

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マコード [*] （参考）
C 1 2 N 15/09	ZNA	A 0 1 K 67/027	2 G 0 4 5
A 0 1 K 67/027		A 6 1 K 31/7088	4 B 0 2 4
A 6 1 K 31/7088		35/12	4 B 0 6 3
35/12		35/76	4 B 0 6 5
35/76		39/395	4 C 0 8 4
審査請求 未請求 予備審査請求（全 73数） 最終頁に続く			

(21)出願番号	特願2001 - 537347(P2001 - 537347)	(71)出願人	ザ ジェネラル ホスピタル コーポレーション アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ボ ストン フルート ストリート 55
(86)(22)出願日	平成12年11月3日(2000.11.3)	(72)発明者	フィッシュマン マーク シー アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ニ ュートン センター ケンウッド アベニ ュー 43
(85)翻訳文提出日	平成14年5月7日(2002.5.7)	(72)発明者	チョン タオ アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ベ ルモント ルイス ロード 20
(86)国際出願番号	PCT/US00/30439	(74)代理人	弁理士 清水 初志 （外1名）
(87)国際公開番号	W001/034636		
(87)国際公開日	平成13年5月17日(2001.5.17)		
(31)優先権主張番号	60/163,903		
(32)優先日	平成11年11月5日(1999.11.5)		
(33)優先権主張国	米国(US)		
		最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 グリッドロック（GRIDLOCK）核酸分子、ポリペプチド、ならびに診断および治療方法

(57)【要約】
本発明は、新規遺伝子グリッドロック、および同遺伝子がコードするタンパク質を提供する。グリッドロックは、血管の発生およびモデリングにかかわり、グリッドロック上の変異は、大動脈弓の疾患である狭窄症と関連している。したがってグリッドロック核酸分子およびポリペプチドは、大動脈弓疾患などのグリッドロック関連疾患および症状の診断法、治療法、および予防法に使用することができる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 実質的に純粋なグリッドロック (gridlock) ポリペプチド。

【請求項2】 配列番号：2または配列番号：4のアミノ酸配列と実質的に同一であるアミノ酸配列を含む、請求項1記載のポリペプチド。

【請求項3】 配列番号：2または配列番号：4のアミノ酸配列を含む、請求項2記載のポリペプチド。

【請求項4】 哺乳類に由来する、請求項1記載のポリペプチド。

【請求項5】 哺乳類がヒトである、請求項4記載のポリペプチド。

【請求項6】 グリッドロックポリペプチドをコードする配列を含む、実質的に純粋な核酸分子。

【請求項7】 ヒトグリッドロックポリペプチドをコードする、請求項6記載の核酸分子。

【請求項8】 配列番号：2または配列番号：4のアミノ酸配列と実質的に同一であるアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする、請求項6記載の核酸分子。

【請求項9】 配列番号：2または配列番号：4のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする、請求項8記載の核酸分子。

【請求項10】 配列番号：1または配列番号：3のヌクレオチド配列と実質的に同一であるヌクレオチド配列を含む、請求項6記載の核酸分子。

【請求項11】 核酸分子がDNAである、請求項6記載の核酸分子。

【請求項12】 断片が少なくとも6個のアミノ酸を含み、かつ核酸分子がグリッドロック核酸分子の少なくとも一部と高ストリンジェンシー条件でハイブリダイズするが、ヘアリー (hairy) 関連タンパク質ファミリーメンバーをコードする核酸分子とは高ストリンジェンシー条件でハイブリダイズしない、グリッドロックポリペプチドまたはその断片をコードする配列と少なくとも55%の核酸配列同一性を有する核酸分子。

【請求項13】 グリッドロックポリペプチドまたは少なくとも6個のアミノ酸を含むその断片をコードする核酸分子と100%の相補性を有し、該核酸分子がグリッドロック核酸分子の少なくとも一部と高ストリンジェンシー条件でハイ

ブリダイズするが、ヘアリー関連タンパク質ファミリーメンバーをコードする核酸分子とは高ストリンジェンシー条件でハイブリダイズしない、請求項12記載の核酸分子。

【請求項14】 グリッドロックコード鎖またはその断片に対してアンチセンスである配列を含む核酸分子。

【請求項15】 アンチセンス配列が変異グリッドロックコード領域に対して特異的である、請求項14記載の核酸分子。

【請求項16】 請求項6記載の核酸分子を含むベクター。

【請求項17】 ベクターが遺伝子治療ベクターである、請求項16記載のベクター。

【請求項18】 請求項16記載のベクターを含む細胞。

【請求項19】 請求項6記載の核酸分子を含む非ヒト・トランスジェニック動物。

【請求項20】 動物がゼブラフィッシュである、請求項19記載の非ヒト・トランスジェニック動物。

【請求項21】 グリッドロックポリペプチドをコードする対立遺伝子の一つまたは双方にノックアウト変異を有する非ヒト動物。

【請求項22】 請求項21記載の非ヒトノックアウト動物からの細胞。

【請求項23】 グリッドロックポリペプチドまたはその断片をコードする配列に対して少なくとも55%の核酸配列同一性を有し、該断片が少なくとも6個のアミノ酸を含み、グリッドロック核酸分子の少なくとも一部と高ストリンジェンシー条件でハイブリダイズするが、ヘアリー関連タンパク質ファミリーメンバーをコードする核酸分子とは高ストリンジェンシー条件でハイブリダイズしない、動物のグリッドロック核酸分子を分析するプローブ。

【請求項24】 グリッドロックポリペプチドまたは少なくとも6個のアミノ酸を含むその断片をコードする核酸分子と100%の相補性を有し、グリッドロック核酸分子の少なくとも一部と高ストリンジェンシー条件でハイブリダイズするが、ヘアリー関連タンパク質ファミリーメンバーをコードする核酸分子とは高ストリンジェンシー条件でハイブリダイズしない、請求項23記載のプローブ。

【請求項25】 グリッドロックポリペプチドに特異的に結合する抗体。

【請求項26】 ポリペプチドが配列番号：2または配列番号：4のアミノ酸配列を含む、請求項25記載の抗体。

【請求項27】 グリッドロックポリペプチドに特異的に結合する抗体に試料を接触させる段階、および該ポリペプチドに対する該抗体の結合をアッセイする段階を含む、試料中のグリッドロックポリペプチドの存在を検出する方法。

【請求項28】 変異型グリッドロックポリペプチドに特異的に結合する抗体に上記の試料を接触させる段階、および該変異型ポリペプチドに対する該抗体の結合をアッセイする段階を含む、試料中の変異型グリッドロックポリペプチドの存在を検出する方法。

【請求項29】 試験被験者の核酸分子を分析して、該試験被験者がグリッドロック遺伝子に変異を含むか否かを決定する段階を含み、該変異が存在すれば、該試験被験者がグリッドロック関連疾患を発症する可能性が高まることが示される、試験被験者においてグリッドロック関連疾患または病態を発症する可能性の増大を診断する方法。

【請求項30】 ポリメラーゼ連鎖反応による核酸分子増幅のためにグリッドロック遺伝子に対して特異的な核酸分子プライマーを用いる段階をさらに含む、請求項29記載の方法。

【請求項31】 試験被験者からのグリッドロック核酸分子をシークエンシングする段階をさらに含む、請求項30記載の方法。

【請求項32】 試験被験者が哺乳類である、請求項29記載の方法。

【請求項33】 試験被験者がヒトである、請求項32記載の方法。

【請求項34】 分析する段階が、制限断片長多形（RFLP）分析によって行われる、請求項29記載の方法。

【請求項35】 疾患または病態が大動脈の縮窄、大動脈弓断続疾患またはアテローム性動脈硬化症である、請求項29記載の方法。

【請求項36】 請求項23または24記載の試験被験者の核酸分子を分析する核酸分子プローブを含む、グリッドロック核酸分子を分析するキット。

【請求項37】 試験被験者のグリッドロックタンパク質を分析する抗体を

含む、グリッドロック核酸分子を分析するキット。

【請求項38】 グリッドロック欠損症を有する被験者に、機能的グリッドロックポリペプチドをコードする核酸分子を含む発現ベクターを投与する段階を含み、該核酸分子がプロモーターに機能的に結合し、該グリッドロックポリペプチドが該グリッドロック欠損症の作用を予防または改善するために十分である、グリッドロック欠損症の作用を予防または改善する方法。

