンについて幾つかのライブラリをスクリーニングするために、ライブラリからのＤＮＡを上掲のAusubel等, Current Protocols in Molecular Biologyに従って、ＰＣＲプライマー対でのＰＣＲ増幅によりスクリーニングした。次いでポジティブライブラリを、プローブオリゴヌクレオチド及びプライマー対の一方を用いた興味ある遺伝子をコードするクローンの単離に使用した。

ＰＣＲプライマーの対（正方向及び逆方向）を合成した：

正方向ＰＣＲプライマー：

5'-TCACGATGATCCTGACAATGC-3'(配列番号：２２８)

逆方向ＰＣＲプライマー：

5'-AATAATGAAGGTCAAAGTGCCCTT-3'(配列番号：２２９)

さらに、次のヌクレオチド配列を持つ合成オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションプローブをコンセンサスＤＮＡ２８７５４配列から構築した：

ハイブリダイゼーションプローブ：

5'-TGCTCCTTCTTGTTCTGGGCTCTCATG-3'(配列番号：２３０)

【０３１４】

ｃＤＮＡライブラリーの構築のためのＲＮＡはヒト胎児腎臓組織から単離した。ｃＤＮＡクローンを単離するために用いたｃＤＮＡライブラリーは、例えば、Invitrogen, San Diego, CAの市販試薬を用いて標準的方法によって作成した。ｃＤＮＡは、ＮｏｔＩ部位を含むオリゴｄＴでプライムし、ＳａｌＩヘミキナーゼ化アダプターの平滑末端で結合させ、ＮｏｔＩで切断し、ゲル電気泳動で適切にサイズ分割をし、決められた方向で適当なクローニングベクター（ｐＲＫＢ又はｐＲＫＤ等；ｐＲＫ５Ｂは、ＳｆｉＩ部位を持たないｐＲＫ５Ｄの前駆体である；Holmes等, Science, 253:1278-1280 (1991)）に独特のＸｈｏｌ及びＮｏｔＩ部位においてクローン化した。

上記のように単離したクローンのＤＮＡ配列決定により、ＰＲＯ２１６ポリペプチドの全長ＤＮＡ配列（ここで、ＤＮＡ３３０８７と命名される[図９５、配列番号：２２６]）及びＰＲＯ２１６ポリペプチドの誘導タンパク質配列が得られた。

上記で同定した全長クローンは、ヌクレオチド位置２６８－２７０に見掛けの翻訳開始部位、及びヌクレオチド位置１５３１－１５３３に停止シグナルを持つ単一のオープンリーディングフレームを有していた（図９５；配列番号：２２６）。予想されるポリペプチド前駆体は、４２１アミノ酸長であり［図９６；（配列番号：２２７）］、約４９,４９２ダルトンの算定分子量及び約５．５１の見積もりｐＩを有する。図９６（配列番号：２２７）に示された全長ＰＲＯ２１６配列の分析により、図９６に示す様々な重要なポリペプチドドメインの存在が証明されたが、それらの重要なポリペプチドドメインに対して与えられる位置はおよそ上記の通りである。全長ＰＲＯ２１６配列（図９６；配列番号：２２７）の分析により以下の存在が証明された：約アミノ酸１１３～約アミノ酸１１７、約アミノ酸１２１～アミノ酸１２５、約アミノ酸１８７～約アミノ酸１９１、約アミノ酸２

４２～約アミノ酸２４６、及び約アミノ酸３１６～約アミノ酸３２０のＮ-グリコシル化部位；約アミノ酸２６８～約アミノ酸２７５及び約アミノ酸３００～約アミノ酸３０７のチロシンキナーゼリン酸化部位；約アミノ酸２３０～約アミノ酸２３６のＮ-ミリストイル化部位；及び約アミノ酸１４６～約アミノ酸１６８及び約アミノ酸２１７～約アミノ酸２３９のロイシンジッパーパターン。クローンＤＮＡ３３０８７は１９９７年１０月１６日にＡＴＣＣに寄託され、ＡＴＣＣ寄託番号２０９３８１が付与された。

このクローンは、I. Ohnoにより１９９６年１２月２６日にGenBankに提出された（AB000114_1）及びI. Ohnoにより１９９７年１２月５日にGenBankに提出された（AB009589-1）ヒトオステオモジュリンと同じである。

【実施例５２】

【０３１５】

心臓新生児肥大の刺激

このアッセイは新生児心臓の肥大を刺激するＰＲＯポリペプチドの能力を測定するように設計されている。１日齢のHarlan Sprague Dawleyラットから筋細胞を得た。細胞（7.5 x10^4/mlで180μl、血清＜0.1%、新たに単離）をDMEM/F12＋4%FCSで予めコートした９６ウェルプレートに１日目に添加した。試験ＰＲＯポリペプチドを含有する試験試料を２日目に20μLの容量でウェルに直接添加した。さらに２日後に細胞をクリスタルバイオレットで染色し、次の日に視覚によりスコアをつけた。インキュベータ条件は重要であり5%のCO_2を含む。

活性基準：1-100μMのフェニルエフリン(phenylephrine)、0.1-1.0μMのＰＧＦ-２アルファ、1-10nMのエンドセリン、1-10nMのCT1（ＬＩＦ）。アッセイ反応にＣａ濃度が重要であるためＰＢＳは含有しない。アッセイ媒体は以下を含む：DMEM/F12（2.44gmの重炭酸塩を含む）、10μg/mlのトランスフェリン、1μg/mlのインシュリン、1μg/mlのアプロチニン、2mmol/Lのグルタミン、100U/mlのペニシリンG、100μg/mlのストレプトマイシン。マンニトール（4%）を含むタンパク質バッファーは1/10（0.4%）及び1/100（0.04%）ではポジティブシグナル（スコア3.5）を与えたが、1/1000(0.004%)では与えなかった。従って、マンニトールを含む試験試料バッファーは実行しなかった。二次アッセイは細胞からの条件培地中でのＥＬＩＳＡによるＡＮＰレベル（ng/ml）の測定からなる。ＡＮＰメッセージの増加は数時間後の細胞からのＰＣＲにより測定できる。

【０３１６】

結果を細胞サイズの視覚的観察により評価し：条件培地についてはスコア=3.5又はそれ以上をポジティブと考え；精製タンパク質についてはスコア＝3.0又はそれ以上をポジティブと考えた。

ＰＲＯ２３１、ＰＲＯ５２６、ＰＲＯ７１３、ＰＲＯ７９２、ＰＲＯ１２４６、及びＰＲＯ１３１２精製ポリペプチドは、下記の表４に示すように、新生児心臓肥大を刺激し、このアッセイでポジティブなスコアがつけられることが観察された。

表 4

心臓新生児肥大の刺激

PRO試料	濃度（又は希釈）	スコア
PRO231	12.0 μM	3.375
PRO526	1%	3.50
PRO713	10.0 nM	3.25
PRO713	10.0 nM	3.25
PRO792	1%	4.50
PRO1246	1%	3.25
PRO1312	85.0 nM	3.375

【実施例５３】

【０３１７】

Ｆ２ａにより誘導された心臓新生児肥大の促進

このアッセイは新生児心臓の肥大を刺激するＰＲＯポリペプチドの能力を測定するように設計されている。１日齢のHarlan Sprague Dawleyラットから筋細胞を得た。細胞（7.5 x10^4/mlで180μl、血清＜0.1%、新たに単離）をDMEM/F12＋4%FCSで予めコートした９６ウェルプレートに１日目に添加した。試験ＰＲＯポリペプチド（20μl/ウェル）を含有する試験試料を１日目にウェルに直接添加した。次いで２日後にＰＧＦ（20μl/ウェル）を最終濃度10^{-6}Mで添加した。次いで細胞を４日目に染色し、５日目にスコアをつけた。視覚的スコアは細胞サイズに基づき、ネガティブ対照に比較してサイズの増加を示さない細胞を0.0とスコア付けし、ネガティブ対照に比較してサイズの小から中程度の増加を示す細胞を1.0とスコア付けし、ネガティブ対照に比較してサイズの大きな増加を示す細胞を2.0とスコア付けした。1.0又はそれ以上のスコアをポジティブと考えた。

アッセイ反応にＣａ濃度が重要であるためＰＢＳは含有しない。プレートはDMEM/F12＋4%FCS（200μl/ウェル）でコートした。アッセイ媒体は以下を含む：DMEM/F12（2.44gmの重炭酸塩を含む）、10μg/mlのトランスフェリン、1μg/mlのインシュリン、1μg/mlのアプロチニン、2mmol/Lのグルタミン、100U/mlのペニシリンＧ、100μg/mlのストレプトマイシン。マンニトール（4%）を含むタンパク質バッファーは1/10（0.4%）及び1/100（0.04%）ではポジティブシグナル（スコア3.5）を与えたが、1/1000(0.004%)では与えなかった。従って、マンニトールを含む試験試料バッファーは実行しなかった。

ＰＲＯ１７９、ＰＲＯ１８２、ＰＲＯ１９５、及びＰＲＯ２２４精製ポリペプチドは、下記の表５に示すように、上記の方法によりアッセイしたときポジティブな結果を示した。

表 5

Ｆ２ａによって誘導される心臓新生児肥大の促進

PRO	濃 度	スコア
PRO179	0.01%	0.0
PRO179	0.10%	0.0
PRO179	1%	1.0
PRO182	0.01%	0.0
PRO182	0.10%	0.0
PRO182	1%	1.0
PRO195	0.01%	0.0
PRO195	0.1%	1.0
PRO195	1%	1.0
PRO224	0.01%	0.0
PRO224	0.10%	0.0
PRO224	1%	1.0

【実施例５４】

【０３１８】

心臓成人肥大の阻害

このアッセイは心臓成人肥大の阻害を測定するように設計されている。心室筋細胞を成体（250g）Harlan Sprague Dawlwyラットから新たに単離し、細胞を2000細胞/180μlウェル容積でプレーティングした。２日目にＰＲＯポリペプチドを含む試験試料（20μｌ）を添加した。５日目に細胞を固定した後に染色した。数時間後に細胞からのＰＣＲによりＡＮＰメッセージの増加も測定できる。結果は細胞サイズの視覚的スコアに基づく：0＝阻害無し、-1＝小さな阻害、-2＝大きな阻害。0未満の祖コアをポジティブと考えた。活性参照は、ポジティブ対照としての0.1mMのフェニルエフィン（ＰＥ）に相当する。2のスコアは極めてポジティブと考える。アッセイ媒体は以下を含む：100mMのインシュリン、0.2%のＢＳＡ、5mMのクレチン、2mMのL-カルニチン、5mMのタウリン、100U/mlのペニシリンG、100μg/mlのストレプトマイシン(ＣＣＴ媒体)中に懸濁したＭ１９９(修飾)-グルタミンフリー、$NaHCO_3$、フェノールレッド。９６ウェルプレートの内側６０ウェルのみを使用した。これらの中で、６ウェルをネガティブ及びポジティブ（ＰＥ）対照用にとっておいた。最初に、視覚的スコア系と平行して感受性の相対的レベルを決定するための定量的ＰＣＲを実行した。

ＰＲＯ２６９及びＰＲＯ３５６は、上記のアッセイで心臓成人肥大の阻害においてポジティブな結果を示した。

【実施例５５】

【０３１９】

内皮細胞増殖の刺激

このアッセイは、ＰＲＯポリペプチドが副腎皮質毛細管内皮細胞（ＡＣＥ）成長を刺激する能力を示すか否かを測定する用に設計されている。

ウシ副腎皮質毛細管内皮（ＡＣＥ）細胞（初代培養からのもの、最大12-14継代）を９６ウェルのプレートにおいて100マイクロリットル当たり500細胞／ウェルでプレーティングした。アッセイ媒体は、低グルコースDMEM、10%子ウシ血清、2mMグルタミン、及び1xペニシリン／ストレプトマイシン／ファンギゾンを含む。対照ウェルは以下を含む：（１）ＡＣＥ細胞無添加；（２）ＡＣＥ細胞のみ；（３）ＡＣＥ細胞＋ＶＥＧＦ(5ng/ml)；及び（４）ＡＣＥ細胞＋ＦＧＦ(5ng/ml)。次いで、対照及び試験試料（100マイクロリットル容量）をウェルに添加した（各々、1%、0.1%及び0.01%希釈）。細胞培地を37℃／5%ＣＯ

$_2$で6-7日間インキュベートした。インキュベーションの後、ウェル中の培地を吸引して細胞をＰＢＳで1x洗浄した。次いで、酸ホスファターゼ反応混合物（100マイクロリットル、0.1M酢酸ナトリウム，pH5.5，0.1% トリトンX-100，10mMのリン酸ｐ-ニトロフェニル）を殻ウェルに添加した。37℃で2時間のインキュベーション後に、10マイクロリットルの1NのNaOHの添加により反応を停止させた。光学密度（ＯＤ）を405nmでマイクロタイタープレートで測定した。

ＰＲＯポリペプチドの活性は、（１）細胞のみのバックグラウンドに対する、及び（２）ＶＥＧＦによる最大阻害に対する（酸ホスファターゼ活性、ＯＤ405nmで測定した）増殖増加の倍数として計算した。最大阻害についての活性参照としてＶＥＧＦ（3-10ng/ml）及びＦＧＦ（1-5ng/ml）を使用した。アッセイの結果は、観察された刺激がバックグラウンドを越えて>=50%である場合に「ポジティブ」と考えた。ＶＥＧＦ（5ng/ml）対照は1%希釈において1.24倍の刺激を与え；ＦＧＢ（5ng/ml）対照は1%希釈において1.46倍の刺激を与えた。

ＰＲＯ１７９、ＰＲＯ２１２、ＰＲＯ１０７５、ＰＲＯ１１５４、ＰＲＯ１２４４、ＰＲＯ１２８６、及びＰＲＯ１３０３は、下記の表６に示すように、「ポジティブ」と検定された。

【０３２０】

表 6

	内皮細胞増殖の刺激	
PRO	濃　度	刺激の倍数
PRO179	0.01%	1.16
PRO179	0.10%	1.57
PRO179	1.0%	1.38
PRO212	0.01%	4.08
PRO212	0.10%	4.73
PRO212	1.0%	4.75
PRO1075	0.01%	4.21
PRO1075	0.10%	4.52
PRO1075	1.0%	3.39
PRO1154	0.0017 nM	4.63
PRO1154	0.017 nM	5.15
PRO1154	0.17 nM	5.53
PRO1244	0.67 nM	4.60
PRO1244	6.7 nM	4.78
PRO1244	67.0 nM	5.24
PRO1286	0.5 nM	4.61
PRO1286	5.0 nM	4.55
PRO1303	0.38 nM	4.29
PRO1303	3.80 nM	4.28
PRO1303	38.0 nM	3.74

【実施例５６】

【０３２１】

血管内皮成長因子（ＶＥＧＦ）に刺激された内皮細胞成長増殖の阻害

内皮細胞のＶＥＧＦ刺激増殖を阻害する様々なＰＲＯポリペプチドの能力を試験した。特に、ウシ副腎皮質毛細管内皮（ＡＣＥ）細胞（初代培養からのもの、最大12-14継代）を９６ウェルのプレートにおいて100マイクロリットル当たり500細胞／ウェルでプレーテ

ィングした。アッセイ媒体は、低グルコースDMEM、10%子ウシ血清（牛胎児ではない）、2mMグルタミン、及び1xペニシリン／ストレプトマイシン／ファンギゾンを含む。対照ウェルは以下を含む：（１)ＡＣＥ細胞無添加；（２）ＡＣＥ細胞のみ；（３）ＡＣＥ細胞＋5ng/mlＦＧＦ；（４）ＡＣＥ細胞＋5ng/mlＶＥＧＦ；（５）ＡＣＥ細胞＋3ng/mlＶＥＧＦ＋1ng/mlＴＧＴ-ベータ；及び（６）ＡＣＥ細胞＋3ng/mlＶＥＧＦ＋5ng/mlＬＩＦ。次いで、試験試料、ポリ-HisタグＰＲＯポリペプチド（100マイクロリットル容量）をウェルに添加した（各々、1%、0.1%及び0.01%希釈）。細胞培地を37℃／5%CO_2で6-7日間インキュベートした。インキュベーションの後、ウェル中の培地を吸引して細胞をＰＢＳで1x洗浄した。次いで、酸ホスファターゼ反応混合物（100マイクロリットル、0.1M酢酸ナトリウム，pH5.5，0.1% トリトンX-100，10mMのリン酸ｐ-ニトロフェニル）を各ウェルに添加した。37℃で2時間のインキュベーション後に、10マイクロリットルの1NのNaOHの添加により反応を停止させた。光学密度（ＯＤ）を405nmでマイクロタイタープレートで測定した。

ＰＲＯポリペプチドの活性は、刺激なしの細胞に対する、（OD405nmでの酸性ホスファターゼ活性を測定したときの）ＶＥＧＦ（3ng/ｍｌ）刺激増殖の阻害パーセントとして計算した。ＴＧＦ-ベータは、ＶＥＧＦ-刺激ＡＣＥ細胞増殖の70-90%をブロックするため、ＴＧＦ-ベータを1ng/mlにおいて活性対照として用いた。以下の表７に示す結果は、癌治療、特に腫瘍血管形成の阻害におけるＰＲＯポリペプチドの有用性を示す。表７に示される数値（相対的阻害）は、刺激なしの細胞に対するＰＲＯポリペプチドによるＶＥＧＦ刺激増殖の阻害パーセントを算定し、次いでＶＥＧＦ刺激細胞増殖の70-90%を阻害することが知られている１ng/mlのＴＧＦ-βにより得られた阻害パーセントでそのパーセントを割ることにより決定される。結果は、ＰＲＯポリペプチドが内皮細胞成長のＶＥＧＦ刺激の30%又はそれ以上の阻害を示した場合（30%以上の相対的阻害）をポジティブと考えた。

【０３２２】

表 7

ＶＥＧＦ刺激内皮細胞増殖の阻害

PRO名称	PRO濃度	相対的%阻害
PRO187	0.01%	91
PRO187	0.10%	82
PRO187	1.0%	44
PRO214	0.01%	68
PRO214	0.10%	91
PRO214	1.0%	94
PRO216	0.01%	96
PRO216	0.10%	81
PRO216	1.0%	31
PRO216	0.01%	104
PRO216	0.10%	93
PRO216	1.0%	50
PRO323	0.01%	59
PRO323	0.10%	93
PRO323	1.0%	91
PRO812	0.025 nM	101
PRO812	0.25 nM	101
PRO812	2.5 nM	96
PRO1246	0.007 nM	90
PRO1246	0.07 nM	87
PRO1246	0.70 nM	60
PRO1246	0.007 nM	99
PRO1246	0.07 nM	94
PRO1246	0.70 nM	73

【実施例５７】

【０３２３】

内皮細胞におけるｃ-ｆｏｓの誘導

このアッセイはＰＲＯポリペプチドが内皮細胞においてｃ-ｆｏｓを誘導する能力を示すか否を決定するために設計されている。

成長培地（50%のハムのＦ１２ｗ／ｏＧＨＴ：低グルコース、及びグリシンなしの50%ＤＭＥＭ：$NaHCO_3$、1%グルタミン、10mMのＨＥＰＥＳ、10%のＦＢＳ、10ng/mlのｂＦＧＦ）中のヒト静脈臍静脈内皮細胞（HUVEC, Cell Systems）を$1x10^4$細胞／ウェルの細胞密度で９６ウェルマクロタイタープレートにプレーティングした。プレーティングの次の日、成長培地を除き、細胞を100μｌ／ウェルの試験試料と対照（ポジティブ対照：成長培地；ネガティブ対照：10mMのＨＥＰＥＳ、140mMのＮａＣｌ、4%（w/v）マンニトール、pH6.8）で処理することにより、細胞を飢餓させた。細胞を5%CO_2中で37℃において30分間インキュベートした。試料を取り除いて、ＤＮＡキットプロトコール（Chiron Diagnostics, cat.#6005-037）の最初の部分に従った。ここで、下記の各大文字の試薬／バッファーはキットから利用可能であった。

簡単には、試験に必要なＴＭ溶菌バッファー(TM Lysis Buffer)及びプローブの量を製造者により提供された情報に基づいて計算した。適当な量の解凍プローブをＴＭ溶菌バッファーに添加した。捕獲ハイブリダイゼーションバッファー(Capture Hybridization Buffer)を室温まで温めた。ｂＤＮＡ条片を金属条片ホルダーにセットアップし、100μｌの捕獲ハイブリダイゼーションバッファーを必要な各ｂ-ＤＮＡウェルに添加し、少なくと

も30分インキュベートした。細胞内の試験プレートをインキュベータから取り除き、真空マニフォールドを使用して培地を穏やかに除いた。マイクロタイタープレートの各ウェルに100μｌのプローブを伴う溶菌ハイブリダイゼーションバッファーを各ｂ-ＤＮＡウェルにピペットで素早く添加した。ついで、プレートを15分間55℃でインキュベートした。インキュベーターからの取り出し、マイクロタイターアダプターヘッドを備えたボルテックスミキサーにプレートを配し、1分の間、#2の設定でボルテックスした。80μｌの溶菌液を取り除き、捕獲ハイブリダイゼーションバッファーを含むｂＤＮＡウェルに添加し、ピペットで上下して混合した。プレートを少なくとも16時間の間53℃でインキュベートした。

【０３２４】

次の日に、ｂＤＮＡキットプロトコールの第２の部分に従った。すなわち、プレートをインキュベーターから取り除き、ベンチに配置して10分間冷却した。必要な添加の容積は製造者により適用された情報に基づいて計算した。ＡＬハイブリダイゼーションバッファー中に1:100の希釈のアンプリファイアー濃縮物（Amplifier Concentrate）（20fm/μｌ）を作成することにより50μｌのアンプリファイアー作用液を調製した。ついで、プレートをインキュベーターから取り除いて10分間冷却した。標識プローブ作用液を、ＡＬハイブリダイゼーションバッファー中に1:100の希釈で標識濃縮物（40pmoles/μｌ）を作成することにより調製した。10分の冷却期間後、アンプリファイアーハイブリダイゼーション混合物を除去し、プレートを洗浄剤Ａで2回洗浄した。50μｌの標識プローブ作用液を各ウェルに添加し、ウェルを53℃で15分間インキュベートした。10分間の冷却後、基質を室温まで温めた。アッセイに必要な各モルの基質に3μｌの基質エンハンサーを添加して、プレートを10分間冷却し、標識ハイブリダイゼーション混合物を取り除き、プレートを洗浄剤Ａで2回、洗浄剤Ｄで3回洗浄した。50μｌのエンハンサーを伴う基質溶液を各ウェルに添加した。プレートを37℃で30分間インキュベートし、ＲＬＵを適当な照度計で読みとった。

複製を平均化し変動係数を決定した。ネガティブ対照（上述のプロテイン３２／ＨＥＰＥＳバッファー）値に対する増加倍数の活性の測定は化学発光単位（ＲＬＵ）によって示された。結果を下記の表８に示し、ネガティブ対照値に対して少なくとも２倍の値を示す試料はポジティブと考えた。

ネガティブ対照＝1.00%希釈で1.00RLU。ポジティブ対照＝1.00%希釈で8.39RLU。

【０３２５】

表 8

内皮細胞におけるc-fosの誘導

PRO名称	PRO濃度	RLU値
PRO287	0.018 nM	2.06
PRO287	0.18 nM	1.89
PRO287	1.8 nM	1.73
PRO287	0.18 nM	1.64
PRO287	1.8 nM	2.14
PRO538	0.2149 nM	1.95
PRO538	2.149 nM	2.15
PRO538	21.49 nM	1.46
PRO538	0.2149 nM	2.38
PRO538	2.149 nM	2.42
PRO538	21.49 nM	2.84
PRO713	0.022 nM	1.95
PRO713	0.22 nM	2.17
PRO713	2.2 nM	2.13
PRO713	0.022 nM	2.66
PRO713	0.22 nM	2.52
PRO713	2.2 nM	2.69
PRO788	0.29 nM	1.23
PRO788	2.9 nM	2.65
PRO788	29.0 nM	0.93
PRO865	0.027 nM	1.98
PRO865	0.27 nM	3.09
PRO865	2.7 nM	2.90
PRO865	0.027 nM	2.88
PRO865	0.27 nM	2.19
PRO865	2.7 nM	2.64
PRO1126	0.029 nM	1.94
PRO1126	0.29 nM	2.33
PRO1126	2.9 nM	1.81
PRO1130	0.6 nM	1.89
PRO1130	6.0 nM	2.04
PRO1130	60.0 nM	2.06
PRO1274	0.365 nM	0.86
PRO1274	3.65 nM	1.14
PRO1274	36.5 nM	2.11

PRO1274	0.365 nM	2.04
PRO1274	3.65 nM	1.86
PRO1274	36.5 nM	2.41
PRO1294	0.13 nM	2.38
PRO1294	1.3 nM	2.23
PRO1294	13.0 nM	1.39
PRO1294	0.13 nM	2.78
PRO1294	1.3 nM	2.53
PRO1294	13.0 nM	1.39
PRO1304	0.074 nM	1.72
PRO1304	0.74 nM	2.08
PRO1304	7.4 nM	1.41
PRO1304	0.074 nM	2.66
PRO1304	0.74 nM	1.75
PRO1304	7.4 nM	1.45
PRO1376	0.86 nM	1.41
PRO1376	8.6 nM	2.20
PRO1376	86.0 nM	2.59
PRO1376	0.86 nM	1.43
PRO1376	8.6 nM	2.28
PRO1376	86.0 nM	1.49
PRO1387	0.1 nM	2.19
PRO1387	1.0 nM	1.81
PRO1387	10.0 nM	2.45

【実施例５８】

【０３２６】

ヒト静脈内皮細胞Ｃａフラックスアッセイ

このアッセイは、ＰＲＯポリペプチドがヒトの臍静脈内皮細胞（HUVEC, Cell Systems）におけるカルシウムフラックスを刺激する能力を示すか否かを決定するために設計されている。Ｃａ流入(influx)は、ある種のリガンドがそのレセプターに結合する際の良好に実証された反応である。このＣａ流入アッセイにおいてポジティブ反応をもたらす試験化合物は、特定のレセプターに結合してヒト内皮細胞における生物学的シグナル伝達経路を活性化すると言える。これは究極的に、例えば細胞分裂、細胞増殖の阻害、内皮管形成、細胞泳動、アポトーシスを誘導しうる。

成長培地（50:50グリシン無し、1%グルタミン、10mMのHepes、10%FBS、10ng/mlのbFGF）中のヒト静脈の臍静脈内皮細胞（HUVEC, Cell Systems）を、９６ウェルのmicrotiter View Plate-96（Packard Instrument Company Part#6005182）マイクロタイタープレートに$2x10^4$細胞／ウェルの細胞密度でプレーティングした。プレーティングの次の日、細胞をバッファー（HBSS＋10mMのHepes）で3回洗浄し、100μｌ／ウェルを残した。次いで100μｌ／ウェルの8μMのＦｌｕｏ-３（2x）を添加した。細胞を37℃/5%CO_2において1.5時間インキュベートした。インキュベーションの後、細胞をバッファー（上記）で3x洗浄し、100μｌ／ウェルを残した。ＰＲＯポリペプチドの試験試料は、異なる９６ウェルプレート上で、バッファー中5x濃度で調製した。ポジティブ対照は50μMイオノマイシン（5x）に相当し；ネガティブ対照はプロテイン３２に相当する。細胞プレート及び試料プレートをＦＬＩＰＲ（Molecular Devices）マシンで走らせた。ＦＬＩＰＲマシンは25μｌの試験試料を細胞に添加し、2秒ごとに1分間、次いで3秒ごとに3分間読み取りを行った。

曲線のベースラインから最大値まで上昇する蛍光変化（Δ変化）を計算し、複製を平均化した。蛍光増加の速度を監視し、1000より大きなΔ変化及び60秒以内の上昇を有する試料のみをポジティブと考えた。下記の表９において、結果はポジティブ対照に対して表現した。

【０３２７】

表 9

ヒト静脈内皮細胞Ｃａフラックスアッセイ

PRO名称	PRO濃度	蛍光における相対的Δ
PRO179	0.01%	1.0
PRO179	0.10%	1.0
PRO179	1.0%	3.0
PRO179	0.01%	1.0
PRO179	0.10%	1.0
PRO179	1.0%	3.0
PRO245	0.093 nM	1.0
PRO245	0.93 nM	1.0
PRO245	9.3 nM	2.0
PRO771	0.075 nM	1.0
PRO771	0.75 nM	1.0
PRO771	7.5 nM	2.0
PRO1313	0.611 nM	1.0
PRO1313	6.11 nM	1.0
PRO1313	61.1 nM	4.0
PRO1313	0.611 nM	1.0
PRO1313	6.11 nM	1.0
PRO1313	61.1 nM	3.0
PRO1376	0.86 nM	1.0
PRO1376	8.6 nM	1.0
PRO1376	86.0 nM	2.0
PRO1376	0.86 nM	1.0
PRO1376	8.6 nM	1.0
PRO1376	86.0 nM	2.0
PRO1561	0.023 nM	1.0
PRO1561	0.23 nM	1.0
PRO1561	23.0 nM	2.0

【実施例５９】

【０３２８】

内皮細胞アポトーシスの誘導

内皮細胞においてアポトーシスを誘導するＰＲＯポリペプチドの能力をヒト静脈の臍静脈内皮細胞（HUVEC, Cell Systems）中で試験した。

細胞を９６ウェルマイクロたーたープレート（Amersham Life Science, cytostar-Tシンチレーティングマイクロプレート、無菌、組織培地処理、個々にラッピング）で10%の血清（CSG-媒体、Cell Systems）中、ウェル当たり$2x10^4$細胞の密度で全容量100μｌでプレーティングした。２日目に、ＰＲＯポリペプチドを含有する試験試料を1%、0.33%及び0.11%希釈の３段階で添加した。細胞無しのウェルをブランクとして用い、細胞のみのウェルをネガティブ対照として用いた。ポジティブ対照としてスタウロスポリンの３ｘストックの1:3連続希釈50μｌを用いた。ＰＲＯポリペプチドのアポトーシスを誘導する能力は、

カルシウム及びリン脂質結合タンパク質のメンバーであるアネキシンＶの検出のために９６ウェルをプロセッシングしてアポトーシスを検出することにより決定した。

0.2mlのアネキシンＶ-ビオチンのストック溶液（100μg/ml）を、4.6mlの2 x Ca^{2+}結合バッファー及び2.5%BSA中に希釈した(1:25希釈)。50μlの希釈アネキシンＶ-ビオチン液を、1.0μg/mlの最終濃度になるまで各ウェル（対照を除く）に添加した。試料を^{35}Ｓ-ストレプトアビジンの直接添加の前にアネキシン-ビオチンと共に10-15分間インキュベートした。^{35}Ｓ-ストレプトアビジンは2 x Ca^{2+}結合バッファー、2.5%BSA中に希釈し、最終濃度が3 x 10^4cpm／ウェルになるまで全てのウェルに添加した。次いでプレートを密封し、1000rpmで15分間遠心分離し、2時間の間、軌道シェイカー上に配した。分析は1450 Microbeta Trilux (Wallac)で実施した。バックグラウンドを越えるパーセントがネガティブ対照を越える毎分当たりのカウントのパーセント量を表す。バックグラウンドを越えるパーセントが30%以上のものがポジティブであると考えられる。

ＰＲＯ１７８、ＰＲＯ１７９、ＰＲＯ１８８、ＰＲＯ２１７、ＰＲＯ２６１、ＰＲＯ３０１、ＰＲＯ５３８、及びＰＲＯ７１９は、上記のアッセイにおいてポジティブな結果を与えた（内皮細胞アポトーシスを誘導した）。

【実施例６０】

【０３２９】

内皮細胞アポトーシスの誘導（ＥＬＩＳＡ）

内皮細胞においてアポトーシスを誘導するＰＲＯポリペプチドの能力を、100ng/mlのＶＥＧＦ、0.1%のＢＳＡ、1Xｐｅｎｎ／ｓｔｒｅｐを補充した0%血清培地中で９６ウェルフォーマットを使用して、ヒト静脈の臍静脈内皮細胞（HUVEC, Cell Systems）中で試験した。使用した９６ウェルプレートはFalconにより製造された（番号3072）。９６ウェルのコーティングは、ＰＢＳ溶液中の0.2%ゼラチン100μlで＞30分間ゼラチン化を起こすことにより調製した。ゼラチン混合物を全部吸引した後、10%血清含有培地中で最終濃度2x104細胞/mlの最終濃度－ウェル当たり100μl容量でプレーティングした。対象とするＰＲＯポリペプチドを含有する試験試料を添加する前に細胞を24時間成長させた。

全てのウェルに、100ng/mlのＶＥＧＦ、0.1%のＢＳＡ、1Xｐｅｎｎ／ｓｔｒｅｐを補充した0%血清培地中100μlを添加した。ＰＲＯポリペプチドを含有する試験試料を1%、0.33%及び0.11%の希釈で三つ組で添加した。細胞の無いウェルをブランクとして使用し、細胞だけのウェルをネガティブ対照として使用した。ポジティブ対照として、3x原液のスタウロスポリンの50μlの1:3の連続希釈物を使用した。ＥＬＩＳＡに先立って、細胞を24から35時間インキュベートした。

ＥＬＩＳＡを、Boehringer マニュアル［Boehringer, 細胞死検出ELISA plus, カタログ番号1920685］に従ってアポトーシス調製溶液のレベルを決定するのに使用した。試料調製：９６ウェルプレートを1krpmで10分間スピン沈降させ（200g）、高速反転により上清を除去し、プレートをペーパータオル上に上下逆に置いて残りの液体を除去した。各ウェルに、100μlの1X溶菌バッファーを添加して振盪させずに30分間室温でインキュベートした。プレートを1krpmで10分間スピン沈降させ、20μlの溶菌液（細胞質画分）をストレプトアビジン被覆ＭＴＰに移した。80μlの免疫試薬混合物を各ウェルで20μl溶菌液に加えた。ＭＴＰを粘着性ホイルでカバーし、それを軌道振盪機（200rpm）に配することにより2時間室温でインキュベートした。2時間後、上清を吸引により除去し、ウェル当たり250μlの1Xインキュベーションバッファーで3回ウェルをリンスした（吸引で除去した）。各ウェルに基質溶液を添加し（100μl）、軌道振盪機で室温において250rpmで、光度測定分析に十分な発色がされるまでインキュベートした（約10-20分後）。参照波長492nmとして405nmでプレートを読むのに９６ウェルリーダーを用いた。ＰＩＮ３２（対照バッファー）について得られたレベルを100%に設定した。レベル＞130%の試料をアポトーシス誘導についてのポジティブと考えた。

ＰＲＯ１７２及びＰＲＯ２３５は、上記のＥＬＩＳＡアッセイによって測定したときにポジティブな結果を与えた。

【実施例６１】

【０３３０】
内皮細胞アポトーシスの検出（ＦＡＣＳ）
内皮細胞においてアポトーシスを誘導するＰＲＯポリペプチドの能力を、10継代未満のＨＵＶＥ細胞を用いてゼラチン化Ｔ-１７５フラスコ内でのヒト静脈の臍静脈内皮細胞（HUVEC, Cell Systems）中で試験した。１日目に細胞を分裂させ［6cmのゼラチン化ディッシュ当たり420,000細胞-（11x10^{3}細胞/cm^{2}Falcon, Pharmacia）］、血清（CS-C, Cell System）含有培地中で終夜又は16～24時間成長させた。
２日目に、細胞を5mlのＰＢＳで洗浄し；3mlの0%血清培地をＶＥＧＦ（100ng/ml）とともに添加し；そして30μlのＰＲＯ試験化合物（最終希釈1%）を添加した。細胞を含む混合物、培地お試験ＰＲＯ化合物を回収の前に48時間インキュベートした。
次いで細胞をＦＡＣＳ分析のために回収した。培地を吸引し、細胞をＰＢＳで1回洗浄した。Ｔ-１７５フラスコ内で細胞に5mlの1xトリプシンを添加し、細胞をそれらがプレートから放出されるまで（約5-10分間）放置した。5mlの成長培地を添加することによりトリプシン化を停止させた。細胞を4℃において1000rpmで5分間スピンさせた。培地を吸引し、10mlの10%血清補充培地（Cell Systems）中に細胞を再懸濁させ、5μlのアネキシン-ＦＩＴＣ（Bio Vison）を添加して冷却管をＦＡＣＳに提示した。
ＰＲＯ３３１及びＰＲＯ３６４は、上記のアッセイによってポジティブな結果を与えた。
【実施例６２】
【０３３１】
インサイツハイブリダイゼーション
インサイツハイブリダイゼーションは、細胞又は組織調製物内での核酸配列の検出及び位置測定のための強力で多用途の技術である。それは、例えば、遺伝子発現部位の同定、転写物の組織分布の分析、ウイルス感染の同定と位置測定、特定のｍＲＮＡ合成における変化の追跡及び染色体マッピングにおける補助に有用である。
インサイツハイブリダイゼーションは、Lu及びGillett, Cell Vision 1: 169-176 (1994)のプロトコールの最適化バージョンに従って、ＰＣＲ生成^{33}Ｐ-標識リボプローブを用いて実施される。簡単には、ホルマリン固定、パラフィン包埋ヒト組織を切片化し、脱パラフィンし、プロテイナーゼＫ（20g/ml）で15分間37℃で脱タンパクし、さらに上掲のLu及びGillettに記載されたようにインサイツハイブリダイゼーションする。(^{33}-Ｐ)ＵＴＰ-標識アンチセンスリボプローブをＰＣＲ産物から生成し、５５℃で終夜ハイブリダイゼーションする。スライドをKodak NTB2^{TM}核トラックエマルションに浸漬して４週間露出する。
【０３３２】
^{33}Ｐ-リボプローブ合成
6.0μl（125mCi）の^{33}Ｐ-ＵＴＰ（Amersham BF 1002, SA＜2000 Ci/mmol）をスピード真空乾燥させた。乾燥^{33}Ｐ-ＵＴＰを含む各管に以下の成分を添加した：
2.0μlの5x転写バッファー
1.0μlのＤＴＴ（100mM）
2.0μlのＮＴＰ混合物（2.5mM: 各10μlの10mM GTP, CTP及びATP+10μlのH_2O）
1.0μlのＵＴＰ（50μM）
1.0μlのＲＮＡｓｉｎ
1.0μlのＤＮＡテンプレート（1μg）
1.0μlのH_2O
1.0μlのＲＮＡポメラーゼ（ＰＣＲ産物についてT3＝AS, T7=S,通常）
管を３７℃で１時間インキュベートし、1.0μlのRQ1 ＤＮａｓｅを添加し、次いで３７℃で１５分間インキュベートした。90μlのＴＥ（10mMトリスpH7.6／1mMのＥＤＴＡpH8.0）を添加し、混合物をDE81紙にピペットした。残りの溶液をMicrocon-50限外濾過ユニットに負荷し、プログラム１０を用いてスピンさせた（6分間）。濾過ユニットを第２の管に変換し、プログラム２を用いてスピンさせた（3分間）。最終回収スピンの後、100μl

のＴＥを添加した。1μｌの最終生成物をDE81紙にピペットし6mlのBIOFLUOR II™で数えた。

プローブをＴＢＥ／尿素ゲル上で走らせた。1-3μｌのプローブ又は5μｌのＲＮＡ ＭｒｋＩＩＩを3μｌの負荷バッファーに添加した。加熱ブロック上で95℃に３分間加熱した後、ゲルを即座に氷上に置いた。ゲルのウェルをフラッシングし、試料を負荷し、180-250ボルトで45分間走らせた。ゲルをサランラップでラップし、－70℃冷凍機内で補強スクリーンを持つＸＡＲフィルムに１時間から終夜露出した。

【０３３３】

^{33}Ｐ-ハイブリダイゼーション

Ａ．凍結切片の前処理

スライドを冷凍機から取り出し、アルミニウムトレイに配置して室温で５分間解凍した。トレイを55℃のインキュベータに5分間配置して凝結を減らした。スライドを蒸気フード内において4%パラホルムアルデヒド中で5分間固定し、0.5ｘＳＳＣで5分間室温で洗浄した（25ml 20xSSC + 975ml SQ H_2O）。0.5μg/mlのプロテイナーゼ中、３７℃で１０分間の脱タンパクの後（250mlの予備加熱ＲＮａｓｅ無しＲＮａｓｅバッファー中の10mg/mlストック12.5μl）、切片を0.5ｘＳＳＣで10分間室温で洗浄した。切片を、70%、95%、100%エタノール中、各2分間脱水した。

Ｂ．パラフィン包埋切片の前処理：

スライドを脱パラフィンし、ＳＱ H_2O中に配置し、2ｘＳＳＣで室温において各々５分間２回リンスした。切片を20μg/mlのプロテイナーゼＫ（250ｍｌのＲＮａｓｅ無しＲＮａｓｅバッファー中10mg/mlを500μｌ；３７℃、１５分間）－ヒト胚又は８ｘプロテイナーゼＫ（250mlのＲＮａｓｅバッファー中100μl、３７℃、３０分間）－ホルマリン組織で脱タンパクした。続く0.5ｘＳＳＣでのリンス及び脱水は上記のように実施した。

【０３３４】

Ｃ．プレハイブリッド化：

スライドをＢｏｘバッファー（4ｘＳＳＣ、50%ホルムアミド）－飽和濾紙で列を作ったプラスチックボックスに並べた。組織を50μｌのハイブリダイゼーションバッファー（3.75gデキストラン硫酸＋6mlＳＱ H_2O）で被覆し、ボルテックスし、キャップを外して2分間マイクロ波で加熱した。氷上で冷却した後、18.75mlのホルムアミド、3.75ｍｌの20ｘＳＳＣ及び9mlのＳＱ H_2Oを添加し、組織を良くボルテックスし、42℃で1-4時間インキュベートした。

Ｄ．ハイブリダイゼーション：

スライド当たり$1.0x10^6$ cpmのプローブ及び1.0μｌのｔＲＮＡ（50mg/mlストック）を95℃で3分間加熱した。スライドを氷上で冷却し、スライド当たり48μｌのハイブリダイゼーションバッファーを添加した。ボルテックスの後、50μｌの^{33}Ｐ混合物をスライド上のプレハイブリッド50μｌに添加した。スライドを55℃で終夜インキュベートした。

Ｅ．洗浄：

洗浄は、2xＳＳＣ、ＥＤＴＡで2x10分間、室温で実施し（400mlの20ｘSSC＋16mlの0.25M EDTA、Ｖｆ＝4L）、次いでＲＮａｓｅＡ処理を37℃で30分間行った（250mlＲＮａｓｅバッファー中10mg/mlを500μｌ＝20μg/ml）。スライドを2x10分間、ＥＤＴＡで室温において洗浄した。ストリンジェントな洗浄条件は次の通り：55℃で2時間、0.1xＳＳＣ、ＥＤＴＡ（20mlの20ｘSSC＋16mlのEDTA、V_f＝4L）。

【０３３５】

Ｆ．オリゴヌクレオチド

ここに開示したＤＮＡ配列の二つについてインサイツ分析を実施した。これらの分析に対して用いたオリゴヌクレオチドは次の通りである：

（１）ＤＮＡ２３３３９－１１３０（ＰＲＯ１７８）

p1：

5'-GGA TTC TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC CAC GGG CGC TGT GTG CTG GAG-3'(配列番号：２３１)

p2：
5'-CTA TGA AAT TAA CCC TCA CTA AAG GGA TGG TGG GGA CCG CAG GGT GAC-3'(配列番号：２３２)
p3：
5'-GGA TTC TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC CCG CCA CGA GGA GCT GTT ACG-3'(配列番号：２３３)
p4：
5'-CTA TGA AAT TAA CCC TCA CTA AAG GGA TGA CCT GCA GGC ATG GGA GAA-3'(配列番号：２３４)
p5：
5'-GGA TTC TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC GGC CGC CAC GAG GAG CTG TTA-3'(配列番号：２３５)
p6：
5'-CTA TGA AAT TAA CCC TCA CTA AAG GGA GGG GCT CTG GGG CTG GGT C-3'(配列番号：２３６)
（２）ＤＮＡ２８４９７－１１３０（ＰＲＯ１８８）
p1：
5'-GGA TTC TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC CAA CAC CAA GGG GCA AGA TG-3'(配列番号：２３７)
p2：
5'-CTA TGA AAT TAA CCC TCA CTA AAG GGA GGG CTT TTG GTG GGA GAA GTT-3'(配列番号：２３８)
（３）ＤＮＡ３０９４２－１１３４（ＰＲＯ２１２）
p1：
5'-GGA TTC TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC TCG CTG CTG TGC CTG GTG TTG-3'(配列番号：２３９)
p2：
5'-CTA TGA AAT TAA CCC TCA CTA AAG GGA CCG CTG CAG CCT CTT GAT GGA-3'(配列番号：２４０)
【０３３６】
（４）ＤＮＡ３２２８６－１１９１（ＰＲＯ２１４）
p1：
5'-GGA TTC TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC CCC TCC TGC CTT CCC TGT CC-3'(配列番号：２４１)
p2：
5'-CTA TGA AAT TAA CCC TCA CTA AAG GGA GTG GTG GCC GCG ATT ATC TGC-3'(配列番号：２４２)
（５）ＤＮＡ３３０９４－１１３１（ＰＲＯ２１７）
p1：
5'-GGA TTC TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC TCA GAA AAG CGC AAC AGA GAA-3'(配列番号：２４３)
p2：
5'-CTA TGA AAT TAA CCC TCA CTA AAG GGA TGT CTT CCA TGC CAA CCT TC-3'(配列番号：２４４)
（６）ＤＮＡ３３２２１－１１３３（ＰＲＯ２２４）
p1：
5'-GGA TTC TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC GCA GCG ATG GCA GCG ATG AGG-3'(配列番号：２４５)
p2：
5'-CTA GAA ATT AAC CCT CAC TAA AGG GAC AGA CGG GGC AGC AGG GAG TG-3'(配列番号：