【請求項39】 グリッドロック欠損症を有する被験者に機能的グリッドロックポリペプチドを投与する段階を含み、該グリッドロックポリペプチドが、該グリッドロック欠損症の作用を予防または改善するために十分である、グリッドロック欠損症の作用を予防または改善する方法。

【請求項40】 グリッドロック過剰症を有する被験者にアンチセンスグリッドロック分子を投与する段階を含み、該アンチセンスグリッドロック分子が、該グリッドロック過剰症の作用を予防または改善するために十分である、グリッドロック過剰症の作用を予防または改善する方法。

【請求項41】 グリッドロック過剰症を有する被験者にグリッドロック抗体を投与する段階を含み、上記のグリッドロック抗体が上記のグリッドロック過剰症の上記の作用を予防または改善するために十分である、グリッドロック過剰症の作用を予防または改善する方法。

【請求項42】 グリッドロック核酸分子またはポリペプチドを化合物と接触させる段階、およびグリッドロック発現または活性に及ぼす該化合物の作用を決定する段階を含む、グリッドロック核酸分子またはポリペプチドの発現または活性を調節する化合物を同定する方法。

【発明の詳細な説明】**【0001】****連邦出資研究に関する声明**

本研究は、米国国立衛生研究所の助成金番号HL07208、R01-RR0888、R01-DK55383、およびR0-HL49579によって一部助成を受けた。政府は本発明に特定の権利を保有する可能性がある。

【0002】**発明の分野**

本発明は、心血管疾患に関する。

【0003】**発明の背景**

血管系は、形態学的および機能的に異なる血管を含む。例えば、動脈は心臓から高圧で酸素飽和した血液を運び、静脈は血液が戻るための容量血管として作用する。血管系内部の差のいくつかは機能の発現後に起こるが、躯幹動脈および静脈によって形成される完全な血管ループは、最初の心拍の拍出量を適応させるために必要である。脊椎動物胚の主要な躯幹血管、すなわち大動脈および体軸静脈は、「脈管形成」と呼ばれる過程によって、散在した中胚葉血管芽細胞が単純な内皮細胞管へと合体することによって形成され、これは新芽および再形成による血管の形成である「血管新生」とは区別される（フィッシュマン（Fishman）、「胚における血管の集合（Assembly of blood vessels in the embryos）」、リップンコット-レイブン出版社、フィラデルフィア、1996；フォークマン（Folkman）ら、Cell 87：1153～1155、1996；リサウ（Risau）、Nature 386：671～674、1997；ヤンコポロス（Yancopoulos）ら、Cell 93、661～664、1998）。

【0004】

全身の動脈ネットワークの主要な幹となる大動脈は、いくつかの先天性および後天性障害を受けやすく、それらは幼少期および成人における重度の合併症に至る可能性がある。大動脈の縮窄は、最も一般的なヒトの先天性心血管疾患の一つである。縮窄において、孤立性の局在した血管形成異常は、全身への主な動脈である下行性大動脈を部分的に閉塞し、頭部および腕に血液を供給する血管の起点

に対して遠位で起こることが最も多い。出生時では、管の閉鎖が大動脈血流に対する制限を悪化させうるために、その作用はしばしばより生理学的に重度となる。縮窄の結果として、罹患被験者は上肢および頭部では高血圧となり、体躯および脚では低血圧となる。生存はしばしば、病変部を迂回するように血液循環を容易にする側副血管の発達に依存する。

【0005】

多数の個体に影響を及ぼすもう一つの重篤な心血管疾患は、アテローム性動脈硬化症である。この病態は大規模および中規模の動脈の内膜における脂質の沈着を特徴とする。そのような沈着は繊維症および石灰化に関連している。

【0006】

グリッドロック (gridlock) 変異 (grl^{m145}) は、ゼブラフィッシュ系において同定され、ヒトにおける大動脈の縮窄に似た巣状の血管形成異常を引き起こす劣性変異である。 grl^{m145} 変異体胚では、開口血管の輪郭を描くために心臓に注入した蛍光デキストランは、2つの前方背側大動脈が融合して体躯の単一の動脈を形成する領域での背側大動脈の起点で遮断される。蛍光ビーズは頭部では正常に循環した (ワインスタイン (Weinstein) ら、Nature Medicine 1: 1143~1147、1995)。このように、 grl 変異体胚は、躯幹に対する循環を欠損する。

【0007】

発明の概要

本発明は、新規遺伝子、グリッドロックと、グリッドロック遺伝子にコードされるタンパク質とを提供する。グリッドロックは血管の発達およびモデリングにおいて役割を有し、グリッドロックにおける変異は大動脈弓疾患、縮窄に関連している。このように、グリッドロック核酸分子およびポリペプチドは、大動脈弓疾患のようなグリッドロック関連疾患および病態を診断、治療、および予防する方法において用いることができる。

【0008】

一つの局面において、本発明は、実質的に純粋なグリッドロックポリペプチドを提供する。この局面の好ましい態様において、グリッドロックポリペプチドには、配列番号：2もしくは配列番号：4のアミノ酸配列が含まれ、または配列番号

:2もしくは配列番号:4のアミノ酸配列と実質的に同一であるアミノ酸配列が含まれる。この局面の他の好ましい態様において、ポリペプチドは、哺乳類、例えばヒトに由来する。

【0009】

もう一つの局面において、本発明は、グリッドロックポリペプチドをコードする配列を含む実質的に純粋な核酸分子、例えばDNAを提供する。この局面の好ましい態様において、核酸分子はヒトグリッドロックポリペプチドをコードする。この局面の他の好ましい態様において、核酸分子は、配列番号:2もしくは配列番号:4のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードするか、または配列番号:2もしくは配列番号:4のアミノ酸配列と実質的に同一であるアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする。この局面の他の好ましい態様において、核酸分子には、配列番号:1または配列番号:3のヌクレオチド配列と実質的に同一であるヌクレオチド配列が含まれる。

【0010】

関連する局面において、本発明は、断片が少なくとも6個のアミノ酸を含み、核酸分子がグリッドロック核酸分子の少なくとも一部と高ストリンジェンシー条件でハイブリダイズするが、ヘアリー(hairy)関連タンパク質ファミリーメンバーをコードする核酸分子とは高ストリンジェンシー条件でハイブリダイズしない、グリッドロックポリペプチドまたはその断片をコードする配列と少なくとも55%の核酸配列同一性を有する核酸分子を提供する。この局面の好ましい態様において、核酸分子は、グリッドロックポリペプチドまたは少なくとも6個のアミノ酸を含むその断片をコードする核酸分子と100%の相補性を有し、核酸分子はグリッドロック核酸分子の少なくとも一部と高ストリンジェンシー条件でハイブリダイズするが、ヘアリー関連タンパク質ファミリーメンバーをコードする核酸分子とは高ストリンジェンシー条件でハイブリダイズしない。

【0011】

関連する局面において、本発明は、グリッドロックコード鎖またはその断片に対してアンチセンスである配列を含む核酸分子を提供する。この局面の好ましい態様において、アンチセンス配列は変異グリッドロックコード領域に対して特異

的である。

【0012】

もう一つの関連する局面において、本発明は、ベクター、例えばグリッドロック核酸分子を含む遺伝子治療ベクターおよびこのベクターを含む細胞を提供する。

【0013】

他の局面において、本発明は、グリッドロック核酸分子を含む、例えばゼブラフィッシュ等の非ヒト・トランスジェニック動物、およびグリッドロックポリペプチドをコードする対立遺伝子の一つまたは双方にノックアウト変異を有する非ヒト動物を提供する。本発明はまた、グリッドロックポリペプチドをコードする対立遺伝子の一つまたは双方にノックアウト変異を有する非ヒト動物からの細胞をも提供する。

【0014】

他の局面において、本発明は、グリッドロックポリペプチドまたはその断片をコードする配列と少なくとも55%の核酸配列同一性を有し、動物のグリッドロック核酸分子を分析するプローブを提供する。断片には少なくとも6個のアミノ酸が含まれ、プローブは、グリッドロック核酸分子の少なくとも一部と高ストリンジエンシー条件でハイブリダイズするが、ヘアリー関連タンパク質ファミリーメンバーをコードする核酸分子とは高ストリンジエンシー条件でハイブリダイズしない。好ましい態様において、プローブは、グリッドロックポリペプチドまたは少なくとも6個のアミノ酸を含むその断片をコードする核酸分子と100%の相補性を有し、グリッドロック核酸分子の少なくとも一部と高ストリンジエンシー条件でハイブリダイズするが、ヘアリー関連タンパク質ファミリーメンバーをコードする核酸分子とは高ストリンジエンシー条件でハイブリダイズしない。

【0015】

もう一つの局面において、本発明は、グリッドロックポリペプチド、例えば配列番号：2または配列番号：4のアミノ酸配列を含むポリペプチドに対して特異的に結合する抗体を提供する。

【0016】

もう一つの局面において、本発明は、試料中のグリッドロックポリペプチドの存在を検出する方法を提供する。方法は、グリッドロックポリペプチドに対して特異的に結合する抗体に試料を接触させる段階、およびポリペプチドに対する抗体の結合をアッセイする段階を含む。

【0017】

もう一つの局面において、本発明は、試料中の変異型グリッドロックポリペプチドの存在を検出する方法を提供する。方法は、変異型グリッドロックポリペプチドに対して特異的に結合する抗体に試料を接触させる段階、および変異型ポリペプチドに対する抗体の結合をアッセイする段階を含む。

【0018】

もう一つの局面において、本発明は、試験被験者においてグリッドロック関連疾患または病態を発症する可能性の増大を診断する方法を提供する。方法は、被験者がグリッドロック遺伝子に変異を含むか否かを決定するために、試験被験者の核酸分子を分析する段階を含む。変異が存在すれば、試験被験者がグリッドロック関連疾患を発症する可能性が増大していることの指標である。この局面の好ましい態様において、試験被験者は哺乳類、例えばヒトである。この局面の他の好ましい態様において、方法には、ポリメラーゼ連鎖反応による核酸分子増幅のためにグリッドロック遺伝子に対して特異的な核酸分子プライマーを用いる段階が含まれるか、または試験被験者からのグリッドロック核酸分子をシークエンシングする段階が含まれる。この局面のもう一つの好ましい態様において、分析する段階は、制限断片長多形（RFLP）分析によって行われる。この局面のもう一つの好ましい態様において、疾患または病態は、大動脈の縮窄、大動脈弓断続疾患、またはアテローム性動脈硬化症である。

【0019】

もう一つの局面において、本発明は、グリッドロック核酸分子を分析するキットを提供する。キットには、試験被験者のグリッドロック核酸分子を分析する核酸プローブが含まれる。

【0020】

もう一つの局面において、本発明は、グリッドロック核酸分子を分析するキッ

トを提供する。キットには、試験被験者のグリッドロックタンパク質を分析する抗体が含まれる。

【0021】

もう一つの局面において、本発明は、グリッドロック欠損症を有する被験者に、機能的グリッドロックポリペプチドをコードする核酸分子を含む発現ベクターを投与することによって、グリッドロック欠損症の作用を予防または改善する方法を提供する。核酸分子はプロモーターに機能的に結合し、グリッドロックポリペプチドは、グリッドロック欠損症の作用を予防または改善するために十分である。

【0022】

関連する局面において、本発明は、グリッドロック欠損症を有する被験者に機能的グリッドロックポリペプチドを投与することによって、グリッドロック欠損症の作用を予防または改善する方法を提供する。グリッドロックポリペプチドは、グリッドロック欠損症の作用を予防または改善するために十分である。

【0023】

さらなる局面において、本発明は、グリッドロック過剰症を有する被験者にアンチセンスグリッドロック分子を投与することによって、グリッドロック過剰症の作用を予防または改善する方法を提供する。アンチセンスグリッドロック分子はグリッドロック過剰症の作用を予防または改善するために十分である。

【0024】

関連する局面において、本発明は、グリッドロック過剰症を有する被験者にグリッドロック抗体を投与することによって、グリッドロック過剰症の作用を予防または改善する方法を提供する。グリッドロック抗体は、グリッドロック過剰症の作用を予防または改善するために十分である。

【0025】

もう一つの局面において、本発明は、グリッドロック核酸分子またはポリペプチドの発現または活性を調節する化合物を同定する方法を提供する。方法は、グリッドロック核酸分子またはポリペプチドを化合物に接触させる段階、およびグリッドロック発現または活性に及ぼす化合物の作用を決定する段階を含む。

【0026】

「ポリペプチド」または「ポリペプチド断片」とは、如何なる翻訳後改変（例えば、グリコシル化またはリン酸化）にかかわらず、自然界に存在するまたは自然界に存在しないポリペプチドの全てまたは一部を構成する二つまたはそれ以上のアミノ酸の鎖を意味する。「翻訳後改変」とは、合成の際または合成後のポリペプチドまたはポリペプチド断片に対する如何なる変化も意味する。翻訳後改変は、（細胞内での合成の際に）自然に起こりうるか、または（組換えまたは化学的手段によって）人工的に作製しうる。「タンパク質」は、一つまたはそれ以上のポリペプチドで構成されうる。

【0027】

「グリッドロック」、「グリッドロックタンパク質」、または「グリッドロックポリペプチド」とは、図2に示すヒトまたはゼブラフィッシュのグリッドロックポリペプチドの配列（それぞれ、配列番号：2および配列番号：4）と少なくとも45%、好ましくは少なくとも60%、より好ましくは少なくとも75%、および最も好ましくは少なくとも90%のアミノ酸配列同一性を有するポリペプチドを意味する。図2に示すヒトまたはゼブラフィッシュのグリッドロックポリペプチド（それぞれ配列番号：2および配列番号：4）のbHLHと少なくとも85%のアミノ酸同一性を有するか、またはオレンジ（Orange）ドメインと少なくとも55%のアミノ酸同一性を有するポリペプチドは、グリッドロックポリペプチドであるとみなしうる。最も好ましくは、そのようなポリペプチドは、図2に示すヒトまたはゼブラフィッシュのグリッドロックポリペプチド（それぞれ配列番号：2および配列番号：4）のbHLHドメインと少なくとも95%のアミノ酸同一性を有するか、またはオレンジドメインと少なくとも90%のアミノ酸同一性を有する。グリッドロック遺伝子配列のスプライシング変種および変異（例えば、*grl*^{m145}変異）を含むグリッドロック遺伝子からのポリペプチド産物もまたこの定義に含まれる。好ましくは、グリッドロックポリペプチドは、「YRPW」モチーフを含む。本明細書において定義するように、グリッドロックポリペプチドは、血管の発達およびモデリングにおいて役割を有する。これは、脈管形成または血管芽細胞の運命決定の初期マーカーとして用いることができると共に、発達期の後期または成人におけ

る動脈特異的、例えば大動脈特異的マーカーとして用いることができる。

【0028】

「グリッドロック核酸分子」とは、上記のようにグリッドロック、グリッドロックタンパク質、グリッドロックポリペプチド、またはその一部をコードするゲノムDNA、cDNA、またはRNA（例えば、mRNA）分子のような核酸分子を意味する。

【0029】

「同一性」という用語は、本明細書において、同じタイプの参照分子の配列に対する特定の核酸分子またはポリペプチドの配列の関係を記述するために用いられる。例えば、並置した参照分子と比較して、ポリペプチドまたは核酸分子が所定の位置で同じアミノ酸またはヌクレオチド残基を有する場合、その位置で「同一」とであると言われる。参照分子に対する核酸分子またはポリペプチドの配列同一性のレベルは典型的に、最適な配置を得るためのギャップの導入のような、そこに明記されたデフォルトパラメータを用いて、配列分析ソフトウェア（例えば、ウィスコンシン大学バイオテクノロジーセンターのジェネティクスコンピューターグループの配列分析ソフトウェアパッケージ、1710 University Avenue, Madison, WI 53705、BLAST、またはPILEUP/PRETTYBOXプログラム）を用いて測定される。これらのソフトウェアプログラムは、様々な置換、欠失、または他の改変に同一性の程度を割付することによって同一または類似の配列を整合させる。保存的置換には典型的に、以下のグループ内での置換が含まれる：グリシン、アラニン、バリン、イソロイシン、およびロイシン；アスパラギン酸、グルタミン酸、アスパラギン、およびグルタミン；セリンおよびトレオニン；リジンおよびアルギニン；ならびにフェニルアラニンおよびチロシン。