２４６）
【０３３７】
（７）ＤＮＡ３５６３８－１１４１（ＰＲＯ２４５）
p1：
5'-GGA TTC TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC GGG AAG ATG GCG AGG AGG AG-3'(配列番号：２４７)
p2：
5'-CTA TGA AAT TAA CCC TCA CTA AAG GGA CCA AGG CCA CAA ACG GAA ATC-3'(配列番号：２４８)
（８）ＤＮＡ３３３４７３－１１７６（ＰＲＯ２６１）
p1：
5'-GGA TTC TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC GCG AGG ACG GCG GCT TCA-3'(配列番号：２４９)
p2：
5'-CTA TGA AAT TAA CCC TCA CTA AAG GGA AGA GTC GCG GCC GCC CTT TTT-3'(配列番号：２５０)
（９）ＤＮＡ４０６２８－１２１６（ＰＲＯ３０１）
p1：
5'-GGA TTC TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC GAG TCC TTC GGC GGC TGT T-3'(配列番号：２５１)
p2：
5'-CTA TGA AAT TAA CCC TCA CTA AAG GGA CGG GTG CTT TTG GGA TTC GTA-3'(配列番号：２５２)
【０３３８】
（１０）ＤＮＡ４７３６５－１２０６（ＰＲＯ３６４）
p1：
5'-GGA TTC TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC AAC CCG AGC ATG GCA CAG CAC-3'(配列番号：２５３)
p2：
5'-CTA TGA AAT TAA CCC TCA CTA AAG GGA TCT CCC AGC CGC CCC TTC TC-3'(配列番号：２５４)
（１１）ＤＮＡ２９１０１－１１２２（ＰＲＯ７１３）
p1：
5'-GGA TTC TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC GGC GGA ATC CAA CCT GAG TAG-3'(配列番号：２５５)
p2：
5'-CTA TGA AAT TAA CCC TCA CTA AAG GGA GCG GCT ATC CTC CTG TGC TC-3'(配列番号：２５６)
（１２）ＤＮＡ３３０８７（ＰＲＯ２１６）
p1：
5'-GGA TTC TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC CCC GAG TGT TTT CCA AGA-3'(配列番号：２５７)
p2：
5'-CTA TGA AAT TAA CCC TCA CTA AAG GGA CAA GTT TAC TAG CCC ATC CAT-3'(配列番号：２５８)
p3：
5'-GGA TTC TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC TGG ATG GGC TAG TAA ACT TGA-3'(配列番号：２５９)
p4：
5'-CTA TGA AAT TAA CCC TCA CTA AAG GGA CCC TTC TGC TCC TTC TTG TT-3'(配列番号：

２６０）

【０３３９】

Ｇ．結果

ここに開示した上記の１２のＤＮＡ配列についてインサイツ分析を実施した。これらの分析からの結果は次の通りである：

（１）ＤＮＡ２３３９－１１３０（ＰＲＯ１７８）

胎児の下肢において、骨格筋と骨（初期骨膜）との間の結合組織界面で顕著な発現パターンが観察された。また発現は脈管組織に隣接しても観察され、よって血管形成に関連している可能性が示された。体壁では、下肢発現に類似した発現パターンが観察された。発現は気管の平滑筋で見られた。また、発現は固有層の平滑筋／結合組織における小腸及び胃で見られた。臍静脈平滑筋もポジティブであった。発育中の下肢、腸及び体壁における高度に組織化された発現パターンは、これらの部位における顕著な役割を示唆している。可能性は、血管形成及びパターニングを含んでいる。

胎児の胸腺の髄並びに胎児脳の大脳皮質（皮質性ニューロン）において発現が増加する可能性が見られた。以下の胎児組織はポジティブな結果を示さなかった：脊髄、甲状腺、副甲状腺、肝臓及び胎盤。

全ての成人組織はネガティブであると試験された。

【０３４０】

（２）ＤＮＡ２８４９７－１１３０（ＰＲＯ１８８）

胎児の下肢では、軟骨内骨形成の部位において、発育中の骨の骨細胞及び骨膜／軟骨膜において高い発現が観察された。この分布は、骨形成／分化における役割を示唆している。甲状腺上皮細胞に全体に発現の僅かな増加が見られた。体壁では、骨細胞並びに発育中の骨の骨膜／軟骨膜おいて高い発現が観察された。このことは、骨形成及び分化における役割を示唆している。以下の胎児組織では発現は見られなかった：胸腺、気管、脳（大脳皮質）、脊髄、小腸、副腎、肝臓、胃、胎盤及び臍。

成人組織では、良性乳房上皮、アポクリン化生の領域及び硬化性腺疾患に発現が見られた。さらに、浸潤乳房腺管癌細胞全体に発現が見られた。成人肝臓、心臓又は肝細胞癌では発現は見られなかった。

成人皮膚の鱗屑状上皮及び成人副腎皮質で発現の可能性が見られた。他の全ての組織はネガティブであった。胎児の多ブロック組織は以下を含む：肝臓、腎臓、副腎、甲状腺、肺、心臓、大血管、小腸、脾臓、胸腺、膵臓、脳、脊髄、体壁、骨盤及び下肢。成人の多ブロック組織は以下を含む：肝臓、腎臓、副腎、心筋、大動脈、脾臓、リンパ節、膵臓、肺及び皮膚。

【０３４１】

（３）ＤＮＡ３０９４２－１１３４（ＰＲＯ２１２）

肺癌、腫瘍ブロック、及び乳癌における発現

正常チンパンジー胸腺の多核貪食細胞並びに試験した一つ胃癌のうちの一つ、一つの結腸直腸癌のうちの一つ、五つの乳ガンのうちに二つ及び四つの肺癌のうちの一つで発現が観察された。発現は、骨肉腫の悪性細胞及び僅かに分化した脂肪肉腫により観察された。精巣奇形腫及び試験した五つの乳ガンのうちの一つの悪性細胞において可能なシグナルが見られた。肺癌の一つでは、肺性リンパ組織内の高度な上皮細動脈全体に散乱したシグナルが見られた。

試験した胎児の組織（E12-E16週）は以下を含む：胎盤、臍帯、肝臓、腎臓、副腎、甲状腺、肺、心臓、大動脈、食道、胃、小腸、脾臓、胸腺、膵臓、脳、眼、脊髄、体壁、胎盤及び下肢。試験したヒト成人組織は以下を含む：肝臓、腎臓、副腎、心筋、大動脈、脾臓、肺、皮膚、骨肉腫、眼、胃、胃癌、結腸、結腸癌、腎細胞癌、胎盤、膀胱粘膜及び胆嚢、及びアセトアミノフェン誘発性肝臓障害及び肝硬変。試験したアカゲザル組織は大脳皮質（ｒｍ）及び海馬（ｒｍ）を含む。試験したチンパンジー組織は以下を含む：甲状腺、副甲状腺、卵巣、神経、舌、胸腺、副腎胃粘膜及び唾液腺。

肺の腺癌及び扁平上皮癌における発現

八つの腺癌及び七つの扁平上皮癌を試験した。全ての腫瘍においてアクチンが強いポジティブであり、全てがインサイツハイブリダイゼーション分析に適していることを示した。発現は、以下の六つの腫瘍で観察された：

６７２７－９５扁平上皮癌　－新生上皮全体で強く発現
９５５８－９５扁平上皮癌　－新生上皮全体で発現
１２２３５－９５腺癌　－インサイツ及び浸潤腫瘍細胞全体で発現
６５４５－９５及び４１８７－９７扁平上皮癌
－腫瘍間質全体で発現、腫瘍細胞全体で発現は見られず
１２９５４－９４扁平上皮癌　－間質細胞全体で弱い発現の可能性。

【０３４２】

（４）ＤＮＡ３２２８６－１１９１（ＰＲＯ２１４）

胎児組織において、間葉全体に渡って低レベルの発現が見られた。膜状組織及び甲状腺の胎盤性間質細胞で中程度の発現が観察された。また、皮質性ニューロンにおいても低レベルの発現が見られた。成人組織は全てネガティブであった。

試験した胎児の組織（E12-E16週）は以下を含む：胎盤、臍帯、肝臓、腎臓、副腎、甲状腺、肺、心臓、大動脈、食道、胃、小腸、脾臓、胸腺、膵臓、脳、眼、脊髄、体壁、骨盤及び下肢。試験した成人組織は以下を含む：肝臓、腎臓、副腎、心筋、大動脈、脾臓、リンパ節、膵臓、肺及び皮膚。

【０３４３】

（５）ＤＮＡ３３０９４－１１３１（ＰＲＯ２１７）

高度に特有の発現パターンが以下のように観察された：ヒト胚において、発現は、ＧＩ管の外平滑筋層、呼吸器軟骨、分岐状呼吸器上皮、骨芽細胞、腱、生殖腺、視神経頭及び発育表皮において観察された。成体では、発現は、チンパンジー舌の上皮先端、胎盤及び膀胱の基底上皮／筋上皮細胞において観察された。また、発現は、成人肺の肺胞裏打ち細胞、陰茎の勃起組織に並列する間葉細胞、及び大脳皮質（おそらくグリア細胞）においても見られた。腎臓では、発現は疾患においてのみ、甲状腺化尿細管を取り囲む細胞で見られた。

試験したヒト胎児組織（E12-E16）は以下を含む：胎盤、臍帯、肝臓、腎臓、副腎、甲状腺、肺、心臓、大血管、食道、胃、小腸、脾臓、胸腺、膵臓、脳、眼、脊髄、体壁、骨盤及び下肢。試験したヒト成体組織は以下を含む：腎臓（正常及び末期）、副腎、心筋、大動脈、脾臓、リンパ節、胆嚢、膵臓、肺、皮膚、眼（網膜を含む）、胎盤、膀胱、及び肝臓（正常、慢性、急性障害）。

試験した非ヒト霊長類は以下を含む：チンパンジー組織（唾液腺、胃、甲状腺、副甲状腺、皮膚、胸腺、卵巣、リンパ節）：アカゲザル組織（大脳皮質、海馬、小脳、陰茎）。

【０３４４】

（６）ＤＮＡ３３２２１－１１３３（ＰＲＯ２２４）

発現は、胎児の脾臓、成体の脾臓、胎児の肝臓、成体の甲状腺及び成体のリンパ節（チンパンジー）の血管内皮に限られていた。発現の付加的部位は発育中の脊髄神経節に見られた。他の全ての組織はネガティブであった。

試験したヒト胎児組織（E12-E16）は以下を含む：胎盤、臍帯、肝臓、腎臓、副腎、甲状腺、肺、心臓、大血管、食道、胃、小腸、脾臓、胸腺、膵臓、脳、眼、脊髄、体壁、骨盤及び下肢。試験したヒト成体組織は以下を含む：腎臓（正常及び末期）、副腎、心筋、大動脈、脾臓、リンパ節、胆嚢、膵臓、肺、皮膚、眼（網膜を含む）、膀胱、肝臓（正常、慢性、急性障害）。試験した非ヒト霊長類は以下を含む：チンパンジー組織（唾液腺、胃、甲状腺、副甲状腺、皮膚、胸腺、卵巣、リンパ節）：アカゲザル組織（大脳皮質、海馬、小脳、陰茎）。

【０３４５】

（７）ＤＮＡ３５６３８－１１４１（ＰＲＯ２４５）

ヒト成体及び胎児組織における発現パターン

胎児の胎盤の血管のサブセットを内張する上皮において発現が観察された。内皮発現は

これらの組織ブロックに限定されていた。また発現は胎盤の中間栄養芽細胞全体にも観察された。

試験した胎児組織（E12-E16）は以下を含む：胎盤、臍帯、肝臓、腎臓、副腎、甲状腺、肺、大血管、食道、胃、小腸、脾臓、胸腺、膵臓、脳、眼、脊髄、体壁、骨盤及び下肢。試験した成体組織は以下を含む：肝臓、腎臓、副腎、心筋、大動脈、脾臓、リンパ節、膵臓、肺、皮膚、大脳（ｒｍ）、海馬（ｒｍ）、小脳（ｒｍ）、陰茎、眼、膀胱、胃、胃癌、結腸、結腸癌、甲状腺（チンパンジー）、副甲状腺（チンパンジー）、卵巣（チンパンジー）及び軟骨肉腫、アセトアミノフェン誘発性肝臓障害及び肝硬変。

炎症組織（乾癬、ＩＢＤ、炎症性腎臓、炎症性肺、肝炎（肝臓ブロック）、正常扁桃腺、成人及びチンパンジー多ブロック）における発現

この分子は免疫刺激性であり（ＭＬＲ及び同時刺激においてＴリンパ球の増殖を促進し）、プロ炎症特性を有する（インビボで好中球浸潤を誘導する）ことが示された。上に示したように、この分子は胎児組織のサブセットで、上皮／内膜及び胎盤において発現されることが示されたが、これらの組織の種々の正常成体組織又は血管で発現されることは見られなかった。非炎症性組織に比較した場合の炎症性ヒト組織の血管におけるこの分子の発現について評価を実施した。要するに、発現は慢性的炎症に罹患した肺における大血管の上皮／内膜、乾癬性皮膚の表層表皮血管、慢性硬化性腎炎の検体の細動脈及び扁桃の毛包周囲洞を含む毛細管で見られた。

発現は、正常皮膚（ヒト包皮検体）、正常肺、炎症性（８のＩＢＤ検体）又は正常大腸、慢性炎症性又は硬変性肝臓、正常成人組織、又は副腎では観察されなかった。

【０３４６】

（８）ＤＮＡ３３４７３－１１７６（ＰＲＯ２６１）

ヒト成体及び胎児組織における発現パターン

正常成体皮膚の表皮線維芽細胞において強い発現が見られた。また、強い発現は、２つの硬変性肝臓においても活性肝性線症の部位で見られた。さらに、副腎皮質の策状(fasciculata)細胞全体に中程度の発現が見られた。発現の局在化は、細胞外マトリクス形成／ターンオーバーにおけるこの分子の役割を支持している。

ヒト乳癌及び正常乳房組織、及び肺癌における発現

試験した二つの乳房腫瘍において弱い拡散性シグナルが見られた。良性及び悪性上皮細胞で発現は見られなかったが、間葉細胞、特に異栄養性骨化を含む組織修復の領域において特異的なハイブリダイゼーションが観察された。シグナルは同じ細胞集団に局在するが、同じ領域（乳房腫瘍０２）においてシグナルが有意に強いことがわかった。最もポジティブな細胞は線維芽細胞の形態を有するが、平滑筋細胞はネガティブであることがわかった。シグナルは肺組織の方が弱いが、この断片は乳房腫瘍スライドに比較して見られる組織修復が少なかった。正常肺及び腎臓組織は実質的にネガティブであった。

要するに、この実験は、組織修復及び／又はコラーゲン沈積に含まれる間葉細胞での発現を示した。シグナルは、浸潤性乳癌又は良性炎症性状態による組織破壊（管破裂）のいずれかに隣接する良性線維芽様細胞において特に強かった。注目すべきことは、良性の類骨の沈積がＲＮＡの強い発現と関連していると思われる事実である。

正常ヒト結腸及び結腸癌における発現

腫瘍細胞においてポジティブなハイブリダイゼーションシグナルを示す組織断片は無かった。可変強度のポジティブシグナルが、線維芽又は平滑筋分化のいずれかの間葉細胞で観察された。ポジティブシグナルを持つ線維芽細胞は、浸潤性腫瘍がいわゆる線維形成反応（コラーゲン性線維の沈積を伴う線維芽細胞増殖）を誘発するならば、この腫瘍に隣接して観察された。ポジティブな線維芽細胞は、組織修復の領域（肉芽形成又は肉芽腫性反応）でも見られた。ポジティブな平滑筋細胞は中程度のサイズの殆どの動脈血管で見られた。

【０３４７】

（９）ＤＮＡ４０６２８－１２１６（ＰＲＯ３０１）

炎症性ヒト組織（乾癬、ＩＢＤ、炎症性腎臓、炎症性肺、肝炎、正常扁桃腺、成人及びチ

ンパンジー多ブロック）での発現
発現は、主に炎症性ヒト組織で、少数の正常ヒト及び非ヒト霊長類組織で評価した。発現は、結腸の粘膜上皮、気管大気道上皮、口腔粘膜（舌）、扁桃陰窩粘膜、胎盤粘膜、前立腺粘膜、腺性胃粘膜、上皮細胞、胸腺ハッサル小体、肝細胞、胆管上皮、及び胎盤上皮を含む評価した各上皮構造で見られた。上皮構造の外側での発現の唯一の証拠は、反応性肥厚を持つ扁桃での濾胞の胚中心における弱くて低い、不整合発現であった。
非ヒト霊長類組織（チンパンジー）において：扁桃上皮の表皮に弱い拡散性発現が見られた；ハッサル小体の胸腺上皮に弱い発現が見られた；胃においては、腺性粘膜の上皮において温和な拡散性発現が観察された。

【０３４８】

ヒト組織において：
（１）肝臓（慢性胆管炎、小葉過形成、アセトアミノフェン毒性を含む多ブロック）において、拡散性で低から中程度の発現が肝細胞及び胆管上皮に存在した。発現は小葉周辺／門脈周辺肝細胞において最も優勢であった。慢性硬化性胆管炎を持つ肝臓断片における胆管上皮で最も優勢であった。
（２）表皮の乾癬試料において弱い発現が観察された。
（３）慢性間質性肺炎又は慢性気管支炎を持つ肺において、大気道の粘膜上皮に低い拡散性発現が見られた；肺胞上皮にも弱い拡散性発現が見られた。気管支／細気管支の粘膜下腺の上皮には発現は無かった。
（４）胎盤上皮及び胆嚢の粘膜上皮ともに中程度の拡散性発現が観察された。
（５）前立腺上皮では、低い拡散性発現が見られた。
（６）扁桃粘膜及び陰窩の上皮に高い拡散性発現が観察された；シグナルは扁桃陰窩に並ぶ粘膜細胞で最も高かった。皮質濾胞の胚中心（Ｂリンパ球領域）において弱い不整合な拡散性発現があった；しかしながら、リンパ構造又はリンパ球性炎症を持つ評価した多の組織では、Ｂリンパ球での発現のあるものは無かった。
（７）炎症性腸疾患及びポリープ／腺腫性変化を持つ結腸では、粘膜上皮における低い発現が見られ、発現は絨毛先端で最も高かった。ポリープを持つ一検体では、隣接する粘膜に比較した場合、ポリープの形成異常上皮における発現の増加の証拠は無かった。多くの断片に存在する反応性粘膜リンパ組織における明らかな発現は無かった。
発現の無い組織は以下を含む：心臓、末梢神経、及び筋肉（心臓、平滑）。

【０３４９】

（１０）ＤＮＡ４７３６５－１２０６（ＰＲＯ３６４）
発現は、胎児において、椎骨体の前側表面を内張りする筋膜で観察された。発現は、胎児網膜全体でも見られた。胎児ニューロン全体で低レベルの発現が起こった。多の組織は全てネガティブであった。

【０３５０】

（１１）ＤＮＡ２９１０１－１１２２（ＰＲＯ７１３）
胎児組織において：発現は、軟骨原基の縁における発育中の下肢骨（即ち、外縁周辺）において：発育中の腱、血管平滑筋及び細胞包含発育骨格筋の筋細胞及び筋小管において観察された。また発現は骨端成長板でも観察された。胎児リンパ節では、発現は発育中のリンパ節の辺縁洞で見られた。発現は胸腺皮質の被膜下領域で観察され、おそらく、この領域で見られる被膜下上皮細胞又は増殖中の胸腺細胞のいずれかを表している。さらに発現は以下の組織で見られた：気管の平滑筋における発現；脳の大脳皮質における皮質ニューロンでの局所的発現；小腸の平滑筋での発現；胸腺上皮全体の全般的な発現；肝臓の管板細胞における発現；胃の壁在性平滑筋での発現；胎児皮膚の扁平上皮の基底層での発現；胎盤の栄養芽層絨毛における間質細胞での発現；及び動脈の壁及び臍帯の静脈での発現。発現パターンは、この分子が細胞分化／増殖に含まれることを示唆している。
胎児の脾臓、脊髄、又は副腎では発現が観察されなかった。
高い発現は以下の部位で観察された：
（１）チンパンジーの卵巣－成熟中の濾胞の顆粒膜、低い強度のシグナルが包膜細胞全体

で観察された；，
（２）チンパンジーの副甲状腺－高い発現が主細胞全体で見られた；
（３）ヒト胎児の精巣－発育中の管を取り囲む間質細胞全体に中程度の発現が見られた。
（４）ヒト胎児の肺－発育中の気管支樹における軟骨細胞で高い発現が見られ、分岐している気管支上皮で低レベルの発現が見られた。
試験した胎児の組織（E12-E16週）は以下を含む：胎盤、臍帯、肝臓、腎臓、副腎、甲状腺、肺、心臓、大血管、食道、胃、小腸、脾臓、胸腺、膵臓、脳、眼、脊髄、体壁、骨盤及び下肢。試験した成人組織は以下を含む：肝臓、腎臓、副腎、心筋、大動脈、脾臓、リンパ節、膵臓、肺、皮膚、大脳皮質（ｒｍ）、海馬（ｒｍ）、小脳（ｒｍ）、陰茎、眼、膀胱、胃、胃癌、結腸、結腸癌及び軟骨肉腫、アセトアミノフェン誘発性肝臓障害及び肝硬変。

【０３５１】
（１２）ＤＮＡ３３０８７（ＰＲＯ２１６）
強く特異的な発現が、内軟骨及び骨膜性骨形成の全ての部位で骨芽細胞において見られた。さらなる発現部位は、発育中の肺性動脈及び大動脈幹を含んでいた。それ以外は、全ての胎児組織はネガティブであった。試験した組織は以下を含む：胎盤、臍帯、脳、脊髄、眼、視神経、気管、肺、心臓、胸腺、肝臓、脾臓、食道、小腸、膵臓、副腎、甲状腺、体壁及び下肢。
試験した成人組織は全てネガティブであり、以下を含む：肝臓、腎臓、副腎、心筋、大動脈、脾臓、リンパ節、膵臓、肺及び皮膚。多ブロックにおける全ての成人組織はベータ-アクチンに対してポジティブであった。
この分子の可能な役割は、骨マトリクス沈積及び／又は骨芽細胞成長の制御である。

【実施例６３】
【０３５２】
ＰＲＯポリペプチドのハイブリダイゼーションプローブとしての使用
以下の方法は、ＰＲＯポリペプチドをコードするヌクレオチド配列のハイブリダイゼーションプローブとしての使用を記述する。
（各々、図１、３、５、７、９、１１、１３、１５、１７、１９、２１、２３、２５、２７、２９、３１、３３、３５、３７、３９、４１、４３、４５、４７、４９、５１、５３、５５、５７、５９、６１、６３、６５、６７、６９、７１、７３、７５、７７、７９、８１、８３、８５、８７、８９、９１、９３及び９５、各々、配列番号：３、８、１３、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６１、６６、７１、７６、８４、８９、９７、１０６、１１１、１１６、１２６、１３１、１３６、１４２、１４７、１５２、１５４、１５９、１６１、１６９、１８０、１８２、１９０、１９２、１９４、１９６、１９８、２００、２０２、２０４、２１３、２１５、２１７、２１９、２２１及び２２６に示されたような）全長又は成熟ＰＲＯポリペプチド又はその断片のコード化配列を含むＤＮＡは、ヒト組織ｃＤＮＡライブラリ又はヒト組織ゲノムライブラリの同種ＤＮＡ（ＰＲＯの天然発生変異体をコードするもの等）のスクリーニングのためのプローブとして用いられ得る。
ハイブリダイゼーション及びいずれかのライブラリＤＮＡを含むフィルターの洗浄は、以下の高度にストリンジェントな条件下で実施される。ＰＲＯポリペプチドをコードしている遺伝子から誘導された放射標識プローブのフィルターへのハイブリダイゼーションは、50%ホルムアミド、5x ＳＳＣ、0.1%ＳＤＳ、0.1%ピロリン酸ナトリウム、50mMリン酸ナトリウム、pH6.8、2xデンハード液、及び10%デキストラン硫酸の溶液中で42℃で20時間実施した。フィルターの洗浄は、0.1xＳＳＣ及び0.1%ＳＤＳ水溶液中で、42℃で実施した。
全長天然配列をコードするＤＮＡと所望の同一性を持つＤＮＡは、次いでこの分野で知られた標準的技術を用いて同定できる。

【実施例６４】
【０３５３】
大腸菌におけるＰＲＯポリペプチドの発現

この実施例は、大腸菌での組換え発現による非グリコシル化形態のＰＲＯポリペプチドの調製を例示する。

ＰＲＯ１８７、ＰＲＯ１９５、ＰＲＯ２２４、ＰＲＯ３０１、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ７１３、ＰＲＯ７８８、ＰＲＯ１２７４、ＰＲＯ１２８６、ＰＲＯ１３０３、ＰＲＯ１３１２、ＰＲＯ１３１３及びＰＲＯ１３７６（各々配列番号：２０、３０、５０、８９、１１６、１３６、１５２、１９６、１９８、２０２、２１３、２１５及び２１７）をコードするＤＮＡ配列を、選択したＰＣＲプライマーを用いて最初に増幅した。プライマーは、選択された発現ベクターの制限酵素部位に対応する制限酵素部位を持たなければならない。種々の発現ベクターが用いられる。好適なベクターの例は、ｐＢＲ３２２（大腸菌から誘導されたもの；Bolivar等, Gene, 2:95 (1977)参照）であり、アンピシリン及びテトラサイクリン耐性についての遺伝子を含む。ベクターは、制限酵素で消化され脱リン酸される。ＰＣＲ増幅した配列は、次いでベクターに結合させる。ベクターは、好ましくは抗生物質耐性遺伝子、ｔｒｐプロモーター、ポリ-hisリーダー（最初の６つのＳＴＩＩコドン、ポリ-His配列、及びエンテロキナーゼ切断部位を含む）、ＰＲＯ１８７、ＰＲＯ１９５、ＰＲＯ２２４、ＰＲＯ３０１、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ７１３、ＰＲＯ７８８、ＰＲＯ１２７４、ＰＲＯ１２８６、ＰＲＯ１３０３、ＰＲＯ１３１２、ＰＲＯ１３１３及びＰＲＯ１３７６のコード化領域、ラムダ転写終結区、及びａｒｇＵ遺伝子を含む。

ライゲーション混合物は、次いで、上掲のSambrook等に記載された方法を用いた選択した大腸菌の形質転換に使用される。形質転換体は、それらのＬＢプレートで成長する能力により同定され、次いで抗生物質耐性クローンが選択される。プラスミドＤＮＡが単離され、制限分析及びＤＮＡ配列決定で確認される。

選択されたクローンは、抗生物質を添加したＬＢブロスなどの液体培地で終夜成長させることができる。終夜培地は、続いて大規模培地の播種に用いられる。次に細胞を最適密度で成長させ、その間に発現プロモーターが作動する。

更に数時間の培養の後、細胞を遠心分離により採集できる。遠心分離で得られた細胞ペレットは、この分野で知られた種々の試薬を用いて可溶化され、次いで可溶化ＰＲＯ１８７、ＰＲＯ１９５、ＰＲＯ２２４、ＰＲＯ３０１、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ７１３、ＰＲＯ７８８、ＰＲＯ１２７４、ＰＲＯ１２８６、ＰＲＯ１３０３、ＰＲＯ１３１２、ＰＲＯ１３１３及びＰＲＯ１３７６ポリペプチドを金属キレート化カラムを用いてポリペプチドを緊密に結合させる条件下で精製できる。

【実施例６５】

【０３５４】

哺乳動物細胞におけるＰＲＯポリペプチドをコードする核酸のの発現

この実施例は、哺乳動物細胞での組換え発現による潜在的にグリコシル化形態のＰＲＯポリペプチドの調製を例示する。

発現ベクターとしてベクターｐＲＫ５（1989年3月15日発行のEP 307,247参照）を用いた。場合によっては、ＰＲＯ ＤＮＡを選択した制限酵素でｐＲＫ５に結合させ、上掲のSambrook等に記載されたような結合方法を用いてＰＲＯポリペプチドコード化ＤＮＡへの挿入を行う。得られたベクターは、ｐＲＫ５-(ＰＲＯコード化ＤＮＡ)と呼ばれる。

一実施態様では、選択された宿主細胞は２９３細胞とすることができる。ヒト２９３細胞（ATCC CCL 1573）は、子ウシ胎児血清及び場合によっては滋養成分又は抗生物質を添加したＤＭＥＭなどの媒質中で組織培養プレートにおいて成長させて集密化した。約10μgのｐＲＫ５-(ＰＲＯコード化ＤＮＡ)を約1μgのＶＡ ＲＮＡ遺伝子をコードするＤＮＡ（Thimmappaya等, Cell, 31:543 (1982))と混合し、500μlの1mMトリス-ＨＣｌ、0.1mMのＥＤＴＡ、0.227MのＣａＣｌ$_2$に溶解させた。この混合物に、滴状の、500μlの50mMのＨＥＰＥＳ（pH7.35）、280mmのＮａＣｌ、1.5mMのＮａＰＯ$_4$を添加し、25℃で10分間析出物を形成させた。析出物を懸濁し、２９３細胞に加えて37℃で約4時間定着させた。培養培地を吸引し、2mlのＰＢＳ中20%グリセロールを30秒間添加した。２９３細胞は、次いで無血清培地で洗浄し、新鮮な培地を添加し、細胞を約5日間インキュベートした。

形質移入の約24時間後、培養培地を除去し、培養培地（のみ）又は200μCi/mlの^{35}Ｓ

-システイン及び200μCi/mlの^{35}Ｓ-メチオニンを含む培養培地で置換した。12時間のインキュベーションの後、条件培地を回収し、スピンフィルターで濃縮し、15%ＳＤＳゲルに添加した。処理したゲルを乾燥させ、ＰＲＯポリペプチドの存在を現す選択された時間にわたってフィルムに暴露した。形質転換した細胞を含む培地は、更なるインキュベーションを施し（無血清培地で）、培地を選択されたバイオアッセイで試験した。

【０３５５】

これに換わる技術では、ＰＲＯポリペプチドをコードする遺伝子を、Somparyac等，Proc. Natl. Acad. Sci., 12:7575 (1981)に記載されたデキストラン硫酸法を用いて２９３細胞に一過的に導入してもよい。２９３細胞は、スピナーフラスコ内で最大密度まで成長させ、700μgのｐＲＫ５-(ＰＲＯコード化ＤＮＡ)を添加する。細胞は、まずスピナーフラスコから遠心分離によって濃縮してＰＢＳで洗浄した。ＤＮＡ－デキストラン沈殿物を細胞ペレット上で4時間インキュベートした。細胞を20%グリセロールで90秒間処理し、組織培養培地で洗浄し、組織培養培地、5μｇ/mlウシインシュリン及び0.1μg/mlウシトランスフェリンを含むスピナーフラスコに再度導入した。約4日後に、条件培地を遠心分離して濾過し、細胞及び細胞片を除去した。次いでＰＲＯポリペプチドをコードする発現された遺伝子を含む試料を濃縮し、透析又はカラムクロマトグラフィー等の選択した方法によって精製できる。

他の実施態様では、ＰＲＯポリペプチドをコードする遺伝子をＣＨＯ細胞で発現させることができる。ｐＲＫ５-(ＰＲＯコード化ＤＮＡ)核酸は、$CaPO_4$又はＤＥＡＥ-デキストランなどの公知の試薬を用いてＣＨＯ細胞に形質移入することができる。上記したように、細胞培地をインキュベートし、培地を培養培地（単独）又は^{35}Ｓ-メチオニン等の放射性標識を含む培地に置換することができる。ＰＲＯポリペプチドの存在を同定した後、培養培地を無血清培地に置換してもよい。好ましくは、培地を約6日間インキュベートし、次いで条件培地を収集する。次いで、発現されたＰＲＯポリペプチドを含む培地を濃縮して、選択した方法によって精製することができる。

また、ＰＲＯポリペプチドをコードしているエピトープタグ遺伝子を宿主ＣＨＯ細胞において発現させてもよい。ＰＲＯポリペプチドをコードしている遺伝子はｐＲＫ５ベクターからサブクローニングしてもよい。サブクローン挿入物はＰＣＲ増幅を受けてバキュロウイルス発現ベクター中にポリ-hisタグ等の選択されたエピトープタグとフレーム内で融合できる。ポリ-hisタグＰＲＯポリペプチドをコードする遺伝子挿入物は、次いで、安定なクローンの選択のためのＤＨＦＲ等の選択マーカーを含むＳＶ４０誘導ベクターにサブクローニングできる。最後に、ＣＨＯ細胞をＳＶ４０誘導ベクターで（上記のように）形質移入した。発現を確認するために、上記のように標識化を行ってもよい。次いで、発現されたポリ-hisタグＰＲＯポリペプチドをコードする発現遺伝子を含む培地を濃縮し、Ni^{2+}-キレートアフィニティクロマトグラフィー等の選択された方法により精製できる。

ＰＲＯ１７２、ＰＲＯ１７８、ＰＲＯ１７９、ＰＲＯ１８２、ＰＲＯ１８８、ＰＲＯ２１２、ＰＲＯ２１４、ＰＲＯ２１６、ＰＲＯ２１７、ＰＲＯ２２４、ＰＲＯ２４５、ＰＲＯ２６１、ＰＲＯ３０１、ＰＲＯ３５６、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ７１３、ＰＲＯ７８８、ＰＲＯ７９２、ＰＲＯ８６５、ＰＲＯ１１２６、ＰＲＯ１１３０、ＰＲＯ１２４４、ＰＲＯ１２４６、ＰＲＯ１２７４、ＰＲＯ１２８６、ＰＲＯ１２９４、ＰＲＯ１３０３、ＰＲＯ１３０４、ＰＲＯ１３７６及びＰＲＯ１３８７は、上述の方法によりＣＨＯ細胞に置いて安定に発現された。さらに、ＰＲＯ１７２、ＰＲＯ１７８、ＰＲＯ１８２、ＰＲＯ２３１、ＰＲＯ２４５、ＰＲＯ３０１、ＰＲＯ３５６及びＰＲＯ３６４は、ＣＨＯ細胞において一過性の手法により発現された。

【実施例６６】

【０３５６】

酵母菌でのＰＲＯポリペプチドをコードする核酸の発現

以下の方法は、酵母菌中でのＰＲＯポリペプチドをコードする遺伝子の組換え発現を記載する。

第１に、ＡＤＨ２／ＧＡＰＤＨプロモーターからのＰＲＯポリペプチドの細胞内生産又は分泌のための酵母菌発現ベクターを作成する。ＰＲＯポリペプチドをコードするＤＮＡ及びプロモーターを選択したプラスミドの適当な制限酵素部位に挿入してＰＲＯポリペプチドをコードする遺伝子の細胞内発現を指示する。分泌のために、ＰＲＯポリペプチドをコードするＤＮＡを選択したプラスミドに、ＡＤＨ２／ＧＡＰＤＨプロモーター、天然ＰＲＯポリペプチドシグナルペプチド又は他の哺乳類シグナルペプチドをコードするＤＮＡ、又は、例えば酵母菌アルファ因子分泌シグナル／リーダー配列、及び（必要ならば）ＰＲＯポリペプチドの発現のためのリンカー配列とともにクローニングすることができる。

酵母菌株ＡＢ１１０等の酵母菌は、次いで上記の発現プラスミドで形質転換し、選択された発酵培地中で培養できる。形質転換した酵母菌上清は、10%トリクロロ酢酸での沈降及びＳＤＳ－ＰＡＧＥによる分離で分析し、次いでクマシーブルー染色でゲルの染色をすることができる。

続いて組換えＰＲＯポリペプチドは、発酵培地から遠心分離により酵母菌細胞を除去し、次いで選択されたカートリッジフィルターを用いて培地を濃縮することによって単離及び精製できる。ＰＲＯポリペプチドを含む濃縮物は、選択されたカラムクロマトグラフィー樹脂を用いてさらに精製してもよい。

【実施例６７】

【０３５７】

バキュロウイルス感染昆虫細胞でのＰＲＯポリペプチドをコードする核酸の発現

以下の方法は、バキュロウイルス感染昆虫細胞中における組換え発現を記載する。

ＰＲＯポリペプチドをコードする配列は、バキュロウイルス発現ベクターに含まれるエピトープタグの上流に融合させた。このようなエピトープタグは、ポリ-Hisタグ及び免疫グロブリンタグ（ＩｇＧのＦｃ領域など）を含む。ｐＶＬ１３９３（Navogen）などの市販されているプラスミドから誘導されるプラスミドを含む種々のプラスミドを用いることができる。簡単には、ＰＲＯポリペプチドをコードする配列又はＰＲＯポリペプチドコード化配列の所定部分［膜貫通タンパク質の細胞外ドメインをコードする配列又はタンパク質が細胞外である場合の成熟タンパク質をコードする配列など］が、５'及び３'領域に相補的なプライマーでＰＣＲにより増幅される。５'プライマーは、隣接する（選択された）制限酵素部位を包含していてもよい。生成物は、次いで、選択された制限酵素で消化され、発現ベクターにサブクローニングされる。

組換えバキュロウイルスは、上記のプラスミド及びBaculoGoldＴＭウイルスＤＮＡ（Pharmingen）を、Spodoptera frugiperda（「Ｓｆ９」）細胞（ATCC CRL 1711）中にリポフェクチン（GIBCO-BRLから市販）を用いて同時形質移入することにより作成される。28℃で4-5日インキュベートした後、放出されたウイルスを回収し、更なる増幅に用いた。ウイルス感染及びタンパク質発現は、O'Reilley等, Baculovirus expression vectors: A laboratory Manual, Oxford: Oxford University Press (1994)に記載されているように実施した。

【０３５８】

次いで、発現されたポリ-hisタグＰＲＯポリペプチドは、例えば、Ni^{2+}-キレートアフィニティクロマトグラフィーにより以下のように精製される。抽出物は、Rupert等, Nature, 362:175-179 (1993)に記載されているように、ウイルス感染した組み換えＳｆ９細胞から調製した。簡単には、Ｓｆ９細胞を洗浄し、超音波処理用バッファー（25mlのＨｅｐｅｓ、pH7.9；12.5mMの$MgCl_2$；0.1mMのＥＤＴＡ；10%のグリセロール；0.1%のＮＰ-４０；0.4MのＫＣｌ）中に再懸濁し、氷上で2回20秒間超音波処理した。超音波処理物を遠心分離で透明化し、上清を負荷バッファー（50mMリン酸塩、300mMＮａＣｌ、10%のグリセロール、pH7.8）で50倍希釈し、0.45μｍフィルターで濾過した。Ni^{2+}-ＮＴＡアガロースカラム（Qiagenから市販）を5mlの総容積で調製し、25mlの水で洗浄し、25mlの負荷バッファーで平衡させた。濾過した細胞抽出物は、毎分0.5mlでカラムに負荷した。カラムを、分画回収が始まる点であるA_{280}のベースラインまで負荷バッファーで洗浄した。次に、カラムを、結合タンパク質を非特異的に溶離する二次洗浄バッファー（50

mMのリン酸塩；300mMのＮａＣｌ、10%のグリセロール、pH6.0）で洗浄した。A_{280}のベースラインに再度到達した後、カラムを二次洗浄バッファー中で0から500mMのイミダゾール勾配で展開した。1mlの分画を回収し、ＳＤＳ-ＰＡＧＥ及び銀染色又はアルカリホスファターゼ（Qiagen）に複合したNi^{2+}-ＮＴＡでのウェスタンブロットで分析した。溶離したHis_{10}-タグＰＲＯポリペプチドを含む分画をプールし、負荷バッファーで透析した。

【０３５９】

あるいは、ＩｇＧタグ（又はＦｃタグ）-ＰＲＯの精製は、例えば、プロテインＡ又はプロテインＧカラムクロマトグラフィーを含む公知のクロマトグラフィー技術を用いて実施できる。

ＰＲＯ１７２、ＰＲＯ１７８、ＰＲＯ２１４、ＰＲＯ２１６、ＰＲＯ２３１、ＰＲＯ２３５、ＰＲＯ２６９、ＰＲＯ３０１、ＰＲＯ３５６、ＰＲＯ５３８、ＰＲＯ７１９、及びＰＲＯ１３７６は、バキュロウイルス感染したＳｆ９昆虫細胞で発現された。発現は実際には0.5-2Lのスケールで実施したが、容易により大きな（例えば8L）調製にスケールアップできる。タンパク質はＩｇＧ作成物（イムノアドヘシン）として発現され、そこではタンパク質細胞外領域がヒンジ、ＣＨ２及びＣＨ３ドメイン及び／又はポリ-Hisタグ形態を含むＩｇＧ１定常領域配列に融合している。

ＰＣＲ増幅に続いて、対応するコード化配列をバキュロウイルス発現ベクター（ＩｇＧ融合物に対するpb.PH.IgG及びポリ-Hisタグに対するpb.PH.His.c）にサブクローニングし、そのベクター及びBaculogold(登録商標)バキュロウイルスＤＮＡ（Pharmingen）を１０５スポドプテラグルヒペルダ（Spodoptera frugiperda）（「Ｓｆ９」）細胞（ATCC CRL 1711）にリポフェクチン（Gibco BRL）を用いて同時形質移入した。pb.PH.IgG及びPH.His.cは、市販のバキュロウイルス発現ベクターｐＶＬ１３９３（Pharmingen）の修飾物であり、Ｈｉｓ又はＦｃタグ配列を含むように修飾されたポリリンカー領域を持つ。細胞を、10%のＦＢＳ（Hyclone）を添加したHinkのＴＮＭ-ＦＭ培地で成長させた。細胞は、28℃で5日間インキュベートした。上清を回収し、続いて10%ＦＢＳを添加したHinkのＴＮＭ-ＦＨ培地におけるＳｆ９細胞感染による約10の感染効率（ＭＯＩ）での最初のウイルス増幅に用いた。細胞を28℃で3日間インキュベートした。上清を回収し、バキュロウイルス発現ベクターにおける作成物の発現を、1mlの上清の25mLのヒスチジンタグタンパク質用のNi^{2+}-ＮＴＡビーズ（QIAGEN）又はＩｇＧタグタンパク質用のプロテインＡセファロースCL-4Bビーズ（Pharmacia）へのバッチ結合、次いでクマシーブルー染色により周知の濃度のタンパク質標準と比較するＳＤＳ－ＰＡＧＥ分析により測定した。

【０３６０】

第１のウイルス増幅上清をＥＳＦ-９２１培地（Expression System LLC）で成長させたＳｆ９細胞のスピナー培地（500ml）の約0.1のＭＯＩでの感染に使用した。細胞は28℃で3日間インキュベートした。上清を回収して濾過した。バッチ結合及びＳＤＳ－ＰＡＧＥを、スピナー培地の発現が確認されるまで、必要に応じて繰り返した。

形質移入細胞からの条件培地（0.5～3L）を、遠心分離により細胞を除去し0.22ミクロンフィルターを通して濾過することにより回収した。ポリ-Hisタグ作成物については、配列を含むタンパク質をNi^{2+}-ＮＴＡカラム（Qiagen）を用いて精製した。精製前に、イミダゾールを条件培地に5mMの濃度まで添加した。条件培地を、0.3MのＮａＣｌ及び5mMイミダゾールを含む20mMのＨｅｐｅｓ，pH7.4バッファーで平衡化した6mlのNi^{2+}-NTAカラムに4-5ml/分の流速で４℃においてポンプ供給した。負荷後、カラムをさらに平衡バッファーで洗浄し、タンパク質を0.25Mイミダゾールを含む平衡バッファーで溶離した。高度に精製されたタンパク質は、続いて10mMのＨｅｐｅｓ、0.14MのＮａＣｌ及び4%のマンニトールを含む貯蔵バッファー，pH6.8中で25mlのG25 Superfine（Pharmacia）を用いて脱塩し、－80℃で貯蔵した。