【0030】

核酸分子またはポリペプチドは、それが、参照分子の配列に対してその全長にわたって少なくとも51%、好ましくは少なくとも55%、60%、または65%、および最も好ましくは75%、85%、90%、または95%の同一性を示す場合に、参照分子に対して「実質的に同一」とであると言われる。ポリペプチドに関して、比較配列の長さは少なくとも16個のアミノ酸、好ましくは少なくとも20個のアミノ酸、より好ましくは少なくとも25個のアミノ酸、および最も好ましくは少なくとも35

個のアミノ酸である。核酸分子に関して、比較配列の長さは、少なくとも50ヌクレオチド、好ましくは少なくとも60ヌクレオチド、より好ましくは少なくとも75ヌクレオチド、および最も好ましくは少なくとも110ヌクレオチドである。

【0031】

グリッドロック核酸分子またはグリッドロックポリペプチドは、その生物活性の決定、またはそれが野生型であるか、もしくは変異しているかの決定する試験技法が実施された場合に、「分析される」か、または「分析」に供される。例えば、ポリメラーゼ連鎖反応を用いて動物のゲノムDNAを増幅し、次に、例えばヌクレオチド配列または制限断片分析によって、増幅されたDNAが変異を含むか否かを決定することで、動物（例えばヒトまたはゼブラフィッシュ）のグリッドロック遺伝子を分析することができる。

【0032】

「プローブ」または「プライマー」は、相補的配列（「標的」）を含む第二のDNAまたはRNA分子と塩基対を形成することができる規定の配列の一本鎖DNAまたはRNA分子を意味する。得られたハイブリッドの安定性は、起こる塩基対形成の程度に依存する。この安定性は、プローブと標的分子との相補性の程度、およびハイブリダイゼーション条件のストリンジェンシーの程度のようなパラメータによって影響を受ける。ハイブリダイゼーションストリンジェンシーの程度は、温度、塩濃度、およびホルムアミド等の有機分子の濃度のようなパラメータによって影響を受け、当業者に周知の方法によって決定される。グリッドロック核酸分子に対して特異的なプローブまたはプライマーは、好ましくは配列番号：1または配列番号：3と呼ばれる配列と45%以上の配列同一性、より好ましくは少なくとも55～75%の配列同一性、さらにより好ましくは少なくとも75～85%の配列同一性、さらにより好ましくは少なくとも85～99%の配列同一性、および最も好ましくは100%の配列同一性を有する。プローブは、当業者に周知である方法によって検出可能に、放射活性または非放射活性標識することができる。プローブは、核酸シーケンシング、ポリメラーゼ連鎖反応による核酸増幅、一本鎖構造多形（SSCP）分析、制限断片多形（RFLP）分析、サザンハイブリダイゼーション、ノーザンハイブリダイゼーション、インサイチュハイブリダイゼーション、電

気泳動移動度シフトアッセイ (EMSA) 法、および当業者に周知の他の方法のような、核酸ハイブリダイゼーションを含む方法のために用いることができる。

【0033】

分子、例えば、オリゴヌクレオチドプローブもしくはプライマー、遺伝子もしくはその断片、cDNA分子、ポリペプチド、または抗体は、その存在が試料中で直接同定されうるように標識される場合に、「検出可能に標識」されることができる。分子を検出可能に標識する方法は当技術分野で周知であり、放射活性標識 (例えば、 ^{32}P または ^{35}S のような同位元素)、および非放射活性標識 (例えば、フルオレセインのような蛍光標識) が含まれるがこれらに限定されない。

【0034】

「実質的に純粋なポリペプチド」とは、それが天然に伴うタンパク質および有機分子から分離されているポリペプチド (またはその断片) を意味する。典型的に、ポリペプチドは、それが天然に会合しているタンパク質および天然に存在する有機分子を重量で少なくとも60%含まない場合に実質的に純粋である。好ましくは、ポリペプチドは、重量で少なくとも75%、より好ましくは少なくとも90%、および最も好ましくは少なくとも99%純粋であるグリッドロックポリペプチドである。実質的に純粋なグリッドロックポリペプチドは、例えば天然資源からの抽出 (例えば、単離された大動脈または血管組織)、グリッドロックポリペプチドをコードする組換え核酸分子の発現、または化学合成によって得ることができる。純度は適当な方法、例えばカラムクロマトグラフィー、ポリアクリルアミドゲル電気泳動、またはHPLC分析によって測定することができる。

【0035】

ポリペプチドは、それがその天然の状態でそれが伴うタンパク質および有機分子から分離されている場合に、天然に会合する分子を実質的に含まない。このように、化学合成された、またはそれが天然に産生される細胞とは異なる細胞系において産生されたタンパク質は、その天然に会合する成分を実質的に含まない。したがって、実質的に純粋なポリペプチドには、真核生物に由来するポリペプチドが含まれるのみならず、大腸菌またはその他の原核生物で合成されたポリペプチドも含まれる。

【0036】

抗体は、それが、試料、例えば天然にポリペプチドを含む生体試料において、ポリペプチド（例えば、グリッドロックポリペプチド）を認識して結合するが、他の分子（例えば、非グリッドロック関連ポリペプチド）を実質的に認識せず、結合しなければ、ポリペプチドに対して「特異的に結合する」と言われる。

【0037】

「高ストリンジェンシー条件」とは、0.5 M NaHPO_4 、pH 7.2、7 % SDS、1 mM EDTA、および1 % BSA（分画V）を含む緩衝液において65 °Cで、または48 %ホルムアミド、4.8 × SSC、0.2 M トリス-Cl、pH 7.6、1 × デンハルツ溶液、10 % 硫酸デキストラン、および0.1 % SDSを含む緩衝液中で42 °Cで、少なくとも500ヌクレオチド長のDNAプローブを用いて起こるハイブリダイゼーションと同等のハイブリダイゼーションを可能にする条件を意味する。（これらは、高ストリンジェンシーノーザンまたはサザンハイブリダイゼーションの典型的な条件である）。高ストリンジェンシーハイブリダイゼーションはまた、高ストリンジェンシーPCR、DNAシーケンシング、一本鎖構造多形分析およびインサイチュールハイブリダイゼーションのような、分子生物学者によって日常的に行われる多数の技術の成功に依存する。ノーザンおよびサザンハイブリダイゼーションとは対照的に、これらの技法は通常比較的短いプローブを用いて行われる（例えば、PCRまたはシーケンシングに関しては通常16ヌクレオチドまたはそれ以上、およびインサイチュールハイブリダイゼーションに関しては40ヌクレオチドまたはそれ以上）。これらの技術において用いられる高ストリンジェンシー条件は、分子生物学の当業者に周知であり、その例は例えば、参照として本明細書に組み入れられる、アウスユベール（Ausubel）ら、「分子生物学の最新プロトコール（Current Protocols in Molecular Biology）」、ジョン・ウィリー＆サンズ、ニューヨーク州ニューヨーク、1998に見ることができる。

【0038】

「トランスジーン」とは、細胞（例えば、細胞の核ゲノム）に人工的に挿入され、細胞から発達する生物のゲノムに組み入れられたDNA分子を意味する。そのようなトランスジーンは、トランスジェニック生物に対して部分的にもしくは完

全に異種（すなわち異物）となりうる、または生物の内因性遺伝子に対して同種である遺伝子となりうる。生物または動物（例えば、マウス、ラット、またはヤギのような哺乳類）は、それが人工的に挿入されたトランスジーンを有する細胞から発達すれば、「トランスジェニック」であると言うことができる。

【0039】

「ノックアウト変異」とは、変異していない遺伝子と比較してそれらから通常コードされたポリペプチドの生物活性を少なくとも80%減少させる核酸分子における人工的に誘発された変化（組換えDNA技術または変異誘発物質に対する故意の曝露によって作製された）を意味する。変異は挿入、欠失、フレームシフト変異、またはミスセンス変異となりうるがこれらに限定しない。「ノックアウト動物」は、好ましくは上記のようにノックアウト変異を含む哺乳類であり、より好ましくはマウスである。

【0040】

「形質転換」とは、外来分子（例えば、核酸分子）を細胞に導入する如何なる方法をも意味する。リポフェクション、DEAE-デキストラン媒介トランスフェクション、マイクロインジェクション、プロトプラスト融合、リン酸カルシウム沈殿、レトロウイルス輸送、電気穿孔、およびバイオリスティック形質転換は、本発明において用いることができる当業者に周知の多くの形質転換方法のごく一部に過ぎない。例えば、バイオリスティック形質転換は、タングステンまたは金粒子のような速度駆動微小弾丸を用いて細胞に外来分子を導入する方法である。そのような方法は、ヘリウム駆動、空気駆動、および火薬駆動技術を含みうる。バイオリスティック形質転換は、広く多様な細胞型、細胞内オルガネラ、ならびにミトコンドリア、葉緑体、細菌、酵母、真菌、藻類、動物組織、および培養組織を含むがこれらに限定されない無傷の組織の形質転換またはトランスフェクションに適用することができる。