タンパク質のイムノアドヘシン（Ｆｃ含有）作成物を以下のようにして条件培地から精製した。条件培地を、20mMのリン酸ナトリウムバッファー，pH6.8で平衡化した5mlのプロテインＡカラム（Pharmacia）に負荷した。負荷後、カラムを平衡バッファーで強く洗浄

した後、100mMのクエン酸，pH3.5で溶離した。溶離したタンパク質は、1mlの画分を275mLの1Mトリスバッファー，pH9を含む管に回収することにより即座に中性化した。高度に精製されたタンパク質は、続いてポリ-Hisタグタンパク質について上記した貯蔵バッファー中で脱塩した。タンパク質の均一性はＳＤＳポリアクリルアミドゲル（ＰＥＧ）電気泳動及びエドマン(Edman)分解によるＮ-末端アミノ酸配列決定により評価できる。

【０３６１】

あるいは、修飾バキュロウイルス法をｈｉｇｈ-５細胞取り込みに使用してもよい。この方法では、所望の配列をコードするＤＮＡは、Ｐｆｕ（Stratagene）等の適当な系で増幅されても、又はバキュロウイルス発現ベクターの含まれるエピトープタグの上流（5'-）に融合させてもよい。このようなエピトープタグは、ポリ-Ｈｉｓタグ及び免疫グロブリンタグ（ＩｇＧのＦｃ領域等）を含む。種々のプラスミドを用いることができ、ｐＩＥ-１（Novagen）等の市販のプラスミドから誘導されたプラスミドを含む。ｐＩＥ-１及びｐＩＥ-２ベクターは、安定に形質転換された昆虫細胞におけるバキュロウイルスｉｅ１プロモーターからの組換えタンパク質の構成的発現のために設計される。このプラスミドは複数のクローニング部位の方向においてのみ相違し、未感染昆虫細胞におけるｉｅ１媒介遺伝子発現に重要であることが知られた全てのプロモーター配列並びにｈｒ５エンハンサー成分を含む。ｐＩＥ-１及びｐＩＥ-２は翻訳開始部位を含み、融合タンパク質の製造に使用できる。簡単には、所望の配列又は配列の所望の部分（膜貫通タンパク質の細胞外ドメインをコードする配列など）を、５'及び３'領域に相補的なプライマーでのＰＣＲにより増幅する。５'プライマーは隣接する（選択された）制限酵素部位を導入してもよい。生成物は、次いで、選択された制限酵素で消化して発現ベクターにサブクローニングされる。例えば、ｐＩＥｌ-１の誘導体はヒトＩｇＧ（pb.PH.IgG）のＦｃ領域又は８ヒスチジン（pb.PH.His）タグ下流（3'-）を含むことができる。好ましくは、ベクター作成物は確認のために配列決定される。

Ｈｉｇｈ-５細胞は、27℃、CO_2 無し、pen/strep無しの条件下で50%の集密度まで成長させた。150mmプレート各々について、30μgのＰＲＯポリペプチドを含むｐＩＥベースベクターを1mlのＥｘ-細胞培地（媒質：Ex-細胞401＋1/100のL-Ｇｌｕ JRH Biosciences #14401-78P（注：この媒質は光感受性））と混合し、別の管において、100μlのセルフェクチン（CellFECTIN(Gibco BRL #10362-010)(ボルテックスで混合)）を1mlのＥｘ-細胞培地と混合した。２つの溶液を混合し、室温で１５分間インキュベーションした。8mlのＥｘ-細胞培地を2mlのＤＮＡ／セルフェクチン混合物に添加し、Ｅｘ-細胞培地で１回洗浄したＨｉ５細胞上に層形成させた。次いでプレートを暗中室温でインキュベートした。次いでＤＮＡ／セルフェクチン混合物を吸引し、細胞をＥｘ-細胞で１回戦乗して過剰のセルフェクチンを除去した。30mlの新鮮なＥｘ-細胞培地を添加し、細胞を２８℃で３日間インキュベートした。上清を回収して、バキュロウイルス感染ベクターでのＰＲＯポリペプチドの発現を、1mlの上清の25mLのヒスチジンタグタンパク質用のNi^{2+}-ＮＴＡビーズ（QIAGEN）又はＩｇＧタグタンパク質用のプロテインＡセファロースCL-4Bビーズ（Pharmacia）へのバッチ結合、次いでクマシーブルー染色により周知の濃度のタンパク質標準と比較するＳＤＳ－ＰＡＧＥ分析により測定した。

【０３６２】

形質移入細胞からの条件培地（0.5～3L）を、遠心分離により細胞を除去し0.22ミクロンフィルターを通して濾過することにより回収した。ポリ-Hisタグ作成物については、タンパク質作成物をNi^{2+}-ＮＴＡカラム（Qiagen）を用いて精製した。精製前に、イミダゾールを条件培地に5mMの濃度まで添加した。条件培地を、0.3MのＮａＣｌ及び5mMイミダゾールを含む20mMのＨｅｐｅｓ，pH7.4バッファーで平衡化した6mlのNi2+-NTAカラムに4-5ml/分の流速で４８℃においてポンプ供給した。負荷後、カラムをさらに平衡バッファーで洗浄し、タンパク質を0.25Mイミダゾールを含む平衡バッファーで溶離した。高度に精製されたタンパク質は、続いて10mMのＨｅｐｅｓ、0.14MのＮａＣｌ及び4%のマンニトールを含む貯蔵バッファー，pH6.8中で25mlのG25 Superfine（Pharmacia）を用いて脱塩し、－80℃で貯蔵した。

タンパク質のイムノアドヘシン（Ｆｃ含有）作成物を以下のようにして条件培地から精製した。条件培地を、20mMのリン酸ナトリウムバッファー，pH6.8で平衡化した5mlのプロテインＡカラム（Pharmacia）に負荷した。負荷後、カラムを平衡バッファーで強く洗浄した後、100mMのクエン酸，pH3.5で溶離した。溶離したタンパク質は、1mlの画分を275mLの1Mトリスバッファー，pH9を含む管に回収することにより即座に中性化した。高度に精製されたタンパク質は、続いてポリ-Hisタグタンパク質について上述した貯蔵バッファー中で脱塩した。配列の均一性はＳＤＳポリアクリルアミドゲル及びエドマン(Edman)分解によるＮ-末端アミノ酸配列決定及び所望又は必要に応じて他の分析手法により評価できる。

ＰＲＯ１７２、ＰＲＯ１７８、ＰＲＯ１７９、ＰＲＯ１８２、ＰＲＯ１８７、ＰＲＯ１８８、ＰＲＯ２１２、ＰＲＯ２１６、ＰＲＯ２１７、ＰＲＯ２２４、ＰＲＯ２３１、ＰＲＯ２３５、ＰＲＯ２６９、ＰＲＯ２８７、ＰＲＯ３０１、ＰＲＯ３２３、ＰＲＯ３３１、ＰＲＯ３５６、ＰＲＯ３６４、ＰＲＯ５２６、ＰＲＯ５３８、ＰＲＯ７１３、ＰＲＯ７７１、ＰＲＯ７８８、ＰＲＯ７９２、ＰＲＯ８１２、ＰＲＯ８６５、ＰＲＯ１０７５、ＰＲＯ１１５４、ＰＲＯ１２４４、ＰＲＯ１２８６、ＰＲＯ１３０４、ＰＲＯ１３１２、ＰＲＯ１３７６、ＰＲＯ１３８７、及びＰＲＯ１５６１は、ｈｉｇｈ-５細胞を導入する上記の改変バキュロウイルス法により成功裏に発現された。

【実施例６８】

【０３６３】

ＰＲＯポリペプチドに結合する抗体の調製

この実施例は、ＰＲＯポリペプチドに特異的に結合できるモノクローナル抗体の調製を例示する。

モノクローナル抗体の生産のための技術は、この分野で知られており、例えば、上掲のGodingに記載されている。用いられ得る免疫原は、ＰＲＯポリペプチドを含む精製ＰＲＯ融合タンパク質、細胞表面に組換えＰＲＯポリペプチドをコードする遺伝子を発現する細胞を含む。免疫原の選択は、当業者が過度の実験をすることなくなすことができる。

Ｂａｌｂ／ｃ等のマウスを、完全フロイントアジュバントに乳化して皮下又は腹腔内に1-100マイクログラムで注入したＰＲＯポリペプチド免疫原で免疫化する。あるいは、免疫原をＭＰＬ－ＴＤＭアジュバント（Ribi Immunochemical Researh, Hamilton, MT）に乳化し、動物の後足蹠に注入してもよい。免疫化したマウスは、次いで10から12日後に、選択したアジュバント中に乳化した付加的免疫源で追加免疫する。その後、数週間、マウスをさらなる免疫化注射で追加免疫する。抗-ＰＲＯ抗体の検出のためのＥＬＩＳＡアッセイで試験するために、レトロオービタル出血により血清試料をマウスから周期的に採取してもよい。

適当な抗体力価が検出された後、抗体に「ポジティブ」な動物に、ＰＲＯポリペプチドの静脈内注射の最後の注入をすることができる。3から4日後、マウスを屠殺して脾臓を取り出した。次いで脾臓細胞を（35%ポリエチレングリコールを用いて）、ＡＣＴＴから番号ＣＲＬ１５９７で入手可能なＰ３Ｘ６３ＡｇＵ.１等の選択されたマウス骨髄腫細胞系に融合させた。融合によりハイブリドーマ細胞が生成され、次いで、ＨＡＴ培地を含む９６ウェル組織培養プレートに蒔き、非融合細胞、骨髄腫ハイブリッド、及び脾臓細胞ハイブリッドの増殖を阻害した。

ハイブリドーマ細胞は、ＰＲＯポリペプチドに対する反応性についてのＥＬＩＳＡでスクリーニングされる。ＰＲＯポリペプチドに対する所望のモノクローナル抗体を分泌する「ポジティブ」ハイブリドーマ細胞の決定は技術常識の範囲内である。

ポジティブハイブリドーマ細胞を同系のＢａｌｂ／ｃマウスに腹腔内注入し、抗-ＰＲＯモノクローナル抗体を含む腹水を生成させる。あるいは、ハイブリドーマ細胞を、組織培養フラスコ又はローラーボトルで成長させることもできる。腹水中に生成されたモノクローナル抗体の精製は、硫酸アンモニウム沈降、それに続くゲル排除クロマトグラフィーを用いて行うことができる。あるいは、抗体のプロテインＡ又はプロテインＧへの親和性に基づくアフィニティクロマトグラフィーを用いることもできる。

【０３６４】
材料の寄託
次の材料をアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション，１０８０１　ユニバーシティ・ブルバード、マナッサス、バージニア２０１１０－２２０９米国(ＡＴＣＣ)に寄託した：

材料	ATCC寄託番号	寄託日
DNA35916-1161	209419	1997年10月28日
DNA23339-1130	209282	1997年 9月18日
DNA16451-1388	209776	1998年 4月14日
DNA27865-1091	209296	1997年 9月23日
DNA27864-1155	209375	1997年10月16日
DNA28497-1130	209279	1997年 9月18日
DNA26847-1395	209772	1998年 4月14日
DNA30942-1134	209254	1997年 9月16日
DNA32286-1191	209385	1997年10月16日
DNA33094-1131	209256	1997年 9月16日
DNA33221-1133	209263	1997年 9月16日
DNA34434-1139	209252	1998年 9月16日
DNA35558-1167	209374	1997年10月16日
DNA35638-1141	209265	1997年 9月16日
DNA33473-1176	209391	1997年10月17日
DNA38260-1180	209397	1997年10月17日
DNA39969-1185	209400	1997年10月17日
DNA40628-1216	209432	1997年11月 7日
DNA35595-1228	209528	1997年12月10日
DNA40981-1234	209439	1997年11月 7日
DNA47470-1130-P1	209422	1997年10月28日

【０３６５】

DNA47365-1206	209436	1997年11月 7日
DNA44184-1319	209704	1998年 3月26日
DNA48613-1268	209752	1998年 4月 7日
DNA29101-1122	209653	1998年 3月 5日
DNA49646-1327	209705	1998年 3月26日
DNA49829-1346	209749	1998年 4月 7日
DNA56405-1357	209849	1998年 5月 6日
DNA56352-1358	209846	1998年 5月 6日
DNA59205-1421	203009	1998年 6月23日
DNA53974-1401	209774	1998年 4月14日
DNA57689-1385	209869	1998年 5月14日
DNA60615-1483	209980	1998年 6月16日
DNA59814-1486	203359	1998年10月28日
DNA59846-1503	209978	1998年 6月16日
DNA64883-1526	203253	1998年 9月 9日
DNA64885-1529	203457	1998年11月 3日
DNA64889-1541	203250	1998年 9月 9日
DNA64903-1553	203223	1998年 9月15日
DNA64905-1558	203233	1998年 9月15日
DNA65409-1566	203232	1998年 9月15日
DNA65406-1567	203219	1998年 9月15日
DNA61873-1574	203132	1998年 8月18日

DNA64966-1575	203575	1999年 1月12日
DNA67300-1605	203163	1998年 8月25日
DNA68872-1620	203160	1998年 8月25日
DNA76538-1670	203313	1998年10月 6日
DNA33087	203381	1997年10月16日

【０３６６】

これらの寄託は、特許手続き上の微生物の寄託の国際的承認に関するブダペスト条約及びその規則(ブダペスト条約)の規定に従って行われた。これは、寄託の日付から３０年間、寄託の生存培養物が維持されることを保証するものである。寄託物はブダペスト条約の条項に従い、またジェネンテク社とＡＴＣＣとの間の合意に従い、ＡＴＣＣから入手することができ、これは、何れが最初に来ようとも、関連した米国特許の発行時又は任意の米国又は外国特許出願の公開時に、寄託培養物の後代を永久かつ非制限的に入手可能とすることを保証し、米国特許法第１２２条及びそれに従う特許庁長官規則(特に参照番号８８６ＯＧ６３８の３７ＣＦＲ第１．１４条を含む)に従って権利を有すると米国特許庁長官が決定した者に子孫を入手可能とすることを保証するものである。

本出願の譲受人は、寄託した材料の培養物が、適切な条件下で培養されていた場合に死亡もしくは損失又は破壊されたならば、材料は通知時に同一の他のものと速やかに取り替えることに同意する。寄託物質の入手可能性は、特許法に従いあらゆる政府の権限下で認められた権利に違反して、本発明を実施するライセンスであるとみなされるものではない。

上記の文書による明細書は、当業者に本発明を実施できるようにするために十分であると考えられる。寄託した態様は、本発明のある側面の一つの説明として意図されており、機能的に等価なあらゆる作成物がこの発明の範囲内にあるため、寄託された作成物により、本発明の範囲が限定されるものではない。ここでの材料の寄託は、ここに含まれる文書による説明が、そのベストモードを含む、本発明の任意の側面の実施を可能にするために不十分であることを認めるものではないし、それが表す特定の例証に対して請求の範囲を制限するものと解釈されるものでもない。実際、ここに示し記載したものに加えて、本発明を様々に変形することは、前記の記載から当業者にとっては明らかなものであり、添付の請求の範囲内に入るものである。

【図面の簡単な説明】

【０３６７】

【図１】天然配列ＰＲＯ１７２ｃＤＮＡのヌクレオチド配列（配列番号：３）を示す図であり、配列番号：３は、ここで「ＤＮＡ３５９１６-１１６１」と命名されるクローンである。

【図２】図１に示した配列番号：３のコード化配列から誘導されたアミノ酸配列（配列番号：４）を示す図である。

【図３】天然配列ＰＲＯ１７８ｃＤＮＡのヌクレオチド配列（配列番号：８）を示す図であり、配列番号：８は、ここで「ＤＮＡ２３３３９-１１３０」と命名されるクローンである。

【図４】図３に示した配列番号：８のコード化配列から誘導されたアミノ酸配列（配列番号：９）を示す図である。

【図５】天然配列ＰＲＯ１７９ｃＤＮＡのヌクレオチド配列（配列番号：１３）を示す図であり、配列番号：１３は、ここで「ＤＮＡ１６４５１-１３８８」と命名されるクローンである。

【図６】図５に示した配列番号：１３のコード化配列から誘導されたアミノ酸配列（配列番号：１４）を示す図である。

【図７】天然配列ＰＲＯ１８２ｃＤＮＡのヌクレオチド配列（配列番号：１５）を示す図であり、配列番号：１５は、ここで「ＤＮＡ２７８６５-１０９１」と命名されるクローンである。

【図８】図７に示した配列番号：１５のコード化配列から誘導されたアミノ酸配列（配列

番号：１６）を示す図である。
【図９】天然配列ＰＲＯ１８７ｃＤＮＡのヌクレオチド配列（配列番号：２０）を示す図であり、配列番号：２０は、ここで「ＤＮＡ２７８６４-１１５５」と命名されるクローンである。
【図１０】図９に示した配列番号：２０のコード化配列から誘導されたアミノ酸配列（配列番号：２１）を示す図である。
【図１１】天然配列ＰＲＯ１８８ｃＤＮＡのヌクレオチド配列（配列番号：２５）を示す図であり、配列番号：２５は、ここで「ＤＮＡ２８４９７-１１３０」と命名されるクローンである。
【図１２】図１１に示した配列番号：２５のコード化配列から誘導されたアミノ酸配列（配列番号：２６）を示す図である。
【図１３】天然配列ＰＲＯ１９５ｃＤＮＡのヌクレオチド配列（配列番号：３０）を示す図であり、配列番号：３０は、ここで「ＤＮＡ２６８４７-１３９５」と命名されるクローンである。
【図１４】図１３に示した配列番号：３０のコード化配列から誘導されたアミノ酸配列（配列番号：３１）を示す図である。
【図１５】天然配列ＰＲＯ２１２ｃＤＮＡのヌクレオチド配列（配列番号：３５）を示す図であり、配列番号：３５は、ここで「ＤＮＡ３０９４２-１１３４」と命名されるクローンである。
【図１６】図１５に示した配列番号：３５のコード化配列から誘導されたアミノ酸配列（配列番号：３６）を示す図である。
【図１７】天然配列ＰＲＯ２１４ｃＤＮＡのヌクレオチド配列（配列番号：４０）を示す図であり、配列番号：４０は、ここで「ＤＮＡ３２２８６-１１９１」と命名されるクローンである。
【図１８】図１７に示した配列番号：４０のコード化配列から誘導されたアミノ酸配列（配列番号：４１）を示す図である。
【図１９】天然配列ＰＲＯ２１７ｃＤＮＡのヌクレオチド配列（配列番号：４５）を示す図であり、配列番号：４５は、ここで「ＤＮＡ３３０９４-１１３１」と命名されるクローンである。
【図２０】図１９に示した配列番号：４５のコード化配列から誘導されたアミノ酸配列（配列番号：４６）を示す図である。
【図２１】天然配列ＰＲＯ２２４ｃＤＮＡのヌクレオチド配列（配列番号：５０）を示す図であり、配列番号：５０は、ここで「ＤＮＡ３３２２１-１１３３」と命名されるクローンである。
【図２２】図２１に示した配列番号：５０のコード化配列から誘導されたアミノ酸配列（配列番号：５１）を示す図である。
【図２３】天然配列ＰＲＯ２３１ｃＤＮＡのヌクレオチド配列（配列番号：５５）を示す図であり、配列番号：５５は、ここで「ＤＮＡ３４４３４-１１３９」と命名されるクローンである。
【図２４】図２３に示した配列番号：５５のコード化配列から誘導されたアミノ酸配列（配列番号：５６）を示す図である。
【図２５】天然配列ＰＲＯ２３５ｃＤＮＡのヌクレオチド配列（配列番号：６１）を示す図であり、配列番号：６１は、ここで「ＤＮＡ３５５５８-１１６７」と命名されるクローンである。
【図２６】図２５に示した配列番号：６１のコード化配列から誘導されたアミノ酸配列（配列番号：６２）を示す図である。
【図２７】天然配列ＰＲＯ２４５ｃＤＮＡのヌクレオチド配列（配列番号：６６）を示す図であり、配列番号：６６は、ここで「ＤＮＡ３５６３８-１１４１」と命名されるクローンである。
【図２８】図２７に示した配列番号：６６のコード化配列から誘導されたアミノ酸配列（

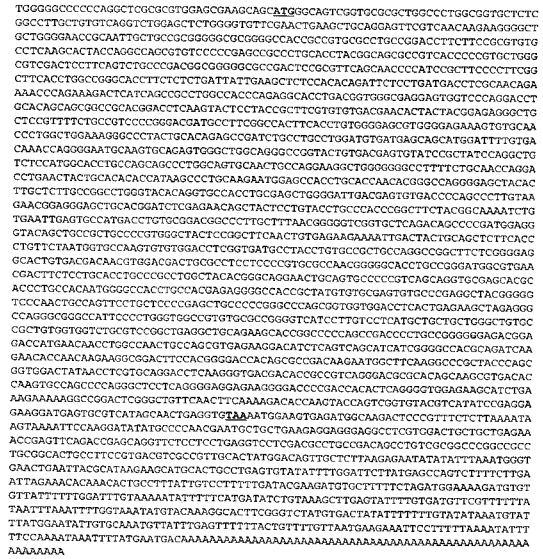
配列番号：６７）を示す図である。
【図２９】天然配列ＰＲＯ２６１ｃＤＮＡのヌクレオチド配列（配列番号：７１）を示す図であり、配列番号：７１は、ここで「ＤＮＡ３３４７３-１１７６」と命名されるクローンである。
【図３０】図２９に示した配列番号：７１のコード化配列から誘導されたアミノ酸配列（配列番号：７２）を示す図である。
【図３１】天然配列ＰＲＯ２６９ｃＤＮＡのヌクレオチド配列（配列番号：７６）を示す図であり、配列番号：７６は、ここで「ＤＮＡ３８２６０-１１８０」と命名されるクローンである。
【図３２】図３１に示した配列番号：７６のコード化配列から誘導されたアミノ酸配列（配列番号：７７）を示す図である。
【図３３】天然配列ＰＲＯ２８７ｃＤＮＡのヌクレオチド配列（配列番号：８４）を示す図であり、配列番号：８４は、ここで「ＤＮＡ３９９６９-１１８５」と命名されるクローンである。
【図３４】図３３に示した配列番号：８４のコード化配列から誘導されたアミノ酸配列（配列番号：８５）を示す図である。
【図３５】天然配列ＰＲＯ３０１ｃＤＮＡのヌクレオチド配列（配列番号：８９）を示す図であり、配列番号：８９は、ここで「ＤＮＡ４０６２８-１２１６」と命名されるクローンである。
【図３６】図３５に示した配列番号：８９のコード化配列から誘導されたアミノ酸配列（配列番号：９０）を示す図である。
【図３７】天然配列ＰＲＯ３２３ｃＤＮＡのヌクレオチド配列（配列番号：９７）を示す図であり、配列番号：９７は、ここで「ＤＮＡ３５５９５-１２２８」と命名されるクローンである。
【図３８】図３７に示した配列番号：９７のコード化配列から誘導されたアミノ酸配列（配列番号：９８）を示す図である。
【図３９】天然配列ＰＲＯ３３１ｃＤＮＡのヌクレオチド配列（配列番号：１０６）を示す図であり、配列番号：１０６は、ここで「ＤＮＡ４０９８１-１２３４」と命名されるクローンである。
【図４０】図３９に示した配列番号：１０６のコード化配列から誘導されたアミノ酸配列（配列番号：１０７）を示す図である。
【図４１】天然配列ＰＲＯ３５６ｃＤＮＡのヌクレオチド配列（配列番号：１１１）を示す図であり、配列番号：１１１は、ここで「ＤＮＡ４７４７０-１１３０-Ｐ１」と命名されるクローンである。
【図４２】図４１に示した配列番号：１１１のコード化配列から誘導されたアミノ酸配列（配列番号：１１２）を示す図である。
【図４３】天然配列ＰＲＯ３６４ｃＤＮＡのヌクレオチド配列（配列番号：１１６）を示す図であり、配列番号：１１６は、ここで「ＤＮＡ４７３６５-１２０６」と命名されるクローンである。
【図４４】図４３に示した配列番号：１１６のコード化配列から誘導されたアミノ酸配列（配列番号：１１７）を示す図である。
【図４５】天然配列ＰＲＯ５２６ｃＤＮＡのヌクレオチド配列（配列番号：１２６）を示す図であり、配列番号：１２６は、ここで「ＤＮＡ４４１８４-１３１９」と命名されるクローンである。
【図４６】図４５に示した配列番号：１２６のコード化配列から誘導されたアミノ酸配列（配列番号：１２７）を示す図である。
【図４７】天然配列ＰＲＯ５３８ｃＤＮＡのヌクレオチド配列（配列番号：１３１）を示す図であり、配列番号：１３１は、ここで「ＤＮＡ４８６１３-１２６８」と命名されるクローンである。
【図４８】図４７に示した配列番号：１３１のコード化配列から誘導されたアミノ酸配列

（配列番号：１３２）を示す図である。
【図４９】天然配列ＰＲＯ７１３ｃＤＮＡのヌクレオチド配列（配列番号：１３６）を示す図であり、配列番号：１３６は、ここで「ＤＮＡ２９１０１-１１２２」と命名されるクローンである。
【図５０】図４９に示した配列番号：１３６のコード化配列から誘導されたアミノ酸配列（配列番号：１３７）を示す図である。
【図５１】天然配列ＰＲＯ７１９ｃＤＮＡのヌクレオチド配列（配列番号：１４２）を示す図であり、配列番号：１４２は、ここで「ＤＮＡ４９６４６-１３２７」と命名されるクローンである。
【図５２】図５１に示した配列番号：１４２のコード化配列から誘導されたアミノ酸配列（配列番号：１４３）を示す図である。
【図５３】天然配列ＰＲＯ７７１ｃＤＮＡのヌクレオチド配列（配列番号：１４７）を示す図であり、配列番号：１４７は、ここで「ＤＮＡ４９８２９-１３４６」と命名されるクローンである。
【図５４】図５３に示した配列番号：１４７のコード化配列から誘導されたアミノ酸配列（配列番号：１４８）を示す図である。
【図５５】天然配列ＰＲＯ７８８ｃＤＮＡのヌクレオチド配列（配列番号：１５２）を示す図であり、配列番号：１５２は、ここで「ＤＮＡ５６４０５-１３５７」と命名されるクローンである。
【図５６】図５５に示した配列番号：１５２のコード化配列から誘導されたアミノ酸配列（配列番号：１５３）を示す図である。
【図５７】天然配列ＰＲＯ７９２ｃＤＮＡのヌクレオチド配列（配列番号：１５４）を示す図であり、配列番号：１５４は、ここで「ＤＮＡ５６３５２-１３５８」と命名されるクローンである。
【図５８】図５７に示した配列番号：１５４のコード化配列から誘導されたアミノ酸配列（配列番号：１５５）を示す図である。
【図５９】天然配列ＰＲＯ８１２ｃＤＮＡのヌクレオチド配列（配列番号：１５９）を示す図であり、配列番号：１５９は、ここで「ＤＮＡ５９２０５-１４２１」と命名されるクローンである。
【図６０】図５９に示した配列番号：１５９のコード化配列から誘導されたアミノ酸配列（配列番号：１６０）を示す図である。
【図６１】天然配列ＰＲＯ８６５ｃＤＮＡのヌクレオチド配列（配列番号：１６１）を示す図であり、配列番号：１６１は、ここで「ＤＮＡ５３９７４-１４０１」と命名されるクローンである。
【図６２】図６１に示した配列番号：１６１のコード化配列から誘導されたアミノ酸配列（配列番号：１６２）を示す図である。
【図６３】天然配列ＰＲＯ１０７５ｃＤＮＡのヌクレオチド配列（配列番号：１６９）を示す図であり、配列番号：１６９は、ここで「ＤＮＡ５７６８９-１３８５」と命名されるクローンである。
【図６４】図６３に示した配列番号：１６９のコード化配列から誘導されたアミノ酸配列（配列番号：１７０）を示す図である。
【図６５】天然配列ＰＲＯ１１２６ｃＤＮＡのヌクレオチド配列（配列番号：１８０）を示す図であり、配列番号：１８０は、ここで「ＤＮＡ６０６１５-１４８３」と命名されるクローンである。
【図６６】図６５に示した配列番号：１８０のコード化配列から誘導されたアミノ酸配列（配列番号：１８１）を示す図である。
【図６７】天然配列ＰＲＯ１１３０ｃＤＮＡのヌクレオチド配列（配列番号：１８２）を示す図であり、配列番号：１８２は、ここで「ＤＮＡ５９８１４-１４８６」と命名されるクローンである。
【図６８】図６７に示した配列番号：１８２のコード化配列から誘導されたアミノ酸配列

（配列番号：１８３）を示す図である。
【図６９】天然配列ＰＲＯ１１５４ｃＤＮＡのヌクレオチド配列（配列番号：１９０）を示す図であり、配列番号：１９０は、ここで「ＤＮＡ５９８４６-１５０３」と命名されるクローンである。
【図７０】図６９に示した配列番号：１９０のコード化配列から誘導されたアミノ酸配列（配列番号：１９１）を示す図である。
【図７１】天然配列ＰＲＯ１２４４ｃＤＮＡのヌクレオチド配列（配列番号：１９２）を示す図であり、配列番号：１９２は、ここで「ＤＮＡ６４８８３-１５２６」と命名されるクローンである。
【図７２】図７１に示した配列番号：１９２のコード化配列から誘導されたアミノ酸配列（配列番号：１９３）を示す図である。
【図７３】天然配列ＰＲＯ１２４６ｃＤＮＡのヌクレオチド配列（配列番号：１９４）を示す図であり、配列番号：１９４は、ここで「ＤＮＡ６４８８５-１５２９」と命名されるクローンである。
【図７４】図７３に示した配列番号：１９４のコード化配列から誘導されたアミノ酸配列（配列番号：１９５）を示す図である。
【図７５】天然配列ＰＲＯ１２７４ｃＤＮＡのヌクレオチド配列（配列番号：１９６）を示す図であり、配列番号：１９６は、ここで「ＤＮＡ６４８８９-１５４１」と命名されるクローンである。
【図７６】図７５に示した配列番号：１９６のコード化配列から誘導されたアミノ酸配列（配列番号：１９７）を示す図である。
【図７７】天然配列ＰＲＯ１２８６ｃＤＮＡのヌクレオチド配列（配列番号：１９８）を示す図であり、配列番号：１９８は、ここで「ＤＮＡ６４９０３-１５５３」と命名されるクローンである。
【図７８】図７７に示した配列番号：１９８のコード化配列から誘導されたアミノ酸配列（配列番号：１９９）を示す図である。
【図７９】天然配列ＰＲＯ１２９４ｃＤＮＡのヌクレオチド配列（配列番号：２００）を示す図であり、配列番号：２００は、ここで「ＤＮＡ６４９０５-１５５８」と命名されるクローンである。
【図８０】図７９に示した配列番号：２００のコード化配列から誘導されたアミノ酸配列（配列番号：２０１）を示す図である。
【図８１】天然配列ＰＲＯ１３０３ｃＤＮＡのヌクレオチド配列（配列番号：２０２）を示す図であり、配列番号：２０２は、ここで「ＤＮＡ６５４０９-１５６６」と命名されるクローンである。
【図８２】図８１に示した配列番号：２０２のコード化配列から誘導されたアミノ酸配列（配列番号：２０３）を示す図である。
【図８３】天然配列ＰＲＯ１３０４ｃＤＮＡのヌクレオチド配列（配列番号：２０４）を示す図であり、配列番号：２０４は、ここで「ＤＮＡ６５４０６-１５６７」と命名されるクローンである。
【図８４】図８３に示した配列番号：２０４のコード化配列から誘導されたアミノ酸配列（配列番号：２０５）を示す図である。
【図８５】天然配列ＰＲＯ１３１２ｃＤＮＡのヌクレオチド配列（配列番号：２１３）を示す図であり、配列番号：２１３は、ここで「ＤＮＡ６１８７３-１５７３」と命名されるクローンである。
【図８６】図８５に示した配列番号：２１３のコード化配列から誘導されたアミノ酸配列（配列番号：２１４）を示す図である。
【図８７】天然配列ＰＲＯ１３１３ｃＤＮＡのヌクレオチド配列（配列番号：２１５）を示す図であり、配列番号：２１５は、ここで「ＤＮＡ６４９６６-１５７５」と命名されるクローンである。
【図８８】図８７に示した配列番号：２１５のコード化配列から誘導されたアミノ酸配列

（配列番号：２１６）を示す図である。
【図８９】天然配列ＰＲＯ１３７６ｃＤＮＡのヌクレオチド配列（配列番号：２１７）を示す図であり、配列番号：２１７は、ここで「ＤＮＡ６７３００-１６０５」と命名されるクローンである。
【図９０】図８９に示した配列番号：２１７のコード化配列から誘導されたアミノ酸配列（配列番号：２１８）を示す図である。
【図９１】天然配列ＰＲＯ１３８７ｃＤＮＡのヌクレオチド配列（配列番号：２１９）を示す図であり、配列番号：２１９は、ここで「ＤＮＡ６８８７２-１６２０」と命名されるクローンである。
【図９２】図９１に示した配列番号：２１９のコード化配列から誘導されたアミノ酸配列（配列番号：２２０）を示す図である。
【図９３】天然配列ＰＲＯ１５６１ｃＤＮＡのヌクレオチド配列（配列番号：２２１）を示す図であり、配列番号：２２１は、ここで「ＤＮＡ７６５３８-１６７０」と命名されるクローンである。
【図９４】図９３に示した配列番号：２２１のコード化配列から誘導されたアミノ酸配列（配列番号：２２２）を示す図である。
【図９５】天然配列ＰＲＯ２１６ｃＤＮＡのヌクレオチド配列（配列番号：２２６）を示す図であり、配列番号：２２６は、ここで「ＤＮＡ３３０８７」と命名されるクローンである。
【図９６】図９５に示した配列番号：２２６のコード化配列から誘導されたアミノ酸配列（配列番号：２２７）を示す図である。

【図１】



【図２】

シグナル配列：　アミノ酸 1-21

膜貫通ドメイン：　アミノ酸 546-566

N-グリコシル化部位：　アミノ酸 477-481

cAMP- 及び cGMP-依存性プロテインキナーゼリン酸化部位：　アミノ酸 660-664

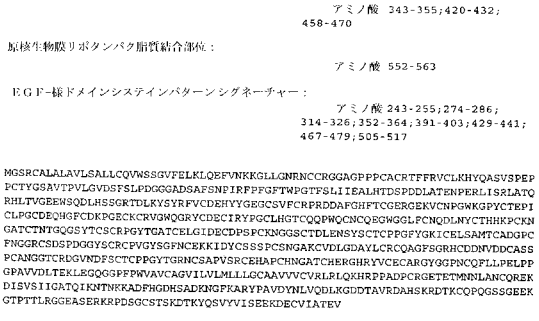
チロシンキナーゼリン酸化部位：　アミノ酸 176-185;252-261

N-ミリストイル化部位：　アミノ酸 2-8;37-43;40-46;98-104;99-105;262-268;281-287;282-288;301-307;310-316;328-334;340-344;378-384;387-393;512-518;676-682;683-689;695-701

アスパラギン酸アスパラギンヒドロキシル化部位：　アミノ酸 343-355;420-432;458-470

原核生物膜リポタンパク脂質結合部位：　アミノ酸 552-563

ＥＧＦ-様ドメインシステインパターンシグネーチャー：　アミノ酸 243-255;274-286;314-326;352-364;391-403;429-441;467-479;505-517



【図３】

GGCTCAGAGGCCCCACTGGACCCTCGGCTCTTCCTTGGACTTCTTGTGTGTTCTGTGAGCTTCGCTGGATTCAGG
GTCTTGGGCATCAGAGGTGAGAGGGTGGGAAGGTCCGCCGCATGGGGAAGCCCTGGCTGCGTGCGCTACAGCTG
CTGCTCCTGCTGGCGCGTCGTGGCGCGGGCGGGCGCCCCGCGCTGCACCTACACCTTCGTGCTGCCCCCGCAG
AAGTTCACGGGCGCTGTGTGCTGGAGCGGCCCCGCATCCACGCGGGCGACGCCCGAGGCCGCCAACGCCAGCGAG
CTGGCGGCGCTGCGCATGCGCGTCGGCCGCCACGAGGAGCTGTTACGCGAGCTGCAGAGGCTGGCGGCGGCCGAC
GGCGCCGTGGCCGGCGAGGTGCGCGCCGCTGCGACAAGGAGACCGCGGCCTGAGCGCGCCCTGGGCCAGTTGCGC
GCGCAGCTGCAGCACGAGGCGGGCCCGGGGCGGCCCGGGGGCGGATCTGGGGGCGGAGCCTGCCGCGGCGCTG
GCGCTGCTCGGGGAGCGCGTGCTCAACGCGTCCGCCGAGGCTCAGCGCGCAGCCGCCCGGTTCCACCAGCTGGAC
GTCAAGTTCCGCGAGCTGGCGCAGCTCGTCACCCAGCAGAGCAGTCTCATCGCCCGCCTGGAGCGCCTGTGCCCG
GGAGGCGCGGGCGGGCAGCAGCAGGTCCTGCCGCCACCCCCACTGGTGCCTGTGGTTCCGGTCCGTCTTGTGGGT
AGCACCAGTGACACCAGTAGGAGGCTGGACCCAGCCCCAGAGGACCAGACCCAGAGACAGCAGGAG
CCCATGGCTTCTCCCATGCCTGCAGGTCACCCTGCGGTCCCCACCAAGCCTGTGGGCCCGTGGCAGGATTGTGCA
GAGGCCCGCCAGGCAGGCCATGAACAGAGTGGAGTGTATGAACTGCGAGTGGGCCGTCACGTAGTGTCAGTATGG
TGTGAGCAGCAACTGGAGGGTGGAGGCTGGACTGTGATCCAGCGGAGGCAAGATGGTTCAGTCAACTTCTTCACT
ACCTGGCAGCACTATAAGGCGGCCTTTGGGCGGCCAGACGGAGAATACTGGCTGGGCCTTGAACCCGTGTATCAG
CTGACCAGCCGTGGGGACCATGAGCTGCTGGTTCTCCTGGAGGACTGGGGGGGCCGTGGAGCACGTGCCCACTAT
GATGGCTTCTCCCTGGAACCCGAGAGGCGACCACTACCGCCTGCGGCTTGGCCAGTACCATGGTGATGCTGGAGAC
TCTCTTTCCTGGCACAATGACAAGCCCTTCAGCACCGTGGATAGGGACCGAGACTCCTATTCTGGTAACTGTGCC
CTGTACCAGCGGGGAGGCTGGTGGTACCATGCCTGTGCCACTCCAACCTCCAACCTCAACGGTGTGTGGCACCACGGCGGC
CACTACCGAAGCCGCTACCAGGATGGTGTCTACTGGGCTGAGTTTCGTGGTGGGGCATATTCTCTCAGGAAGGCC
GCCATGCTCATTCGGCCCCTGAAGCTGTGACTCTGTGTTTCTGTCCCTAGGCCTAGAGGACATTGGTCAGC
AGGAGCCCAAGTTGTTCTGGCCACACCTTCTTTTGTGGCTCAGTGCCAATGTGTCCCACAGAACTTCCCACTGTGG
ATCTGTGACCCTGGGCGCTGAAAATGGGACCCAGGAATCCCCCCGTCAATATCTTGGCCTCAGATGGCTCCCCA
AGGTCATTCATATCTCGGTTTGAGCTCATATCTTATAATAACACAAAGTAGCCAC

【図４】

シグナル配列： アミノ酸 1-20

N-グリコシル化部位： アミノ酸 58-62;145-149

cAMP- 及び cGMP-依存性プロテインキナーゼリン酸化部位： アミノ酸 97-101

チロシンキナーゼリン酸化部位： アミノ酸 441-448

N-ミリストイル化部位： アミノ酸 16-22;23-29;87-93;108-114;121-127;125-131;129-135;187-193;293-299;353-359;378-384;445-451;453-459

細胞接着配列： アミノ酸 340-343

フィブリノーゲンベータ及びガンマ鎖C-末端ドメインシグネチャー： アミノ酸 418-431

MGKPWLRALQLLLLLGASWARAGAPRCTYTFVLPPQKFTGAVCWSGPASTRATPEAANASELAALRMRVGRHEEL
LRELQRLAAADGAVAGEVRALRKESRGLSARLGQLRAQLQHEAGPGAGPGADLGAEPAAALALLGERVLNASAEA
QRAAARFHQLDVKFRELAQLVTQQSSLIARLERLCPGGAGGQQQVLPPPPLVPVVPVRLVGSTSDTSRMLDPAPE
PQRDQTQRQQEPMASPMPAGHPAVPTKPVGPWQDCAEARQAGHEQSGVYELRVGRHVVSVWCEQQLEGGGWTVIQ
RRQDGSVNFFTTWQHYKAGFGRPDGEYWLGLEPVYQLTSRGDHELLVLLEDWGGRGARAHYDGFSLEPESDHYRL
RLSQYHGDAGDSLSWHNDKPFSTVDRDRDSYSGNCALYQRGGWWYHACAHSNLNGVWHHGGHYRSRYQDGVYWAE
FRGGAYSLRKAAMLIRPLKL

【図５】

GCGGACGCGTGGGTGAAATTGAAAATCAAGATAAAAATGTTCACAATTAAGCTCCTTCTTTTTATTGTTCCTCTA
GTTATTTCCTCCAGAATTGATCAAGACAATTCATCATTTGATTCTCTATCTCCAGAGCCAAAATCAAGATTTGCT
ATGTTAGACGATGTAAAAATTTTAGCCAATGGCCTCCTTCAGTTGGGACATGGTCTTAAAGACTTTGTCCATAAG
ACGAAGGGCCAAATTAATGACATATTTCAAAAACTCAACATATTGATCAGTCTTTTTATGATCTATCGCTGCAA
ACCAGTGAAATCAAAGAAGAAGAAAAGGAACTGAGAAGAACTACATATAAACTACAAGTCAAAAATGAAGAGGTA
AAGAATATGTCACTTGAACTCAACTCAAAACTTGAAAGCCTCCTAGAAGAAAAAATTCTACTTCAACAAAAAGTG
AAATATTTAGAAGAGCAACTAACTAACTTTAATTCAAAATCAACCTGAAACTCCAGAACACCCAGAAGTAACTTCA
CTTAAAACTTTTGTAGAAAAACAAGATAATAGCATCAAAGACCTTCTCCAGACCGTGGAAGACCAATATAAACAA
TTAAACCAACAGCATAGTCAAATAAAAGAAATAGAAAATCAGCTCAGAAGGACTAGTATTCAAGAACCCACAGAA
ATTTCTCTATCTTCCAAGCCAAGAGCACCAAGAACTACTCCCTTTCTTCAGTTGAATGAAATAAGAAATGTAAAA
CATGATGGCATTCCTGCTGAATGTACCACCATTTATAACAGAGGTGAACATACAAGTGGCATGTATGCCATCAGA
CCCAGCAACTCTCAAGTTTTTCATGTCTACTGTGATGTTATATCAGGTAGTCCATGGACATTAATTCAACATCGA
ATAGATGGATCACAAAACTTCAATGAAACGTGGGAGAACTACAAATATGGTTTTGGGAGGCTTGATGGAGAATTT
TGGTTGGGCCTAGAGAAGATATACTCCATAGTGAAGCAATCTAATTATGTTTTACGAATTGAGTTGGAAGACTGG
AAAGACAACAAACATTATATTGAATATTCTTTTTACTTGGGAAATCACGAAACCAACTATACGCTACATCTAGTT
GCGATTACTGGCAATGTCCCCAATGCAATCCCGGAAAACAAAGATTGGTGTTTTCTACTTGGGATCACAAAGCA
AAAGGACACTTCAACTGTCCAGAGGGTTATTCAGGAGGCTGGTGGTGGCATGATGAGTGTGGAGAAAACAACCTA
AATGGTAAATATAACAAACCAAGAGCAAAATCTAAGCCAGAGAGGAGAAGAGGATTATCTTGGAAGTCTCAAAAT
GGAAGGTTATACTCTATAAAATCAACCAAAATGTTGATCCATCCAACAGATTCAGAAAGCTTGAATGAACTGAG
GCAATTTAAAGGCATATTTAACCATTAACTCATTCCAAGTTAATGTGGTCTAATAATCTGGTATAAATCCTTAAG
AGAAAGCTTGAGAAATAGATTTTTTTATCTTAAAGTCACTGTCTATTTAAGATTAAACATACAATCACATAACC
TTAAACGAATACCGTTTACATTTCTCAATCAAAATTCTTATAATACTATTTGTTTTAAATTTTGTGATGTGGGAATC
AATTTTAGATGGTCACAATCTAGATTATAATCAATAGGTGAACTTATTAAATAACTTTTCTAAATAAAAAATTTA
GAGACTTTTATTTTAAAAGGCATCATATGAGCTAATATCACAACTTTCCCAGTTTAAAAAACTAGTACTCTTGTT
AAAACTCTAAACTTGACTAAATACAGAGGACTGGTAATTGTACAGTTCTTAAATGTTGTAGTATTAATTTCAAAA
CTAAAAATCGTCAGCACAGAGTATGTGTAAAAATCTGTAATACAAATTTTAAACTGATGCTTCATTTTGCTACA
AAATAATTTGGAGTAAATGTTTGATATGATTTATTTATGAAACCTAATGAAGCAGAATTAAATACTGTATTAAAA
TAAGTTCGCTGTCTTT

【図６】

シグナル配列： アミノ酸 1-16

N-グリコシル化部位： アミノ酸 23-27;115-119;296-300;357-361

cAMP- 及び cGMP-依存性プロテインキナーゼリン酸化部位： アミノ酸 100-104;204-208

チロシンキナーゼリン酸化部位： アミノ酸 342-351

N-ミリストイル化部位： アミノ酸 279-285;352-358;367-373

ロイシンジッパーパターン： アミノ酸 120-142;127-149

MFTIKLLLFIVPLVISSRIDQDNSSFDSLSPEPKSRFAMLDDVKILANGLLQLGHGLKDFVHKTKGQINDIFQKL
NIFDQSFYDLSLQTSEIKEEEKELRRTTYKLQVKNEEVKNMSLELNSKLESLLEEKILLQQKVKYLEEQLTNLIQ
NQPETPEHPEVTSLKTFVEKQDNSIKDLLQTVEDQYKQLNQQHSQIKEIENQLRRTSIQEPTEISLSSKPRAPRT
TPFLQLNEIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISGSPWTLIQHRIDGSQNFNETWE
NYKYGFGRLDGEFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRIELEDWKDNKHYIEYSFYLGNHETNYTLHLVAITGNVPNAIPE
NKDLVFSTWDHKAKGHFNCPEGYSGGWWWHDECGENNLNGKYNKPRAKSKPERRRGLSWKSQNGRLYSIKSTKML
IHPTDSESPE

【図７】

TATTTACCATATCAGATTCACATTCAGTCCTCAGCAAAATGAAGGGCTCCATTTTCACTCTGTTTTTATTCTCTG
TCCTATTTGCCATCTCAGAAGTGCGGAGCAAGGAGTCTGTGAGACTCTGTGGGCTAGAATACATACGGACAGTCA
TCTATATCTGTGCTAGCTCCAGGTGGAGAAGGCATCTGGAGGGGATCCCTCAAGCTCAGCAAGCTGAGACAGGAA
ACTCCTTCCAGCTCCCACATAAACGTGAGTTTTCTGAGGAAAATCCAGCGCAAAACCTTCCGAAGGTGGATGCCT
CAGGGGAAGACCGTCTTTGGGGTGGACAGATGCCCACTGAAGAGCTTTGGAAGTCAAAGAAGCATTCAGTGATGT
CAAGACAAGATTTACAAACTTTGTGTTGCACTGATGGCTGTTCCATGACTGATTTGAGTGCTCTTTGCTAAGACA
AGAGCAAATACCCAATGGGTGGCAGAGCTTTATCACATGTTTAATTACAGTGTTTTACTGCCTGGTAGAACACTA
ATATTGTGTTATTAAAATGATGGCTTTTGGGTAGGCAAAACTTCTTTTCTAAAAGGTATAGCTGAGCGGTTGAAA
CCACAGTGATCTCTATTTTCTCCCTTTGCCAAGGTTAATGAACTGTTCTTTTCAAATTCTACTAATGCTTTGAAA
TTTCAAATGCTGCGCAAAATTGCAATAAAAATGCTATAAA

【図８】

シグナル配列： アミノ酸 1-18

cAMP- 及び cGMP-依存性プロテインキナーゼリン酸化部位： アミノ酸 107-111

N-ミリストイル化部位： アミノ酸 3-9;52-58;96-102;125-131

インシュリンファミリーシグネーチャー： アミノ酸 121-136

MKGSIFTLFLFSVLFAISEVRSKESVRLCGLEVIRTVIYICASSRWRRHLEGIPQAQQAETGNSFQLPHKREFSE
ENPAQNLPKVDASGEDRLWGGQMPTEELWKSKKHSVMSRQDLQTLCCTDGCSMTDLSALC

【図９】

CCCACGCGTCCGAACCTCTCCAGCGATGGGAGCCGCCCGCCTGCTGCCCAACCTCACTCTGTGCTTACAGCTGCT
GATTCTCTGCTGTCAAACTCAGTACGTGAGGGACCAGGGCGCCATGACCGACCAGCTGAGCAGGCGGCAGATCCG
CGAGTACCAACTCTACAGCAGGACCAGTGGCAAGCACGTGCAGGTCACCGGGCGTCGCATCTCCGCCACCGCCGA
GGACGGCAACAAGTTTGCCAAGCTCATAGTGGAGACGGACACGTTTGGCAGCCGGGTTCGCATCAAAGGGGCTGA
GAGTGAGAAGTACATCTGTATGAACAAGAGGGGCAAGCTCATCGGGAAGCCCAGCGGGAAGAGCAAAGACTGCGT
GTTCACGGAGATCGTGCTGGAGAACAACTATACGGCCTTCCAGAACGCCCGGCACGAGGGCTGGTTCATGGCCTT
CACGCGGCAGGGGCGGCCCGCCAGGCTTCCGCAGCCGCCAGAACCAGCGCGAGGCCCACTTCATCAAGCGCCT
CTACCAAGGCCAGCTGCCCTTCCCCAACCACGCCGAGAAGCAGAAGCAGTTCGAGTTTGTGGGCTCCGCCCCAC
CCGCCGGACCAAGCGCACACGGCGGCCCCAGCCCCTCACGTAGTCTGGGAGGCAGGGGGCAGCAGCCCCTGGGCC
GCCTCCCCACCCCTTTCCCTTCTTAATCCAAGGACTGGGCTGGGGTGGCGGGAGGGGAGCCAGATCCCCGAGGGA
GGACCCTGAGGGCCGCGAAGCATCCGAGCCCCCAGCTGGGAAGGGGCAGGCCGGTGCCCCAGGGGCGGCTGGCAC
AGTGCCCCCTTCCCGGACGGGTGGCAGGCCCTGGAGAGGAACTGAGTGTCACCCTGATCTCAGGCCACCAGCCTC
TGCCGGCCTCCCAGCCGGGCTCCTGAAGCCCGCTGAAAGGTCAGCGACTGAAGGCCTTGCAGACAACCGTCTGGA
GGTGGCTGTCCTCAAAATCTGCTTCTCGGATCTCCCTCAGTCTGCCCCCAGCCCCCAAACTCCTCCTGGCTAGAC
TGTAGGAAGGGACTTTTGTTTGTTTGTTTGTTTCAGGAAAAAAGAAAGGGAGAGAGAGGAAAATAGAGGGTTGTC
CACTCCTCACATTCCACGACCCAGGCCTGCACCCCACCCCCAACTCCCAGCCCCGGAATAAAACCATTTTCCTGC

【図１１】

GCAGCTGGTTACTGCATTTCTCCATGTGGCAGACAGAGCAAAGCCACAACGCTTTCTCTGCTGGATTAAAGACGG
CCCACAGACCAGAACTTCCACTATACTACTTAAAATTACATAGGTGGCTTGTCAAATTCAATTGATTAGTATTGT
AAAAGGAAAAAGAAGTTCCTTCTTACAGCTTGGATTCAACGGTCCAAAACAAAAATGCAGCTGCCATTAAAGTCT
CAGATGAACAAACTTCTACACTGATTTTAAAATCAAGAATAAGGGCAGCAAGTTTCTGGATTCACTGAATCAAC
AGACACAAAAGCTGGCAATATAGCAACTATGAAGAGAAAAGCTACTAATAAAATTAACCCAACGCATAGAAGAC
TTTTTTTTCTCTTCTAAAAACAACTAAGTAAAGACTTAAATTTAAACACATCATTTTACAACCTCATTTCAAAAT
GAAGACTTTTACCTGGACCCTAGGTGTGCTATTCTTCCTACTAGTGGACACTGGACATTGCAGAGGTGGACAATT
CAAAATTAAAAAAATAAACCAGAGAAGATACCCTCGTGCCACAGATGGTAAAGAGGAAGCAAAGAAATGTGCATA
CACATTCCTGGTACCTGAACAAAGAATAACAGGGCCAATCTGTGTCAACACCAAGGGGCAAGATGCAAGTACCAT
TAAAGACATGATCACCAGGATGGACCTTGAAAACCTGAAGGATGTGCTCTCCAGGCAGAAGCGGGAGATAGATGT
TCTGCAACTGGTGGTGGATGTAGATGGAAACATTGTGAATGAGGTAAAGCTGCTGAGAAAGGAAAGCCGTAACAT
GAACTCTCGTGTTACTCAACTCTATATGCAATTATTACATGAGATTATCCGTAAGAGGGATAATTCACTTGAACT
TTCCCAACTGGAAAACAAAATCCTCAATGTCACCACAGAAATGTTGAAGATGGCAACAAGATACAGGGAACTAGA
GGTGAAATACGCTTCCTTGACTGATCTTGTCAATAACCAATCTGTGATGATCACTTTGTTGGAAGAACAGTGCTT
GAGGATATTTTCCCGACAAGACACCCATGTGTCTCCCCCACTTGTCCAGGTGGTGCCACAACATATTCCTAACAG
CCAACAGTATACTCCTGGTCTGCTGGGAGGTAACGAGATTCAGAGGGATCCAGGTTATCCCAGAGATTTAATGCC
ACCACCTGATCTGGCAACTTCTCCCACCAAAAGCCCTTTCAAGATACCACCGGTAACTTTCATCAATGAAGGACC
ATTCAAAGACTGTCAGCAAGCAAAAGAAGCTGGGCATTCGGTCAGTGGGATTTATATGATTAAACCTGAAAACAG
CAATGGACCAATGCAGTTATGGTGTGAAAACAGTTTGGACCCTGGGGGTTGGACTGTTATTCAGAAAAGAACAGA
CGGCTCTGTCAACTTCTTCAGAAATTGGGAAAATTATAAGAAAGGGTTTGGAAACATTGACGGAGAATACTGGCT
TGGACTGGAAAATATCTATATGCTTAGCAATCAAGATAATTACAAGTTATTGATTGAATTAGAAGACTGGAGTGA
TAAAAAAGTCTATGCAGAATACAGCAGCTTTCGTCTGGAACCTGAAAGTGAATTCTATAGACTGCGCCTGGGAAC
TTACCAGGGAAATGCAGGGGATTCTATGATGTGGCATAATGGTAAACAATTCACCACACTGGACAGAGATAAAGA
TATGTATGCAGGAAACTGCGCCCACTTTCATAAAGGAGGCTGGTGGTACAATGCCTGTGCACATTCTAACCTAAA
TGGAGTATGGTACAGAGCAGGCCATTACAGAAGCAAGCACCAAGATGGAATTTTCTGGGCCGAATACAGAGGCGG
GTCATACTCCTTAAGAGCAGTTCAGATGATGATCAAGCCTATTGACTGAGAGAGACACTCGCCAATTTAAATGA
CACAGAACTTTGTACTTTTCAGCTCTTAAAAATGTAAATGTTACATGTATATTACTTGGCACAATTTATTTCTAC
ACAGAAAGTTTTTAAAATGAATTTTACCGTAACTATAAAAGGGAACCTATAAATGTAGTTTCATCTGTCGTCAAT
TACTGCAGAAAATTATGTGTATCCACAACCTAGTTATTTTAAAAATTATGTTGACTAAATACAAAGTTTGTTTTC
TAAAATGTAAATATTTGCCACAATGTAAAGCAAATCTTAGCTATATTTTAAATCATAAATAACATGTTCAAGATA
CTTAACAATTTATTTAAAATCTAAGATTGCTCTAACGTCTAGTGAAAAAAATATTTTTTAAATTTCAGCCAAATA
ATGCATTTTATTTTATAAAAAATACAGACAGAAAATTAGGGAGAAACTTCTAGTTTGCCAATAGAAAATGTTCTT
CCATTGAATAAAAGTTATTTCAAATTGAATTTGTGCCTTTCACACGTAATGATTAAATCTGAATTCTTAATAATA
TATCCTATGCTGATTTTCCCAAAACATGACCCATAGTATTAAATACATATCATTTTAAAAATAAAAAAAACCC
AAAAATAATGCATGCATAATTTAAATGGTCAATTTATAAAGACAAATCTATGAATGAATTTTTCAGTGTTATCTT
CATATGATATGCTGAACACCAAAATCTCCAGAAATGCATTTTATGTAGTTCTAAAATCAGCAAAATATTGGTATT
ACAAAAATGCAGAATATTTAGTGTGCTACAGATCTGAATTATAGTTCTAATTTATTATTACTTTTTTTCTAATTT
ACTGATCTTACTACTACAAAGAAAAAAAAACCCAACCCATCTGCAATTCAAATCAGAAAGTTTGCACAGCTTTAC
AAGTATTAGTGCATGCTCAGAACAGGTGGGACTAAAACAAACTCAAGGAACTGTTGGCTGTTTTCCCGATACTGA
GAATTCAACAGCTCCAGAGCAGAAGCCACAGGGCATAGCTTAGTCCAAACTGCTAATTTCATTTTACAGTGTAT
GTAACGCTTAGTCTCACAGTGTCTTTAACTCATCTTTGCAATCAACAACTTTACTAGTGACTTTCTGGAACAATT
TCCTTTCAGGAATACATATTCACTGCTTAGAGGTGACCTTGCCTTAATATATTTGTGAAGTTAAAATTTTAAAGA
TAGCTCATGAAACTTTTGCTTAAGCAAAAAGAAAACCTCGAATTGAAATGTGTGAGGCAAACTATGCATGGGAAT
AGCTTAATGTGAAGATAATCATTTGGACAACTCAAATCCATCAACATGACCAATGTTTTCATCTGCCACATCTC
AAAATAAAACTTCTGGTGAAACAAATTAAACAAAATATCCAAACCTCAAAAAAAA

【図１２】

シグナル配列： アミノ酸 1-23

N-グリコシル化部位： アミノ酸 160-164;188-192

cAMP- 及び cGMP-依存性プロテインキナーゼリン酸化部位：
アミノ酸 120-124

チロシンキナーゼリン酸化部位： アミノ酸 173-180;387-396

N-ミリストイル化部位 アミノ酸 70-76;110-116;232-238
343-349;400-406;467-473;475-487

フィブリノ・ゲンペ・タ及びガンマ鎖 C-末端ドメインシグネーチャー：
アミノ酸 440-453

MKTFTWTLGVLPFLLVDTGHCRGGQFKIKKINQRRYPRATDGKEEAKKCAYTFLVPEQRITGPICVNTKGQDAST
IKEMITRMDLENLKDVLSRQKREIDVLQLVVVDVDGNIVNEVKLLRKESRNMNSRVTQLYMQLLHEIIRKRDNSLE
LSQLENKILNVTTEMLKMATRYRELEVKYASLTDLVNNQSVMITLLEEQCLRIFSRQDTHVSPPLVQVVPQHIPN
SQQYTPGLLGGNEIQRDPGYPRDLMPPPDLATSPTKSPFKIPVTFINEGPFKDCQQAKEAGHSVSGIYMIKPEN
SNGPMQLWCENSLDPGGWTVIQKRTDGSVNFFRNWENYKKGFGNIDGEYWLGLENIYMLSNQDNYKLLIELEDWS
DKKVYAEYSSFRLEPESEFYRLRLGTYQGNAGDSMMWHNGKQFTTLDRDKDMYAGNCAHFHKGGNWWYNACAHSNL
NGVWYRGGHYRSKHQDGIPWAEYRGGSYSLRAVQMMIKPID

【図１３】

CGGACGCGTGGGGGAAACCCTTCCGAGAAAACAGCAACAAGCTGAGCTGCTGTGACAGAGGGGAACAAGATGGCG
GCGCCGAAGGGGAGCCTCTGGGTGAGGACCCAACTGGGGCTCCCGCCGCTGCTGCTGACCATGGCCTTGGCC
GGAGGTTCGGGGACCGCTTCGGCTGAAGCATTTGACTCGGTCTTGGGTGATACGGCGTCTTGCCACCGGGCCTGT
CAGTTGACCTACCCCTTGCACACCTACCCTAAGGAAGAGGAGTTGTACGCATGTCAGAGAGGTTGCAGGCTGTTT
TCAATTTGTCAGTTTGTGGATGATGGAATTGACTTAAATCGAACTAAATTGGAATGTGAATCTGCATGTACAGAA
GCATATTCCCAATCTGATGAGCAATATGCTTGCCATCTTGGTTGCCAGAATCAGCTGCCATTCGCTGAACTGAGA
CAAGAACAACTTATGTCCCTGATGCCAAAAATGCACCTACTCTTTCCTCTAACTCTGGTGAGGTCATTCTGGAGT
GACATGATGGACTCCGCACAGAGCTTCATAACCTCTTCATGGACTTTTTATCTTCAAGCCGATGACGGAAAAATA
GTTATATTCCAGTCTAAGCCAGAAATCCAGTACGCACCACATTTGGAGCAGGAGCCTACAAATTTGAGAGAATCA
TCTCTAAGCAAAATGTCCTATCTGCAAATGAGAAATTCACAAGCGCACAGGAATTTTCTTGAAGATGGAGAAAGT
GATGGCTTTTTAAGATGCCTCTCTCTTAACTCTGGGTGGATTTTAACTACAACTCTTGTCCTCCTGGTGATGGTA
TTGCTTTGGATTTGTTGTGCAACTGTTGCTACAGCTGTGGAGCAGTATGTTCCCTCTGAGAAGCTGAGTATCTAT
GGTGACTTCTGGAGTTTATGAATGAACAAAAGCTAAACAGATATCCAGCTTCTCTTCTCTTGTGGTTGTTAGATCTAAA
ACTGAAGATCATGAAGAAGCAGGGCCTCTACCTACAAAAGTGAATCTTGCTCATTCTGAAATTTAAGCATTTTTC
TTTTAAAAGACAAGTGTAATAGACATCTAAAATTCCACTCCTCATAGAGCTTTAAAATGGTTTCATTGGATATA
GGCCTTAAGAAATCACTATAAAATGCAAATAAAGTTACTCAAATCTGTG

【図１４】

シグナル配列： アミノ酸 1-31

膜貫通ドメイン： アミノ酸 242-262

N-グリコシル化部位： アミノ酸 90-94

N-ミリストイル化部位： アミノ酸 28-34;29-35;31-37;86-92

MAAPKGSLWVRTQLGLPPLLLLTMALAGGSGTASAEAFDSVLGDTASCHRACQLTYPLHTYPKEEELYACQRGCR
LFSICQFVDDGIDLNRTKLECESACTEAYSQSDEQYACHLGCQNQLPFAELRQEQLMSLMPKMHLLPPLTLVRSF
WSDMMDSAQSFITSSWTFYLQADDGKIVIFQSKPEIQYAPHLEQEPTNLRESSLSKMSYLQMRNSQAHRNFLEDG
ESDGFLRCLSLNSGWILTTTLVLSVMVLLWICCATVATAVEQYVPSEKLSIYGDLEPMNEQKLNRYPASSLVVVR
SKTEDHEEAGPLPTKVNLAHSEI

【図１５】

TCCGCAGGCGGACCGGGGGCAAAGGAGGTGGCATGTCGGTCAGGCACAGCAGGGTCCTGTGTCCGCGCTGAGCCG
CGCTCTCCCTGCTCCAGCAAGGACCATGAGGGCGCTGGAGGGGCCAGGCCTGTCGCTGCTGTGCCTGGTGTTGGC
GCTGCCTGCCCTGCTGCCGGTGCCGGCTGTACGCGGAGTGGCAGAAACACCCACCTACCCCTGGCGGGACGCAGA
GACAGGGGAGCGGCTGGTGTGCGCCCAGTGCCCCCCAGGCACCTTTGTGCAGCGGCCGTGCCGCCGAGACAGCCC
CACGACGTGTGGCCCGTGTCCACCGCGCCCACTACACGCAGTTCTGGAACTACCTGGAGCGCTGCCGCTACTGCAA
CGTCCTCTGCGGGGAGCGTGAGGAGGAGGCACGGGCTTGCCACGCCACCCACAACCGTGCCTGCCGCTGCCGCAC
CGGCTTCTTCGCGCACGCTGGTTTCTGCTTGGAGCACGCATCGTGTCCACCTGGTGCCGGCGTGATTGCCCCGGG
CACCCCCAGCCAGAACACGCAGTGCCAGCCGTGCCCCCCAGGCACCTTCTCAGCCAGCAGCTCCAGCTCAGAGCA
GTGCCAGCCCCACCGCAACTGCACGGCCCTGGGCCTGGCCCTCAATGTGCCAGGCTCTTCCTCCCATGACACCCT
GTGCACCAGCTGCACTGGCTTCCCCCTCAGCACCAGGGTACCAGGAGCTGAGGAGTGTGAGCGTGCCGTCATCGA
CTTTGTGGCTTTCCAGGACATCTCCATCAAGAGGCTGCAGCGGCTGCTGCAGGCCCTCGAGGCCCCGGAGGGCTG
GGGTCCGACACCAAGGGCGGGCCGCGCGGCCTTGCAGCTGAAGCTGCGTCGGCGGCTCACGGAGCTCCTGGGGGC
GCAGGACGGGGCCCTGCTGGTGCGGCCTGCTGCAGGCGCTGCCGCGTGGCCAGGATGCCCGGGCTGGAGCGGAGCGT
CCGTGAGCGCTTCCTCCCTGTGCACTGACTCCTGGCCCCCCTCTTATTTATTCTACATCCTTGGCACCCCACTTGCA
CTGAAAGAGGCTTTTTTTTAAATAGAAGAAATGAGGTTTCTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

【図１６】

シグナル配列： アミノ酸 1-23

N-グリコシル化部位： アミノ酸 173-177

cAMP- 及び cGMP-依存性プロテインキナーゼリン酸化部位：
アミノ酸 63-67;259-263

チロシンキナーゼリン酸化部位： アミノ酸 28-37

N-ミリストイル化部位： アミノ酸 156-162;178-184;
207-213;266-272;287-293

MRALEGPGLSLLCLVLALPALLPVPAVRGVAETPTYPWRDAETGERLVCAQCPPGTFVQRPCRRDSPTTCGPCPP
RHYTQFWNYLERCRYCNVLCGEREEEARACHATHNRACRCRTGFFAHAGFCLEHASCPPGAGVIAPGTPSQNTQC
QPCPPGTFSASSSSSEQCQPHRNCTALGLALNVPGSSSHDTLCTSCTGFPLSTRVPGAEECERAVIDFVAFQDIS
IKRLQRLLQALEAPEGWGPTPRAGRAALQLKLRRRLTELLGAQDGALLVRLLQALRVARMPGLERSVRERFLPVH

【図１７】

CGGACGCGTGGGCCGACGCGTGGGCGGCCCACGGCGCCCGCGGGCTGGGGCGGTCGCTTCTTCCTTCTCCGTGGC
CTACGAGGGTCCCCAGCCTGGGTAAAGATGGCCCCATGGCCCCCGAAGGGCCTAGTCCCAGCTGTGCTCTGGGGC
CTCAGCCTCTTCCTCAACCTCCCAGGACCTATCTGGCTCCAGCCCTCTCCACCTCCCCAGTCTTCTCCCCCGCCT
CAGCCCCATCCGTGTCATACCTGCCGGGGACTGGTTGACAGCTTTAACAAGGGCCTGGAGAGAACCATCCGGGAC
AACTTTGGAGGTGGAAACACTGCCTGGGAGGAAGAGAATTTGTCCAAATACAAAGACAGTGAGACCCGCCTGGTA
GAGGTGCTGGAGGGTGTGTGCAGCAAGTCAGACTTCGAGTGCCACCGCCTGCTGGAGCTGAGTGAGGAGCTGGTG
GAGAGCTGGTGGTTTCACAAGCAGCAGGAGGCCCGGACCTCTTCCAGTGGCTGTGCTCAGATTCCCTGAAGCTC
TGCTGCCCCGCGAGGCACCTTCGGGCCCTCCTGCCTTCCCTGTCCTGGGGGAACAGAGAGGCCCTGCGGTGGCTAC
GGGCAGTGTGAAGGAGAGGGACACGAGGGGGCAGCGGGCACTGTGACTGCCAAGCCGGCTACGGGGGTGAGGCC
TGTGGCCAGTGTGGCCTTGGCTACTTTGAGGCAGAACGCAACGCCAGCCATCTGGTATGTTCGGCTTGTTTTGGC
CCCTGTGCCCGATGCTCAGGACCTGAGGAATCAAACTGTTTGCAATGCAAGAAGGGCTGGGCCCTGCATCACCTC
AAGTGTGTAGACATTGATGAGTGTGGCACAGAGGGAGCCAACTGTGGAGCTGACCAATTCTGCGTGAACACTGAG
GGCTCCTATGAGTGCCGAGACTGTGCCAAGGCCTGCCTAGGCTGCATGGGGGCAGGGCCAGGTCGCTGTAAGAAG
TGTAGCCCTGGCTATCAGCAGGTGGGCTCCAAGTGTCTCGATGTGGATGAGTGTGAGACAGAGGTGTGTCCGGGA
GAGAACAAGCAGTGTGAAAACACCGAGGGCGGTTATCGCTGCATCTGTGCCGAGGGCTACAAGCAGATGGAAGGC
ATCTGTGTGAAGGAGCAGATCCCAGAGTCAGCAGGCTTCTTCTCAGAGATGACAGAAGACAGAGTTGGTGGTGCTG
CAGCAGATGTTCTTTGGCATCATCATCTGTGCACTGGCCACGCTGGCTGCTAAGGGCGACTTGGTGTTCACCGCC
ATCTTCATTGGGGCTGTGGCGGCCATGACTGGCTACTGGTTGTCAGAGCGCAGTGACCGTGTGCTGGAGGGCTTC
ATCAAGGGCAGATAATCGCGGCCACCACCTGTAGGACCTCCTCCCACCCACGCTGCCCCCAGAGCTTGGGCTGCC
CTCCTGCTGGACACTCAGGACAGCTTGGTTTATTTTGAGAGTGGGGTAAGCACCCCTACCTGCCTTACAGAGCA
GCCCAGGTACCCAGGCCCGGGCAGACAAGGCCCCTGGGGTAAAAAGTAGCCCTGAAGGTGGATACCATGAGCTCT
TCACCTGGCGGGGACTGGCAGGCTTCACAATGTGTGAATTTCAAAAGTTTTCCTTAATGGTGGCTGCTAGAGCT
TTGGCCCCTGCTTAGGATTAGGTGGTCCTCACAGGGGTGGGGCCATCACAGCTCCCTCCTGCCAGCTGCATGCTG
CCAGTTCCTGTTCTGTGTTCACCACATCCCCACACCCCATTGCCACTTATTTATTCATCTCAGGAAATAAAGAAA
GGTCTTGGAAAGTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

【図１８】

シグナル配列： アミノ酸 1-29

膜貫通ドメイン： アミノ酸 342-392

N-グリコシル化部位： アミノ酸 79-83;205-209

cAMP- 及び cGMP-依存性プロテインキナーゼリン酸化部位：
アミノ酸 290-294

アスパラギン酸及びアスパラギンヒドロキシル化部位：
アミノ酸 321-333

EGF 様ドメインシステインパターンシグネーチャー：
アミノ酸 181-193

MAPWPPKGLVPAVLWGLSLFLNLPGPIWLQPSPPPQSSPPPQPHPCHTCRGLVDSFNKGLERTIRDNPGGGNTAW
EEENLSKYKDSETRLVEVLEGVCSKSDFECHRLLELSEELVESWVFFHKQQEADPLFQWLCSDSLKLCCPAGTFGP
SCLPCPGGTERPCGGYGQCEGEGTRGGSGHCDCQAGYGGEACGQCGLGYFEAERNASHLVCSACFGPCARCSGPE
ESNCLQCKKGWALHHLKCVDIDECGTEGANCGADQFCVNTEGSYECRDCAKACLGCMGAGPGRCKKCSPGVQQVG
SKCLDVDECETEVCPGENKQCENTEGGYRCICAEGYKQMEGICVKEQIPESAGFFSEMTEDELVVLQQMFFGIII
CALATLAAKGDLVFTAIPIGAVAAMTGYWLSERSDRVLEGPIKGR

【図１９】

CCAGGCCGGGAGGCGACGCGCCCAGCCGTCTAAACGGGAACAGCCCTGGCTGAGGGAGCTGCAGCGCAGCAGAGT
ATCTGACGGCGCCAGGTTGCGTAGGTGCGGCACGAGGAGTTTCCCGGCAGCGAGGAGTCCTGAGCAGCATGGC
CCGGAGGAGCGCCTTCCCTGCCGCCGCGCTCTGGCTCTGGAGCATCCTCCTGTGCCTGCTGGCACTGCGGCCGA
GGCCGGCCGCCGCAGGAGGAGGCCTGTACCTATGGATCGATGCTCACCAGGCAAGAGTACTCATAGGATTTGA
AGAAGATATCCTGATTGTTTCAGAGGGGAAAATGGCACCTTTTACACATGATTTCAGAAAAGCGCAACAGAGAAT
GCCAGCTATTCCTGTCAATATCCATTCCATGAATTTTACCTGGCAAGCTGCAGGGCAGGCAGAATACTTCTATGA
ATTCCTGTCCTTGCGCTCCCTGGATAAAGGCATCATGGCAGATCCAACCGTCAATGTCCCTCTGCTGGGAACAGT
GCCTCACAAGGCATCAGTTGTTCAAGTTGGTTCCCATGTCTTGGAAAACAGGATGGGGTGGCAGCATTTGAAGT
GGATGTGATTGTTATGAATTCTGAAGCCAACACCATTCTCCAAACACCTCAAAATGCTATCTTCTTTAAAACATG
TCAACAAGCTGAGTGCCCAGGCGGGTGCCGAAATGGAGGCTTTTGTAATGAAAGACGCATCTGCGAGTGTCCTGA
TGGGTTCCACGGACCTCACTGTGAGAAAGCCCTTTGTACCCCACGATGTATGAATGGTGGACTTTGTGTGACTCC
TGGTTTCTGCATCTGCCCACCTGGATTCTATGGAGTGAACTGTGACAAAGCAAACTGCTCAACCACCTGCTTTAA
TGGAGGGACCTGTTTCTACCCTGGAAAATGTATTTGCCCTCCAGGACTAGAGGGAGAGCAGTGTGAAATCAGCAA
ATGCCCACAACCCTGTCGAAATGGAGGTAAATGCATTGGTAAAAGCAAATGTAAGTGTTCCAAAGGTTACCAGGG
AGACCTCTGTTCAAAGCCTGTCTGCGAGCCTGGCTGTGGTGCACATGGAACCTGCCATGAACCCAACAAATGCCA
ATGTCAAGAAGGTTGGCATGGAAGACACTGCAATAAAAGGTACGAAGCCAGCCTCATACATGCCCTGAGGCCAGC
AGGCGCCCAGCTCAGGCAGCACACGCCTTCACTTAAAAAGGCCGAGGAGCGGCGGGATCCACCTGAATCCAATTA
CATCTGGTGAACTCCGACATCTGAAACGTTTTAAGTTACACCAAGTTCATAGCCTTTGTTAACCTTTCATGTGTT
GAATGTTCAAATAATGTTCATTACACTTAAGAATACTGGCCTGAATTTTATTAGCTTCATTATAAATCACTGAGC
TGATATTTACTCTTCCTTTTAAGTTTTCTAAGTACGTCTGTAGCATGATGGTATAGATTTTCTTGTTTCAGTGCT
TTGGGACAGATTTTATATTATGTCAATTGATCAGGTTAAAATTTTCAGTGTGTAGTTGGCAGATATTTTCAAAAT
TACAATGCATTTATGGTGTCTGGGGGCAGGGGAACATCAGAAAGGTTAAATTGGGCAAAAATGCGTAAGTCACAA
GAATTTGGATGGTGCAGTTAATGTTGAAGTTACAGCATTTCAGATTTTATTGTCAGATATTTAGATGTTTGTTAC
ATTTTTAAAAATTGCTCTTAATTTTTAAACTCTCAATACAATATATTTTGACCTTACCATTATTCCAGAGATTCA
GTATTAAAAAAAAAAAAAATTACACTGTGGTAGTGGCATTTAAACAATATAATATTCTAAACACAATGAAATAG
GGAATATAATGTATGAACTTTTTGCATTGGCTTGAAGCAATATAATATATTGTAAACAAAACACAGCTCTTACCT
AATAAACATTTTATACTGTTTGTATGTATAAAATAAAGGTGCTGCTTTAGTTTTTGGAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAAAAAA

【図２０】

シグナル配列： アミノ酸 1-28

N-グリコシル化部位： アミノ酸 88-92;245-249

チロシンキナーゼリン酸化部位： アミノ酸 370-378

N-ミリストイル化部位： アミノ酸 184-190;185-191;189-195;315-321

ATP/GTP-結合部位モチーフＡ（P-loop）： アミノ酸 285-293

EGF-様ドメインシステインパターンシグネーチャー： アミノ酸 198-210;230-242;262-274;294-306;326-338

MARRSAFPAAALWLWSILLCLLALRAEAGPPQEESLYLWIDAHQARVLIGFEEDILIVSEGKMAPFTHDFRKAQQ
RMPAIPVNIHSMNFTWQAAQQAEYFYEFLSLRSLDKGIMADPTVNVPLLGTVPHKASVVQVGFPCLGKQDGVAAF
EVDVIVMMSEGNTILQTPQNAIFFKTCQQAECPGGCRNGGFCNERRICECPDGFHGPHCEKALCTPRCMNGGLCV
TPGFCICPPGFYGVNCDKANCSTTCFNGGTCFYPGKCICPPGLEGEQCEISKCPQPCRNGGKCIGKSKCKCSKGY
QGDLCSKPVCEPGCGAHGTCHEPNKCQCQEGWHGRHCNKRYEASLIHALRPAGAQLRQHTPSLKKAEERDPPES
NYIW

【図２１】

CAGCGCGTGGCCGGCGCCGCTGTGGGGACAGCATGAGCGGCGGTTGGATGGCGCAGGTTGGAGCGTGGCGAACAG
GGGCTCTGGGCCTGGCGCTGCTGCTGCTGCTCGGCCTCGGACTAGGCCTGGAGGCCGCCGCGAGCCCGCTTTCCACC
CCGACCTCTGCCCAGGCCGCAGGCCCCAGCTCAGGCTCGTGCCCACCCACCAAGTTCCAGTGCCGCACCAGTGGC
TTATGCGTGCCCCTCACCTGGCGCTGCGACAGGGACTTGGACTGCAGCGATGGCAGCGATGAGGAGGAGTGCAGG
ATTGAGCCATGTACCCAGAAAGGGCAATGCCCACCGCCCCCTGGCCTCCCCTGCCCCTGCACCGGCGTCAGTGAC
TGCTCTGGGGGAACTGACAAGAAACTGCGCAACTGCAGCCCCCTGGCCTGCCTAGCAGGCGAGCTCCGTTGCACG
CTGAGCGATGACTGCATTCCACTCACGTGGCGCTGCGACGGCCACCCAGACTGTCCCCGACTCCAGCGACGAGCTC
GGCTGTGGAACCAATGAGATCCTCCCGGAAGGGGATGCCACAACCATGGGGCCCCCTGTGACCCTGGAGAGTGTC
ACCTCTCTCAGGAATGCCACAACCATGGGGCCCCCTGTGACCCTGGAGAGTGTCCCCTCTGTCGGGAATGCCACA
TCCTCCTCTGCCGGAGACCAGTCTGGAAGCCCAACTGCCTATGGGGTTATTGCAGCTGCTGCGGTGCTCAGTGCA
AGCCTGGTCACCGCCACCCTCCTCCTTTTGTCCTGGCTCCGAGCCCAGGAGCGCCTCCGCCCACTGGGGTTACTG
GTGGCCATGAAGGAGTCCCTGCTGCTGTCAGAACAGAAGACCTCGCTGCCCTGAGGACAAGCACTTGCCACCACC
GTCACTCAGCCCTGGGCGTAGCCGGACAGGAGGAGAGCAGTGATGCGGATGGGTACCCGGGCACACCAGCCCTCA
GAGACCTGAGTTCTTCTGGCCACGTGGAACCTCGAACCCGAGCTCCTGCAGAAGTGGCCCTGGAGATTGAGGGTCCC
TGGACACTCCCTATGGAGATCCGGGGGAGCTAGGATGGGGAACCTGCCACAGCCAGAACTGAGGGGCTGGCCCCAG
GCAGCTCCCAGGGGGTAGAACGGCCCTGTGCTTAAGACACTCCCTGCTGCCCCGTCTGAGGGTGGCGATTAAAGT
TGCTTC

【図２２】

シグナル配列： アミノ酸 1-30

膜貫通ドメイン： アミノ酸 231-248

N-グリコシル化部位： アミノ酸 126-130;195-199;213-217

N-ミリストイル化部位： アミノ酸 3-9;10-16;26-32;30-36;112-118;166-172;212-218;224-230;230-236;263-269

原核生物膜リポタンパク脂質結合部位： アミノ酸 44-55

ロイシンジッパーパターン： アミノ酸 17-39

MSGGWMAQVGAWRTGALGLALLLLLGLGLGLEAAASPLSTPTSAQAAGPSSGSCPPTKFQCRTSGLCVPLTWRCD
RDLDCSDGSDEEECRIEPCTQKGQCPPPPGLPCPCTGVSDCSGGTDKKLRNCSRLACLAGELRCTLSDDCIPLTW
RCDGHPDCPDSSDELGCGTNEILPEGDATTMGPPVTLESVTSLRNATTMGPPVTLESVPSVGNATSSSAGDQSGS
PTAYGVIAAAAVLSASLVTATYLLLLSWLRAQERLRPLGLLVAMKESLLLSEQKTSLP

【図２３】

GGGGTCTCCCTCAGGGCCGGGAGGCACAGCGGTCCCTGCTTGCTGAAGGGCTGGATGTACGCATCCGCAGGTTCC
CGCGGACTTGGGGGCGCCCGCTGAGCCCCGGCGCCCCGCAGAAGACTTGTGTTTGCCTCCTGCAGCCTCAACCCGG
AGGGCAGCGAGGGCCTACCACCATGATCACTGGTGTGTTCAGCATGCGCTTGTGGACCCCAGTGGGCGTCCTGAC
CTCGCTGGCGTACTGCCTGCACCAGCGGCGGGTGGCCCTGGCCGAGCTGCAGGAGGCCGATGGCCAGTGTCCGGT
CGACCGCAGCCTGCTGAAGTTGAAAATGGTGCAGGTCGTGTTTCGACACGGGGCTCGGAGTCCTCTCAAGCCGCT
CCCGCTGGAGGAGCAGGTAGAGTGGAACCCCCAGCTATTAGAGGTCCCACCCCAAACTCAGTTTGATTACACAGT
CACCAATCTAGCTGGTGGTCCGAAACCATATTCTCCTTACGACTCTCAATACCATGAGACCACCCTGAAGGGGGG
CATGTTTGCTGGGCAGCTGACCAAGGTGGGCATGCAGCAAATGTTGCCTTGGGAGAGAGACTGAGGAAGAACTA
TGTGGAAGACATTCCCTTTCTTTCACCAACCTTCAACCCACAGGAGGTCTTTATTCGTTCCACTAACATTTTTCG
GAATCTGGAGTCCACCCGTTGTTTGCTGGCTGGGCTTTTCCAGTGTCAGAAAGAAGGACCCATCATCATCCACAC
TGATGAAGCAGATTCAGAAGTCTTGTATCCCAACTACCAAAGCTGCTGGAGCCTGAGGCAGAGAACCAGAGGCCG
GAGGCAGACTGCCTCTTTACAGCCAGGAATCTCAGAGGATTTGAAAAAGGTGAAGGACAGGATGGGCATTGACAG
TAGTGATAAAGTGGACTTTCTTCATCCTCCTGGACAACGTGGCTGCCGAGCAGGCACACAACCTCCCAAGCTGCCC
CATGCTGAAGAGATTTGCACGGATGATCGAACAGAGAGCTGTGGACACATCCTTGTACATACTGCCCAAGGAAGA
CAGGGAAAGTCTTCAGATGGCAGTAGGCCCATTCCTCCACATCCTAGAGAGCAACCTGCTGAAAGCCATGGACTC
TGCCACTGCCCCCGACAAGATCAGAAAGCTGTATCTCTATGCGGCTCATGATGTGACCTTCATACCGCTCTTAAT
GACCCTGGGGATTTTTGACCACAAATGGCCACCGTTTGCTGTTGACCTGACCATGGAACTTTACCAGCACCTGGA
ATCTAAGGAGTGGTTTGTGCAGCTCTATTACCACGGGAAGGAGCAGGTGCCGAGAGGTTGCCCTGATGGGCTCTG
CCCGCTGGACATGTTCTTGAATGCCATGTCAGTTTATACCTTAAGCCCAGAAAAATACCATGCACTCTGCTCTCA
AACTCAGGTGATGGAAGTTGGAAATGAAGAGTAACTGATTTATAAAAGCAGGATGTGTTGATTTTAAAATAAAGT
GCCTTTATACAATG

【図２４】

シグナル配列： アミノ酸 1-23

cAMP- 及び cGMP-依存性プロテインキナーゼリン酸化部位： アミノ酸 218-222

チロシンキナーゼリン酸化部位： アミノ酸 280-288

N-ミリストイル化部位： アミノ酸 15-21;117-123;118-124;179-185;240-246;387-393

アミド化部位： アミノ酸 216-220

ロイシンジッパーパターン： アミノ酸 10-32

ヒスチジン酸ホスファターゼホスホヒスチジンシグネーチャー： アミノ酸 50-65

MITGVFSMRLWTPVGVLTSLAYCLHQRRVALAELQEADGQCPVDRSLLKLKMVQVVFRHGARSPLKPLPLEEQVE
WNPQLLEVPPQTQFDYTVTNLAGGPKPYSPYDSQYHETTLKGGMFAGQLTKVGMQQMFALGERLRKNYVEDIPFL
SPTFNPQEVFIRSTNIFRNLESTRCLLAGLFQCQKEGPIIIHTDEADSEVLYPNYQSCWSLRQRTGRRQTASLQ
PGISEDLKKVKDRMGIDSSDKVDFFILLDNVAAEQAHNLPSCPMLKRFARMIEQRAVDTSLYILPKEDRESLQMA
VGPFLHILESNLLKAMDSATAPDKIRKLYLYAAHDVTFIPLLMTLGIFDHKWPPFASVDLTMELYQHLESKEWFVQ
LYYHGKEQVPRGCPDGLCPLDMFLNAMSVYTLSPEKYHALCSQTQVMEVGNEE