【0041】

「形質転換細胞」、「トランスフェクトした細胞」、または「形質導入細胞」とは、ポリペプチドをコードするDNA分子が組換えDNA技術によって導入されている細胞（または細胞の子孫）を意味する。

【0042】

「プロモーター」とは、転写を指示するために十分な最小の核酸配列エレメントを意味する。望まれる場合、本発明の構築物は、細胞タイプ特異的、組織特異的、もしくは時間特異的に制御可能な、または外来シグナルもしくは物質によって誘導可能なプロモーター依存的遺伝子発現を与えるために十分であるプロモーターエレメントを含みうる。そのようなエレメントは遺伝子の5'、3'、またはイントロン領域に存在しうる。

【0043】

「機能的に結合した配列」とは、適当な分子（例えば、転写活性化タンパク質）が調節配列に結合すると遺伝子の発現を可能にするように、遺伝子と一つまたはそれ以上の調節配列とが結合していることを意味する。

【0044】

本明細書において核酸分子に関して用いられる「アンチセンス分子」とは、グリッドロック遺伝子のような遺伝子のコード鎖の少なくとも75ヌクレオチド、好ましくは少なくとも100ヌクレオチド、150ヌクレオチド、または200ヌクレオチドと相補的である配列を有する核酸分子を意味する。アンチセンス核酸分子は例えば、変異型グリッドロック遺伝子によってコードされる変異型グリッドロックポリペプチドの産生を選択的に低下させることができる。

【0045】

「ミスセンス変異」とは、得られた新しいコドンが野生型コドンによって当初コードされたアミノ酸とは異なるアミノ酸をコードするように、核酸分子内で一つのプリンまたはピリミジン塩基（すなわち、A、T、G、またはC）が別の塩基に置換されていることを意味する。

【0046】

「フレームシフト変異」とは、ポリヌクレオチドコード配列内で少なくとも一つのヌクレオチドの挿入または欠失を意味する。フレームシフト変異は、変異部位で、または変異部位から下流でのコドン読みとり枠を変化させる。そのような変異の結果、コードされた野生型アミノ酸配列が新規アミノ酸配列に置換されるか、または停止コドンの形成によりコードされたポリペプチドの未成熟な停止、

またはその両者が起こる。

【0047】

「試料」とは、患者または試験被験者から得た組織生検、羊水、細胞、血液、血清、尿、便、またはその他の標本を意味する。試料は、当技術分野で既知の方法によって、グリッドロック遺伝子における変異、またはグリッドロック遺伝子の発現レベルを検出するために分析することができる。例えば、患者の試料に由来するPCR産物のシーケンシング、一本鎖構造多形（SSCP）分析、または制限断片長多形（RFLP）分析を用いてグリッドロック遺伝子における変異を検出することができ、ELISAを用いてグリッドロックポリペプチドのレベルを測定することができ、およびPCRを用いてグリッドロック核酸分子のレベルを測定することができる。

【0048】

「グリッドロック関連疾患」または「グリッドロック関連病態」とは、グリッドロック遺伝子の不適當に高いもしくは低い発現、またはグリッドロック核酸分子もしくはポリペプチドの生物活性を変化させるグリッドロック遺伝子の変異が原因で起こる疾患または病態を意味する。グリッドロック関連疾患および病態は、グリッドロックが出生前または出生後のあいだに発現される如何なる血管組織においても生じうる。グリッドロック関連疾患および病態は先天性心血管疾患（例えば、先天性異形態発生）、およびアテローム性動脈硬化症のような成人期に発症する心血管疾患を含みうる。「先天性心血管疾患」とは、心臓または血管の異常な形成に関連した疾患を意味する。先天性心血管疾患、例えば大動脈弓断続疾患または大動脈縮窄のような大動脈弓疾患を有する患者は、大動脈の収縮を示す可能性がある。

【0049】

本発明はいくつかの長所を提供する。例えば、血管の形成異常または機能障害によって引き起こされた疾患の診断および治療において用いることができる方法および試薬を提供する。これらの障害は、大動脈弓断続疾患、大動脈弓疾患、例えば大動脈の縮窄のような先天性の心血管疾患、ならびにアテローム性動脈硬化症、高血圧症、および冠動脈疾患のような成人期に起こる心血管疾患が含まれる

。これらの障害は、例えば低分子治療、遺伝子治療、アンチセンスオリゴヌクレオチド治療、およびタンパク質補充治療を含む多様な方法で、本明細書に記載の方法を用いて治療することができる。さらに、本発明の核酸分子およびポリペプチドは、診断/疾患管理応用を有する、例えば心血管疾患の予後的マーカーまたは素因指標としての用途を有する。

【0050】

本発明のその他の特徴および長所は、本発明の詳細な説明、図面、および請求の範囲から明らかとなるであろう。

【0051】

発明の詳細な説明

本発明は、血管の発達およびモデリングにおいて役割を有するグリッドロック遺伝子、これらの遺伝子によってコードされるポリペプチド、これらの遺伝子に関連する核酸分子（下記参照）、ならびにこれらの遺伝子、ポリペプチド、および核酸分子を用いる診断および治療方法を提供する。本発明はまた、グリッドロック遺伝子およびポリペプチドの生物活性を調節する化合物を同定する方法、およびこれらの化合物を用いる治療方法を提供する。

【0052】

本発明の診断、治療、およびスクリーニング方法を最初に説明し、その後これらの方法を実行する場合に用いることができる一般的アプローチを説明する。最後に、本発明の方法の根拠となる実験結果を説明する。

【0053】

グリッドロック核酸分子、ポリペプチド、および抗体を用いる診断方法

グリッドロック核酸分子、ポリペプチド、および抗体は、グリッドロック遺伝子における変異またはその不適当な発現を含む疾患および病態を診断またはモニターする方法において用いることができる。上記のように、ゼブラフィッシュにおけるグリッドロック変異は、それによって異常に長いグリッドロックポリペプチドの翻訳が起こるが、これはヒトにおける縮窄と類似の表現型を特徴とする。このように、グリッドロック遺伝子またはその発現における異常の検出は、ヒトの動脈弓断続または縮窄のような大動脈弓疾患の治療また発達を診断またはモニ

ターする方法において用いることができる。グリッドロックはまた、アテローム性動脈硬化症のような大動脈弓疾患以外の心血管疾患において役割を有する可能性があり、このように、グリッドロック遺伝子またはその発現における異常の検出は、これらの病態を診断およびモニターする方法においても同様に用いることができる。

【0054】

本発明の診断方法は、例えば、その病因を決定する、そしてこのように適当な治療コースの選択を容易にする努力において、大動脈弓疾患を有する患者に用いることができる。診断方法はまた、大動脈疾患をまだ発症していないがそのような疾患を発症するリスクを有する可能性がある患者、またはそのような疾患を発症する初期段階にある患者について用いることができる。多くの大動脈弓疾患が発達の際に起こり、このように、本発明の診断方法は、発達の際に胎児または胚について行うことができる。同様に、本発明の診断方法は、例えば、劣性のグリッドロック変異の保有者である可能性がある親を特定するための出生前遺伝子スクリーニングにおいて用いることができる。

【0055】

本発明の診断方法を用いて検出することができるグリッドロック異常は、例えば、(i) 異常なグリッドロックポリペプチド（例えば、異常に長いグリッドロックポリペプチド）、(ii) そのようなポリペプチドが産生される変異を含むグリッドロック遺伝子、および(iii) グリッドロックの異常な量の産生が起こるグリッドロック変異、を特徴とする異常が含まれる。このように、そのような異常の検出は、縮窄のようなヒト大動脈弓疾患、またはアテローム性動脈硬化症を診断する方法において用いることができる。

【0056】

患者の試料におけるグリッドロック発現レベルは、当技術分野で周知の多くの標準的ないかなる技術も用いることによって決定することができる。例えば、患者からの生体試料（例えば、血液もしくは組織試料、または羊水）におけるグリッドロック発現は、標準的ノーザンブロット分析または定量的PCRによってモニターすることができる（例えば、アウスユベール（Ausubel）ら、上記、「PCR技