【図２５】

CGAGGGCTTTCCGGCTCCGGAATGGCACATGTGGGAATCCCAGTCTTGTTGGCTACAACATTTTCCCTTTCCT
AACAAGTTCTAACAGCTGTTCTAACAGCTAGTGATCAGGGGTTCTTCTTGCTGGAGAAGAAAGGGCTGAGGGCAG
AGCAGGGCACTCTCACTCAGGGTGACCAGCTCCTTGCCTCTCTGTGGATAACAGAGCATGAGAAAGTGAAGAGAT
GCAGCGGAGTGAGGTGATGGAAGTCTAAAATAGGAAGGAATTTTGTGTGCAATATCAGACTCTGGCAGCAGTTGA
CCTGGAGAGCCTGGGGGAGGGCCTGCCTAACAAGCTTTCAAAAAACAGGAGCGACTTCCACTGGGCTGGGATAAG
ACGTGCCGGTAGGATAGGGAAGACTGGGTTTAGTCCTAATATCAAATTGACTGGCTGGGTGAACTTCAACAGCCT
TTTAACCTCTCTGGGAGATGAAAACGATGGCTTAAGGGGCCAGAAATAGAGATGCTTTGTAAAATAAAATTTTAA
AAAAAGCAAGTATTTTATAGCATAAAGGCTAGAGACCAAAATAGATAACAGGATTCCCTGAACATTCCTAAGAGG
GAGAAAGTATGTTAAAAATAGAAAAACCAAAATGCAGAAAGGAGGAGACTCACAGAGCTAAACCAGGATGGGACC
CTGGGTCAGGCCAGCCTCTTTGCTCCTCCCGGAAATTATTTTGGTCTGACCACTCTGCCTTGTGTTTTGCAGAA
TCATGTGAGGGCCAACCGGGGAAGGTGGAGCAGATGAGCACACACAGGAGCGTCTCCTCACGCCGCCCCTCTC
AGCATGGAACAGAGGCAGCCCTGGCCCCGGGCCCTGGAGGTGGACAGCCGCTCTGTCGTCCTGCTCTCAGTGGTC
TGGGTGCTGCTGGCCCCCCCAGCAGCCGGCATGCCTCAGTTCAGCACCTTCCACTCTGAGAATCGTGACTGGACC
TTCAACCACTTGACCGTCCACCAAGGGACGGGGGCCGTCTATGTGGGGGCCATCAACCGGGTCTATAAGCTGACA
GGCAACCTGACCATCCAGGTGGCTCATAAGACAGGGCCAGAAGAGGACACAACAGTCTCGTTACCCGCCCCTCATC
GTGCAGCCCTGCAGCGAAGTGCTCACCCTCACCAACAATGTCAACAAGCTGCTCATCATTGACTACTCTGAGAAC
CGCCTGCTGGCCTGTGGGAGCCTCTACCAGGGGGTCTGCAAGCTGCTGCGGCTGGATGACCTCTTCATCCTGGTG
GAGCCATCCCACAAGAAGGAGCACTACCTGTCCAGTGTCAACAAGACGGGCACCATGTACGGGGTGATTGTGCGC
TCTGAGGGTGAGGATGGCAAGCTCTTCATCGGCACGGCTGTGGATGGGAAGCAGATCACTTCCCGACCCTGTCC
AGCCGGAAGCTGCCCCGAGACCCTGAGTCCTCAGCCATGCTCGACTATGAGCTACACAGCGATTTTGTCTCCTCT
CTCATCAAGATCCCTTCAGACACCCTGGCCCTGGTCTCCCACTTTGACATCTTCTACATCTACGGCTTTGCTAGT
GGGGGCTTTGTCTACTTTCTCACTGTCCAGCCCGAGACCCCTGAGGGTGTGGCCATCACTCGCTGGAGACCTC
TTCTACACCTCACGCATCGTGCGCTCTGCAAGGATGACCCCAAGTTCCACTCATACATCTTCGCCCTGCCCTTCGGC
TGCACCCGGGCCGGGGTGGAATACCGCCTCCTGCAGGCTGCTTACCTGGCCAAGCCTGGGGACTCACTGGCCCAG
GCCTTCAATATCACCAGCCAGGACGATGTACTCTTTGCCATCTTCTCCAAAGGGCAGAAGCAGTATCACCACCCG
CCCGATGACTCTGCCCTGTGTGCCTTCCCTATCCGGGCCATCAACTTGCAGATCAAGGACGGCCTGCAGTCCTGT
TACCAGGGCGAGGGCAACCTGGAGCTCAACTGGCTGCTGGGGAAGGACGTCCAGTGCACGAAGGCGCCTGTCCCC
ATCGATGATAACTTCTGTGGACTGGACATCAACCAGCCCCTGGGAGGCTCAACTCCAGTGGAGGGCCTGACCCTG
TACACCACCAGCAGGACCGCATGACCTCTGTGGCCTCCTACGTTTACAACGGTACAGCGTGGTTTTTTGTGGGG
ACTAAGAGTGGCAAGCTGAAAAAGGTAAGAGTCTATGAGTTCAGATGCTCCAATGCCATTCACCTCCTCCAGCAAA
GAGTCCCTCTTGGAAGGTAGCTATTGGTGGAGATTTAACTATAGGCAACTTTATTTTCTTGGGGAACAAAGGTGA
AATGGGGAGGTAAGAAGGGGTTAATTTTGTGACTTAGCTTCTAGCTACTTCCTCCAGCCATCAGTCATTGGGTATG
TAAGGAATGCAAGCGTATTTCAATATTTCCCAAACTTTAAGAAAAAACTTTAAGAAGGTACATCTGCAAAAGCAAA

【図２６】

シグナル配列： アミノ酸 1-32

膜貫通ドメイン： アミノ酸 71-86

N-グリコシル化部位： アミノ酸 130-134;145-149;217-221;380-385

N-ミリストイル化部位： アミノ酸 220-226;319-325;353-359;460-466;503-509

MGTLGQASLFAPPGNYFWSDHSALCFAESCBGQPGKVEQMSTHRSRLLTAAPLSMEQRQPWPRALEVDSRSVVLL
SVVWVLLAPPAAGMPQFSTFHSENRDWTFNHLTVHQGTGNVVVGAINRVVKLTGNLTIQVAHKTGPEEDNKSRYP
PLIVQPCSEVLTLTNNVNKLLIIDYSENRLLACGSLVQGVCKLLRLDDLFILVEPSHKKEHYLSSVNKTGTMYGV
IVRSEGEDGKLFIGTAVDGKQDYFPTLSSRKLPRDPESSAMLDYELNRSDFVSSLIKIPSDTLALVSHFDIFYIYG
FASGGFVYFLTVQPETPEGVAINSAGDLFYTSRIVRLCKDDPKFHSVVSLPFGCTRAGVEYRLLQAAYLAKPGDS
LAQAFNITSQDDVLFAIFSKGQKQYHHPPDDSALCAFPIRAINLQIKERLQSCYQGEGNLELNWLLGKDVQCTKA
PVPIDDNFCGLDINQPLGGSTPVEGLTLYTTSRDRMTSVASVVYNGYSVVFVGTKSGKLKKVPVYEPRCSNAIHL
LSKESLLEGSYWWRFNYRQLYFLGEQR

【図２７】

CCCAGAAGTTCAAGGGCCCCCGGCCTCCTGCGCTCCTGCCGCCGGGACCCTCGACCTCCTCAGAGCAGCCGGCTG
CCGCCCCGGGAAGATGGCGAGGAGGAGCCGCCACCGCCTCCTCCTGCTGCTGCTGCCGCTACCTGGTGGTCGCCCT
GGGCTATCATAAGGCCTATGGGTTTTCTGCCCCAAAAGACCAACAAGTAGTCACAGCAGTAGAGTACCAAGAGGC
TATTTTAGCCTGCAAAACCCCAAAGAAGACTGTTTCCTCCAGATTAGAGTGGAAGAAACTGGGTCGGAGTGTCTC
CTTTGTCTACTATCAACAGACTCTTCAAGGTGATTTTAAAAATCGAGCTGAGATGATAGATTTCAATATCCGGAT
CAAAAATGTGACAAGAAGTGATGCGGGGAAATATCGTTGTGAAGTTAGTGCCCCATCTGAGCAAGGCCAAAACCT
GGAAGAGGATACAGTCACTCTGGAAGTATTAGTGGCTCCAGCAGTTCCATCATGTGAAGTACCCTCTTCTGCTCT
GAGTGGAACTGTGGTAGAGCTACGATGTCAAGACAAAGAAGGGAATCCAGCTCCTGAATACACATGGTTTAAGGA
TGGCATCCGTTTGCTAGAAAAATCCCAGACTTGGCTCCCAAAGCACCAACAGCTCATACACAATGAATACAAAAAC
TGGAACTCTGCAATTTAATACTGTTTCCAAACTGGACACTGGAGAATATTCCTGTGAAGCCCGCAATTCTGTTGG
ATATCGCAGGTGTCCTGGGAAACGAATGCAAGTAGATGATCTCAACATAAGTGGCATCATAGCAGCCGTAGTAGTGT
GGCCTTAGTGATTTCCGTTTGTGGCCTTGGTGTATGCTATGCTCAGAGGAAAGGCTACTTTTCAAAAGAAACCTC
CTTCCAGAAGAGTAATTCTTCATCTAAAGCCACGACAATGAGTGAAAATGTGCAGTGGCTCACGCCTGTAATCCC
AGCACTTTGGAAGGCCGCGGCGGGCGGATCACGAGGTCAGGAGTTCTAGACCAGTCTGGCCAATATGGTGAAACC
CCATCTCTACTAAAATACAAAAATTAGCTGGGCATGGTGGCATGTGCCTGCAGTTCCAGCTGCTTGGGAGACAGG
AGAATCACTTGAACCCGGGAGGCGGAGGTTGCAGTGAGCTGAGATCACGCCACTGCAGTCCAGCCTGGGTAACAG
AGCAAGATTCCATCTCAAAAAATAAAATAAATAAATAAATAAATACTGGTTTTTACCTGTAGAATTCTTACAATA
AATATAGCTTGATATTC

【図２８】

シグナル配列： アミノ酸 1-20

膜貫通ドメイン： アミノ酸 237-258

N-グリコシル化部位： アミノ酸 98-102;187-191;
236-240;277-281

N-ミリストイル化部位： アミノ酸 182-188;239-245;
255-261;257-263;305-311

アミド化部位： アミノ酸 226-230

MARRSRHRLLLLLLRYLVVALGYHKAYGFSAPKDQQVVTAVEYQEAILACKTPKKTVSSRLEWKKLGRSVSFVYY
QQTLQGDFKNRAEMIDFNIRIKNVTRSDAGKYRCEVSAPSEQGQNLEEDTVTLEVLVAPAVPSCEVPSSALSGTV
VELRCQDKEGNPAPEYTWFKDGIRLLENPRLGSQSTNSSYTMNTKTGTLQFNTVSKLDTGEYSCEARNSVGYRRC
PGKRMQVDDLNISGIIAAVVVVALVISVCGLGVCYAQRKGYFSKETSFQKSNSSSKATTMSENVQWLTPVIPALW
KAAAGGSRGQEF

【図２９】

GCTGGGGACATGAGAGGCACACCGAAGACCCACCTCCTGGCCTTCTCCCTCCTCTGCCTCCTCTCAAAGGTGCGT
ACCCAGCTGTGCCCGACACCATGTACCTGCCCCTGGCCACCTCCCCGATGCCCGCTGGGAGTACCCCTGGTGCTG
GATGGCTGTGGCTGCTGCCGGGTATGTGCACGGCGGCTGGGGGAGCCCTGCGACCAACTCCACGTCTGCGACGCC
AGCCAGGGCCTGGTCTGCCAGCCCGGGCAGGACCCGGTGGCCGGGGGCCCTGTGCCTCTTGGCAGAGGACGAC
AGCAGCTGTGAGGTGAACGGCCGCCTGTATCGGGAAGGGGAGACCTTCCAGCCCCACTGCAGCATCCGCTGCCGC
TGCGAGGACGGCGGCTCACCTGCGTGCCGCTGTGCAGCGAGGATGTGCGGCTGCCCAGCTGGGACTGCCCCCAC
CCCAGGAGGGTCGAGGTCCTGGGCAAGTGCTGCCCTGAGTGGGTGTGCGGCCAAGGAGGGGGACTGGGGACCCAG
CCCCTTCCAGCCCAAGGACCCCAGTTTTCTGGCCTTGTCTCTTCCCTGCCCCCTGGTGTCCCCTGCCCAGAATGG
AGCACGGCCTGGGGACCCTGCTCGACCACCTGTGGGCTGGGCATGGCCACCCGGGTGTCCAACCAGAACCGCTTC
TGCCGACTGGAGACCCAGCGCCGCCTGTGCCTGTCCAGGCCCTGCCCACCCTCCAGGGGTCGCAGTCCACAAAAC
AGTGCCTTCTAGAGCCGGGCTGGGAATGGGGACACGGTGTCCACCATCCCCAGCTGGTGGCCCTGTGCCTGGGCC
CTGGGCTGATGGAAGATGGTCCGTGCCCAGGCCCTTGGCTGCAGGCAACACTTTAGCTTGGGTCCACCATGCAGA
ACACCAATATTAACACGCTGCCTGGTCTGTCTGGATCCCGAGGTATGGCAGAGGTGCAAGACCTAGTCCCCTTTC
CTCTAACTCACTGCCTAGGAGGCTGGCCAAGGTGTCCAGGGTCCTCTAGCCCACTCCCTGCCTACACACACAGCC
TATATCAAACATGCACACGGGCGAGCTTTCTCCCGACTTCCCCTGGGCAAGAGATGGGACAAGCAGTCCCTTAA
TATTGAGGCTGCAGCAGGTGCTGGGCTGGACTGGCCATTTTTCTGGGGGTAGGATGAAGAGAAGGCACACAGAGA
TTCTGGATCTCCTGCTGCCTTTTCTGGAGTTTGTAAAATTGTTCCTGAATACAAGCCTATGCGTGA

【図３０】

シグナル配列： アミノ酸 1-23

N-ミリストイル化部位： アミノ酸 3-9;49-55;81-87;
85-91;126-132;164-170;166-172;
167-173;183-189;209-215

インシュリン様成長因子結合タンパク質シグネチャー：
アミノ酸 49-65

フォン・ウィルブランドＣＩドメイン： アミノ酸 107-124

トロンボスポンジンＩ相同ブロック： アミノ酸 201-216

IGF結合タンパク質部位： アミノ酸 49-58

MRGTPKTHLLAFSLLCLLSKVRTQLCPTPCTCPWPPPRCPLGVPLVLDGCGCCRVCARRLGEPCDQLHVCDASQG
LVCQPGAGPGGRGALCLLAEDDSSCEVNGRLYREGETFQPHCSIRCRCEDGGFTCVPLCSEDVRLPSWDCPHPRR
VEVLGKCCPEWVCGQGGGLGTQPLPAQGPQFSGLVSSLPPGVPCPEWSTAWGPCSTTCGLGMATRVSNQNRFCRL
ETQRRLCLSRPCPPSRGRSPQNSAF

【図３１】

AGTCGACTGCGTCCCCTGTACCCGGCGCCAGCTGTGTTCCTGACCCCAGAATAACTCAGGGCTGCACCGGGCCTG
GCAGCGCTCCGCACACATTTCCTGTCGCGGCCTAAGGGAAACTGTTGGCCCCTGGGCCCGCGGGGGGATTCTTGG
CAGTTGGGGGGTCCGTCGGGAGCGAGGGCGGAGGGGAAGGAGGGGGAACCGGGTTGGGGAAGCCAGCTGTAGAG
GGCGGTGACCGCGCTCCAGACACAGCTCTGCGTCCTCGAGCGGCACAGATCCAAGTTGGGAGCAGCTCTGCGTGC
GGGGCCTCAGAGAATGAGGCCGGCGTTCGCCCTGTGCCTCCTCTGGCAGGCGCTCTGGCCCGGCCGGGCGGCGG
CGAACACCCCACTGCCGACCGTGCTGGCTGCTCGGCCTCGGGGGCCTGCTACAGCCTGCACCACGCTACCATGAA
GCGGCAGGCGGCCGAGGAGGCCTGCATCCTGCGAGGTGGGGCGCTCAGCACCGTGCGTGCGGGCGCCGAGCTGCG
CGCTGTGCTCGCGCTCCTGCGGGCAGGCCCAGGGCCCGGAGGGGGCTCCAAAGACCTGCTGTTCTGGGTCGCACT
GGAGCGCAGGCGTTCCCACTGCACCCTGGAGAACGAGCCTTTGCGGGGTTTCTCCTGGCTGTCCTCCGACCCCGG
CGGTCTCGAAAGCGACACGCTGCAGTGGGTGGAGGAGCCCCAACGCTCCTGCACCGCGCGGAGATGCGCGGTACT
CCAGGCCACCGGTGGGGTCGAGCCCGCAGGCTGGAAGGAGATGCGATGCCACCTGCGCGCCAACGGCTACCTGTG
CAAGTACCAGTTTGAGGTCTTGTGTCCTGCGCCGCGCCCCGGGGCCGCCTCTAACTTGAGCTATCGCGCGCCCTT
CCAGCTGCACAGCGCCGCTCTGGACTTCAGTCCACCTGGGACCGAGGTGAGTGCGCTCTGCCGGGGACAGCTCCC
GATCTCAGTTACTTGCATCGCGGACGAAATCGGCGCTCGCTGGGACAAACTCTCGGGCGATGTGTTGTGTCCCTG
CCCCGGGAGGTACCTCCGTGCTGGCAAATGCGCAGAGCTCCCTAACTGCCTAGACGACTTGGGAGGCTTTGCCTG
CGAATGTGCTACGGGCTTCGAGCTGGGGAAGGACGGCCGCTCTTGTGTGACCAGTGGGGAAGGACAGCCGACCCT
TGGGGGGACCGGGGTGCCCACCAGGCGCCCGCCGGCCACTGCAACCAGCCCCGTGCCGCAGAGAACATGGCCAAT
CAGGGTCGACGAGAAGCTGGGAGAGACACCACTTGTCCCTGAACAAGACAATTCAGTAACATCTATTCCTGAGAT
TCCTCGATGGGGATCACAGAGCACGATGTCTACCCTTCAAATGTCCCTTCAAGCGGAGTCAAAGGCCACTATCAC
CCCATCAGGGAGCGTGATTTCCAAGTTTAATTCTACGACTTCCTCTGCCACTCCTCAGGCTTCGACTCCTCCTC
TGCCGTGGTCTTCATATTTGTGAGCACAGCAGTAGTAGTGTTGGTGATCTTGACCATGACAGTACTGGGGCTTGT
CAAGCTCTGCTTCACGAAAGCCCCTCTTCCCAGCCAAGGAAGGAGTCTATGGGCCCGCCGGCCTGGAGAGTGA
TCCTGAGCCCGCTGCTTGGGCTCCAGTTCTGCACATTGCACAAACAATGGGGTGAAAGTCGGGGACTGTGATCT
GCGGGACAGAGCAGAGGGTGCCTTGCTGGCGGAGTCCCCTCTTGGCTCTAGTGATGCATAGGGAAACAGGGGACA
TGGGCACTCCTGTGAACAGTTTTTCACTTTTGATGAAACGGGGAACCAAGAGGAACTTACTTGTGTAACTGACAA
TTTCTGCAGAAATCCCCCTTCCTCTAAATTCCCTTTACTCCACTGAGGAGCTAAATCAGAACTGCACACTCCTTC
CCTGATGATAGAGGAAGTGGAAGTGCCTTTAGGATGGTGATACTGGGGGACCGGGTAGTGCTGGGGAGAGATATT
TTCTTATGTTTATTCGGAGAATTTGGAGAAGTGATTGAACTTTCAAGACATTGGAAACAAATAGAACACATATAT
AATTTACATTAAAAAATAATTTCTACCAAAATGGAAAGGAAATGTTCTATGTTGTTCAGGCTAGGAGTATATTGG
TTCGAAATCCCAGGGAAAAAAATAAAAATAAAAAATTAAAGGATTGTTGAT

【図３２】

シグナル配列： アミノ酸 1-16

膜貫通ドメイン： アミノ酸 397-418

N-グリコシル化部位： アミノ酸 189-193;381-385

グリコサミノグリカン接着部位： アミノ酸 289-293

cAMP- 及び cGMP-依存性プロテインキナーゼリン酸化部位：
アミノ酸 98-102;434-438

N-ミリストイル化部位： アミノ酸 30-36;35-41;58-64;
59-65;121-127;151-157;185-191;
209-215;267-273;350-356;374-380;
453-459;463-469;477-483

アスパラギン酸及びアスパラギンヒドロキシル化部位：
アミノ酸 262-274

MRPAFALCLLWQALWPGPGGGEHPTADRAGCSASGACYSLHHATMKRQAAEEACILRGGALSTVRAGAELRAVLA
LLRAGPGPGGGSKDLLFWVALERRRSHCTLENEPLRGFSWLSSDPGGLESDTLQWVEEPQRSCTARRCAVLQATG
GVEPAGWKEMRCHLRANGYLCKYQFEVLCPAPRPGAASNLSYRAPFQLHSAALDFSPPGTEVSALCRGQLPISVT
CIADEIGARWDKLSGDVLCPCPGRYLRAGKCAELPNCLDDLGGFACECATGFELGKDGRSCVTSGEGQPTLGGTG
VPTRRPPATATSPVPQRTWPIRVDEKLGETPLVPEQDNSVTSIPEIPRWGSQSTMSTLQMSLQAESKATITPSGS
VISKFNSTTSSATPQAFDSSSAVVFIFVSTAVVVLVILTMTVLGLVKLCFHESPSSQPRKESMGPPGLESDPEPA
ALGSSSAHCTNNGVKVGDCDLRDAEGALLAESPLGSSDA

【図３３】

CGGACGCTGGGATTCAGCAGTGGCCTGTGGCTGCCAGAGCAGCTCCTCAGGGGAAACTAAGCGTCGAGTCAGAC
GGCACCATAATCGCCTTTAAAAGTGCCTCCGCCCTGCCGGCCGCGTATCCCCCGGCTACCTGGGCCGCCCCGCGG
CGGTGCGCGCGTGAGAGGGAGCGCGGCGGGCAGCCGAGCGCCGGTGTGAGCCAGCGCTGCTGCCAGTGTGAGCCGC
GGTGTGAGCGCGGTGGGTGCGGAGGGGCGTGTGTGCCGGCGCGCGCCGTGGGGTGCAAACCCCGAGCGTCTAC
GCTGCCATGAGGGGCGCGAACGCCTGGGCGCCACTCTGCCTGCTGCTGGCTGCCGCCACCCAGCTCTCGCGGCAG
CAGTCCCCAGAGAGACCTGTTTTCACATGTGGTGGCATTCTTACTGGAGAGTCTGGATTTATTGGCAGTGAAGGT
TTTCCTGGAGTGTACCCTCCAAATAGCAAATGTACTTGGAAAATCACAGTTCCCGAAGGAAAAGTAGTCGTTCTC
AATTTCCGATTCATAGACCTCGAGAGTGACAACCTGTGCCGCTATGACTTTGTGGATGTGCATCAATGGCCATGTC
AATGGCCAGCCCATTGGCCGCTTCTGTGGCACTTTCCGGCCTGGAGCCCTTGTGTCCAGTGGCAACAAGATGATG
GTGCAGATGATTTCTGATGCCAACACAGCTGGCAATGGCTTCATGGCCATGTTCTCCGCTGCTGAACCAAACGAA
AGAGGGGATCAGTATTGTGGAGGACTCCTTGACAGACCTTCCGGCTCTTTTAAAACCCCCAACTGGCCAGACCGG
GATTACCCTGCAGGAGTCACTTGTGTGTGGCACATTGTAGCCCCAAAGAATCAGCTTATAGAATTAAAGTTTGAG
AAGTTTGATGTGGAGCGAGATAACTACTGCCGATATGATTATGTGGCTGTGTTTAATGGCGGGGAAGTCAACGAT
GCTAGAAAGAATTGGAAAGTATTGTGGTGATAGTCCACCTGCGCCAATTGTGTCTGAGAGAAATGAACTTCTTATT
CAGTTTTTATCAGACTTAAGTTTAACTGCAGATGGGTTTATTGGTCACTACATATTCAGGCCAAAAAAACTGCCT
ACAACTACAGAACAGCCTGTCACCACCACATTCCCTGTAACCACGGGTTTAAAACCCACCGTGGCCTTGTGTCAA
CAAAAGTGTAGACGGACGGGGACTCTGGAGGGCAATTATTGTTCAAGTGACTTTGTATTAGCCGGCACTGTTATC
ACAACCATCACTCGCGATGGGAGTTTGCACGCCACAGTCTCGATCATCAACATCTACAAAGAGGGAAATTTGGCG
ATTCAGCAGGCGGGCAAGAACATGAGTGCCAGGCTGACTGTCGTCTGCAAGCAGTGCCCTCTCCTCAGAAGAGGT
CTAAATTACATTATTATGGCCAAGTAGGTGAAGATGGGCGAGGCAAAATCATGCCAAACAGCTTTATCATGATG
TTCAAGACCAAGAATCAGAAGCTCCTGGATGCCTTAAAAAATAAGCAATGTTAACAGTGAACTGTGTCCATTTAA
GCTGTATTCTGCCATTGCCTTTGAAAGATCTATGTTCTCTCAGTAGAAAAAAAAATACTTATAAAATTACATATT
CTGAAAGAGGATTCCGAAAGATGGGACTGGTTGACTCTTCACATGATGGAGGTATGAGGCCTCCGAGATAGCTGA
GGGAAGTTCTTTGCCTGCTGTCAGAGGAGCAGCTATCTGATTGGAAACCTGCCGACTTAGTGCGGTGATAGGAAGC
TAAAAGTGTCAAGCGTTGACAGCTTGGAAGCGTTTATTTATACATCTCTGTAAAAGGATATTTTAGAATTGAGTT
GTGTGAAGATGTCAAAAAAAGATTTTAGAAGTGCAATATTTATAGTGTTATTGTTTCACCTTCAAGCCTTTGCC
CTGAGGTGTTACAATCTTGTCTTGCGTTTTCTAAATCAATGCTTAATAAAATATTTTTAAAGGAAAAAAAAAAAA

【図３４】

シグナル配列： アミノ酸 1-23

N-グリコシル化部位： アミノ酸 355-359

チロシンキナーゼリン酸化部位： アミノ酸 199-208

N-ミリストイル化部位： アミノ酸 34-40;35-41;100-106;
113-119;218-224;289-295;305-311;
309-315;320-326;330-336

細胞接着配列： アミノ酸 149-152

MRGANAWAPLCLLLAAATQLSRQQSPERPVFTCGGILTGESGFIGSEGFPGVYPPNSKCTWKITVPEGKVVVLNF
RFIDLESDNLCRYDFVDVYNGHANGQRIGRFCGTFRPGALVSSGNKMMVQMISDANTAGNGFMAMFSAAEPNERG
DQYCGGLLDRPSGSFKTPNWPDRDYPAGVTCVWHIVAPKNQLIELKFEKFDVERDNYCRYDYVAVFNGGEVNDAR
RIGKYCGDSPPAPIVSERNELLIQFLSDLSLTADGFIGHYIFRPKKLPTTTEQPVTTTFPVTTGLKPTVALCQQK
CRRTGTLEGNYCSSDFVLAGTVITTITRDGSLHATVSIINIYKEGNLAIQQAGKNMSARLTVVCKQCPLLRRGLN
YIIMGQVGEDGRGKIMPNSFIMMFKTKNQKLLDALKNKQC

【図３５】

GTCTGTTCCCAGGAGTCCTTCGGCGGCTGTTGTGTCAGTGGCCTGATCGCGATGGGGACAAAGGCGCAAGTCGAG
AGGAAACTGTTGTGCCTCTTCATATTGGCGATCCTGTTGTGCTCCCTGGCATTGGGCAGTGTTACAGTGCACTCT
TCTGAACCTGAAGTCAGAATTCCTGAGAATAATCCTGTGAAGTTGTCCTGTGCCTACTCGGGCTTTTCTTCTCCC
CGTGTGGAGTGGAAGTTTGACCAAGGAGACACCACCAGACTCGTTTGCTATAATAACAAGATCACAGCTTCCTAT
GAGGACCGGGTGACCTTCTTGCCAACTGGTATCACCTTCAAGTCCGTGACACGGGAAGACACTGGGACATACACT
TGTATGGTCTCTGAGGAAGGCGGCAACAGCTATGGGGAGGTCAAGGTCAAGCTCATCGTGCTTGTCGCCTCCATCC
AAGCCTACAGTTAACATCCCCTCCTCTGCCACCATTGGGAACCGGGCAGTGCTGACATGCTCAGAACAAGATGGT
TCCCCACCTTCTGAATACACCTGGTTCAAAGATGGGATAGTGATGCCTACGAATCCCAAAAGCACCCGTGCCTTC
AGCAACTCTTCCTATGTCCTGAATCCCACAACAGGAGAGCTGGTCTTTGATCCCCTGTCAGCCTCTGATACTGGA
GAATACAGCTGTGAGGCACGGAATGGGTATGGGACACCCATGACTTCAAATGCTGTGCGCATGGAAGCTGTGGAG
CGGAATGTGGGGGTCATCGTGGCAGCCGTCCTTGTAACCCTGATTCTCCTGGGAATCTTGGTTTTGGCATCTGG
TTTGCCTATAGCCGAGGCCACTTTGACAGAACAAAGAAAGGGACTTCGAGTAAGAAGGTGATTTACAGCCAGCCT
AGTGCCCGAAGTGAAGGAGAATTCAAACAGACCTCGTCATTCCTGGTGTGAGCCTGGTCGGCTCACCGCCTATCA
TCTGCATTTGCCTTACTCAGGTGCTACCGGACTCTGGCCCCTGATGTCTGTAGTTTCACAGGATGCCTTATTTGT
CTTCTACACCCCACAGGGCCCCCTACTTCTTCGGATGTGTTTTTAATAATGTCAGCTATGTGCCCCATCCTCCTT
CATGCCCTCCCTCCCCTTTCCTACCACTGCTGAGTGGCCTGGAACTTGTTTAAAGTGTTTATTCCCCATTTCTTTG
AGGGATCAGGAAGGAATCCTGGGTATGCCATTGACTTCCCTTCTAAGTAGACAGCAAAAATGGCGGGGGTCGCAG
GAATCTGCACTCAACTGCCCACCTGGCTGGCAGGGATCTTTGAATAGGTATCTTGAGCTTGGTTCTGGGCTCTTT
CCTTGTGTACTGACGACCAGGGCCAGCTGTTCTAGAGCGGGAATTAGAGGCTAGAGCGGCTGAAATGGTTGTTTG
GTGATGACACTGGGGTCCTTCCATCTCTGGGGCCCACTCTCTTCTGTCTCCCATGGGAAGTGCCACTGGGATCC
CTCTGCCCTGTCCTCCTGAATACAAGCTGACTGACATTGACTGTGTCTGTGGAAAATGGGAGCTCTTGTTGTGGA
GAGCATAGTAAATTTTCAGAGAACTTGAAGCCAAAAGGATTTAAAACCGCTGCTCTAAAGAAAGAAAACTGGAG
GCTGGGCGCAGTGGCTCACGCCTGTAATCCCAGAGGCTGAGGCAGGCGGATCACCTGAGGTCGGGAGTTCGGAT
CAGCCTGACCAACATGGAGAAACCCTACTGGAAATACAAAAGTTAGCCAGGCATGGTGGTGCATGCCTGTAGTCCC
AGCTGCTCAGGAGGCTGGCAACAAGAGCAAAACTCCAGCTCAAAAAAAAAAAAAAAA

【図３６】

シグナル配列：	アミノ酸 1-27
膜貫通ドメイン：	アミノ酸 235-256
N-グリコシル化部位：	アミノ酸 185-189
cAMP- 及び cGMP-依存性プロテインキナーゼリン酸化部位：	アミノ酸 270-274
N-ミリストイル化部位：	アミノ酸 105-111;116-122; 158-164;219-225;237-243;256-262

MGTKAQVERKLLCLFILAILLCSLALGSVTVHSSRPEVRIPENNPVKLSCAYSGFSSPRVEWKFDQGDTTRLVCY
NNKITASYEDRVTFLPTGITFKSVTREDTGTYTCMVSEEGGNSYGEVKVKLIVLVPPSKPTVNIPSSATIGNRAV
LTCSEQDGSPPSEYTWFKDGIVMPTNPKSTRAFSNSSYVLNPTTGELVFDPLSASDTGEYSCEARNGYGTPMTSN
AVRMEAVERNVGVIVAAVLVTLILLGILVFGIWFAYSRGHFDRTKKGTSSKKVIYSQPSARSEGEFKQTSSFLV

【図３７】

GCTGAGTCTGCTGCTCCTGCTGCTGCTGCTCCAGCCTGTAACCTGTGCCTACACCACGCCAGGCCCCCCCAGAGC
CCTCACCACGCTGGGCGCCCCCAGAGCCCACACCATGCCGGGCACCTACGCTCCCTCGACCACACTCAGTAGTCC
CAGCACCCAGGGCCTGCAAGAGCAGGCACGGGCCCTGATGCGGGACTTCCCGCTCGTGGACGGCCACAACGACCT
GCCCCTGGTCCTAAGGCAGGTTTACCAGAAAGGGCTACAGGATGTTAACCTGCGCAATTTCAGCTACGGCCAGAC
CAGCCTGGACAGGCTTAGAGATGGCCTCGTGGGCGCCCAGTTCTGGTCACCCTATGTGCCATGCCAGACCCAGGA
CCGGGATGCCCTGCGCCTCACCCTGGAGCAGATTGACCTCATACGCCGCATGTATGTGCCTCCTATTCTGAGCTGGA
GCTTGTGACCTCGGCTAAAGCTCTGAACGACACTCAGAAATTGGCCTGCCTCATCGGTGTAGAGGGTGGCCACTC
GCTGGACAATAGCCTCTCCATCTTACGTACCTTCTACATGCTGGGAGTGCGCTACCTGACGCTCACCCACACCTG
CAACACACCCTGGGCAGAGAGCTCCGCTAAGGGCGTCCACTCCTTCTACAACAACATCAGCGGGCTGACTGACTT
TGGTGAGAAGGTGGTGGCAGAAATGAACCGCCTGGGCATGATGGTAGACTTATCCCATGTCTCAGATGCTGTGGC
ACGGCGGGCCCTGGAAGTGTCACAGGCACCTGTGATCTTCTCCCACTCGGCTGCCCGGGGTGTGTGCAACAGTGC
TCGGAATGTTCCTGATGACATCCTGCAGCTTCTGAAGAAGAACGGTGGCGTCGTGATGGTGTCTTTGTCCATGGG
AGTAATACAGTGCAACCCATCAGCCAATGTGTCCACTGTGGCAGATCACTTCGACCACATCAAGGCTGTCATTGG
ATCCAAGTTCATCGGGATTGGTGGAGATTATGATGGGGCCGGCAAATTCCCTCAGGGGCTGGAAGACGTGTCCAC
ATACCCGGTCCTGATAGAGGAGTTGCTGAGTCGTGGCTGGAGTGAGGAAGAGCTTCAGGGTGTCCTTCTGGAAA
CCTGCTGCGGGTCTTCAGACAAGTGGAAAAGGTACAGGAAGAAAACAAATGGCAAAGCCCCTTGGAGGACAAGTT
CCCGGATGAGCAGCTGAGCAGTTCCTGCCACTCCGACCTCTCACGTCTGCGTCAGAGACAGAGTCTGACTTCAGG
CCAGGAACTCACTGAGATTCCCATACACTGGACAGCCAAGTTACCAGCCAAGTGGTCAGTCTCAGAGTCCTCCCC
CCACATGGCCCCAGTCCTTGCAGTTGTGGCCACCTTCCCAGTCCTGCCAATCTTATTCTGTGGCTCTGATGACCCAGTTAGTC
CTGCCAGATGTCACTGTAGCAAGCCACAGACACCCCACAAAGTTCCCCTGTTGTGCAGGCACAAATATTTCCTGA
AATAAATGTTTTGGACATAG

【図３８】

N-グリコシル化部位：	アミノ酸 58-62;123-127; 182-186;273-277
N-ミリストイル化部位：	アミノ酸 72-78;133-139; 234-240;264-270;334-340; 389-395
腎臓ジペプチダーゼ活性部位：	アミノ酸 134-157

MPGTYAPSTTLSSPSTQGLQEQARALMRDFPLVLDGHNDLPLVLRQVYQKGLQDVNLRNFSYGQTSLDRLRDGLVG
AQFWSAYVPCQTQDRDALRLTLEQIDLIRRMCASYSELELVTSAKALNDTQKLACLIGVEGGHSLDNSLSILRTF
YMLGVRYLTLTHTCNTPWAESSAKGVHSFYNNISGLTDFGEKVVAEMNRLGMMVDLSHVSDAVARRALEVSQAPV
IFSHSAARGVCNSARNVPDDILQLLKKNGGVVMVSLSMGVIQCNPSANVSTVADHFDHIKAVIGSKFIGIGGDYD
GAGKFPQGLEDVSTYPVLIEELLSRGWSEEELQGVLRGNLLRVFRQVEKVQEENKWQSPLEDKFPDEQLSSSCHS
DLSRLRQRQSLTSGQELTEIPIHWTAKLPAKWSVSESSPHMAPVLAVVATFPVLILWL

【図３９】

GGGGAGAGGAATTGACCATGTAAAAGGAGACTTTTTTTTTTGGTGGTGGTGGCTGTTGGGTGCCTTGCAAAAATG
AAGGATGCAGGACGCAGCTTTCTCCTGGAACCGAACGCAATGGATAAACTGATTGTGCAAGAGAGAAGGAAGAAC
GAAGCTTTTTCTTGTGAGACCTGGATCTTAACACAAAGTGTATATGTGCACACAGGGAGCATTCAAGAATGAAA
TAAACCAGAGTTAGACCCGCGGGGGTTGGTGTGTTCTGACATAAATAAATAATCTTAAAGCAGCTGTTCCCCTCC
CCACCCCCAAAAAAAAGGATGATTGGAAATGAAGAACCGAGGATTCACAAAGAAAAAAGTATGTTCATTTTTCTC
TATAAAGGAGAAAGTGAGCCAAGGAGATATTTTTGGAATGAAAAGTTTGGGGCTTTTTTAGTAAAGTAAAGAACT
GGTGTGGTGGTGTTTTCCTTTCTTTTTGAATTTCCCACAAGAGGAGGAAATTAATAATACATCTGCAAAGAAA
TTTCAGAGAAGAAAAGTTGACCGCGGCAGATTGAGGCATTGATTGGGGGAGAGAAACCAGCAGAGCACAGTTGGA
TTTGTGCCTATGTTGACTAAAATTGACGGATAATTGCAGTTGGATTTTTCTTCATCAACCTCCTTTTTTTTAAAT
TTTTATTCCTTTTGGTATCAAGATCATGCGTTTTCTCTTGTTCTTAACCACCTGGATTTCCATCTGGATGTTGCT
GTGATCAGTCTGAAATACAACTGTTTGAATTCCAGAAGGACCAACACCAGATAAATTATGAATGTTGAACAAGAT
GACCTTACATCCACAGCAGATAATGATAGGTCCTAGGTTTAACAGGGCCCTATTTGACCCCCTGCTTGTGGTGCT
GCTGGCTCTTCAACTTCTTGTGGTGGCTGGTCTGGTGCGGGCTCAGACCTGCCCTTCTGTGTGCTCCTGCAGCAA
CCAGTTCAGCAAGGTGATTTGTGTTCGGAAAAACCTGCGTGAGGTTCCGATGGCATCTCCACCAACACAGGCTG
CTGAACCTCCATGAGAACCAAATCCAGATCATCAAAGTGAACAGCTTCAAGCACTTGAGGCACTTGGAAATCCTA
CAGTTGAGTAGGAACCATATCAGAACCATTGAAATTGGGGCTTTCAATGGTCTGGCGAACCTCAACACTCTGGAA
CTCTTTGACAATCGTCTTACTACCATCCCGAATGGAGCTTTTGTATACTTGTCTAAACTGAAGGAGCTCTGGTTG
CGAAACAACCCCATTGAAAGCATCCCTTCTTATGCTTTTAACAGAATTCCTTCTTTGCGCCGACTAGACTTAGGG
GAATTGAAAAGACTTTCATACATCTCAGAAGGTGCCTTTGAAGGTCTGTCCAACTTGAGGTATTTGAACCTTGCC
ATGTGCAACCTTCCGGGAAATCCCTAACCTCACACCGCTCATAAAACTAGATGAGCTGGATCTTTCTGGGAATCAT
TTATCTGCCATCAGGCCTGGCTCTTTCCAGGGTTTGATGCACCTTCAAAAACTGTGGATGATACAGTCCCAGATT
CAAGTGATTGAACGGAATGCCTTTGACAACCTTCAGTCACTAGTGGAGATCAACCTGCCACACAATAATCTAACA
TTACTGCCTCATGACCTCTTCACTCCCTTGCATCATCTAGAGCGGATACATTTACATCACAACCCTTGGAACTGT
AACTGTGACATACTGTGGCTCAGCTGGTGGATAAAGACATGGCCCCCTCGAACACAGCTTGTTGTGCCCGGTGT
AACACTCCTCCCAATCTAAAGGGGAGGTACATTGGAGAGCTCGACCAGAATTACTTCACATGCTATGCTCCGGTG
ATTGTGGAGCCCCCTGCAGACCTCAATGTCACTGAAGGCATGGCAGCTGAGCTGAAATGTGGGCCTCCACATCC
CTGACATCTGTATCTTGGATTACTCCAAATGGAACAGTCATGACACATGGGGCGTACAAAGTGCGGATAGCTGTG
CTCAGTGATGGTACGTTAAATTTCACAAATGTAACTGTCAAGATACAGGCATGTACACATGTATGGTGAGTAAT
TCCGTTGGGAATACTACTGCTTCAGCCACCCTGAATGTTACTGCAGCAACCACTACTCCTTTCTCTTACTTTTCA
ACCGTCACAGTAGAGACTATGGAACCGTCTCAGGATGAGGCAGGAACCAGATAACAATGTGGGTCCCACTCCA
GTGGTCGACTGGGAGACCACCAATGTGACCACCTCTCTCACACCACAGAGCACAAGGTCGACAGAGAAAACCTTC
ACCATCCCCAGTGACTGATATAAACAGTGGGATCCCAGGAATTGATGAGGTCATGAAGACTACCAAAATCATCATT
GGGTGTTTTGTGGCCATCACACTCATGGGCTGCAGTGATGCTGGTCATTTTCTACAAGATGAGGAAGCAGCACCAT
CGGCAAAACCATCACGCCCCAACAAGGACTGTTGAAATTATTAATGTGGATGATGAGATTACGGGAGACACACCC
ATGGAAAGCCACCTGCCCATGCCGCTATCGAGCATGAGCACCTAAATCACTATAACTCATACAAATCTCCCCTTC
AACCACACAACAACAGTTAACACAATAAATTCAATACACAGTTCAGTGCATGAACCGTTATTGATCCGAATGAAC
TCTAAAGACAATGTACAAGAGACTCAAATCTAAAACATTTACAGAGTTACAAAAAACAAACAATCAAAAAAAAAG
ACAGTTTATTAAAAATGACACAAATGACTGGGCTAAATCTACTGTTTCAAAAAAGTGTCTTACAAAAAAACAAA
AAAGAAAAGAAATTTATTTATTAAAAATTCTATTGTGATCTAAAGCAGACAAAAA

【図４０】

シグナル配列：	アミノ酸 1-44
膜貫通ドメイン：	アミノ酸 528-543
N-グリコシル化部位：	アミノ酸 278-282;364-368; 390-394;412-416;415-419;434-438; 442-446;488-492;606-610
cAMP- 及び cGMP-依存性プロテインキナーゼリン酸化部位：	アミノ酸 183-187
N-ミリストイル化部位：	アミノ酸 40-46;73-79;118-124; 191-197;228-234;237-243;391-397; 422-428;433-439;531-537

MLNKMTLHPQQIMIGPRFNRALFDPLLVVLLALQLLVVAGLVRAQTCPSVCSCSNQFSKVICVRKNLREVPDGIS
TNTRLLNLHENQIQIIKVNSFKHLRHLEILQLSRNHIRTIEIGAFNGLANLNTLELFDNKLTTIPNGAFVVLSKL
KELWLRNNPIESIPSYAFNRIPSLRRLDLGELKRLSYISEGAFEGLSNLRVLNLAMCNLKEIPNLTPLIKLDELD
LSGNHLSAIRPGSFQGLMHLQKLWMIQSQIQVIERNAFDNLQSLVEINLAHNNLTLLPHDLFTPLHHLERIHLHH
NPWNCNCDILWLSWWIKDMAPSNTACCARCNTPPNLKGRYIGELDQNVFTCYAPVIVEPPADLNVIEGMAAELKC
RASTSLTSVSWITPNGTVMTHGAYRVRIAVLSDGTLNFTNVTVQDTGMYTCMVSNSVGNTTASATLNVTAATTTP
FSYPSTVTVETMEPSQDEARTTDNVGPIFVVDWETTNVTTSLTPQSTRSTEKTFTIPVTDINSGIPGIDEVMKT
TKIIIGCFVAITLMAAVMLVIFYKMRKQHHRQNHHAPTRTVEIINVDDEITGDTPMESHLPMPAIEHEHNLNHYNS
YKSPFNHTTTVNTINSIHSSVHEPLLIRMNSKDNVQETQI