術：DNA増幅の原理と応用（PCR Technology：Principles and Applications for DNA Amplification）」、エールリッヒ（H.A. Ehrlich）編、ストックトン出版、ニューヨーク州；ヤップ（Yap）ら、Nucl. Acids. Res. 19、4294、1991を参照のこと）。

【0057】

患者から得た生体試料はミスマッチ検出アプローチを用いてグリッドロック核酸分子における一つまたはそれ以上の変異に関して分析することができる。一般的に、このアプローチは患者の試料からの核酸のPCR増幅、その後変化したハイブリダイゼーションの検出による変異の同定（すなわち、ミスマッチ）、異常な電気泳動ゲル移動、結合、もしくはミスマッチ結合タンパク質によって媒介される切断、または直接核酸分子シーケンシングを含む。これらの技術の如何なるものも変異型グリッドロック遺伝子の検出を容易にするために用いることができ、それぞれが当技術分野で周知である。これらの技術の例は例えば、オリタ（Orita）ら（Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86：2766～2770、1989）、およびシェフィールド（Sheffield）ら（Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86：232～236、1989）によって記載される。

【0058】

ミスマッチ検出アッセイはまた、症状の発現前に疾患に対するグリッドロック媒介素因を診断する機会を提供する。例えば、正常なグリッドロック生物活性または発現を抑制するグリッドロック変異に関してヘテロ接合である患者は、グリッドロック関連疾患の臨床症状を示さない可能性があるが、なおも心血管疾患を発症する確率は正常より高い。そのような診断が仮定されれば、患者は、有害な環境因子に対する曝露を最小限にする、およびその医学疾患を注意深くモニターするように予防することができる（例えば、頻繁な検査によって）。上記のように、このタイプの診断アプローチはまた、出生前スクリーニングにおいてグリッドロック変異を検出するためにも用いることができる。

【0059】

上記のグリッドロック診断アッセイは、グリッドロックが通常発現されている如何なる生体試料（例えば、血液もしくは組織試料、または羊水）を用いて行う

ことができる。変異型グリッドロック遺伝子の同定はまた、これらの試験試料源を用いてアッセイすることができる。または、特にグリッドロック関連疾患に対する素因に関する診断の一部として、例えばミスマッチ検出技術によって、如何なる細胞からのDNA試料も用いるために、グリッドロック変異を調べることができる。好ましくは、分析の前にDNA試料にPCR増幅を行う。

【0060】

本発明のさらにもう一つの診断アプローチにおいて、イムノアッセイを用いて、生体試料中のグリッドロックタンパク質発現を検出またはモニターする。グリッドロック特異的ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体（下記のように産生する）は、グリッドロックポリペプチドレベルを測定するために、如何なる標準的なイムノアッセイフォーマット（例えば、ELISA、ウェスタンブロット、またはRIA、例えばアウスユベール（Ausubel）ら、上記を参照のこと）においても用いることができる。これらのレベルを野生型グリッドロックレベルと比較する。例えば、グリッドロック産生が減少すれば、心血管疾患のような不十分なグリッドロック生物活性を含む病態または病態に対する素因を示す可能性がある。

【0061】

免疫組織化学技術もまた、グリッドロック検出のために用いることができる。例えば、組織試料を患者から得て、切片にし、抗グリッドロック抗体および標準的な検出系（例えば、ホースラディッシュペルオキシダーゼに結合した第二抗体を含む系）を用いてグリッドロックの存在に関して染色することができる。そのような技術に関する一般的な手引きは、例えばバンクcroft（Bancroft）らの「組織学的技術の理論と実践（Theory and Practice of Histological Techniques）」、チャーチルリビングストン、1982、およびアウスユベール（Ausubel）ら、上記に見ることができる。

【0062】

好ましい例において、グリッドロックタンパク質産生の評価を含む複合診断法を用いることができる（例えば、免疫学的技術またはタンパク質切断試験（ホゲロースト（Hogerrorst）ら、Nature Genetics 10：208～212、1995）、およびより軽微なグリッドロック変異（例えば、点突然変異）を同定するようにデザイン

された核酸分子に基づく検出技術によって)。上記のように、多くのミスマッチ検出アッセイが当業者に利用でき、如何なる好ましい技術も用いることができる。その結果グリッドロック発現の喪失または正常なグリッドロック生物活性の喪失のいずれかが起こるグリッドロックにおける変異を検出することができる。

【0063】

グリッドロック核酸分子、ポリペプチド、および抗体を用いる治療方法

本発明には、グリッドロック関連疾患を治療または予防する方法が含まれる。上記のように、グリッドロック変異の結果、発達の初期において縮窄のような大動脈弓疾患が起こる可能性がある。このように、本発明の治療方法は、場合によっては出生前治療に向けてもよい。例えば、グリッドロック変異を有することが判明した胎児に、正常なグリッドロック遺伝子または正常なグリッドロックタンパク質を含む遺伝子治療ベクターを投与することが可能である(下記参照)。そのような治療は、ごく短期間必要であるに過ぎないか、または場合によっては患者の一生の間必要である可能性がある。しかし、治療が継続的に必要であるか否かは、例えば上記の診断方法を用いて決定することができる。同様に、上記のように、グリッドロック異常は成人における疾患(例えば、大動脈弓疾患およびアテローム性動脈硬化症)に関連する可能性があり、したがって成人にも本発明の治療方法を行うことができる。これらの方法を用いて血管の増殖を促進することができるが、これは、例えば、創傷治癒において望ましい可能性がある。

【0064】

治療は、グリッドロック遺伝子欠損症、または不適當もしくは過剰なグリッドロック遺伝子発現を迂回または克服し、このように、グリッドロック遺伝子またはタンパク質における欠損を含む病態を調節して軽減しうるようにデザインすることができる。様々な治療を考慮すると、そのような治療は、好ましくは罹患臓器、またはおそらく罹患している臓器、例えば大動脈に向けられると理解される。グリッドロック生物活性を調節するために用いることができる試薬は、完全長のグリッドロックポリペプチド；グリッドロックDNA、mRNA、またはアンチセンスRNA；グリッドロック抗体；およびグリッドロック生物活性、発現、または安定性を調節する如何なる化合物も含みうるがこれらに限定されない(下記参照)

。

【0065】

変異グリッドロック遺伝子に起因する疾患の治療または予防は、例えば変異型グリッドロック遺伝子を正常なグリッドロック遺伝子に置換する段階、正常なグリッドロック遺伝子を投与する段階、変異型グリッドロックタンパク質の機能を調節する段階、正常なグリッドロックタンパク質を適当な細胞に輸送する段階、または正常もしくは変異型グリッドロックタンパク質のレベルを変化させる段階によって、行うことができる。同様に、グリッドロックタンパク質が関与する生理的経路（例えば、シグナル伝達経路）を改変するようにグリッドロック欠損を修正することが可能である。

【0066】

変異体タンパク質を正常タンパク質に置換するために、または十分なもしくは正常なグリッドロックタンパク質を発現しない細胞にタンパク質を加えるために、タンパク質が発現される培養細胞系から純粋なグリッドロックタンパク質の大量を得る必要がありうる（例えば、下記参照）。次に、罹患組織へのタンパク質の輸送は、適当なパッケージングまたは投与系を用いて行うことができる。または、グリッドロックアゴニストまたはアンタゴニストとして作用する低分子類似体を投与して所望の生理作用を得ることができる（下記参照）。

【0067】

遺伝子治療は、グリッドロック遺伝子欠損によって引き起こされる疾患を予防または改善するためのもう一つの治療アプローチである。野生型グリッドロックをコードする核酸分子を、十分な正常グリッドロック生物活性を欠損する細胞（例えば、グリッドロック遺伝子に変異を有する細胞）に輸送することができる。核酸分子は、それらが細胞に取り込まれる形で、そして有効なグリッドロック機能を提供するために十分なレベルのタンパク質が産生されうるように、それらの細胞に輸送しなければならない。または、いくつかのグリッドロック変異に関して、結果として生じた疾患の進行を遅らせること、またはその遺伝子において第二の変異を有する相同遺伝子のもう一つのコピーを導入することによってグリッドロック活性を調節する、変異を変化させる、または如何なる負の作用も遮断す

ることが可能であるかも知れない。

【0068】

形質導入するレトロウイルス、アデノウイルス、およびアデノ随伴ウイルスベクターは、特にそれらの感染、安定な組み込みおよび発現の効率が高いことから、体細胞遺伝子治療に用いることができる。(例えば、カヨエッテ (Cayouette) ら、Human Gene Therapy 8 : 423 ~ 430、1997 ; キド (Kido) ら、Current Eye Research 15 : 833 ~ 844、1996 ; ブルーマー (Bloomer) ら、Journal of Virology 71 : 6641 ~ 6649、1997 ; ナルディニ (Naldini) ら、Science 272、263 ~ 267、1996 ; およびミヨシ (Miyoshi) ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94 : 10319 ~ 10322、1997)。例えば、完全長のグリッドロック遺伝子またはその一部をレトロウイルスベクターにクローニングして、その内因性プロモーターから、レトロウイルス長末端反復から、または関係する標的細胞タイプに特異的なプロモーターから発現を開始させることができる。用いることができるその他のウイルスベクターには、例えば、エプスタイン・バーウイルスのようなワクシニアウイルス、ウシ乳頭腫ウイルス、またはヘルペスウイルスが含まれる(同様に、例えばミラー (Miller)、Human Gene Therapy 15 ~ 14、1990 ; フリードマン (Friedman)、Science 244、1275 ~ 1281、1989 ; エグリティス (Eglitis) ら、BioTechniques 6 : 608 ~ 614、1988 ; トルストシェフ (Tolstoshev) ら、Current Opinion in Biotechnology 1 : 55 ~ 61、1990 ; シャープ (Sharp)、The Lancet 337 : 1277 ~ 1278、1991 ; コルネッタ (Cornetta) ら、Nucleic Acid Research and Molecular Biology 36 : 311 ~ 322、1987 ; アンダーソン (Anderson)、Science 226 : 401 ~ 409、1984 ; モーン (Moen)、Blood Cells 17 : 407 ~ 416、1991 ; ミラー (Miller) ら、BioTechnology 7 : 980 ~ 990、1989 ; レガルラサル (Le Gal La Salle) ら、Science 259 : 988 ~ 990、1993 ; およびジョンソン (Johnson)、Chest 107 : 77S ~ 83S、1995を参照のこと)。レトロウイルスベクターは、特に十分に開発され、臨床状況において用いられている(ローゼンバーグ (Rosenberg) ら、N. Engl. J. Med. 323 : 370、1990 ; アンダーソン (Anderson) ら、米国特許第5,399,346号)。

【0069】

遺伝子移入はまた、インビトロでのトランスフェクションを含む非ウイルス手段を用いて行うことができる。そのような方法には、リン酸カルシウム、DEAEデキストラン、エレクトロポレーション、およびプロトプラスト融合を用いることが含まれる。リポソームもまた、DNAを細胞に輸送するためにおそらく有用となりうる。正常な遺伝子を患者の罹患組織に移植することも同様に、エクスビボで培養可能な細胞タイプに正常なグリッドロック遺伝子に移入し、その後、細胞（またはその子孫）を標的組織に注入することによって行うことができる。

【0070】

非ウイルスアプローチもまた、グリッドロックを含む疾患を起こしやすいと予想される細胞に治療的DNAを導入するために用いることができる。例えば、グリッドロック核酸分子またはアンチセンス核酸分子は、リポフェクション（フェルナー（Felgner）ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84 : 7413、1987；オノ（Ono）ら、Neuroscience Letters 17 : 259、1990；ブリガム（Brigham）ら、Am. J. Med. Sci. 298 : 278、1989；スタウビンガー（Staubinger）ら、Methods in Enzymology 101 : 512、1983）、アシアロオロソムコイド-ポリリジン結合体（ウ（Wu）ら、Journal of Biological Chemistry 263 : 14621、1988；ウ（Wu）ら、Journal of Biological Chemistry 264 : 16985、1989）、または次に好ましいが外科的状況でのマイクロインジェクション（ウルフ（Wolff）ら、Science 247 : 1465、1990）によって細胞に導入することができる。

【0071】

遺伝子治療方法において用いられるグリッドロックcDNA発現は、如何なる適したプロモーターからも指示することができ（例えば、ヒトサイトメガロウイルス（CMV）、シミアンウイルス40（SV40）、またはメタロチオネインプロモーター）、如何なる適当な哺乳類の調節エレメントによっても調節することができる。例えば、望ましければ、特定の細胞タイプにおいて選択的に遺伝子発現を指示することが知られているエンハンサーを用いてグリッドロック発現を指示することができる。用いるエンハンサーには、組織または細胞特異的エンハンサーとしての特徴を有するエンハンサーが含まれうるがこれらに限定しない。またはグリッドロックゲノムクローンを治療構築物として用いる場合（そのようなクローンは

上記のように、グリッドロックcDNAのハイブリダイゼーションによって同定することができる)、調節は、同源の調節配列、または望ましければ上記のプロモーターもしくは調節エレメントの如何なるものも含む異種起源に由来する調節配列によって媒介することができる。

【0072】

アンチセンスに基づく戦略を用いて、治療薬デザインの基礎としてグリッドロック遺伝子機能を調べることができる。これらの戦略は、遺伝子発現の配列特異的抑制(転写または翻訳によって)が、ゲノムDNAまたはmRNAと相補的アンチセンス種とのあいだの細胞内ハイブリダイゼーションによって得られうるという原理に基づいている。ハイブリッドRNA二本鎖の形成は、標的グリッドロックコードゲノムDNA分子の転写、標的グリッドロックmRNA分子のプロセッシング、輸送、翻訳、または安定性を妨害する。

【0073】

アンチセンス戦略は多様なアプローチによって輸送することができる。例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチドまたはアンチセンスRNAは、細胞に取り込まれる形で被験者に直接投与することができる(例えば、静脈内注射によって)。または、アンチセンスRNA(またはアンチセンスRNA断片)をコードするウイルスまたはプラスミドベクターをインビボまたはエクシボで細胞に導入することができる。アンチセンス作用は、対照(センス)配列によって誘導することができるが、表現型の変化の程度は非常に多様である。アンチセンス作用によって誘導される表現型作用は、タンパク質レベル、タンパク質活性の測定、および標的mRNAレベルのような基準の変化に基づく。

【0074】

例えば、グリッドロック遺伝子治療は、野生型または変異型グリッドロックの発現によって負の影響を受けると予想される細胞に、アンチセンスグリッドロックmRNAを直接投与することによって行うことができる。アンチセンスグリッドロックmRNAは、如何なる標準的な技術によって産生および単離することも可能であるが、高い効率のプロモーター(例えば、T7プロモーター)の制御下でアンチセンスグリッドロックcDNAを用いるインビトロ転写によって最も容易に産生される

。アンチセンスグリッドロックmRNAの細胞への投与は、上記のように核酸分子を直接投与するための如何なる方法によっても行うことができる。

【0075】

遺伝子治療を用いてグリッドロック機能を阻害するもう一つの方法は、抗グリッドロック抗体または抗グリッドロック抗体の一部の細胞内発現を含む。例えば、グリッドロックに特異的に結合して、その生物活性を阻害するモノクローナル抗体をコードする遺伝子（または遺伝子断片）を、組織特異的遺伝子調節配列の転写制御下に置くことができる。

【0076】

本発明にはまた、大動脈のような動脈の内皮細胞において遺伝子発現を指示するグリッドロック遺伝子プロモーターおよびその断片が含まれる。そのようなプロモーターは、上記の方法において、グリッドロック、アンチセンスグリッドロックRNA、または抗グリッドロック抗体もしくはその一部の発現を指示するために用いることができるか、または動脈（例えば、大動脈）内皮細胞において非グリッドロック関連分子を発現させるために用いることができる。

【0077】

本発明におけるもう一つの治療アプローチは、可能性があるもしくは実際の疾患罹患組織の部位に直接、（例えば、注射によって）、または全身に（例えば、従来の組換えタンパク質投与技術によって）組換えグリッドロックポリペプチドを投与することを含む。グリッドロックの用量は、個々の患者の体格および健康を含む多数の要因に依存するが、一般的に如何なる薬学的に許容される製剤として1日あたり0.1 mg～100 mgまでを成人に投与する。