【図４１】

GAAAGCTATAGGCTACCCATTCAGCTCCCCTGTCAGAGACTCAAGCTTTGAGAAAGGCTAGCAAAGAGCAAGGAA
AGAGAGAAAACAACAAAGTGGCGAGGCCCTCAGAGTGAAAGCGTAAGGTTCAGTCAGCCTGCTGCAGCTTTGCAG
ACCTCAGCTGGGCATCTCCAGACTCCCCTGAAGGAAGAGCCTTCCTCACCCAAACCCACAAAAGATGCTGAAAAA
GCCTCTCTCAGCTGTGACCTGGCTCTGCATTTTCATCGTGGCCTTTGTCAGCCACCCAGCGTGGCTGCAGAAGCT
CTCTAAGCACAAGACACCAGCACAGCCACAGCTCAAAGCGGCCAACTGCTGTGAGGAGGTGAAGGAGCTCAAGGC
CCAAGTTGCCAACCTTAGCAGCCTGCTGAGTGAACTGAACAAGAAGCAGGAGAGGAGTGGGTCAGCGTGGTCAT
GCAGGTGATGGAGCTGGAGAGCAACAGCAAGCGCATGGAGTCGCGGCTCACAGATGCTGAGAGCAAGTACTCCGA
GATGAACAACCAAATTGACATCATGCAGCTGCAGGCAGCACAGACGGTCACTCAGACCTCCGCAGATGCCAAAAAG
CGACTGCTCTTCCCTCTACCAGAAGAACTACCGCATCTCTGGAGTGTATAAGCTTCCTCCTGATGACTTCCTGGG
CAGCCCTGAACTGGAGGTGTTCTGTGACATGGAGACTTCAGGCGGAGGCTGGACCATCATCCAGAGACGAAAAAG
TGGCCTTGTCTCCTTCTACCGGGACTGGAAGCAGTACAAGCAGGGCTTTGGCAGCATCCGTGGGGACTTCTGGCT
GGGGAACGAACACATCCACCGGCTCTCCAGACAGCCAACCCGGCTGCGTGTAGAGATGGAGGACTGGGAGGGCAA
CCTGCGCTACGCTGAGTATAGCCACTTTGTTTTGGGCAATGAACTCAACAGCTATCGCCTCTTCCTGGGGAACTA
CACTGGCAATGTGGGGAACGACGCCCTCCAGTATCATAACAACACAGCCTTCAGCACCAAGGACAAGGACAATGA
CAACTGCTTGGACAAGTGTGCACAGCTCCGCAAAGGTGGCTACTGGTACAACTGCTGCACAGACTCCAACCTCAA
TGGAGTGTACTACCGCCTGGGTGAGCACAATAAGCACCTGGATGGCATCACCTGGTATGGCTGGCATGGATCTAC
CTACTCCCTCAAACGGGTGGAGATGAAAATCCGCCCAGAAGACTTCAAGCCTTAAAGGAGGCTGCCGTGGAGCA
CGGATACAGAAACTGAGACACGTGGAGACTGGATGAGGGCAGATGAGGACAGGAAGAGAGTGTTAGAAAGGGTAG
GACTGAGAAACAGCCTATAATCTCCAAAGAAAGAATAAGTCTCCAAGGAGCACAAAAAAATCATATGTACCAAGG
ATGTTACAGTAAACAGGATGAACTATTAAACCCACTGGGTCCTGCCACATCCTTCTCAAGGTGGTAGACTGAGT
GGGGTCTCTCTGCCCAAGATCCCTGACATAGCAGTAGCTTGTCTTTTCCACATGATTTGTCTGTGAAAGAAAATA
ATTTTGAGATCGTTTTATCTATTTTCTCTACGGCTTAGGCTATGTGAGGGCAAACACAAATCCCTTTGCTAAAAA
AGAACCATATTATTTTGATTCTCAAAGGATAGGCCTTTGAGTGTTAGAGAAGGAGTGAAGAGGCAGGTGGGAA
ATGGTATTTCTATTTTTAAATCCAGTGAAATTATCTTGAGTCTACACATTATTTTTAAAACACAAAAATTGTTCG
GCTGGAACTGACCCAGGCTGGACTTGCGGGGAGGAAACTCCAGGGCACTGCATCTGGCGATCAGACTCTGAGCAC
TGCCCCTGCTCGCCTTGGTCATGTACAGCACTGAAAGGAATGAAGCACCAGCAGGAGCTGGACAGAGTCTCTCAT
GGATGCCGGCACAAAACTGCCTTAAAATATTCATAGTTAATACAGGTATATCTATTTTATTTACTTTGTAAGAA
ACAAGCTCAAGGAGCTTCCTTTTAAATTTTGTCTGTAGGAAATGGTTGAAAACTGAAGGTAGATGGTGTTATAGT
TAATAATAAATGCTGTAAATAAGCATCTCACTTTGTAAAAATAAAATATTGTGGTTTTGTTTAAACATTCAACG
TTTCTTTTCCTTCTACAATAAACACTTTCAAAATGTG

【図４２】

シグナル配列： アミノ酸 1-26

N-グリコシル化部位： アミノ酸 58-62;253-257;267-271

グリコサミノグリカン接着部位： アミノ酸 167-171

cAMP- 及び cGMP-依存性プロテインキナーゼリン酸化部位： アミノ酸 176-180

N-ミリストイル化部位： アミノ酸 168-174;196-202; 241-247;252-258;256-262;327-333

細胞接着配列： アミノ酸 199-202

MLKKPLSAVTWLCIFIVAFVSHPAWLQKLSKHKTPAQPQLKAANCCEEVKELKAQVANLSSLLSELNKKQERDWV
SVVMQVMELESNSKRMESRLTDAESKYSEMNNQIDIMQLQAAQTVTQTSADAIYDCSSLYQKNVRISGVYKLPPD
DFLGSPELEVFCDMETSGGGWTIIQRRKSGLVSFYRDWKQYKQGFGSIRGDFWLGNEHIHRLSRQPTRLRVEMED
WEGNLRYAEYSHFVLGNELNSYRLFLGNYTGNVGNDALQYHNNTAFSTKDKDNDNCLDKCAQLRKGGYWYNCCTD
SNLNGVYYRLGEHNKHLDGITWYGWHGSTYSLKRVEMKIRPEDFKP

【図４３】

CACGCACTTCACCTGGGTCGGGATTCTCAGGTCATGAACGGTCCCAGCCACCTCCGGGCAGGGCGGGTGAGGACG
GGGACGGGGCGTGTCCAACTGGCTGTGGGCTCTTGAAACCCGAGCATGGCACAGCACGGGGCGATGGGCGCGTTT
CGGGCCCTGTGCGGCCTGGCGCTGCTGTGCGCGCTCAGCCTGGGTCAGCGCCCCACCGGGGGTCCCGGGTGCGGC
CCTGGGCGCCTCCTGCTTGGGACGGGAACGGACGCGGCTGCTGCCGGGTTCACACGACGCGCTGCTGCCGCGAT
TACCCGGGCGAGGAGTGCTGTTCCGAGTGGGACTGCATGTGTGTCCAGCCTGAATTCCACTGCGGAGACCCTTGC
TGCACGACCTGCCGGCACCACCCTTGTCCCCCAGGCCAGGGGGTACAGTCCCAGGGGAAATTCAGTTTTGGTTTC
CAGTGTATCGACTGTGCCTCGGGGACCTTCTCCGGGGGCCACGAAGGCCACTGCAAACCTTGGACAGACTGCACC
CAGTTCGGGTTTCTCACTGTGTTCCCTGGGAACAAGACCCACAACGCTGTGTGCGTCCCAGGGTCCCCGCCGGCA
GAGCCGCTTGGGTGGCTGACCGTCGTCCTCCTGGCCGTGGCCGCCTGCGTCCTCCTCCTGACCTCGGCCCAGCTT
GGACTCACATCTGGCAGCTGAGGAGTCAGTGCATGTGGCCCCGAGAGACCCAGCTGCTGCTGGAGGTGCCGCCGTC
GACCGAAGACGCCAGAAGCTGCCAGTTCCCCGAGGAAGAGCGGGGCGAGCGATCGGCAGAGGAGAAGGGGCGGCT
GGGAGACCTGTGGGTGTGAGCCTGGCCGTCCTCCGGGGCCACCGACCGCAGCCAGCCCCTCCCCAGGAGCTCCCC
AGGCCGCAGGGGCTCTGCGTTCTGCTCTGGGCCGGGCCCTGCTCCCCTGGCAGCAGAAGTGGGTGCAGGAAGGTG
GCAGTGACCAGCGCCCTGGACCATGCAGTTC

【図４４】

シグナル配列： アミノ酸 1-25

膜貫通ドメイン： アミノ酸 163-183

N-グリコシル化部位： アミノ酸 146-150

N-ミリストイル化部位： アミノ酸 5-11;8-14;25-31; 30-36;33-39;118-124;122-128; 156-162

原核生物膜リポタンパク脂質結合部位： アミノ酸 166-177

ロイシンジッパーパターン： アミノ酸 171-193

MAQHGAMGAFRALCGLALLCALSLGQRPTGGPGCGPGRLLLGTGTDARCCRVHTTRCCRDYPGEFCCSEWDCMCV
QPEFHCGDPCCTTCPHHPCPPGQGVQSQGKFSFGFQCIDCASGTFSGGHEGHCKPWTDCTQFGFLTVFPGNKTHN
AVCVPGSPPAEPLGWLTVVLLAVAACVLLLTSAQLGLHIWQLRSQCMWPRSTQLLLEVPPSTEDARSCQFPEEER
GERSAEEKGRLGDLWV

【図４５】

GGCGCCGGTGCACCGGGCGGGCTGAGCGCCTCCTGCGGCCCGGCCTGCGCGCCCCGGCCCGCCGCGCCGCCCACG
CCCCAACCCCGGCCCGCCCCCCTAGCCCCCGCCCGGGCCCGCGCCCAGCCCGCCCAGGTGAGCGCTCCGCC
CGCCGCGAGGCCCCGCCCCGGCCCCCCGCCCCGCCCCCGGCCGGCGGGGGAACCGGGCGATTCCTCGCGCGT
CAAACCACCTGATCCCATAAAACATTCATCCTCCCGGCGGCCCGCGCTGCGAGCGCCCCGCCAGTCCGCGCCGCC
GCCGCCCTCGCCCTGTGCGCCCTGCGCGCCCTGCGCACCCGCGGCCCGAGCCCAGCCAGAGCCGGGCGGAGCGGA
GCGCGCCGAGCCTCGTCCCGCGCCGGGCCGGGCCGGGGCCGGGCCGTAGCGGCGGCGCCTGGATGCGGACCCGGCCGCG
GGGAGACGGGCGCCCGCCCCGAAACGACTTTCAGTCCCCGACGCGCCCGCCCAACCCCTACGATGAAGAGGGCG
TCCGCTGGAGGGAGCCGGCTGCTGGCATGGGTGCTGTGGCTGCAGGCCTGGCAGGCTGGCAGCCCCATGCCCAGGT
GCCTGCGTATGCTACAATGAGCCCAAGGTGACGACAAGCTGCCCCCAGCAGGGCCTGCAGGCTGTGCCCGTGGGC
ATCCCTGCTGCCAGCCAGCGCATCTTCCTGCACAGGCAACCGCATCTCGCATGTGCCAGCTGCCAGCTTCCGTGCCTGC
CGCAACCTCACCATCCTGTGGCTGCACTCGAATGTGCTGGCCCGAATTGATGCGGCTGCCTTCACTGGCCTGGCC
CTCCTGGAGCAGCTGGACCTCAGCGATAATGCACAGCTCCGGTCTGTGGACCCTGCCACATTCCACGGCCTGGGC
CGCCTACACACGCTGCACCTGGACCGCTGCGGCCTGCAGGAGCTGGGCCCGGGGCTGTTCCGCGGCCTGGCTGCC
CTGCAGTACCTCTACCTGCAGGACAACGCGCTGCAGGCACTGCCTGATGACACCTTCCGCGACCTGGGCAACCTC
ACACACCTCTTCCTGCACGGCAACCGCATCTCCAGCGTGCCCGAGCGCGCCTTCCGTGGGCTGCACAGCCTCGAC
CGTCTCCTACTGCACCAGAACCGCGTGGCCCATGTGCACCCGCATGCCTTCCGTGACCTTGGCCGCCTCATGACA
CTCTATCTGTTTGCCAACAATCTATCAGCGCTGCCCACTGAGGCCCTGGCCCCCCTGCGTGCCCTGCAGTACCTG
AGGCTCAACGACAACCCCTGGGTGTGTGACTGCCGGGCACGCCCACTCTGGGCCTGGCTGCAGAAGTTCCGCGGC
TCCTCCTCCGAGGTGCCCTGCAGCCTCCCGCAACGCCTGGCTGGCCGTGACCTCAAACGCCTAGCTGCCAATGAC
CTGCAGGGCTGCGCTGTGGCCACCGGCCCTTACCATCCCATCTGGACCGGCAGGGCCACCGATGAGGAGCCGCTG
GGGCTTCCCAAGTGCTGCCAGCCAGATGCCGCTGACAAGGCCTCAGTACTGGAGCCTGGAAGACCAGCTTCGGCA
GGCAATGCGCTGAAGGGACGCGTGCCGCCCGGTGACAGCCCGCCGGGCAACGGCTCTGGCCCACGGCACATCAAT
GACTCACCCTTTGGGACTCTGCCTGGCTCTGCTGAGCCCCCGCTCACTGCAGTGCGGCCCGAGGGCTCCGAGCCA
CCAGGGTTCCCCACCTCGGGCCCCTCGCCGGAGGCCAGGCTGTTCACGCAAGAACCGCACCCGCAGCCACTGCCGT
CTGGGCCAGGCAGGCAGCGGGGGTGGCGGGACTGGTGACTCAGAAGGCTCAGGTGCCCTACCCAGCCTCACCTGC
AGCCTCACCCCCCTGGGCCTGGCGCTGGTGCTGTGGACAGTGCTTGGGCCCTGCTGACCCCCAGCGGACACAAGA
GCGTGCTCAGCAGCCAGGTGTGTGTACATACGGGGTCTCTCTCCACGCCGCCAAGCCAGCCGGGCGGCCGACCCG
TGGGGCAGGCCAGGCCAGGTCCTCCCTGATGGACGCCTGCCGCCCGCCACCCCCATCTCCACCCCATCATGTTTA
CAGGGTTCGGCGGCAGCGTTTGTTCCAGAACGCCGCCTCCCACCCAGATCGCGGTATATAGAGATATGCATTTTA
TTTTACTTGTGTAAAAATATCGGACGACGTGGAATAAAGAGCTCTTTTCTTAAAAAAA

【図４６】

シグナル配列： アミノ酸 1-26

ロイシンジッパーパターン： アミノ酸 135-157

グリコサミノグリカン接着部位： アミノ酸 436-440

N-グリコシル化部位： アミノ酸 82-86;179-183;237-241; 372-376;423-427

フォン・ウィルブランドC型ドメイン： アミノ酸 411-427

MKRASAGGSRLLAWVLWLQAWQVAAPCPGACVCYNEPKVTTSCPQQGLQAVPVGIPAASQRIFLHGNRISHVPAA
SFRACRNLTILWLHSNVLARIDAAAFTGLALLEQLDLSDNAQLRSVDPATFHGLGRLHTLHLDRCGLQELGPGLF
RGLAALQYLYLQDNALQALPDDTFRDLGNLTHLFLHGNRISSVPERAFRGLHSLDRLLLHQNRVAHVHPHAFRDL
GRLMTLYLFANNLSALPTEALAPLRALQYLRLNDNPWVCDCRARPLWAWLQKFRGSSSEVPCSLPQRLAGRDLKR
LAANDLQGCAVATGPYHPIWTGRATDEEPLGLPKCCQPDAADKASVLEPGRPASAGNALKGRVPPGDSPPGNGSG
PRHINDSPFGTLPGSAEPPLTAVRPEGSEPPGFPTSGPRRRPGCSRKNRTKSHCRLQQAGSGGGGTGDSEGSGAL
PSLTCSLTPLGLALVLWTVLGPC

【図４７】

GCGAGGGGAGCGCGGAGCCCGGCGCCTACAGCTCGCCATGGTGCGCCCCCTGAACCCGCGACCGCTGCCGCCCGT
AGTCCTGATGTTGCTGCTGCTGCCGCCGTCGCCGCTGCCTCTCGCAGCCGGAGACCCCCTTCCCACAGAAAG
CCGACTCATGAACAGCTGTCTCCAGGCCAGGAGGAAGTGCCAGGCTGATCCCACCTGCAGTGCTGCCTACCACCA
CCTGGATTCCTGCACCTCTAGCATAAGCACCCCACTGCCCTCAGAGGAGCCTTCGGTCCCTGCTGACTGCCTGGA
GGCAGCACAGCAACTCAGGAACAGCTCTCTGATAGGCTGCATGTGCCACCGGCGCATGAAGAACCAGGTTGCCTG
CTTGGACATCTATTGGACCGTTCACCGTGCCCGCAGCCTTGGTAACTATGAGCTGGATGTCTCCCCCTATGAAGA
CACAGTGACCAGCAAACCCTGGAAAATGAATCTCAGCAAACTGAACATGCTCAAACCAGACTCAGACCTCTGCCT
CAAGTTTGCCATGCTGTGTACTCTCAATGACAAGTGTGACCGGCTGCGCAAGGCCTACGGGGAGGCGTGCTCCGG
GCCCCACTGCCAGCGCCACGTCTGCCTCAGGCAGCTGCTCACTTTCTTCGAGAAGGCCGCCGAGCCCCACGCGCA
GGGCCTGCTACTGTGCCCATGTGCCCCCAACGACCGGGGCTGCGGGGAGCGCCGGCGCAACACCATCGCCCCCAA
CTGCGCGCTGCCGCCTGTGGCCCCCAACTGCCTGGAGCTGCGGCGCCTCTGCTTCTCCGACCCGCTTTGCAGATC
ACGCCTGGTGGATTTCAGACCCACTGCCATCCCATGGACATCCTAGGAACTTGTGCAACAGAGCAGTCCAGATG
TCTACGAGCATACCTGGGGCTGATTGGGACTGCCATGACCCCCAACTTTGTCAGCAATGTCAACACCAGTGTTGC
CTTAAGCTGCACCTGCCGAGGCAGTGGCAACCTGCAGGAGGAGTGTGAAATGCTGGAAAGGTTCTTCTCCCACAA
CCCCTGCCTCACGGAGGCCATTGCAGCTAAGATGCGTTTTCACAGCCAACTCTTCTCCCAGGACTGGCCACACCC
TACCTTTGCTGTGATGGCACACCAGAATGAAAACCCTGCTGTGAGGCCACAGCCCTGGGTGCCCTCTCTTTTCTC
CTGCACGCTTCCCTTGATTCTGCTCCTGAGCCTATGGTAGCTGGACTTCCCCAGGGCCCTCTTCCCCTCCACCAC
ACCCAGGTGGACTTGCAGCCCACAAGGGGTGAGGAAAGGACAGCAGCAGGAAGGAGGTGCAGTGCGCAGATGAGG
GCACAGGAGAAGCTAAGGGTTATGACCTCCAGATCCTTACTGGTCCAGTCCTCATTCCCTCCACCCCATCTCCAC
TTCTGATTCATGCTGCCCCTCCTTGGTGGCCACAATTTAGCCATGTCATCTGGTGGTGACCAGCTCCACCAAGCC
CCTTTCTGAGCCCTTCCTCTTGACTACCAGGATCACCAGAATCTAATAAGTTAGCCTTTCTCTATTGCATTCCAG
ATTAGGGTTAGGGTAGGAGGACTGGGTGTTCTGAGGCAGCCTAGAAAGTCATTCTCCTTTGTGAAGAAGGCTCC
TGCCCCCTCGTCTCCTCCTCTGAGTGGAGGATGGAAAACTACTGCCTGCACTGCCCTGTCCCCGGATCCTGCCGA
ACATCTGGGCATCAGGAGCTGGAGCCTGTGGGCCTTGCTTTATTCCTATTATTGTCCTAAAGTCTCTCTGGGCTC
TTGGATCATGATTAAACCTTTGACTTAAG

【図４８】

シグナル配列： アミノ酸 1-26

N-グリコシル化部位： アミノ酸 95-99;148-152;309-313

cAMP- 及び cGMP-依存性プロテインキナーゼリン酸化部位： アミノ酸 231-235

N-ミリストイル化部位： アミノ酸 279-285;294-300

原核生物膜リポタンパク脂質接着 アミノ酸 306-317;379-390

MVRPLNPRPLPPVVLMLLLLPPSPLPLAAGDPLPTESRLMNSCLQARRKCQADPTCSAAYHHLDSCTSSISTPL
PSEEPSVPADCLEAAQQLRNSSLIGCMCHRRMKNQVACLDIYWTVHRARSLGNYELDVSPYEDTVTSKPWKMNLS
KLNMLKPDSDLCLKFAMLCTLNDKCDRLRKAYGEACSGPHCQRHVCLRQLLTFFEKAAEPHAQGLLLCPCAPNDR
GCGERRRNTIAPNCALPPVAPNCLELRRLCFSDPLCRSRLVDPQTHCHPMDILGTCATEQSRCLRAYLGLIGTAM
TPNPVSNVNTSVALSCTCRGSGNLQEECEMLEGFFSHNPCLTEAIAAKMRFHSQLFSQDWPHPTFAVMAHQNENP
AVRPQPWVPSLFSCTLPLILLLSLW

【図４９】

CGGACGCGTGGGCGGACGCGTGGGCGGACGCGTGGGCGGACGCGTGGGCTGGTTCAGGTCCAGGTTTTGCTTTGA
TCCTTTTCAAAAACTGGAGACACAGAAGAGGGCTCTAGGAAAAAGTTTTGGATGGGATTATGTGGAAACTACCCT
GCGATTCTCTGCTGCCAGAGCAGGCTCGGCGCTTCCACCCCAGTGCAGCCTTCCCCTGGCGGTGGTGAAAGAGAC
TCGGGAGTCGCTGCTTCCAAAGTGCCCGCCGTGAGTGAGCTCTCACCCCAGTCAGCCAA**ATG**AGCCTCTTCGGGC
TTCTCCTGCTGACATCTGCCCTGGCCGGCCAGAGACAGGGGACTCAGGCGGAATCCAACCTGAGTAGTAAATTCC
AGTTTTCCAGCAACAAGGAACAGAACGGAGTACAAGATCCTCAGCATGAGAGAATTATTACTGTGTCTACTAATG
GAAGTATTCACAGCCCAAGGTTTCCTCATACTTATCCAAGAAATACGGTCTTGGTATGGAGATTAGTAGCAGTAG
AGGAAAATGTATGGATACAACTTACGTTTGATGAAAGATTTGGGCTTGAAGACCCAGAAGATGACATATGCAAGT
ATGATTTTGTAGAAGTTGAGGAACCCAGTGATGGAACTATATTAGGGCGCTGGTGTGGTTCTGGTACTGTACCAG
GAAAACAGATTTCTAAAGGAAATCAAATTAGGATAAGATTTGTATCTGATGAATATTTTCCTTCTGAACCAGGGT
TCTGCATCCACTACAACATTGTCATGCCACAATTCACAGAAGCTGTGAGTCCTTCAGTGCTACCCCCTTCAGCTT
TGCCACTGGACCTGCTTAATAATGCTATAACTGCCTTTAGTACCTTGGAAGACCTTATTCGATATCTTGAACCAG
AGAGATGGCAGTTGGACTTAGAAGATCTATATAGGCCAACTTGGCAACTTCTTGGCAAGGCTTTTGTTTTTGGAA
GAAAATCCAGAGTGGTGGATCTGAACCTTCTAACAGAGGAGGTAAGATTATACAGCTGCACACCTCGTAACTTCT
CAGTGTCCATAAGGGAAGAACTAAAGAGAACCGATACCATTTTCTGGCCAGGTTGTCTCCTGGTTAAACGCTGTG
GTGGGAACTGTGCCTGTTGTCTCCACAATTGCAATGAATGTCAATGTGTCCCAAGCAAAGTTACTAAAAAATACC
ACGAGGTCCTTCAGTTGAGACCAAAGACCGGTGTCAGGGGATTGCACAAATCACTCACCGACGTGGCCCTGGAGC
ACCATGAGGAGTGTGACTGTGTGTGCAGAGGGAGCACAGGAGGATA**G**CCGCATCACCACCAGCAGCTCTTGCCCA
GAGCTGTGCAGTGCAGTGGCTGATTCTATTAGAGAACGTATGCGTTATCTCCATCCTTAATCTCAGTTGTTTGCT
TCAAGGACCTTTCATCTTCAGGATTTACAGTGCATTCTGAAAGAGGAGACATCAAACAGAATTAGGAGTTGTGCA
ACAGCTCTTTTGAGAGGAGGCCTAAAGGACAGGAGAAAAGGTCTTCAATCGTGGAAAGAAAATTAAATGTTGTAT
TAAATAGATCACCAGCTAGTTTCAGAGTTACCATGTACGTATTCCACTAGCTGGGTTCTGTATTTCAGTTCTTTC
GATACGGCTTAGGGTAATGTCAGTACAGGAAAAAAACTGTGCAAGTGAGCACCTGATTTCGGTTGCCTTGCTTAAC
TCTAAAGCTCCATGTCCTGGGCCTAAAATCGTATAAAATCTGGATTTTTTTTTTTTTTTGCTCATATTCACAT
ATGTAAACCAGAACATTCTATGTACTACAAACCTGGTTTTTAAAAAGGAACTATGTTGCTATGAATTAAACTTGT
GTCATGCTGATAGGACAGACTGCATTTTTCATATTTCTTATTAAAATTTCTGCCATTTAGAAGAAGAGAACTACA
TTCATGGTTTGGAAGAGATAAACCTGAAAAGAAGAGTGGCCTTATCTTCACTTTATCGATAAGTCAGTTTATTTG
TTTCATTGTGTACATTTTATATTCTCCTTTTGACATTATAACTGTTGGCTTTTCTAATCTTGTTAAAATATCTT
ATTTTTACCAAAGGTATTTAATATTCTTTTTATGACAACTTAGATCAACTATTTTTAGCTTGGTAAATTTTTCT
AAACACAATTGTTATAGCCAGAGGAACAAAGATGATATAAAATATTGTTGCTCTGACAAAAATACATGTATTTCA
TTCTCGTATGGTGCTAGAGTTAGATTAATCTGCATTTTAAAAAACTGAATTGGAATAGAATTGGTAAGTTGCAAA
GACTTTTTGAAAATAATTAAATTATCATATCTTCCATTCCTGTTATTGGAGATGAAAATAAAAAGCAACTTATGA
AAGTAGACATTCAGATCCAGCCATTACTAACCTATTCCTTTTTTGGGGAAATCTGAGCCTAGCTCAGAAAAACAT
AAAGCACCTTGAAAAAGACTTGGCAGCTTCCTGATAAAGCGTGCTGTGCAGTAGGAACACATCCTATTTA
TTGTGATGTTGTGGTTTTATTATCTTAAACTCTGTTCCATACACTTGTATAAATACATGGATATTTTATGTACA
GAAGTATGTCTCTTAACCAGTTCACTTATTGTACTCTGGCAATTTAAAAGAAAATCAGTAAAATATTTTGCTTGT
AAAATGCTTAATATNGTGCCTAGGTTATGTGGTGACTATTTGAATCAAAAATGTATTGAATCATCAAATAAAAGA
ATGTGGCTATTTTGGGGAGAAAATTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGGTTTAGGGATAACAGGGTAATGCGGCC

【図５０】

シグナル配列： アミノ酸 1-14

N-グリコシル化部位： アミノ酸 25-29;55-59;254-258

N-ミリストイル化部位： アミノ酸 15-21;117-123;127-133;281-287;282-288;319-325

アミド化部位： アミノ酸 229-233

MSLFGLLLLTSALAGQRQGTQAESNLSSKFQFSSNKEQNGVQDPQHERIITVSTNGSIHSPRFPHTVPRNTVLVW
RLVAVEENVWIQLTFDERFGLEDPEDDICKYDPVEVEEPSDGTILGRWCGSGTVPGKQISKGNQIRIRFVSDEYF
PSEPGFCIHYNIVMPQFTEAVSPSVLPPSALPLDLLNNAITAFSTLEDLIRYLEPERWQLDLEDLYRPTWQLLGK
APVPGRKSRVVDLNLLTEEVRLVSCTPRNFSVSIREELKRTDTIFWPGCLLVKRCGGNCACCLHNCNECQCVPSK
VTKKYHEVLQLRPKTGVRGLHKSLTDVALEHHEECDCVCRGSTGG

【図５１】

GGACGAGGGCAGATCTCGTTCTGGGGCAAGCCGTTGACACTCGCTCCCTGCCACCGCCCGGGCTCCGTGCCGCCA
AGTTTTCATTTTCCACCTTTCTCTGCCTCCAGTCCCCCAGCCCCTGGCCGAGAGAAGGGTCTTACCGGCCGGGATT
GCTGGAAACACCAAGAGGTGGTTTTTGTTTTTTAAAACTTCTGTTTCTTGGGAGGGGGTGTGGCGGGGCAGG**ATG**
AGCAACTCCGTTCCTCTGCTCTGTTTCTGGAGCCTCTGCTATTGCTTTGCTGCGGGGAGCCCCGTACCTTTTGGT
CCAGAGGGACGGCTGGAAGATAAGCTCCACAAACCCAAAGCTACACAGACTGAGGTCAAACCATCTGTGAGGTTT
AACCTCCGCACCTCCAAGGACCCAGAGCATGAAGGATGCTACCTCTCCGTCGGCCACAGCCAGCCCTTAGAAGAC
TGCAGTTTCAACATGACAGCTAAAACCTTTTTCATCATTCACGGATGGACGATGAGCGGTATCTTTGAAAACTGG
CTGCACAAACTCGTGTCAGCCCTGCACACAAGAGAGAAAGACGCCAATGTAGTTGTGGTTGACTGGCTCCCCCTG
GCCCACCAGCTTTACACGGATGCGGTCAATAATACCAGGGTGGTGGGACACAGCATTGCCAGGATGCTCGACTGG
CTGCAGGAGAAGGACGATTTTTCTCTCGGGAATGTCCACTTGATCGGCTACAGCCTCGGAGCGCACGTGGCGGG
TATGCAGGCAACTTCGTGAAAGGAACGGTGGGCCGAATCACAGGTTTGGATCCTGCCGGGCCCATGTTTGAAGGG
GCCGACATCCACAAGAGGCTCTCTCCGGACGATGCAGATTTTGTGGATGTCCTCCACACCTACACGCGTTCCTTC
GGCTTGAGCATTGGTATTCAGATGCCTGTGGGCCACATTGACATCTACCCCAATGGGGGTGACTTCCAGCCAGGC
TGTGGACTCAACGATGTCTTGGGATCAATTGCATATGGAACAATCACAGAGGTGGTAAAATGTGAGCATGAGCGA
GCCGTCCACCTCTTTGTTGACTCTCTGGTGAATCAGGACAAGCCGAGTTTTGCCTTCCAGTCACTGACTCCAAT
CGCTTCAAAAAGGGGATCTGTCTGAGCTGCCGCAAGAACGGTTGTAATAGCATTGGCTACAATGCCAAGAAAATG
AGGAACAAGAGGAACAGCAAAATGTACCTAAAAACCCGGGCAGGCATGCCTTTCAGAGGTAACCTTCAGTCCCTG
GAGTGTCCT**TGA**GGAAGGCCCTTAATACCTCCTTCTTAATACCATGCTGCAGAGCAGGGCACATCCTAGCCCAGG
AGAAGTGGCCAGCACAATCCAATCAAATCGTTGCAAATCAGATTACACTGTGCATGTCCTAGGAAAGGGAATCTT
TACAAAATAAACAGTGTGGACCCCTAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAAAAAAAA

【図５２】

シグナル配列： アミノ酸 1-16

N-グリコシル化部位： アミノ酸 80-84;136-140

cAMP- 及び cGMP-依存性プロテインキナーゼリン酸化部位： アミノ酸 206-210;329-333

N-ミリストイル化部位： アミノ酸 63-69;96-102;171-177;191-197;227-233;251-257;306-312;346-352

リバーゼ、セリン活性部位： アミノ酸 163-173

MSNSVPLLCPWSLCYCFAAGSPVPFGPEGRLEDKLHKPKATQTEVKPSVRFNLRTSKDPEHEGCYLSVGHSQPLE
DCSFNMTAKTFFIIHGWTMSGIFENWLHKLVSALHTREKDANVVVVDWLPLAHQLYTDAVNNTRVVGHSIARMLD
WLQEKDDFSLGNVHLIGYSLGAHVAGYAGNFVKGTVGRITGLDPAGPMFEGADIHKRLSPDDADFVDVLHTYTRS
FGLSIGIQMPVGHIDIYPNGGDFQPGCGLNDVLGSIAYGTITEVVKCEHERAVHLFVDSLVNQDKPSFAFQCTDS
NKFKKGICLSCRKNRCNSIGYNAKKMRNKRNSKMYLKTRAGMPFRGNLQSLECP

【図５３】

CGCGCCGGGCGCAGGGAGCTGAGTGGACGGCTCGAGACGGCGGCGCGTGCAGCAGCTCCAGAAAGCAGCGAGTTG
GCAGAGCAGGGCTGCATTTCCAGCAGGAGCTGCGAGCACAGTGCTGGCTCACAACAAG**ATG**CTCAAGGTGTCAGC
CGTACTGTGTGTGTGTGCAGCCGCTTGGTGCAGTCAGTCTCTCGCAGCTGCCGCGGCGGTGGCTCGACCCGGGGG
GCGGTCGGACGGCGGTAATTTTCTGGATGATAAACAATGGCTCACCACAATCTCTCAGTATGACAAGGAAGTCGG
ACAGTGGAACAAATTCCGAGACGAAGTAGAGGATGATTATTTCCGCACTTGGAGTCCAGGAAAACCCTTCGATCA
GGCTTTAGATCCAGCTAAGGATCCATGCTTAAAGATGAAATGTAGTCGCCATAAAGTATGCATTGCTCAAGATTC
TCAGACTGCAGTCTGCATTAGTCACCGGAGGCTTACACACAGGATGAAAGAAGCAGGAGTAGACCATAGGCAGTG
GAGGGGTCCCATATTATCCACCTGCAAGCAGTGCCCAGTGGTCTATCCCAGCCCTGTTTGTGGTTCAGATGGTCA
TACCTACTCTTTTCAGTGCAAACTAGAATATCAGGCATGTGTCTTAGGAAAACAGATCTCAGTCAAATGTGAAGG
ACATTGCCCATGTCCTTCAGATAAGCCCACCAGTACAAGCAGAAATGTTAAGAGAGCATGCAGTGACCTGGAGTT
CAGGGAAGTGGCAAACAGATTGCGGGACTGGTTCAAGGCCCTCATGAAAGTGGAAGTCAAAACAAGAAGACAAA
AACATTGCTGAGGCCTGAGAGAAGCAGATTCGATACCAGCATCTTGCCAATTTGCAAGGACTCACTTGGCTGGAT
GTTTAACAGACTTGATACAAACTATGACCTGCTATTGGACCAGTCAGAGCTCAGAAGCATTTACCTTGATAAGAA
TGAACAGTGTACCAAGGCATTCTTCAATTCTTGTGACACATACAAGGACAGTTTAATATCTAATAATGAGTGGTG
CTACTGCTTCCAGAGACAGCAAGACCCACCTTGCCAGACTGAGCTCAGCAATATTCAGAAGCGGCAAGGGGTAAA
GAAGCTCCTAGGACAGTATATCCCCCTGTGTGATGAAGATGGTTACTACAAGCCAACACAATGTCATGGCAGTGT
TGGACAGTGCTGGTGTGTTGACAGATATGGAAATGAAGTCATGGGATCCAGAATAAATGGTGTTGCAGATTGTGC
TATAGATTTTGAGATCTCCGGAGATTTTGCTAGTGGCGATTTTCATGAATGGACTGATGATGAGGATGATGAAGA
CGATATTATGAATGATGAAGATGAAATTGAAGATGATGAAGATGAAGGGGATGATGATGATGGTGGTGATGA
CCATGATGTATACATT**TGA**TTGATGACAGTTGAAATCAATAAATTCTACATTTCTAATATTTACAAAAATGATAG
CCTATTTAAAATTATCTTCTTCCCCAATAACAAAATGATTCTAAACCTCACATATATTTTGTATAATTATTTGAA
AAATTGCAGCTAAAGTTATAGAACTTTATGTTAAATAAGAATCATTTGCTTTGAGTTTTTATATTCCTTACACA
AAAAGAAAAATACATATGCAGTCTAGTCAGACAAAATAAAGTTTTGAAGTGCTACTATAATAAATTTTTCACGAGA
ACAAACTTTGTAAATCTTCCATAAGCAAAATGACAGCTAGTTCTGGGATCTGACATGTTAATTTTTTGAAAGAT
AATTCTAAGTGAAATTTAAAATAAATAAATTTTTAATGACCTGGGTCTTAAGGATTTAGGAAAAATATGCATGCT
TTAATTGCATTTCCAAAGTAGCATCTTGCTAGACCTAGATGAGTCAGGATAACAGAGAGATACCACATGACTCCA
AAAAAAAAAAAAAA

【図５４】

シグナル配列： アミノ酸 1-16

cAMP- 及び cGMP-依存性プロテインキナーゼリン酸化部位： アミノ酸 115-119

チロシンキナーゼリン酸化部位： アミノ酸 62-70

N-ミリストイル化部位： アミノ酸 357-363;371-377;376-382

ロイシンジッパーパターン： アミノ酸 246-268

MLKVSAVLCVCAAAWCSQSLAAAAAVAAAGGRSDGGNFLDDKQWLTTISQYDKEVGQWNKFRDEVEDDYPRTWSP
GKPFDQALDPAKDPCLKMKCSRHKVCIAQDSQTAVCISHRRLTHRMKEAGVDHRQNRGPILSTCKQCPVVYPSPV
CGSDGHTYSFQCKLEYQACVLGKQISVKCEGHCPCPSDKPTSTSRNVKRACSDLEFREVANRLRDWPKALHESGS
QNKKTKTLLRPERSRFDTSILPICKDSLGWMFNRLDTNYDLLLDQSELRSIYLDKNEQCTKAFFNSCDTYKDSLI
SNNEWCYCFQRQQDPPCQTELSNIQKRQGVKKLLGQYIPLCDEDGYYKPTQCHGSVGQCWCVDRYGNEVMGSRIN
GVADCAIDFEISGDFASGDPHEWTDDEDDEDDIMNDEDEIEDDDEDEGDDDDGGDDHDVYI

【図５８】

シグナル配列：	アミノ酸 1-46
膜貫通ドメイン：	アミノ酸 31-54
N-グリコシル化部位：	アミノ酸 73-77;159-163
N-ミリストイル化部位：	アミノ酸 18-24;133-139;242-248
C型レクチンドメインシグネチャー：	アミノ酸 264-288
ロイシンジッパーパターン：	アミノ酸 102-124

MDTTRYSKWGGSSEEVPGGPWGRWVHWSRRPLFLALAVLVTTVLWAVILSILLSKASTERAALLDGHDLLRTNAS
KQTAALGALKEEVGDCHSCCSGTQAQLQTTRAELGEAQAKLMEQESALRELRERVTQGLAEAGRGREDVRTELFR
ALEAVRLQNNSCEPCPTSWLSFEGSCYFFSVPKTTWAAAQDHCADASAHLVIVGGLDEQGFLTRNTRGRGYWLGL
RAVRHLGKVQGYQWVDGVSLSFSHWNQGEPNDAWGRENCVMMLHTGLWNDAPCDSEKDGWICEKRHNC

【図５９】

GTCGAATCCAAATCACTCATTGTGAAAGCTGAGCTCACAGCCGAATAAGCCACC<u>ATG</u>AGGCTGTCAGTGTGTCTC
CTGATGGTCTCGCTGGCCCTTTGCTGCTACCAGGCCCATGCTCTTGTCTGCCCAGCTGTTGCTTCTGAGATCACA
GTCTTCTTATTCTTAAGTGACGCTGCGGTAAACCTCCAAGTTGCCAAACTTAATCCACCTCCAGAAGCTCTTGCA
GCCAAGTTGGAAGTGAAGCACTGCACCGATCAGATATCTTTTAAGAAACGACTCTCATTGAAAAAGTCCTGGTGGAA
A<u>TAG</u>TGAAAAAATGTGGTGTGTGACATGTAAAAATGCTCAACCTGGTTTCCAAAGTCTTTCAACGACACCCTGAT
CTTCACTAAAAATTGTAAAGGTTTCAACACGTTGCTTTAATAAATCACTTGCCCTGC

【図６０】

シグナル配列：	アミノ酸 1-15
cAMP- 及び cGMP-依存性プロテインキナーゼリン酸化部位：	アミノ酸 73-77

MRLSVCLLMVSLALCCYQAHALVCPAVASEITVFLFLSDAAVNLQVAKLNPPPEALAAKLEVKHCTDQISFKKRL
SLKKSWWK

【図６１】

GCGAGGTGGCGATCGCTGAGAGGCAGGAGGGCCGAGGCGGGCCTGGGAGGCGGCCCGGAGGTGGGGCGCCGCTGG
GGCCGGCCCGCACGGGCTTCATCTGAGGGCGCACGGCCCGCGACCGAGCGTGCGGACTGGCCTCCCAAGCGTGGG
GCGACAAGCTGCCGGAGCTGC<u>AATG</u>GGCCGCGGCTGGGGATTCTTGTTTGGCCTCCTGGGCGCCGTGTGGCTGCT
CAGCTCGGGCCACGGAGAGGAGCAGCCCCCGGAGACAGCGGCACAGAGGTGCTTCTGCCAGGTTAGTGGTTACTT
GGATGATTGTACCTGTGATGTTGAAACCATTGATAGATTTAATAACTACAGGCTTTTCCCAAGACTACAAAAACT
TCTTGAAAGTGACTACTTTAGGTATTACAAGGTAAACCTGAAGAGGCCGTGTCCTTTCTGGAATGACATCAGCCA
GTGTGGAAGAAGGGACTGTGCTGTCAAACCATGTCAATCTGATGAAGTTCCTGATGGAATTAAATCTGCGAGCTA
CAAGTATTCTGAAGAAGCCAATAATCTCATTGAAGAATGTGAACAAGCTGAACGACTTGGAGCAGTGGATGAATC
TCTGAGTGAGGAAACACAGAAGGCTGTTCTTCAGTGGACCAAGCATGATGATTCTTCAGATAACTTCTGTGAAGC
TGATGACATTCAGTCCCCTGAAGCTGAATATGTAGATTTGCTTCTTAATCCTGAGCGCTACACTGGTTACAAGGG
ACCAGATGCTTGGAAAAATATGGAATGTCATCTACGAAGAAAACTGTTTTAAGCCACAGACAATTAAAAGACCTTT
AAATCCTTTGGCTTCTGGTCAAGGGACAAGTGAAGAGAACACTTTTACAGTTGGCTAGAAGGTCTCTGTGTAGA
AAAAAGAGCATTCTACAGACTTATATCTGGCCTACATGCAAGCATTAATGTGCATTTGAGTGCAAGATATCTTTT
ACAAGAGACCTGGTTAGAAAAGAAATGGGGACACACATTACAGAATTTCAAACAGCGATTTGATGGAATTTTGAC
TGAAGGAGAAGGTCCAAGAAGGCTTAAGAACTTGTATTTTCTCTACTTAATAGAACTAAGGGCTTTATCCAAAGT
GTTACCATTCTTCGAGCGCCCAGATTTTCAACTCTTTACTGGAAATAAAATTCAGGATGAGGAAAACAAAATGTT
ACTTCTGGAAATACTTCATGAAATCAAGTCATTTCCTTTGCATTTTGATGAGAATTCATTTTTTGCTGGGGATAA
AAAAGAAGCACACAAACTAAAGGAGGACTTTCGACTGCATTTTAGAAATATTTCAAGAATTATGGATTGTTTAGTA
TTGTTTTAAATGTCGTCTGTGGGGAAAGCTTCAGACTCAGGGTTTGGGCACTGCTCTGAAGATCTTATTTTCTGA
GAAATTGATAGCAAATATGCCAGAAAGTGGACCTAGTTATGAATTCCATCTAACCAGACAAGAAATAGTATCATT
ATTCAACGCATTTGGAAGAATTTCTACAAGTGTGAAAGAATTAGAAAACTTCAGGAACTTGTTACAGAATATTCA
T<u>TAA</u>AGAAAACAAGCTGATATGTGCCTGTTTCTGGACAATGGAGGCGAAAGAGTGGAATTTCATTCAAAGGCATA
ATAGCAATGACAGTCTTAAGCCAAACATTTTATATAAAGTTGCTTTTGTAAAGGAGAATTATATTGTTTTAAGTA
AACACATTTTTAAAAATTGTGTTAAGTCTATGTATAATACTACTGTGAGTAAAAGTAATACTTTAATAATGTGGT
ACAAATTTTAAAGTTTAATATTGAATAAAAGGAGGATTATCAAATTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAAAAAAAA

【図６２】

シグナル配列：	アミノ酸 1-23
N-グリコシル化部位：	アミノ酸 280-284;384-388
アミド化部位：	アミノ酸 94-98
グリコサミノグリカン接着部位：	アミノ酸 20-24;223-227
アミノトランスフェラーゼ クラス-V ピリドキサルリン酸部位：	アミノ酸 216-223
インターロイキン 7タンパク質部位：	アミノ酸 338-344

MGRGWGFLFGLLGAVWLLSSGHSEEQPPETAAQRCFCQVSGYLDDCTCDVETIDRFNNYRLFPRLQKLLESDYFR
YYKVNLKRPCPFWNDISQCGRECAVKPCQSDEVPDGIKSASYKYSEEANNLIEECEQAERLGAVDESLSEETQK
AVLQWTKHDDSSDNFCEADDICSPEAEYVDLLLNPERYTGYKGPDAWKIWNVIYEENCFKPQTIKRPLNPLASGQ
GTSEENTFYSWLEGLCVEKRAFRLISGLHASINVHLSARYLLQETWLEKKWGHNITEFQQRFDGILTEGEGPRR
LKNLYFLYLIELRALSKVLPFFERPDPQLFTGNKIQDEENKMLLLEILHEIKSFPLHFDENSFFAGDKKEAHKLK
EDFRLHFRNISRIMDCVGCFKCRLWGKLQTQGLGTALKILFSEKLIANMPESGPSYEFHLTRQEIVSLFNAFGRI
STSVKELENFRNLLQNIH

【図６３】

GAGAGGACGAGGTGCCGCTGCCTGGAGAATCCTCCGCTGCCGTCGGCTCCCGGAGCCCAGCCCTTTCCTAACCCA
ACCCAACCTAGCCCAGTCCCAGCCGCCAGCGCCTGTCCCTGTCACGGACCCCAGCGTTACC<u>ATG</u>CATCCTGCCGT
CTTCCTATCCTTACCCGACCTCAGATGCTCCCTTCTGCTCCTGGTAACTTGGGTTTTTACTCCTGTAACAACTGA
AATAACAAGTCTTGCTACAGAGAATATAGATGAAATTTTAAACAATGCTGATGTTGCTTTAGTAAATTTTTATGC
TGACTGGTGTCGTTTCAGTCAGATGTTGCATCCAATTTTTGAGGAAGCTTCCGATGTCATTAAGGAAGAATTTCC
AAATGAAAATCAAGTAGTGTTTGCCAGAGTTGATTGTGATCAGCACTCTGACATAGCCCAGAGATACAGGATAAG
CAAATACCCAACCCTCAAATTGTTTCGTAATGGGATGATGATGAAGAGAGAATACAGGGGTCAGCGATCAGTGAA
AGCATTGGCAGATTACATCAGGCAACAAAAAAGTGACCCCCATTCAAGAAATTCGGGACTTAGCAGAAATCACCAC
TCTTGATCGCAGCAAAAGAAATATCATTGGATATTTTGAGCAAAAGGACTCGGACAACTATAGAGTTTTTGAACG
AGTAGCGAATATTTTGCATGATGACTGTGCCTTTCTTTCTGCATTTGGGGATGTTTCAAAACCGGAAAGATATAG
TGGCGACAACATAATCTACAAACCACCAGGGCATTCTGCTCCGGATATGGTGTACTTGGGAGCTATGACAAATTT
TGATGTGACTTACAATTGGATTCAAGATAAAATGTGTTCCTCTTGCATTGGGGATGTTTCAAAACCGGAAAGATATAG
ATTGACAGAAGAAGGACTGCTTTTCTCATACTCTTTCACATGAAAGAAGATACAGAAAGTTTAGAAATATTCCA
GAATGAAGTAGCTCGGCAATTAATAAGTGAAAAAGGTACAATAAACTTTTTACATGCCGATTGTGACAAATTTAG
ACATCCTCTTCTGCACATACAGAAAACTCCAGCAGATTGTCCTGTAATCGCTATTGACAGCTTTAGGCATATGTA
TGTGTTTGGAGACTTCAAAGATGTATTAATTCCTGGAAAACTCAAGCAATTCGTATTTGACTTACATTCTGGAAA
ACTGCACAGAGAATTCCATCATGGACCTGACCCAACTGATACAGCCCCAGGAGAGCAAGCCCAAGATGTAGCAAG
CAGTCCACCTGAGAGCTCCTTCCAGAAACTAGCACCCAGTGAATATAGGTATACTCTATTGAGGGATCGAGATGAGCT
T<u>TAA</u>AAACTTGAAAAACAGTTTGTAAGCCTTCAACAGCAGCATCAACCTACGTGGTGGAAATAGTAAACCTATA
TTTTCATAATTCTATGTGTATTTTATTTTGAATAAACAGAAAGAAATTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

【図６４】

シグナル配列：	アミノ酸 1-29
チロシンキナーゼリン酸化部位：	アミノ酸 203-212
N-ミリストイル化部位：	アミノ酸 225-231
小胞体標的化配列：	アミノ酸 403-408

MHPAVFLSLPDLRCSLLLLVTWVPTPVTTEITSLATENIDEILNNADVALVNFYADWCRFSQMLHPIFEEASDVI
KEEFPNENQVVFARVDCDQHSDIAQRYRISKYPTLKLFRNGMMMKREYRGQRSVKALADYIRQQKSDPIQEIRDL
AEITTLDRSKRNIIGYFEQKDSDNYRVFERVANILHDDCAFLSAFGDVSKPERYSGDNIIYKPPGHSAPDMVYLG
AMTNFDVTYNWIQDKCVPLVREITFENGEELTEEGLPFLILFHMKEDTESLEIFQNEVARQLISEKGTINFLHAD
CDKFRHPLLHIQKTPADCPVIAIDSFRHMYVFGDFKDVLIPGKLKQFVFDLHSGKLHREFHHGPDPTDTAPGEQA
QDVASSPPESSFQKLAPSEYRYTLLRDRDEL

【図６５】

GAGGATTTGCCACAGCAGCGGATAGAGCAGGAGAGCACCACCGGAGCCCTTGAGACATCCTTGAGAAGAGCCACA
GCATAAGAGACTGCCCTGCTTGGTGTTTTGCAGG<u>ATG</u>ATGGTGGCCCTTCGAGGAGCTTCTGCATTGCTGGTTCT
GTTCCTTGCAGCTTTTCTGCCCCCGCCGCAGTGTACCCAGGACCCAGCCATGGTGCATTACATCTACCAGCGCTT
TCGAGTCTTGGAGCAAGGGCTGGAAAAATGTACCCAAGCAACGAGGGCATACATTCAAGAATTCCAAGAGTTCTC
AAAAAATATATCTGTCATGCTGGGAAGATGTCAGACCTACACAAGTGAGTACAAGAGTGCAGTGGGTAACTTGGC
ACTGAGAGTTGAACGTGCCCAACGGGAGATTGACTACATACAATACCTTCGAGAGGCTGACGAGTGCATCGTATC
AGAGGACAAGACACTGGCAGAAATGTTGCTCCAAGAAGCTGAAGAAAGAGAAAAAGATCCGGACTCTGCTGAATGC
AAGCTGTGACAACATGCTGATGGGCATAAAGTCTTTGAAAATAGTGAAGAAGATGATGGACACACATGGCTCTTG
GATGAAAGATGCTGTCTATAACTCTCCAAAGGTGTACTTATTAATTGGATCCAGAAACAACACTGTTTGGGAATT
TGCAAACATACGGGCATTCATGGAGGATAACACCAAGCCAGCTCCCCGGAAGCAAATCCTAACACTTTCCTGGCA
GGGAACAGGCCAAGTGATCTACAAAGGTTTTCTATTTTTTCATAACAAGCAACTTCTAATGAGATAATCAAATA
TAACCTGCAGAAGAGGACTGTGGAAGATCGAATGCTGCTCCCAGGAGGGGTAGGCCGAGCATTGGTTTACCAGCA
CTCCCCCTCAACTTACATTGACCTGGCTGTGGATGAGCATGGGCTCTGGGCCATCCACTCTGGGCCAGGCACCCA
TAGCCATTTGGTTCTCACAAAGATTGAGCCGGGCACACTGGGAGTGGAGCATTCATGGGATACCCCATGCAGAAG
CCAGGATGCTGAAGCCTCATTCCTCTTGTGTGGGGTTCTCTATGTGGTCTACAGTACTGGGGGCCAGGGCCCTCA
TCGCATCACCTGCATCTATGATCCACTGGGCACTATCAGTGAGGAGGACTTGCCCAACTTGTTCTTCCCCAAGAG
ACCAAGAAGTCACTCCATGATCCATTACAACCCCAGAGATAAGCAGCTCTATGCCTGGAATGAAGGAAACCAGAT
CATTTACAAACTCCAGACAAAGAGAAAGCTGCCTCTGAA<u>TAA</u>TGCATTACAGCTGTGAGAAAGAGCACTGTGGC
TTTGGCAGCTGTTCTACAGGACAGTGAGGCTATAGCCCCTTCACAATATAGTATCCCTCTAATCACACACAGGAA
GAGTGTGTAGAAGTGGAAATACGTATGCCTCCTTTCCCAAATGTCACTGCCTTAGGTATCTTCCAAGAGCTTAGA
TGAGAGCATATCATCAGGAAAGTTTCAACAATGTCCATTACTCCCCCAAACCTCCTGGCTCTCAAGGATGACCAC
ATTCTGATACAGCCTACTTCAAGCCTTTTGTTTTACTGCTCCCCAGCATTTACTGTAACTCTGCCATCTTCCCTC
CCACAATTAGAGTTGTATGCCAGCCCCTAATATTCACCACTGGCTTTTCTCTCCCCTGGCCTTTGCTGAAGCTCT
TCCCTCTTTTTCAAATGTCTATTGATATTCTCCCATTTTCACTGCCCAACTAAAATACTATTAATATTTCTTTCT
TTTCTTTTCTTTTTTTTTGAGACAAGGTCTCACTATGTTGCCCAGGCTGGTCTCAAACTCCAGAGCTCAAGAGATC
CTCCTGCCTCAGCCTCCTAAGTACCTGGGATTACAGGCATGTGCCACCACACCTGGCTTAAAATACTATTTCTTA
TTGAGGTTTAACCTCTATTTCCCCTAGCCCTGTCCTTCCACTAAGCTTGGTAGATGTAATAATAAAGTGAAAATA
TTAACATTTGAAATATCGCTTTCCAGGTGTGGAGTGTTTGCACATCATTGAATTCTCGTTTCACCTTTGTGAAACA
TGCACAAGTCTTTACAGCTGTCATTCTAGAGTTTAGGTGAGTAACACAATTACAAAGTGAAAGATACAGCTAGAA
AATACTACAAATCCCATAGTTTTCCATTGCCCAAGGAAGCATCAAATACGTATGTTTGTTCACCTACTCTTATA
GTCAATGCGTTCATCGTTTCAGCCTAAAAATAATAGTCTGTCCCTTTAGCCAGTTTTCATGTCTGCACAAGACCT
TTCAATAGGCCTTTCAAATGATAATTCCTCCAGAAAACCAGTCTAAGGGTGAGGACCCCAACTCTAGCCTCCTCT
TGTCTTGCTGTCCTCTGTTTCTTCTTTCTGCTTTAAATTCAATAAAAGTGACACTGAGCAAAAAAAAAAAAAAA

【図６６】

シグナルペプチド：	アミノ酸 1-25
N-グリコシル化部位：	アミノ酸 66-70;138-142;183-187

MMVALRGASALLVLFLAAFLPPPQCTQDPAMVHYIYQRFRVLEQGLEKCTQATRAYIQEFQEPSKNISVMLGRCQ
TYTSEYKSAVGNLALRVERAQREIDYIQYLREADECIVSEDKTLAEMLLQEAEEEKKIRTLLNASCDNMLMGIKS
LKIVKKMDTHGSWMKDAVYNSPKVYLLIGSRNNTVWEFANIRAFMEDNTKPAPRKQILTLSWQGTGQVIYKGFL
FFHNQATSNEIIKYNLQKRTVEDRMLLPGGVGRALVYQHSPSTYIDLAVDEHGLWAIHSGPGTHSHLVLTKIEPG
TLGVEHSWDTPCRSQDAEASFLLCGVLYVVYSTGQGPHRITCIYDPLGTISEEDLPNLFFPKRPRSHSMIHYNP
RDKQLYAWNEGNQIIYKLQTKRKLPLK

【図６７】

GTTGATGGCAAACTTCCTCAAAGGAGGGGCAGAGCCTGCGCAGGGCAGGAGCAGCTGGCCCACTGGCGGCCCGCA
ACACTCCGTCTCACCCCTCTGGGCCCACTGCATCTAGAGGAGGGCCGTCTGTGAGGCCACTACCCCTCCAGCAACT
GGGAGGTGGGACTGTCAGAAGCTGGCCCAGGGTGGTGGTCAGCTGGGTCAGGGACCTACGGCACCTGCTGGACCA
CCTCGCCTTCTCCATCGAAGCAGGGAAGTGGGAGCCTCGAGCCCTCGGGTGGAAGCTGACCCCAAGCCACCCTTC
ACCTGGACAGGATGAGAGTGTCAGGTGTGCTTCGCCTCCTGGCCCTCATCTTTGCCATAGTCACGACATGGATGT
TTATTCGAAGCTACATGAGCTTCAGCATGAAAACCATCCGTCTGCCACGCTGGCTGGCAGCCTCGCCCACCAAGG
AGATCCAGGTTAAAAAGTACAAGTGTGGCCTCATCAAGCCCTGCCCAGCCAACTACTTTGCGTTTAAAATCTGCA
GTGGGGCCGCCAACGTCGTGGGCCCTACTATGTGCTTTGAAGACCGCATGATCATGAGTCCTGTGAAAAACAATG
TGGGCAGAGGCCTAAACATCGCCCTGGTGAATGGAACCACGGGAGCTGTGCTGGGACAGAAGGCATTTGACATGT
ACTCTGGAGATGTTATGCACCTAGTGAAATTCCTTAAAGAAATTCCGGGGGGTGCACTGGTGCTGGTGGCCTCCT
ACGACGATCCAGGGACCAAAATGAACGATGAAAGCAGGAAACTCTTCTCTGACTTGGGGAGTTCCTACGCAAAAC
AACTGGGCTTCCGGGACAGCTGGGTCTTCATAGGAGCCAAAGACCTCAGGGGTAAAAGCCCCTTTGAGCAGTTCT
TAAAGAACAGCCCAGACACAAACAAATACGAGGGATGGCCAGAGCTGCTGGAGATGGAGGGCTGCATGCCCCGA
AGCCATTTTAGGGTGGCTGTGGCTCTTCCTCAGCCAGGGGCCTGAAGAAGCTCCTGCCTGACTTAGGAGTCAGAG
CCCGGCAGGGGCTGAGGAGGAGGAGCAGGGGGTGCTGCGTGGAAGGTGCTGCAGGTCCTTGCACGCTGTGTCGCG
CCTCTCCTCCTCGGAAACAGAACCCTCCCACAGCACATCCTACCCGGAAGACCAGCCTCAGAGGGTCCTTCTGGA
ACCAGCTGTCTGTGGAGAGAATGGGGTGCTTTCGTCAGGGACTGCTGAGGCTGGTCCTGAGGAAGGACAAACTG
CCCAGACTTGAGCCCAATTAAATTTTATTTTTGCTGGTTTTGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

【図６８】

シグナルペプチド： アミノ酸 1-15

ATP/GTP-結合部位モチーフＡ（p-loop） アミノ酸 184-192

N-グリコシル化部位： アミノ酸 107-111

MRVSGVLRLLALIFAIVTTWMFIRSYMSFSMKTIRLPRWLAASPTKEIQVKKYKCGLIKPCPANYFAFKICSGAA
NVVGPTMCFEDRMIMSPVKNNVGRGLNIALVNGTTGAVLSQKAFDMYSGDVMHLVKFLKEIPGGALVLVASYDDP
GTKMNDESRKLFSDLGSSYAKQLGFRDSWVFIGAKDLRGKSPFEQFLKNSPDTNKYEGWPELLEMEGCMPPKPF

【図６９】

GGGGGAGCTAGGCCGGCGGCAGTGGTGGTGGCGGCGGCGCAAGGGTGAGGGCGGCCCCAGAACCCCAGGTAGGTA
GAGCAAGAAGATGGTGTTTCTGCCCCTCAAATGGTCCCTTGCAACCATGTCATTTCTACTTTCCTCAGCAACT
TCTCTTAACTGTGTCCACTCCTTCATGGTGTCAGAGCACTGAAGCATCTCCAAAACGTAGTGATGGGACACCATT
TCCTTGGAATAAAATACGACTTCCTGAGTACGTCATCCCAGTTCATTATGATCTCTTGATCCATGCAAACCTTAC
CACGCTGACCTTCTGGGGAACCACGAAAGTAGAAATCACAGCCAGTCAGCCCACCAGCACCATCATCCTGCATAG
TCACCACCTGCAGATATCTAGGGCCACCCTCAGGAAGGGAGCTGGAGAGAGGCTATCGGAAGAACCCCTGCAGGT
CCTGGAACACCCCCCTCAGGAGCAAATTGCACTGCTGGCTCCCGAGCCCCTCCTTGTCGGGCTCCCGTACACAGT
TGTCATTCACTATGCTGGCAATCTTTCGGAGACTTTCCACGGATTTTACAAAAGCACCTACAGAACCAAGGAAGG
GGAACTGAGGATACTAGCATCAACACAATTTGAACCCACTGCAGCTAGAATGGCCTTTCCCTGCTTTGATGAACC
TGCCTTCAAAGCAAGTTTCTCAATCAAAATTAGAAGAGAGCCAAGGCACCTAGCCATCTCCAATATGCCATTGGT
GAAATCTGTGACTGTTGCTGAAGGACTCATAGAAGACCATTTTGATGTCACTGTGAAGATGAGCACCTATCTGGT
GGCCTTCATCATTTCAGATTTTGAGTCTGTCAGCAAGATAACCAAGAGTGGAGTCAAGGTTTCTGTTTATGCTGT
GCCAGACAAGATAAATCAAGCAGATTATGCACTGGATGCTGCGGTGACTCTTCTAGAATTTTATGAGGATTATTT
CAGCATACCGTATCCCCTACCCAAACAAGATCTTGCTGCTATTCCCGACTTTCAGTCTGGTGCTATGGAAAACTG
GGGACTGACAACATATAGAGAATCTGCTCTGTTGTTTGATGCAGAAAAGTCTTCTGCATCAAGTAAGCTTGGCAT
CACAGTGACTGTGGCCCATGAACTGGCCCACCAGTGGTTTGGGAACCTGGTCACTATGGAATGGTGGAATGATCT
TTGGCTAAATGAAGGATTTGCCAAATTTATGGAGTTTGTGTCTGTCAGTGTGACCCATCCTGAACTGAAAGTTGG
AGATTATTTCTTTGGCAAATGTTTTGACGCAATGGAGGTAGATGCTTAAATTCCTCACACCCTGTGTCTACACC
TGTGGAAAATCCTGCTCAGATCCGGGAGATGTTTGATGATGTTTCTTATGATAAGGGAGCTTGTATTCTGAATAT
GCTAAGGGAGTATCTTAGCGCTGACGCATTTAAAAGTGGTATTGTACAGTATCTCCAGAAGCATAGCTATAAAAA
TACAAAAAACGAGGACCTGTGGGATAGTATGGCAAGTATTTGCCCTACAGATGGTGTAAAAGGGATGGATGGCTT
TTGCTCTAGAAGTCAACATTCATCTTCATCCTCACATTGGCATCAGGAAGGGGTGGATGTGAAAACCATGATGAA
CACTTGGACACTGCAGAGGGGTTTTCCCCTAATAACCATCACAGTGAGGGGGAGGAATGTACACATGAAGCAAGA
GCACTACATGAAGGGCTCTGACGGCGCCCCGGACACTGGGTACCTGTGGCATGTTCCATTGACATTCATCACCAG
CAAATCCAACATGGTCCATCGATTTTGCTAAAAACAAAAACAGATGTGCTCATCCTCCCAGAAGAGGTGGAATG
GATCAAATTTAATGTGGGCATGAATGGCTATTACATTGTGCATTACGAGGATGATGGATGGGACTCTTTGACTGG
CCTTTTAAAAGGAACACACACAGCAGTCAGCAGTAATGATCGGGCAAGTCTCATTAACAATGCATTTCAGCTCGT
CAGCATTGGGAAGCTGTCCATTGAAAGGCCTTGGATTTATCCCTGTACTTGAAACATGAAACTGAAATTATGCC
CGTGTTTCAAGGTTTGAATGAGCTGATTCCTATGTATAAGTTAATGGAGAAAAGAGATATGAATGAAGTGGAAAC
TCAATTCAAGGCCTTCCTCATCAGGCTGCTAAGGGACCTCATTGATAAGCAGACATGGACAGACGAGGGCTCAGT
CTCAGAGCAAATGCTGCGGAGTGAACTACTACTCCTCGCCTGTGTGCACAACTATCAGCCGTGCGTACAGAGGGC
AGAAGGCTATTTCAGAAAGTGGAAGGAATCCAATGGAAACTTGAGCCTGCCTGTCGACGTGACCTTGGCAGTGTT
TGCTGTGGGGGCCCAGAGCACAGAAGGCTGGGATTTTCTTTATAGTAAATATCAGTTTTCTTTGTCCAGTACTGA
GAAAAGCCAAATTGAATTTGCCCTCTGCAGAACCCAAAATAAGGAAAAGTTCAATGGCTACTAGATGAAAGCTT
TAAGGGAGATAAAATAAAAACTCAGGAGTTTCCACAAATTCTTACACTCATTGGCAGGAACCCAGTAGGATACCC
ACTGGCCTGGCAATTTCTGAGGGAAAACTGGAACAAACTTGTACAAAAGTTTGAACTTGGCTCATCTTCCATAGC
CCACATGGTAATGGGTACAACAAATCAATTCTCCACAAGAACACGGCTTGAAGAGGTAAAAGGATTCTTCAGCTC
TTTGAAAGAAAATGGTTCTCAGCTCCGTTGTGTCCAACAGACAATTGAAACCATTGAAGAAAACATCGGTTGGAT
GGATAAGAATTTTGATAAAATCAGAGTGTGGCTGCAAAGTGAAAAGCTTGAACGTATGTAAAAATTCCTCCTTG
CCCGGTTCCTGTTATCTCTAATCACCAACATTTTGTTGAGTGTATTTTCAAACTAGAGATGGCTGTTTTGGCTCC
AACTGGAGATACTTTTTTCCCTCAACTCATTTTTTGACTATCCCTGTGAAAGAATAGCTGTTAGTTTTTCATG
AATGGGCTTTTCATGAATGGGCTATCGCTACCATGTGTTTTGTTCATCACAGGTGTTCCCCTGCAACGTAAACC
CAAGTGTTGGGTTCCCTGCCACAGAAGAATAAAGTACCTTATTCTTCTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
A

【図７０】

シグナルペプチド： アミノ酸 1-34

N-グリコシル化部位： アミノ酸 70-74;154-158;414-418;
760-764;901-905

中性亜鉛メタロペプチダーゼ、亜鉛-結合領域シグネーチャー：
アミノ酸 350-360

MVFLPLKWSLATMSFLLSSLLALLTVSTPSWCQSTEASPKRSDGTPFPWNKIRLPEYVIPVHYDLLIHANLTTLT
FWGTTKVEITASQPTSTIILHSHHLQISRATLRKGAGERLSEEPLQVLEHPPQEQIALLAPEPLLVGLPYTVVIH
YAGNLSETFHGFYKSTYRTKEGELRILASTQFEPTAARMAFPCFDEPAFKASFSIKIRREPRHLAISNMPLVKSV
TVAEGLIEDHFDVTVKMSTYLVAFIISDFESVSKITKSGVKVSVYAVPDKINQADYALDAAVTLLEFYEDYFSIP
YPLPKQDLAAIPDFQSGAMENWGLTTYRESALLFDAEKSSASSKLGITVTVAHELAHQWFGNLVTMEWWNDLWLN
EGFAKFMEFVSVSVTHPELKVGDYFFGKCFDAMEVDALNSSHPVSTPVENPAQIREMFDDVSYDKGACILNMLRE
YLSADAFKSGIVQYLQKHSYKNTKNEDLWDSMASICPTDGVKGMDGFCSRSQHSSSSSHWHQEGVDVKTMMNTWT
LQRGFPLITITVRGRNVHMKQEHYMKGSDGAPDTGYLWHVPLTFITSKSNMVHRFLLKTKTDVLILPEEVEWIKF
NVGMNGYYIVHYEDDGWDSLTGLLKGTHTAVSSNDRASLINNAFQLVSIGKLSIEKALDLSLYLKHETEIMPVFQ
GLNELIPMYKLMERKRDMNEVETQFKAFLIRLLRDLIDKQTWTDEGSVSEQMLRSELLLLACVHNVYQPCVQRAEGY
FRKWKESNGNLSLPVDVTLAVFAVGAQSTEGWDFLYSKYQFSLSSTEKSQIEFALCRTQNKEKLQWLLDESFKGD
KIKTQEFPQILTLIGRNPVGYPLAWQFLRKNWNKLVQKFELGSSSIAHMVMGTTNQFSTRTRLEEVKGFFSSLKE
NGSQLRCVQQTIETIEENIGWMDKNFDKIRVWLQSEKLERM

【図７１】

GAGCGAACATGCAGCGCGTTGGCGGTTTTGGTGTGTCTCTGTGACCATGGTGGTGGCGCTGCTCATCGTTTGCG
ACGTTCCCTCAGCCTCTGCCCAAAGAAAGAAGGAGATGGTGTTATCTGAAAAGGTTAGTCAGCTGATGGAATGGA
CTAACAAAGACCTGTAATAAGAATGAATGGAGACAAGTTCCGTCGCCTTGTGAAAGCCCCACCGAGAAATTACT
CCGTTATCGTCATGTTCACTGCTCTCCAACTGCATAGACAGTGTGTCGTTTGCAAGCAAGCTGATGAAGAATTCC
AGATCCTGGCAAACTCCTGGCGATACTCCAGTGCATTCACCAACAGGATATTTTTTGCCATGGTGGATTTTGATG
AAGGCTCTGATGTATTTCAGATGCTAAACATGAATTCAGCTCCAACTTTCCTGCAAAGGGAAAC
CCAAACGGGGTGATACATATGAGTTACAGGTGCGGGGTTTTCAGCTGAGCAGATTGCCCGGTGGATCGCCGACA
GAACTGATGTCAATATTAGAGTGATTAGACCCCCAAATTATGCTGGTCCCTTATGTGGGATTGCTTTTGGCTG
TTATTGGTGGACTTGTGTATCTTCGAAGAAGTAATATGGAATTTCTCTTTAATAAAACTGGATGGGCTTTTGCAG
CTTTGTGTTTTGTGCTTGCTATGACATCTGGTCAAATGTGGAACCATATAAGAGGACCACCATATGCCCATAAGA
ATCCCCACACGGGACATGTGAATTATATCCATGGAAGCAGTCAAGCCCAGTTGTGAGCTGAAACACACATTGTTC
TTCTGTTTAATGGTGGAGTTACCTTAGGAATGGTGCTTTTATGTGAAGCTGCTACCTCTGACATGGATATTGGAA
AGCGAAAGATAATGTGTGTGGCTGGTATTGGACTTGTTGTATTATTCTTCAGTTGGATGCTCTCTAATTTTAGTACA
CTAAATATCATGGCTACCCATACAGCTTTCTGATGAGTTAAAAGGTCCCAGAGATATATAGACACTGGAGTACT
GGAAATTGAAAACGAAAATCGTGTGTGTTTGAAAAGAGAAATGCAACTTGTATATTTTGTATTACCTCTTTTTT
TCAAGTGATTTAAATAGTTAATCATTTAACCAAAGAAGATGTGTAGTGCCTTAACAAGCAATCCTCTGTCAAAAT
CTGAGGTATTTGAAAATAATTATCCTCTTAACCTTCTCTCCCAGTGAACTTTATGGAACATTTAATTTAGTACA
ATTAAGTATATATAAAAATTGTAAAACTACTACTTTGTTTTAGTTAGAACAAAGCTCAAAACTACTTTAGTTAA
CTTGGTCATCTGATTTTATATTGCCTTATCCAAGATGGGCAAAGTAAGTCCTGACCAGGTGTTCCCACATATGC
CTGTTACAGATAACTACATTAGGAATTCATTCTTAGCTTCTTTCATCTTTGTGTGGATGTGTATACTTTACGCATC
TTTCCTTTTGAGTAGAGAAATTATGTGTGTCATGTGGTCTTCTGAAAATGGAACACCATTCTTCAGAGCACACGT
CTAGCCCTCAGCAAGACAGTTGTTTCTCCTCCTCCTTGCATATTTCCTACTGCGCTCCAGCCTGAGTGATAGAGT
GAGACTCTGTCTCAAAAAAAAGTATCTCTAAATACAGGATTATAATTTCTGCTTGAGTATGGTGTTAACTACCTT
GTATTTAGAAGATTTCAGATTCATTCCATCTCCTTAGTTTTCTTTTAAGGTGACCCATCTGTGATAAAAATATA
GCTTAGTGCTAAAATCAGTGTAACTTATACATGGCCTAAAATGTTTCTACAAATTAGAGTTTGTCACTTATTCCA
TTTGTACCTAAGAGAAAAATAGGCTCAGTTAGAAAAGGACTCCCTGGCCAGGCGCAGTGACTTACGCCTGTAATC
TCAGCACTTTGGGAGGCCAAGGCAGGCAGATCACGAGGTCAGGAGTTCGAGACCATCCTGGCCAACATGGTGAAA
CCCCGTCTCTACTAAAAATATAAAAAATTAGCTGGGTGTGGTGGCAGGAGCCTGTAATCCCAGCTACACAGGAGGC
TGAGGCACGAGAATCACTTGAACTCAGGAGATGGAGGTTTCAGTGAGCCGAGATCACGCCACTGCACTCCAGCCT
GGCAACAGAGCGAGACTCCATCTCAAAAAAAAAAAAAA

【図７２】

シグナルペプチド： Amino acids 1-29

膜貫通ドメイン： アミノ酸 183-205;217-237;
217-287;301-321

N-グリコシル化部位： アミノ酸 71-75;215-219

細胞接着配列： アミノ酸 150-153

MAARWRFWCVSVTMVVALLIVCDVPSASAQRKKEMVLSEKVSQLMEWTNKRPVIRMNGDKFRRLVKAPPRNYSVI
VMFTALQLHRQCVVCKQADEEFQILANSWRYSSAFTNRIFFPAMVDFDEGSDVFQMLNMNSAPTFINFPAKGKPKR
GDTYELQVRGFSAEQIARWIADRTDVNIRVIRPPNYAGPLMLGLLLAVIGGLVYLRRSNMEFLFNKTGWAFAALC
FVLAMISGQMWNHIRGPPYAHKNPHTGHVNYIHGSSQAQFVAETHIVLLFNGGVTLGMVLLCEAATSDMDIGKRK
IMCVAGIGLVVLFFSWMLSIFRSKYHGYPYSPLMS

【図７３】

AAGCAACCAAACTGCAAGCTTTGGGAGTTGTTCGCTGTCCCTGCCCTGCTCTGCTAGGGAGAGAACGCCAGAGGG
AGGCGGCTGGCCCGGCGGCAGGCTCTCAGAACCGCTACCGGCGATGCTACTGCTGGGTGTCGGTGGTCGCAGC
CTTGGCGCTGGCGGTACTGGCCCCCGGAGCCAGGGGAGCAGAGGCGGAGAGCAGCCAAAGCGCCCAATGTGGTGCT
GGTCGTGAGCGACTCCTTCGATGGAAGGTTAACATTTCATCCAGGAAGTCAGGTAGTGAAACTTCCTTTTATCAA
CTTTATGAAGCACGTGGGACTTCCTTTCTGAATGCCTACACAAACTCTCCAATTTGTTGCCCATCACGCGCAGC
AATGATGGATGTCATGGAGAGGCATGGCTACCGAACACAGAAATTTGGGAAACTGGACTATACTTCAGGACATCA
CTCCATTAGTAATCGTGTGGAAGCGTGGACAAGAGATGTTGCTTTCTTACTCAGACAAGAAGGCAGGCCCATGGT
TAATCTTATCCGTAACAGGACTAAAGTCAGAGTGATGGAAAGGGATTGGCAGAATACAGACAAAGCAGTAAACTG
GTTAAGAAAGGAAGCAATTAATTACACTGAACCATTTGTTATTTACTTGGGATTAAATTTACCACACCCTTACCC
TTCACCATCTTCTGGAGAAAATTTTGGATCTTCAACATTTCACACATCTCTTTATTGGCTTGAAAAGTGTCTCA
TGATGCCATCAAAATCCCAAAGTGGTCACCTTTGTCAGAAATGCACCCTGTAGATTATTACCTTCTATACAAA
AAACTGCACTGGAAGATTTACAAAAAAAGAAATTAAGAATATTAGAGCATTTTATTATGCTATGTGTGCTGAGAC
AGATGCCATGGTTGGTGAAATTATTTGGCCCTTCATCAATTAGCTTCCAGAAAACTATTGTCATATACTC
CTCAGACATGGAGAGCTGGCCATGGAACATCGACAGTTTTATAAAATGAGCATGTACGAGGCTATTGTCATATTA
TCCGCTTTTGATGATGGGACCAGGAATTAAAGCCGGCCTACAAGTATCAAATGTGGTTTCTCTTGTGGATATTTA
CCCTACCATGCTTGATATTGCTGGAATTCCTCTGCCTCAGAACCTGAGTGGATACTCTTTGTTGCCGTTATCATC
AGAAACATTTAAGAATGAACATAAAGTCAAAAACCTGCATCCACCCTGGATTCTGAGTGAATTCCATGGATGTAA
TGTGAATGCCTCCACCTACATGCTTCGAACTAACCACTGGAAATATATAGCCTATTCGGATGGTGCATCAATATT
GCCTCAACTCTTTGATCTTTCCTCGGATCCAGATGAATTAACAAATGTTGCTGTAAAATTTCCAGAAATTACTTA
TTCTTTGGATCAGAAGCTTCATTCCATTATAAACTACCCTAAAGTTTCTGCTTCTGTCCACCAGTATAATAAAGA
GCAGTTATCAAGTGGAAACAAAGTATAGGACAGAATTATTCAAACGTTATAGCAAATCTAGGTGGCACCAAGA
CTGGCAGAAGGAACCAAGGAAGTATGAAAATGCAATTGATCAGTGGCTTAAAACCCATATGAATCCAAGAGCAGT
TTGAACAAAAAGTTAAAAATAGTGTTCTAGAGATACATATAAATATATTCAAAGATCATAATTATGTATTTTAA
ATGAAACAGTTTTAATAATTACCAAGTTTTGGCCGGGCACAGTGGCTCACACCTGTAATCCCAGGACTTTGGGAG
GCTGAGGAAAGCAGATCACAAGGTCAAGAGATTGAGACCATCCTGGCCAACATGGTGAAACCCTGTCTCTACTAA
AAATACAAAAATTAGCTGGGCGCGGTGGTGCACACCTATAGTCTCAGCTACTCAGAGGCTGAGGCAGGAGGATCG
CTTGAACCCGGGAGGCAGCAGTTGCAGTGAGCTGAGATTGCGCCACTGTACTCCAGCCTGGCAACAGAGTGAGAC
TGTGTCGCAAAAAAATAAAAATAAAATAATAATAATACCAATTTTCATTATTTTGTAAGAATGTAGTGTATTT
TAAGATAAAATGCCAATGATTACAAAATCACATATTTTCAAAAATGGTTATTATTTAGGCCTTTGTACAATTTCT
AACAATTTAGTGGAAGTATCAAAGGATTGAAGCAAATACTGTAACAGTTATGTTCCTTTAAATAATAGAGAATA
TAAAATATTGTAATAATATGTTCTACAAAATAGTTGTATGTGAGCATTTGATGGTGAAAATTCCATGGATGTAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

【図７４】

シグナルペプチド： アミノ酸 1-15

N-グリコシル化部位： アミノ酸 108-112;166-170; 193-197;262-266;375-379;413-417; 498-502

スルファターゼタンパク質相同性ブロック： アミノ酸 286-316;359-370; 78-98

MLLLWVSVVAALALAVLAPGAGEQRRRAAKAPNVVLVVSDSFDGRLTFHPGSQVVKLPFINFMKTRGTSFLNAYT
NSPICCPSRAAMWSGLFTHLTESWNNFKGLDPNYTTWMDVMERHGYRTQKFGKLDYTSGHHSISNRVEAWTRDVA
FLLRQEGRPMVNLIRNRTKVRVMERDWQNTDKAVNWLRKEAINYTEPFVIYLGLNLPHPYPSPSSGENFGSSTFH
TSLYKLEKVSHDAIKIPKWSPLSEMHPVDYYSSYTKNCTGRFTKKEIKNIRAFYYAMCAETDAMLGEIILALHQL
DLLQKTIVIYSSDHGELAMEHRQFYKMSMYEASAHVPLLMMGPGIKAGLQVSNVVSLVDIYPTMLDIAGIPLPQN
LSGYSLLPLSSETPKNEHKVKNLHPPWILSEFHGCNVNASTYMLRTNHKKYIAYSDGASILPQLFDLSSDPDELT
NVAVKFPEITYSLDQKLHSIINYPKVSASVHQYNKEQFIKWKQSIGQNYSNVIANLRWHQDWQKEPRKYENAIDQ
WLKTHMNPRAV

【図７５】

CTCCACTGCAACCACCCAGAGCCATGGCTCCCCGAGGCTGCATCGTAGCTGTCTTTGCCATTTTCTGCATCTCCA
GGCTCCTCTGCTCACACGGAGCCCCAGTGGCCCCCATGACTCCTTACCTGATGCTGTGCCAGCCACACAAGAGAT
GTGGGGACAAGTTCTACGACCCCCTGCAGCACTGTTGCTATGATGATGCCGTCGTGCCCTTGGCCAGGACCCAGA
CGTGTGGAAACTGCACCTTCAGAGTCTGCTTTGAGCAGTGCTGCCCCTGGACCTTCATGGTGAAGCTGATAAACC
AGAACTGCGACTCAGCCCGGACCTCGGATGACAGGCTTTGTCGCAGTGTCAGCTAATGGAACATCAGGGGAACGA
TGACTCCTGGATTCTCCTTCCTGGGTGGGCCTGGAGAAAGAGGCTGGTGTTACCTGAGATCTGGGATGCTGAGTG
GCTGTTTGGGGGCCAGAGAAACACACACTCAACTGCCCACTTCATTCTGTGACCTGTCTGAGGCCCACCCTGCAG
CTGCCCTGAGGAGGCCCACAGGTCCCCTTCTAGAATTCTGGACAGCATGAGATGCGTGTGCTGATGGGGGCCCAG
GGACTCTGAACCCTCCTGATGACCCCTATGGCCAACATCAACCCGGCACCACCCCAAGGCTGGCTGGGGAACCCT
TCACCCTTCTGTGAGATTTTCCATCATCTCAAGTTCTCTTCTATCCAGGAGCAAAGCACAGGATCATAATAAATT
TATGTACTTTATAAATGAAAA

【図７６】

シグナルペプチド： アミノ酸 1-24

N-グリコシル化部位： アミノ酸 71-75

インシュリンファミリータンパク質相同性ブロック： アミノ酸 76-96;42-61

MAPRGCIVAVFAIFCISRLLCSHGAPVAPMIPYLMLCQPHKRCGDKFYDPLQHCCYDDAVVPLARTQTCGNCTFR
VCFEQCCPWTFMVKLINQNCDSARTSDDRLCRSVS

【図７７】

CTAGCCTGCGCCAAGGGGTAGTGAGACCGCGCGGCAACAGCTTGCGGCTGCGGGGAGCTCCCGTGGGCGCTCCGC
TGGCTGTGCAGGCGGCCATGGATTCCTTGCGGAAAATGCTGATCTCAGTCGCAATGCTGGGCGCAGGGGCTGGCG
TGGGCTACGCGCTCCTCGTTATCGTGACCCCGGGAGAGCGGCGGAAGCAGGAAATGCTAAAGGAGATGCCACTGC
AGGACCCAAGGAGCAGGGAGGAGGCGGCCAGGACCCAGCAGCTATTGCTGGCCACTCTGCAGGAGGCAGCGACCA
CGCAGGAGAACGTGGCCTGGAGGAAGAACTGGATGGTTGGCGGCGAAGGCGGCGCCAGCGGGAGGTCACCGTGAG
ACCGGACTTGCCTCCGTGGGCGCCGGACCTTGGCTTGGGCGCAGGAATCCGAGGCAGCCTTTCTCCTTCGTGGGC
CCAGCGGAGAGTCCGGACCGAGATACCATGCCAGGACTCTCCGGGGTCCTGTGAGCTGCCGTCGGGTGAGCACGT
TTCCCCCAAACCCTGGACTGACTGCTTTAAGGTCCGCAAGGCGGGCCAGGGCCGAGACGCGAGTCGGATGTGGTG
AACTGAAAGAACCAATAAAATCATGTTCCTCCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAA

【図７８】

シグナルペプチド： アミノ酸 1-18

N-ミリストイル化部位： アミノ酸 15-21;17-23;19-25; 83-89;86-92

MDSLRKMLISVAMLGAGAGVGYALLVIVTPGERRKQEMLKEMPLQDPRSREEAARTQQLLLATLQEAATTQENVA
WRKNWMVGGEGGASGRSP

【図７９】

CAGGAGAGAAGGCACCGCCCCCACCCCGCCTCCAAAGCTAACCCTCGGGCTTGAGGGGAAGAGGCTGACTGTACG
TTCCTTCTACTCTGGCACCCACTCTCCAGGCTGCCATGGGGCCCAGCACCCCTCTCCTCATCTTGTTCCTTTTGTC
ATGGTCGGGACCCCTCCAGGAAGGACAGCACCACCCTTGTGGAGTACATGGAACGCCGACTAGCTGCTTTAGAGGA
ACGGCTGGCCCAGTGCCAGGACCAGAGTAGTCGGCATGCTGCTGAGCTGCGGGACTTCAAGAACAAGATGCTGCC
ACTGCTGAGGTGGCAGAGAAGAAGGAGCGGGAGGCACTCACAACTGAGGCCGACACCATCTCCGGGAGAGTGGATCG
TCTGGAGCGGGAGGTAGACTATCTGGAGACCCAGAACCCAGCTCTGCCCTGTGTAGAGTTTGATGAGAAGGTGAC
TGGAGGCCCTGGGACCAAAGGCAAGGGAAGAAGGAATGAGAAGTACAGATATGGTGACAGACTGTGGCTACACAAT
CTCTCAAGTGAGATCAATGAAGATTCTGAAGCGATTTGGTGGCCCAGCTGGTCTATGGACCAAGGATCCACTGGG
GCAAACAGAGAAGATCTACGTGTTAGATGGGACACAGAATGACACAGCCTTTGTCTTCCCAAGGCTGCGTGACTT
CACCCTTGCCATGGCTGCCCGGAAAGCTTCCCGAGTCCGGGTGCCCTTCCCCTGGGTAGGCACAGGGCAGCTGGT
ATATGGTGGCTTTCTTTATTTTGCTCGGAGGCCTCCTGGAAGACCTGGTGGAGGTGGTGAGATGGAGAACACTTT
GCAGCTAATCAAATTCCACCTGGCAAACCGAACAGTGGTGGACAGCTCAGTATTCCCAGCAGAGGGGCTGATCCC
CCCCTACGGCTTGACAGCAGACACCTACATCGACCTGGTAGCTGATGAGGAAGGTCTTTGGGCTGTCTATGCCAC
CCGGGAGGATGACAGGCACTTGTGTCTGGCCAAGTTAGATCCACAGACACTGGACACAGAGCAGCAGTGGGACAC
ACCATGTCCCAGAGAGAATGCTGAGGCTGCCTTTGTCATCTGTGGGACCCTCTATGTCGTCTATAACACCCGTCC
TGCCAGTCGGGCCCGCATCCAGTGCTCCTTTGATGCCAGCGGCACCCTGACCCCTGAACGGGCAGCACTCCCTTA
TTTTCCCCGCAGATATGGTGCCCATGCCAGCCTCCGCTATAACCCCGGAGAACGCCAGCTCTATGCCTGGGATGA
TGGCTACCAGATTGTCTATAAGCTGGAGATGAGGAAGAAAGAGGAGGAGGTTTGAGGAGCTAGCCTTGTTTTTG
CATCTTTCTCACTCCCATACATTTATATTATATCCCCACTAAATTTCTTGTTCCTCATTCTTCAAATGTGGGCCA
GTTGTGGCTCAAATCCTCTATATTTTTAGCCAATGGCAATCAAATTCTTTCAGCTCCTTTGTTTCATACGGAACT
CCAGATCCTGAGTAATCCTTTTAGAGCCCGAAGAGTCAAAAACCCTCAATGTTCCCTCCTGCTCTCCTGCCCCATG
TCAACAAATTTCAGGCTAAGGATGCCCCAGACCCAGGGCTCTAACCTTGTATGCGGGCAGGCCCAGGGAGCAGGC
AGCAGTGTTCTTCCCCTCAGAGTGACTTGGGGAGGGAGAAATAGGAGGAGACGTCCAGCTCTGTCCTCTCTTCCT
CACTCCTCCCTTCAGTGTCCTGAGGAACAGGACTTTCTCCACATTGTTTTGTATTGCAACATTTTGCATTAAAAG
GAAAATCCACAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAAAAAA

【図８０】

シグナルペプチド： アミノ酸 1-21

N-グリコシル化部位： アミノ酸 177-181;248-252

cAMP- 及び cGMP-依存性プロテインキナーゼリン酸化部位： アミノ酸 196-200

チロシンキナーゼリン酸化部位： アミノ酸 89-97

N-ミリストイル化部位： アミノ酸 115-121;152-158; 370-376

アミド化部位： アミノ酸 122-126

MGPSTPLLILFLLSWSGPLQGQQHHLVEYMERRLAALEERLAQCQDQSSRHAAELRDFKNKMLPLLEVAEKEREA
LRTEADTISGRVDRLEREVDYLETQNPALPCVEPDEKVTGGPGTKGKGRRNEKYDMVTDCGYTISQVRSMKILKR
FGGPAGLWTKDPLGQTEKIYVLDGTQNDTAFVFPRLRDFTLAMAARKASPVRVPFPWVGTGQLVYGGFLYFARRP
PGRPGGGGEMENTLQLIKFHLANRTVVDSSVFPAEGLIPPYGLTADTYIDLVADEEGLWAVYATREDDRHLCLAK
LDPQTLDTEQQWDTPCPRENAEAAFVICGTLYVVYNTKPASRARIQCSFDASGTLTPERAALPYFPRRYGAHASL
RYNPRERQLYAWDDGYQIVYKLEMRKKEEEV

【図８１】

CAAGCAGGTCATCCCCTTGGTGACCTTCAAAGAGAAGCAGAGAGGGCAGAGGTGGGGGGCACAGGGAAAGGGTGA
CCTCTGAGATTCCCCTTTTCCCCCAGACTTTGGAAGTGACCCACCATGGGGCTCAGCATCTTTTTGCTCCTGTGTT
GTTCTTGGGCTCAGCCAGGCAGCCACACCGAAGATTTTCAATGGCACTGAGTGTGGGCGTAACTCACAGCCGTGG
CAGGTGGGGCTGTTTGAGGGCACCAGCCTGCGCTGCGGGGGTGTCCTATTGACCACAGGTGGGTCCTCACAGCG
GCTCACTGCAGCGGCAGCAGGTACTGGGTGCGCCTGGGGGAACACAGCCTCAGCCAGCTCGACTGGACCGAGCAG
ATCCGGCACAGCGGCTTCTCTGTGACCCATCCCGGCTACCTGGGAGCCTCGACGAGCCACGAGCACGACCTCCGG
CTGCTCGGCTGCGCCTGCCCGTCCGGTAACCAGCAGCGTTCAACCCCTGCCCCTGCCCAATGACTGTGCAACC
GCTGGCACCGAGTGCCACGTCTCAGGCTGGGGCATCACCAACCACCCACGGAACCATTCCGGATCTGCTCCAG
TGCCTCAACCTCTCCATCGTCTCCCATGCCACCTGCCATGGTGTGTATCCCGGGAGAATCACGAGCAACATGGTG
TGTGCAGGCGGCGTCCGGGGCAGGATGCCTGCCAGGGTGATTCTGGGGGCCCCCTGGTGTGTGGGGGAGTCCTT
CAAGGTCTGGTGTCCTGGGGGCTGTGGGGCCCTGTGGACAAGATGGCATCCCTGGAGTCTACACCTATATTTGC
AAGTATGTGGACTGGATCCGGATGATCATGAGGAACAACTGACCTGTTTCCTCCACCTCCACCCCCACCCCTTAA
CTTGGGTACCCCTCTGGCCCTCAGAGCACCAATATCTCCTCCATCACTTCCCCTAGCTCCACTCTTGTTGGCCTG
GGAACTTCTTGGAACTTTAACTCCTGCCAGCCCTTCTAAGACCCACGAGCGGGGTGAGAGAAGTGTGCAATAGTC
TGGAATAAATATAAATGAAGGAGGGGCAAAAAAAAAAAAAA

【図８２】

シグナルペプチド： アミノ酸 1-17

N-グリコシル化部位： アミノ酸 24-28;163-167

セリンプロテアーゼ、トリプシンファミリー、ヒスチジン活性部位： アミノ酸 58-64

セリンプロテアーゼ、トリプシンファミリー、ヒスチジンタンパク質相同性ブロック： アミノ酸 47-64;196-207;218-242

Kringle ドメインタンパク質相同性ブロック： アミノ酸 194-207;47-65

Apple ドメインタンパク質相同性ブロック： アミノ酸 220-248

MGLSIFLLLCVLGLSQAATPKIFNGTECGRNSQPWQVGLFEGTSLRCGGVLIDHRWVLTAAHCSGSRYWVRLGEH
SLSQLDWTEQIRHSGFSVTHPGYLGASTSHEHDLRLLRLRLPVRVTSSVQPLPLPNDCATAGTECHVSGWGITNH
PRNPFPDLLQCLNLSIVSHATCHGVYPGRITSNMVCAGGVPGQDACQGDSGGPLVCGGVLQGLVSWGSVGPCGQD
GIPGVYTYICKYVDWIRMIMRNN

【図８３】

GAGCAGTGTTCTGCTGGAGCCGATGCCAAAAACCATGCATTTCTTATTCAGATTCATTGTTTTCTTTTATCTGTG
GGGCCTTTTTACTGCTCAGAGACAAAAGAAAGAGGAGAGCACCGAAGAAGTGAAAATAGAAGTTTTGCATCGTCC
AGAAAACTGCTCTAAGACAAGCAAGAAGGGAGACCTACTAAATGCCCATTATGACGGCTACCTGGCTAAAGACGG
CTCGAAATTCTACTGCAGCCGGACACAAAATGAAGGCCACCCCAAATGGTTTGTTCTTGGTGTTGGGCAAGTCAT
AAAAGGCCTAGACATTGCTATGACAGATATGTGCCCTGGAGAAAAGCGAAAAGTAGTTATACCCCCTTCATTTGC
ATACGGAAAGGAAGGCTATGCAGAAGGCAAGATTCCACCGGATGCTACATTGATTTTTGAGATTGAACTTTATGC
TGTGACCAAAGGACCACGGAGCATTGAGACATTTAAACAAATAGACATGGACAATGACAGGCAGCTCTCTAAAGC
CGAGATAAACCTCTACTTGCAAAGGGAATTTGAAAAAGATGAGAAGCCACGTGACAAGTCATATCAGGATGCAGT
TTTAGAAGATATTTTTAAGAAGAATGACCATGATGGTGATGGCTTCATTTCTCCCAAGGAATACAATGTATACCA
ACACGATGAACTATAGCATATTTGTATTTCTACTTTTTTTTTTTAGCTATTTACTGTACTTTATGTATAAAACAA
AGTCACTTTTCTCCAAGTTGTATTTGCTATTTTTCCCCTATGAGAAGATATTTTGATCTCCCCAATACATTGATT
TTGGTATAATAAATGTGAGGCTGTTTTGCAAACTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAAAAA

【図８４】

小胞体標的化配列： アミノ酸 219-224

N-グリコシル化部位： アミノ酸 45-49

FKBP-型 ペプチジル-プロリル シス-トランス異性体相同性ブロック： アミノ酸 87-124;129-143

EF-ハンド カルシウム-結合性ドメイン タンパク質相同性ブロック： アミノ酸 202-215

MPKTMHFLFRFIVFFVLWGLFTAQRQKKEESTEEVKIEVLHRPENCSKTSKKGDLLNAHYDGYLAKDGSKFYCSR
TQNEGHPKWFVLGVGQVIKGLDIAMTDMCPGEKRKVVIPPSFAYGKEGYAEGKIPPDATLIFEIELYAVTKGPRS
IETFKQIDMDNDRQLSKAEINLYLQREFEKDEKPRDKSYQDAVLEDIFKKNDHDGDGFISPKEYNVYQHDEL

【図８５】

GAAAGAATGTTGTGGCTGCTCTTTTTTCTGGTGACTGCCATTCATGCTGAACTCTGTCAACCAGGTGCAGAAAAT
GCTTTTAAAGTGAGACTTAGTATCAGAACAGCTCTGGGAGATAAAGCATATGCCTGGGATACCAATGAAGAATAC
CTCTTCAAAGCGATGGTAGCTTTCTCCATGAGAAAAGTTCCCAACAGAGAAGCAACAGAAATTTCCCATGTCCTA
CTTTGCAATGTAACCCAGAGGGTATCATTCTGGTTTGTGGTTACAGACCCTTCAAAAAATCACACCCTTCCTGCT
GTTGAGGTGCAATCAGCCATAAGAATGAACAAGAACCGGATCAACAATGCCTTCTTTCTAAATGACCAAACTCTG
GAATTTTTAAAAATCCCTTCCACACTTGCACCACCCATGGACCCATCTGTGCCCATCTGGATTATTATATTTGGT
GTGATATTTTGCATCATCATAGTTGCAATTGCACTACTGATTTTATCAGGGATCTGGCAACGTAGAAGAAAGAAC
AAAGAACCATCTGAAGTGGATGACGCTGAAGATAAGTGTGAAAACATGATCACAATTGAAAATGGCATCCCCTCT
GATCCCCTGGACATGAAGGGGGGCATATTAATGATGCCTTCATGACAGAGGATGAGAGGCTCACCCCTCTCTGAA
GGGCTGTTGTTCTGCTTCCTCAAGAAATTAAACATTTGTTTCTGTGTGACTGCTGAGCATCCTGAAATACCAAGA
GCAGATCATATATTTTGTTTCACCATTCTTCTTTTGTAATAAATTTTGAATGTGCTTGAAAGTGAAAAGCAATCA
ATTATACCCACCAACACCACTGAAATCATAAGCTATTCACGACTCAAAATATTCTAAAATATTTTCTGACAGTA
TAGTGTATAAATGTGGTCATGTGGTATTTGTAGTTATTGATTTAAGCATTTTTAGAAATAAGATCAGGCATATGT
ATATATTTTCACACTTCAAAGACCTAAGGAAAAATAAATTTTCCAGTGGAGAATACATATAATGGTGGTAGAAA
TCATTGAAAATGGATCCTTTTTGACGATCACTTATATCACTCTGTATATGACTAAGTAAACAAAAGTGAGAAGTA
ATTATTGTAAATGGATGATAAAATGGAATTACTCATATACAGGGTGGAATTTTATCCTGTTATCACACCAACA
GTTGATTATATATTTTCTGAATATCAGCCCCTAATAGGACAATTCTATTTGTTGACCATTTCTACAATTTGTAAA
AGTCCAATCTGTGCTAACTTAACAAAGTAATAATCATCTCTTTTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

【図８６】

シグナルペプチド：	アミノ酸 1-14
膜貫通ドメイン：	アミノ酸 141-160
N-グリコシル化部位：	アミノ酸 76-80;93-97

MLWLLFFLVTAIHAELCQPGAENAFKVRLSIRTALGDKAYAWDTNEEYLFKAMVAFSMRKVPNREATEISHVLLC
NVTQRVSFWFVVTDPSKNHTLPAVEVQSAIRMNKNRINNAFFLNDQTLEFLKIPSTLAPPMDPSVPIWIIIFGVI
FCIIIVAIALLILSGIWQRRRKNKEPSEVDDAEDKCENMITIENGIPSDPLDMKGGILMMPS

【図８７】

AAGACCCTCTCTTTCGCTGTTTGAGAGTCTCTCGGCTCAAGGACCGGGAGGTAAGAGGTTTGGGACTGCCCCGGC
AACTCCAGGGTGTCTGGTCCACGACCTATCCTAGGCGCCATGGGTGTGATAGGTATACAGCTGGTTGTTACCATG
GTGATGGCCAGTGTCATGCAGAAGATTATACCTCACTATTCTCTTGCTCGATGGCTACTCTGTAATGGCAGTTTG
AGGTGGTATCAACATCCTACAGAAGAAGAATTAAGAATTCTTGCAGGAAGAACACCAAAAAGGGAAAACCAAAAAA
GATAGGAAATATAATGGTCACATTGAAAGTAAGCCATTAACCATTCCAAAGGATATTGACCTTCATCTAGAAACA
AAGTCAGTTACAGAAGTGGATACTTTAGCATTGCATTACTTTCCAGAATACCAGTGGCTGGTGGATTTCACAGTG
GCTGCTACAGTTGTGTATCTAGTAACTGAAGTCTACTACAATTTTATGAAGCCTACACAGGAAATGAATATCAGC
TTAGTCTGGTGCCTACTTGTTTTGTCTTTTGCAATCAAAGTTCTATTTTCATTAACTACACACTATTTAAAGTA
GAAGATGGTGGTGAAAGATCTGTTTGTGTCACCTTTGGATTTTTTTTCTTTGTCAAAGCAATGGCAGTGTTGATT
GTAACAGAAAATTATCTGGAATTTGGACTTGAAACAGGGTTTACAAATTTTTCAGACAGTGCGATCGAGTTTCTT
GAAAAGCAAGGTTTAGAATCTCAGAGTCCTGTTTCAAAACTTACTTTCAAATTTTCCTGGCTATTTTCTGTTCA
TTCATTGGGGCTTTTTGACATTTCCTGGATTACGACTGGCTCAAATGCATCTGGATGCCCTGAATTTGGCAACA
GAAAAAATTACACAAACTTTACTTCATATCAACTTCTTGGCACCTTTATTTATGGTTTTGCTCTGGGTAAAACCA
ATCACCAAAGACTACATTATGAACCCACCACTGGGCAAAGAAATTTCCCCATCTGGAAGATGAAGATAATAGTAT
CTAACTCACAAGGTTATCATTGGAATAAATGAAAGAACACATGTAATGCCACCAGCTGGAATTAAGTGCTTAATA
AATGTTCTTTTCACTGCTTTGCCTCATCAGAATTAAAATAGAAATACTTGACTAGT

【図８８】

膜貫通ドメイン：	アミノ酸 106-121;136-152; 172-188; 230-245;272-285
N-グリコシル化部位：	アミノ酸 34-38;135-139;203-207
チロシンキナーゼリン酸化部位：	アミノ酸 59-67
N-ミリストイル化部位：	アミノ酸 165-171;196-202; 240-246;247-253
ATP/GTP-結合性部位モチーフＡ（p loop）	アミノ酸 53-61

MGVIGIQLVVTMVMASVMQKIIPHYSLARWLLCNGSLRWYQHPTEEELRILAGKQQKGKTKKDRKYNGHIESKPL
TIPKDIDLHLETKSVTEVDTLALHYFPEYQWLVDFIVAATVVYLVTEVFYYNFMKPTQEMNISLVWCLLVLSPAIK
VLFSLTTHYFKVEDGGERSVCVIFGPFFFVKAMAVLIVTENYLEPGLETGFTNFSDSAMQFLEKQGLESQSPVSK
LTPKFFLAIFCSFIGAFLTPPGLRLAQMHLDALNLATEKITQTLLHINFLAPLFMVLLWVKPITKDYIMNPPLGK
EISPSGR

【図８９】

GAAGTAGAGGTGTTGTGCTGAGCGGCGCTCGGCGAACTGTGTGGACCGTCTGCTGGGACTCCGGCCCTGCGTCCG
CTCAGCCCCGTGGCCCCGCGCACCTACTGCCATGGAGACGCGGCCTCGTCTCGGGGCCACCTGTTTGCTGGGCTT
CAGTTTCCTGCTCCTCGTCATCTCTTCTGATGGACATAATGGGCTTGGAAAGGGTTTTGGAGATCATATTCATTGG
AGGACACTGGAAGATGGGAAGAAAGAAGCAGCTGCCAGTGGACTGCCCCTGATGGTGATTATTCATAAATCCTGG
TGTGGAGCTTGCAAAGCTCTAAAGCCCAAATTTGCAGAATCTACGGAAATTTCAGAACTCTCCCATAATTTTGTT
ATGGTAAATCTTGAGGATGAAGAGGAACCCAAAGATGAAGATTTCAGCCCTGACGGGGGTTATATTCCACGAATC
CTTTTTCTGGATCCCAGTGGCAAGGTGCATCCTGAAATCATCAATGAGAATGGAAACCCCAGCTACAAGTATTTT
TATGTCAGTGCCGAGCAAGTTGTTCAGGGGATGAAGGAAGCTCAGGAAAGGCTGACGGGTGATGCCTTCAGAAAG
AAACATCTTGAAGATGAATTGTAACATGAATGTGCCCCTTCTTTCATCAGAGTTAGTGTTCTGGAAGGAAAGCAG
CAGGGAAGGGAATATTGAGGAATCATCTAGAACAATTAAGCCGACCAGGAAACCTCATTCCTACCTACACTGGAA
GGAGCGCTCTCACTGTGGAAGAGTTCTGCTAACAGAAGCTGGTCTGCATGTTTGTGGATCCAGCGGAGAGTGGCA
GACTTTCTTCTCCTTTTCCCTCTCACCTAAATGTCAACTTGTCATTGAATGTAAAGAATGAAACCTTCTGACACAAAA

【図９０】

シグナルペプチド：	アミノ酸 1-23
チオレドキシンファミリータンパク質相同性ブロック：	アミノ酸 58-75

METRPRLGATCLLGFSFLLLVISSDGHNGLGKGFGDHIHWRTLEDGKKEAAASGLPLMVIIHKSWCGACKALKPK
FAESTEISELSHNFVMVNLEDEEEPKDEDFSPDGGYIPRILFLDPSGKVHPEIINENGNPSYKYFYVSAEQVVQG
MKEAQERLTGDAFRKKHLEDEL

【図９１】

CGGCTCGAGTGCAGCTGTGGGGAGATTTCAGTGCATTGCCTCCCCTGGGTGCTCTTCATCTTGGATTTGAAAGTT
GAGAGCAGCATGTTTTGCCCACTGAAACTCATCCTGCTGCCAGTGTTACTGGATTATTCCTTGGGCCTGAATGAC
TTGAATGTTTCCCCGCCTGAGCTAACAGTCCATGTGGGTGATTCAGCTCTGATGGGATGTGTTTTCCAGAGCACA
GAAGACAAATGTATATTCAAGATAGACTGGACTCTGTCACCAGGAGAGCACGCCAAGGACGAATATGTGCTATAC
TATTACTCCAATCTCAGTGTGCCTATTGGGCGCTTCCAGAACCGCGTACACTTGATGGGGGACATCTTATGCAAT
GATGGCTCTCTCCTGCTCCAAGATGTGCAAGAGGCTGACCAGGGAACCCTATATCTGTGAAATCCGCCTCAAAGGG
GAGAGCCAGGTGTTCAAGAAGGCGGTGGTACTGCATGTGCTTCCAGAGGAGCCCAAAGAGCTCATGGTCCATGTG
GGTGGATTGATTCAGATGGGATGTGTTTTCCAGAGCACAGAAGTGAAACACGTGACCAAGGTAGAATGGATATTT
TCAGGACGGCGCGCAAAGGAGGAGATTGTATTTCGTTACTACCACAAACTCAGGATGTCTGTGGAGTACTCCCAG
AGCTGGGGCCACTTCCAGAATCGTGTGAACCTGGTGGGGGACATTTTCCGCAATGACGGTTCCATCATGCTTCAA
GGAGTGAGGGAGTCAGATGGAGGAAACTACACCTGCAGTATCCACCTAGGGAACCTGGTGTTCAAGAAAACCATT
GTGCTGCATGTCAGCCCGGAAGAGCCTCGAACACTGGTGACCCCGGCAGCCCTGAGGCCTCTGGTCTTGGGTGGTAA
TCAGTTGGTGATCATTGTGGGAATTGTCTGTGCCACAATCCTGCTGCTCCCTGTTCTGATATTGATCGTGAAGAA
GACCTGTGGAAATAAGAGTTCAGTGAATTCTACAGTCTTGGTAAAGAACACGAAGAAGACTAATCCAGAGATAAA
AGAAAAACCCTGCCATTTTGAAAGATGTGAAGGGGAGAAACACATTTACTCCCCAATAATTGTACGGGAGGTGAT
CGAGGAAGAAGAACCAAGTGAAAAATCAGAGGCCACCTACATGACCATGCACCCAGTTTGGCCTTCTCTGAGGTC
AGATCGGAACAACTCACTTGAAAAAAAGTCAGGTGGGGGAATGCCAAAAACACAGCAAGCCTTTTGACAAGAATG
GAGAGTCCCTTCATCTCAGCAGCGGTGGAGACTCCTCCGTGTGTGTCCTGGGCCACTCTACCAGTGATTTCAG
ACTCCCGCTCTCCCAGCTGTCCTCCTGTCTCATTGTTTGGTCAATACACTGAAGATGGAGAATTTGGAGCCTGGC
AGAGAGACTGGACAGCTCTGGAGGAACAGGCCTGCTGAGGGGAGGGGAGCATGGACTTGGCCTCTGGAGTGGGAC
ACTGGCCCTGGGAACCAGGCTGAGCTGAGTGGCCTCAAACCCCCCGTTGGATCAGACCCTCCTGTGGGCAGGGTT
CTTAGTGGATGAGTTACTGGGAAGAATCAGAGATAAAAACCAACCCAAATCAA

【図９２】

シグナルペプチド：	アミノ酸 1-19
膜貫通ドメイン：	アミノ酸 275-296
N-グリコシル化部位：	アミノ酸 76-80;231-235;302-306; 307-311;376-380
ミエリン膜タンパク質相同性ブロック：	アミノ酸 210-240;92-122

MFCPLKLILLPVLLDYSLGLNDLNVSPPELTVHVGDSALMGCVFQSTEDKCIFKIDWTLSPGEHAKDEYVLYYYS
NLSVPIGRPQNRVHLMGDILCNDGSLLLQDVQEADQGTYICEIRLKGESQVFKKAVVLHVLPEEPKELMVHVGGL
IQMGCVFQSTEVKHVTKVEWIFSGRRAKEEIVFRYYHKLRMSVEYSQSWGHFQNRVNLVGDIPRNDGSIMLQGVR
ESDGGNYTCSIHLGNLVFKKTIVLHVSPEEPRTLVTPAALRPLVLGGNQLVIIVGIVCATILLLPVLILIVKKTC
GNKSSVNSTVLVKNTKTNPEIKEKPCHFERCEGEKHIYSPIIVREVIEEEEEPSEKSEATYMTMHPVWPSLRSDR
NNSLEKKSGGGMPKTQQAF

【図９３】

TCTGCCTCCACTGCTCTGTGCTGGGATCATGGAACTTGCACTGCTGTGTGGGCTGGTGGTGATGGCTGGTGTGAT
TCCAATCCAGGGCGGGATCCTGAACCTGAACAAGATGGTCAAGCAAGTGACTGGGAAAATGCCCATCCTCTCCTA
CTGGCCCTACGGCTGTCACTGCGGACTAGGTGGCAGAGGCCAACCCAAAGATGCCACGGACTGGTGCTGCCAGAC
CCATGACTGCTGCTATGACCACCTGAAGACCCAGGGGTGCGGCATCTACAAGGACAACAACAAAGCAGCATACA
TTGTATGGATTTATCTCAACGCTATTGTTTAATGGCTGTGTTTAATGTGATCTATCTGGAAAATGAGGACTCCGA
ATAAAAAGCTATTACTAWTTNAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

【図９４】

シグナル配列：	アミノ酸 1-17
N-グリコシル化部位：	アミノ酸 86-90
N-ミリストイル化部位：	アミノ酸 20-26;45-51
ホスホリパーゼＡ２ヒスチジン活性部位：	アミノ酸 63-71

MELALLCGLVVMAGVIPIQGGILNLNKMVKQVTGKMPILSYWPYGCHCGLGGRGQPKDATDWCCQTHDLCYDHLK
TQGCGIYKDNNKSSIHCMDLSQRYCLMAVFNVIYLENEDSE

【図９５】

CACAAGCATCTTAATTTGAATCCACAAAGTTTCATGTAATGAAAAGAAATACATAATTTTAATTCAACCCGAGTG
TTTTCCAAGAAGATTGTATTTGCTTAAATTGCTACAGTAATTCAAGAAGACAGCCCTGTCTGGACACAGAGTTACT
GTGGATTTTTAAGAGACTCAGTTAAAGAATTTAGGAATTTCTGATTCATTTAAAGGATTTACAAATTCATCAACC
CCTGAAAACTAAAGCAAATTGAACAGGAAAAAAAAAAAAAGAAGATGGGTTTTTTAAGTCCAATATATGTTATTTTC
TTCTTTTTTGGAGTCAAAGTACATTGCCAATATGAAACTTATCAGTGGGATGAAGACTATGACCAAGAGCCAGAT
GATGATTACCAAACAGGATTCCCATTTCGTCAAAATGTAGACTACGGAGTTCCTTTTCATCAGTATACTTTAGGC
TGTGTCAGTGAATGCTTCTGTCCAACTAACTTTCCATCATCAATGTACTGTGATAATCGCAAACTCAAGACTATC
CCAAATATTCCGATGCACATTCAGCAACTCTACCTTCAGTTCAATGAAATTGAGGCTGTGACTGCAAATTCATTC
ATCAATGCAACTCATCTTAAAGAAATTAACCTCAGCCACAACAAAATTAAATCTCAAAAGATTGATTATGGTGTG
TTTGCTAAGCTTCCAAATCTACTACAACTTCATCTAGAGCATAATAATTTAGAAGAATTTCCATTTCCTTTCCT
AAATCTCTGGAAAGACTCCTTCTTGGTTACAATGAAATCTCCAAACTGCAGACAAATGCTATGGATGGGCTAGTA
AACTTGACCATGCTTGATCTCTGTTATAATTATCTTCATGATTCTCTGCTAAAAGACAAATCTTTGCCAAAATG
GAAAAACTAATGCAGCTCAACCTCTGCAGTAACAGATTAGAATCAATGCCTCCTGGTTTGCCTTCTTCACTTATG
TATCTGTCTTTAGAAAAATAATTCAATTTCTTCTATACCCGAAAAATACTTCGACAAACTTCCAAACTTCATACT
CTAAGAATGTCACACAACAAACTACAAGACATCCCATATAATATTTTTAATCTTCCCAACATTGTAGAACTCAGT
GTTGGACACAACAAATTGAAGCAAGCATTCTATATTCCAAGAAATTTGGAACACCTATACCTACAAAATAATGAA
ATAGAAAAGATGAATCTTACAGTGATGTGTCCTTCTATTGACCCACTACATTACCACCATTTAACATACATTCGT
GTGGACCAAAATAACTAAAAGAACCAATAAGCTCATACATCTTCTTCTGCTTCCCTCATATACACACTATTTAT
TATGGTGAACAACGAAGCACTAATGGTCAAACAATACAACTAAAGACACAAGTTTTCAGGAGATTTCCAGATGAT
GATGATGAAAGTGAAGATCACGATGATCCTGACAATGCTCATGAGAGCCCAGAACAAGAAGGAGCAGAAGGGCAC
TTTGACCTTCATTATTATGAAAATCAAGAATAGCAAGAAACTATATAGGTATACACTTACGACTTCACAAAACCTA
TACTTAATATAGTAAATCTAAGTAAACATGTATTACTCAAAGTAATATATTTAGAATTATGTATTAGTATAAGAT
CAGAATTGAATTTAAGTTGTTGGTGACATCTGCATCATTTCATAGGATTAGAACTTACTCAAAATAATGTAAATC
TTTAAAAATATAAATTAGAATGACAAGTGGGAATCATAAATTAAACGTTAATGGTTTCTTATGCTCTTTTTAAAT
ATAGAAATATCATGTTAAAGAAAAAAAAAAAAAA

【図９６】

N-グリコシル化部位：	アミノ酸 113-117;121-125; 187-191;242-246;316-320
チロシンキナーゼリン酸化部位：	アミノ酸 268-275;300-307
N-ミリストイル化部位：	アミノ酸 230-236
ロイシンジッパーパターン：	アミノ酸 146-168;217-239

MGFLSPIYVIFFFFGVKVHCQYETYQWDEDYDQEPDDDYQTGFPFRQNVDYGVPFHQYTLGCVSECFCPTNFPSS
MYCDNRKLKTIPNIPMHIQQLYLQFNEIEAVTANSFINATHLKEINLSHNKIKSQKIDYGVFAKLPNLLQLHLEH
NNLEEFPFPLPKSLERLLLGYNEISKLQTNAMDGLVNLTNLDLCYNYLHDSLLKDKIFAKMEKLMQLNLCSNRLE
SMPPGLPSSLMYLSLENNSISSIPEKYFDKLPKLHTLRMSHNKLQDIPYNIFNLPNIVELSVGHNKLKQAFYIPR
NLEHLYLQNNEIEKMNLTVMCPSIDPLHYHHLTYIRVDQNKLKEPISSYIFFCFPHIHTIYYGEQRSTNGQTIQL
KTQVFRRFPDDDDESEDHDDPDNAHESPEQEGAEGHFDLHYYENQE

フロントページの続き

(51)Int.Cl.[7]	FI		テーマコード（参考）
Ａ６１Ｋ 48/00	Ａ６１Ｋ 48/00		４Ｃ０８４
Ａ６１Ｐ 9/00	Ａ６１Ｐ 9/00		４Ｃ０８５
Ａ６１Ｐ 9/10	Ａ６１Ｐ 9/10		４Ｃ０８６
Ａ６１Ｐ 17/00	Ａ６１Ｐ 17/00		４Ｈ０４５
Ａ６１Ｐ 17/02	Ａ６１Ｐ 17/02		
Ａ６１Ｐ 35/00	Ａ６１Ｐ 35/00		
Ｃ０７Ｋ 14/515	Ｃ０７Ｋ 14/515		
Ｃ０７Ｋ 14/52	Ｃ０７Ｋ 14/52		
Ｃ０７Ｋ 16/22	Ｃ０７Ｋ 16/22		
Ｃ０７Ｋ 16/24	Ｃ０７Ｋ 16/24		
Ｃ０７Ｋ 19/00	Ｃ０７Ｋ 19/00		
Ｃ１２Ｎ 1/19	Ｃ１２Ｎ 1/19		
Ｃ１２Ｎ 1/21	Ｃ１２Ｎ 1/21		
Ｃ１２Ｎ 5/10	Ｃ１２Ｎ 7/00		
Ｃ１２Ｎ 7/00	Ｃ１２Ｑ 1/68	Ａ	
Ｃ１２Ｑ 1/68	Ｇ０１Ｎ 33/15	Ｚ	
Ｇ０１Ｎ 33/15	Ｇ０１Ｎ 33/50	Ｚ	
Ｇ０１Ｎ 33/50	Ｇ０１Ｎ 33/53	Ｄ	
Ｇ０１Ｎ 33/53	Ａ６１Ｋ 37/02		
// Ｃ１２Ｐ 21/08	Ｃ１２Ｎ 5/00	Ｂ	
(Ｃ１２Ｎ 1/19	Ｃ１２Ｐ 21/08		
Ｃ１２Ｒ 1:645)	Ｃ１２Ｎ 1/19		
(Ｃ１２Ｎ 1/21	Ｃ１２Ｒ 1:645		
Ｃ１２Ｒ 1:19)	Ｃ１２Ｎ 1/21		
(Ｃ１２Ｎ 5/10	Ｃ１２Ｒ 1:19		
Ｃ１２Ｒ 1:91)	Ｃ１２Ｎ 5/00	Ｂ	
(Ｃ１２Ｎ 7/00	Ｃ１２Ｒ 1:91		
Ｃ１２Ｒ 1:93)	Ｃ１２Ｎ 7/00		
	Ｃ１２Ｒ 1:93		

(31)優先権主張番号 PCT/US99/05028
(32)優先日 平成11年3月8日(1999.3.8)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 60/123,957
(32)優先日 平成11年3月12日(1999.3.12)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 60/131,445
(32)優先日 平成11年4月28日(1999.4.28)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 60/134,287
(32)優先日 平成11年5月14日(1999.5.14)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 PCT/US99/12252
(32)優先日 平成11年6月2日(1999.6.2)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 60/141,037
(32)優先日 平成11年6月23日(1999.6.23)

(33)優先権主張国　米国(US)
(31)優先権主張番号　60/144,758
(32)優先日　平成11年7月20日(1999.7.20)
(33)優先権主張国　米国(US)
(31)優先権主張番号　60/145,698
(32)優先日　平成11年7月26日(1999.7.26)
(33)優先権主張国　米国(US)
(31)優先権主張番号　PCT/US99/20111
(32)優先日　平成11年9月1日(1999.9.1)
(33)優先権主張国　米国(US)
(31)優先権主張番号　PCT/US99/20594
(32)優先日　平成11年9月8日(1999.9.8)
(33)優先権主張国　米国(US)
(31)優先権主張番号　PCT/US99/20944
(32)優先日　平成11年9月13日(1999.9.13)
(33)優先権主張国　米国(US)
(31)優先権主張番号　PCT/US99/21090
(32)優先日　平成11年9月15日(1999.9.15)
(33)優先権主張国　米国(US)
(31)優先権主張番号　PCT/US99/21547
(32)優先日　平成11年9月15日(1999.9.15)
(33)優先権主張国　米国(US)
(31)優先権主張番号　PCT/US99/23089
(32)優先日　平成11年10月5日(1999.10.5)
(33)優先権主張国　米国(US)
(31)優先権主張番号　60/162,506
(32)優先日　平成11年10月29日(1999.10.29)
(33)優先権主張国　米国(US)

（特許庁注：以下のものは登録商標）
１．ＵＮＩＸ

(72)発明者　ベーカー，ケヴィン，ピー.
アメリカ合衆国　メリーランド　２０８７８，ダーンズタウン，インディアン　ラン　ドライブ　１４００６
(72)発明者　フェララ，ナポレオン
アメリカ合衆国　カリフォルニア　９４１０９，サンフランシスコ，パシフィック　アヴェニュー　２０９０，７０４号室
(72)発明者　ゲルバー，ハンズピーター
アメリカ合衆国　カリフォルニア　９４１０７，サンフランシスコ，テネシー　ストリート，５号室
(72)発明者　ヒラン，ケネス，ジェー.
アメリカ合衆国　カリフォルニア　９４１１４，サン　フランシスコ，セワード　ストリート　６４
(72)発明者　ゴッダード，オードリー
アメリカ合衆国　カリフォルニア　９４１３１，サンフランシスコ，コンゴ　ストリート　１１０
(72)発明者　ゴドゥスキー，ポール，ジェー.
アメリカ合衆国　カリフォルニア　９４０１０，バーリンゲーム，イーストン　ドライブ　２６２７
(72)発明者　ガーニー，オースティン，エル.

アメリカ合衆国　カリフォルニア　９４００２，ベルモント，デビー　レーン　１
(72)発明者　クライン，ロバート，ディー．
アメリカ合衆国　カリフォルニア　９４３０１，パロ　アルト，ウェブスター　ストリート　１０４４
(72)発明者　クオ，ソフィア，エス．
アメリカ合衆国　カリフォルニア　９４１３１，サンフランシスコ，シュリー　ストリート　３号室
(72)発明者　パオニ，ニコラス，エフ．
アメリカ合衆国　カリフォルニア　９４００２，ベルモント，テラス　ドライブ　１７５６
(72)発明者　スミス，ヴィクトリア
アメリカ合衆国　カリフォルニア　９４０１０，バーリンゲーム，ドゥワイト　ロード　１９
(72)発明者　ワタナベ，コリン，ケー．
アメリカ合衆国　カリフォルニア　９４５５６，モラガ，コーリス　ドライブ　１２８
(72)発明者　ウィリアムズ，ピー．，ミッキー
アメリカ合衆国　カリフォルニア　９４０１９，ハーフ　ムーン　ベイ，アルト　アヴェニュー　５０９
(72)発明者　ウッド，ウィリアム，アイ．
アメリカ合衆国　カリフォルニア　９４０１０，ヒルス　ボロー，サウスダウン　コート　３５

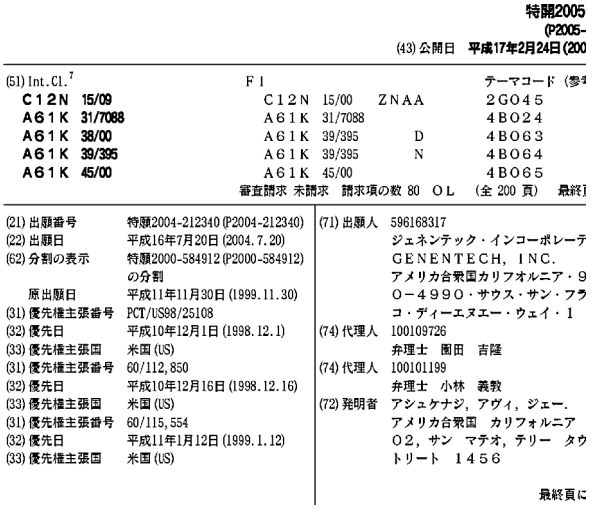
Ｆターム(参考) 2G045 AA25 AA40 CB01 CB17 CB21 DA12 DA13 DA14 DA36 DA77 FB03
4B024 AA01 AA11 BA21 CA04 CA07 DA02 DA06 DA12 EA02 EA04 FA02 FA17 GA11 HA12
4B063 QA01 QA17 QA18 QA19 QQ08 QQ43 QR08 QR42 QR56 QS25 QS34 QX02
4B064 AG27 CA02 CA06 CA10 CA20 CC24 DA01 DA05 DA13 DA14
4B065 AA26X AA72X AA90X AA93Y AA97X AB01 BA02 CA24 CA44 CA46
4C084 AA02 AA13 AA17 DC50 NA14 ZA361 ZA961 ZB151 ZB261
4C085 AA13 BB12 CC02
4C086 AA01 EA16 MA01 MA04 NA14 ZA36 ZA96 ZB15 ZB26
4H045 AA10 AA11 AA30 BA10 CA40 DA01 DA75 EA28 EA51 FA74

专利名称(译)	促进或抑制血管生成和心血管化		
公开(公告)号	JP2005046146A	公开(公告)日	2005-02-24
申请号	JP2004212340	申请日	2004-07-20
[标]申请(专利权)人(译)	健泰科生物技术公司		
申请(专利权)人(译)	Genentech公司		
[标]发明人	アシュケナジアヴィジェー ベーカーケヴィンピー フェララナポレオン ゲルバーハンズピーター ヒランケネスジェー ゴッダードオードリー ゴドゥスキーポールジェー ガーニーオースティンエル クラインロバートディー クオソフィアエス パオニニコラスエフ スミスヴィクトリア ワタナベコリンケー ウィリアムズピーミッキー ウッドウィリアムアイ		
发明人	アシュケナジ,アヴィ,ジェー. ベーカー,ケヴィン,ピー. フェララ,ナポレオン ゲルバー,ハンズピーター ヒラン,ケネス,ジェー. ゴッダード,オードリー ゴドゥスキー,ポール,ジェー. ガーニー,オースティン,エル. クライン,ロバート,ディー. クオ,ソフィア,エス. パオニ,ニコラス,エフ. スミス,ヴィクトリア ワタナベ,コリン,ケー. ウィリアムズ,ピー.,ミッキー ウッド,ウィリアム,アイ.		
IPC分类号	A61K38/17 A61K A61K31/7088 A61K31/711 A61K38/00 A61K39/395 A61K45/00 A61K48/00 A61P7/00 A61P9/00 A61P9/04 A61P9/10 A61P17/00 A61P17/02 A61P35/00 C07K14/47 C07K14/515 C07K14/52 C07K16/18 C07K16/22 C07K16/24 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N7/00 C12N15/09 C12N15/11 C12N15/12 C12N15/867 C12P21/02 C12P21/08 C12Q1/02 C12Q1/68 C12R1/19 C12R1/645 C12R1/93 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/68 C12R1/91		
CPC分类号	A61K38/00 A61P7/00 A61P9/00 A61P9/04 A61P9/10 A61P17/00 A61P17/02 A61P35/00 C07K14/47 C07K14/4703 C07K16/18 C12N9/6408 C12N2799/026 C12Y304/21034 G01N2800/32		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K31/7088 A61K39/395.D A61K39/395.N A61K45/00 A61K48/00 A61P9/00 A61P9/10 A61P17/00 A61P17/02 A61P35/00 C07K14/515 C07K14/52 C07K16/22 C07K16/24 C07K19/00 C12N1/19 C12N1/21 C12N7/00 C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D A61K37/02 C12N5/00.B C12P21/08 C12R1/645 C12R1/19 C12R1/91 C12R1/93 A61K38/00 C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A C12N5/00.102 C12N5/10 C12N7/01		

F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/AA40 2G045/CB01 2G045/CB17 2G045/CB21 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/DA77 2G045/FB03 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA21 4B024/CA04 4B024/CA07 4B024/DA02 4B024/DA06 4B024/DA12 4B024/EA02 4B024/EA04 4B024/FA02 4B024/FA17 4B024/GA11 4B024/HA12 4B063/QA01 4B063/QA17 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ08 4B063/QQ43 4B063/QR08 4B063/QR42 4B063/QR56 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QX02 4B064/AG27 4B064/CA02 4B064/CA06 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA05 4B064/DA13 4B064/DA14 4B065/AA26X 4B065/AA72X 4B065/AA90X 4B065/AA93Y 4B065/AA97X 4B065/AB01 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA13 4C084/AA17 4C084/DC50 4C084/NA14 4C084/ZA361 4C084/ZA961 4C084/ZB151 4C084/ZB261 4C085/AA13 4C085/BB12 4C085/CC02 4C086/AA01 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/ZA36 4C086/ZA96 4C086/ZB15 4C086/ZB26 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA01 4H045/DA75 4H045/EA28 4H045/EA51 4H045/FA74
优先权	PCT/US1998/025108 1998-12-01 WO 60/112850 1998-12-16 US 60/115554 1999-01-12 US PCT/US1999/005028 1999-03-08 WO 60/123957 1999-03-12 US 60/131445 1999-04-28 US 60/134287 1999-05-14 US PCT/US1999/012252 1999-06-02 WO 60/141037 1999-06-23 US 60/144758 1999-07-20 US 60/145698 1999-07-26 US PCT/US1999/020111 1999-09-01 WO PCT/US1999/020594 1999-09-08 WO PCT/US1999/020944 1999-09-13 WO PCT/US1999/021090 1999-09-15 WO PCT/US1999/021547 1999-09-15 WO PCT/US1999/023089 1999-10-05 WO 60/162506 1999-10-29 US
其他公开文献	JP2005046146A5 JP3803681B2
外部链接	Espacenet

摘要(译)

公开了用于刺激或抑制哺乳动物中的血管生成和/或心血管形成的药物组合物，其使用方法等。 所述药物组合物基于针对这些用途中的一种或多种鉴定的多肽或其拮抗剂。 通过该组合物诊断，预防或治疗疾病。 疾病包括诸如伤口的创伤，各种癌症以及包括动脉粥样硬化和心脏肥大的血管疾病。 本发明涉及新颖的多肽和编码这些多肽的核酸分子，包含这些核酸序列的载体和宿主细胞，包含与异源多肽融合的本发明多肽的嵌合分子，产生了与本发明的多肽和本发明的多肽结合的抗体。 [选择图]无



特開2005
(P2005-
(43)公開日 平成17年2月24日(200

(51) Int.Cl.[7]	F I		テーマコード（参
C12N 15/09	C12N 15/00	ZNAA	2G045
A61K 31/7088	A61K 31/7088		4B024
A61K 38/00	A61K 39/395	D	4B063
A61K 39/395	A61K 39/395	N	4B064
A61K 45/00	A61K 45/00		4B065

審査請求 未請求 請求項の数 80 OL （全 200 頁） 最終

(21) 出願番号	特願2004-212340 (P2004-212340)
(22) 出願日	平成16年7月20日 (2004.7.20)
(62) 分割の表示	特願2000-584912 (P2000-584912)の分割
原出願日	平成11年11月30日 (1999.11.30)
(31) 優先権主張番号	PCT/US98/25108
(32) 優先日	平成10年12月1日 (1998.12.1)
(33) 優先権主張国	米国 (US)
(31) 優先権主張番号	60/112,850
(32) 優先日	平成10年12月16日 (1998.12.16)
(33) 優先権主張国	米国 (US)
(31) 優先権主張番号	60/115,554
(32) 優先日	平成11年1月12日 (1999.1.12)
(33) 優先権主張国	米国 (US)

(71) 出願人 596168317
ジェネンテック・インコーポレーテ
GENENTECH, INC.
アメリカ合衆国カリフォルニア・9
0－4990・サウス・サン・フラ
コ・ディーエヌエー・ウェイ・1
(74) 代理人 100109726
弁理士 園田 吉隆
(74) 代理人 100101199
弁理士 小林 義教
(72) 発明者 アシュケナジ，アヴィ，ジェー．
アメリカ合衆国 カリフォルニア
02，サン マテオ，テリー タウ
トリート 1456

最終頁に