【0078】

グリッドロック変異に関してヘテロ接合であると、またはグリッドロック変異もしくは異常なグリッドロック発現を受けやすいと診断された患者において（たとえ、それらの変異または発現パターンがグリッドロック発現または生物活性の変化を生じない場合でも）、上記の治療の如何なるものも、疾患の表現型が発生する前に投与することができる。特に、グリッドロック発現またはグリッドロック生物活性を調節することが知られている化合物は、如何なる標準的な用量およ

び投与経路によっても、可能性があるまたは実際の疾患であると診断された患者に投与することができる（上記を参照のこと）。または、アンチセンスグリッドロックmRNA発現構築物を用いる遺伝子治療は、疾患の発症前に遺伝子欠損を逆転または予防するために行うことができる。

【0079】

本発明の方法は、如何なる哺乳類、例えばヒト、ペット、または家畜における本明細書に記載の障害を診断または治療するために用いることができる。非ヒト哺乳類を治療または診断する場合、用いるグリッドロックポリペプチド、核酸分子、または抗体は、好ましくはその種に特異的である。

【0080】

グリッドロック核酸分子およびポリペプチドは、組織工学において、例えば人工または部分的に人工的な血管の製造において、用いることができる。冠動脈バイパス手術は、典型的に静脈移植片を用いて行われるが、これは手術の結果として、動脈としての役割を担う。したがって、そのような静脈移植片に動脈の特徴を付与することが望ましい。上記のように、グリッドロックは動脈マーカーであり、動脈の発達およびモデリングにおいて役割を有する。このように、静脈移植にそのような特徴を付与するために、上記のように静脈移植片をグリッドロック核酸分子またはポリペプチドによって処理することができる。グリッドロック核酸分子およびポリペプチドはまた、人工血管の構築においても用いることができる。例えば、人工マトリクスの外側を平滑筋細胞でコーティングし、内側を内皮細胞でコーティングすることができる。グリッドロック核酸分子またはポリペプチドは、人工血管の動脈特性を増強するために、これらの成分の如何なるものとも関連して用いることができる。

【0081】

グリッドロックの生物学的活性を調節する分子の同定、またはグリッドロックにより調節される分子の生物学的活性の同定

グリッドロックcDNAを単離（本明細書に記載）することで、グリッドロックの生物学的活性を上昇または低下させる分子の同定も促される。また同様に、活性がグリッドロックの生物学的活性によって調節される分子を同定することができ

る。ある方法では、グリッドロックmRNAを発現する細胞培養液に候補分子を種々の濃度で添加する。次にグリッドロックの生物学的活性を標準的な手法で測定する。生物学的活性の測定には、グリッドロックタンパク質および核酸分子の濃度の測定、グリッドロックのリン酸化の測定、またはグリッドロックが血管発生に及ぼす影響の測定を含めることができる。

【0082】

望ましいならば、候補分子が発現に及ぼす影響は、別の方法ではグリッドロックタンパク質生産のレベルを同じ一般的なアプローチで、またグリッドロックに特異的な抗体（下記参照）を用いるウェスタンブロット法または免疫沈降法などの標準的な免疫学的検出法で測定することができる。

【0083】

候補調節因子は、精製した（または実質的に精製された）分子であるほか、混合物（例えば細胞由来の抽出物または上清）の一成分の場合もある（Ausubelら、前掲）。混合化合物を対象としたアッセイ法（mixed compound assay）では、グリッドロックの発現は、候補化合物プールを（例えばHPLCまたはFPLCなどの標準的な精製法を行い）次第に小さくしながら、一つの化合物または極めて少数の化合物混合物がグリッドロック発現を調節することを示すまで検討を続ける。

【0084】

あるいはこれに加えて、候補化合物をスクリーニングしてグリッドロック活性を調節する化合物を回収することができる。この方法では、候補化合物の存在下における大動脈の発生および血液循環のレベルを、同化合物の非存在下以外は同じ条件下における大動脈の発生および血液循環のレベルと比較する。また、このようなスクリーニング法は候補化合物のプールを対象に始めることが可能であり、この場合、プールから一つまたは複数の有用な調節因子化合物を段階的に単離する。

【0085】

大動脈の発生および血液循環は、例えばゼブラフィッシュの系を用いて調べることができる。ゼブラフィッシュ（*Danio rerio*）は、血管発生の遺伝解析に使用するのに好都合な生物である（下記参照）。世代時間が短いことと旺盛な繁殖

力に加えて、ゼブラフィッシュは扱いやすく、胚が透明であることから血管機能を初期段階から直接観察することができる。

【0086】

グリッドロックは血管新生に影響する場合もある。血管新生とは上述したように、出芽およびリモデリングにより血管が形成される過程を指す。したがって、グリッドロックまたはその断片（例えばYPPWモチーフを含むグリッドロック断片）を調節または模倣することが上述の方法で明らかにされた化合物は、血管新生を促進する（例えば創傷治癒を促進する）方法、または抑制する（例えば腫瘍成長を抑制する）方法に使用することができる。

【0087】

上述のスクリーニングアッセイ法は当技術分野で周知のさまざまな方法で実施可能である。これにはグリッドロック^{m145}変異体などのグリッドロック変種の使用、またはグリッドロック断片の使用が含まれる。

【0088】

上述の方法におけるスクリーニング対象となる被験化合物は、化学物質、天然化合物、または人工的に作製された化合物の場合がある。このような化合物には例えばポリペプチド、合成有機分子、天然有機分子、核酸分子、およびそれらの成分が含まれる。候補となるグリッドロック調節因子にはペプチドならびに非ペプチド性分子（例えば細胞抽出物、哺乳類の血清、または哺乳類細胞を培養した成長培養物中に見出されるペプチドまたは非ペプチド性分子）などが含まれる。

【0089】

一般に、グリッドロック関連疾患の予防または治療に用いられる新規薬剤は、天然産物、合成（または半合成）抽出物および化学物質ライブラリーの両方からなる大規模ライブラリーから当技術分野で周知の方法で同定される。薬剤の探索および開発に従事する者であれば、被験抽出物または被験化合物の詳細な供給源が本発明のスクリーニング法に重要ではないことを理解すると思われる。したがって、実際に任意の数の化学的抽出物または化合物を上記の方法でスクリーニングすることができる。抽出物または化合物の例には、植物、真菌、原核生物、または動物に由来する抽出物、培養ブロス、および合成化合物、ならびに既存の化

化合物を改変したものなどが含まれるが、これらに限定されない。

【0090】

糖類、脂質、ペプチド、および核酸分子に由来する化合物を含むがこれらに限定されない任意の数の化合物のランダム合成または標的合成（例えば半合成または全合成）を行う多くの方法がある。合成化合物ライブラリーは、ブランドンアソシエイツ（Brandon Associates）（ニューハンプシャー州メリマク）およびアルドリッチケミカル（Aldrich Chemical）（ウィスコンシン州ミルウォーキー）から市販されている。また、細菌、真菌、植物、および動物の抽出物の状態である天然化合物のライブラリーはバイオティックス（Biotics）（英国サセックス）、ゼノバ（Xenova）（英国スラウ）、ハーバーブランチ・オーシャノグラフィックインスティテュート（Harbor Branch Oceanographic Institute）（フロリダ州フォートピアス）、およびファルママー（PharmaMar）U.S.A（マサチューセッツ州ケンブリッジ）を含む多くの業者から市販されている。また望ましいならば、天然のライブラリーおよび合成的に作製されたライブラリーを、例えば標準的な抽出法および分画法といった当技術分野で周知の方法にしたがって作製する。また望ましいならば任意のライブラリーまたは化合物を、標準的な化学的方法、物理的方法、生化学的方法で容易に修飾することができる。

【0091】

また、薬剤の探索および開発に従事する者であれば、脱反復（dereplication）法（例えば分類学的な脱反復、生物学的な脱反復、および化学的な脱反復、またはこれらの任意の組み合わせ）、または、大動脈弓または他の心血管がかかわる疾患（例えばアテローム性動脈硬化症）に対して治療活性があることが既に明らかな材料の反復または繰り返しを避けることを必要に応じて行うことが可能であることを容易に理解する。

【0092】

粗抽出物が血管発生を調節することが判明したら、陽性を示す初期抽出物（positive lead extract）を対象にさらに分画を行い、観察された作用を示す化学成分を単離することができる。つまり抽出過程、分画過程、および精製過程の目的は、所望の活性を有する粗抽出物に含まれる化学物質の特性を慎重に決定して

同定することにある。本明細書に記載の、化合物混合物中における活性を検出するアッセイ法と同様のアッセイ法を用いて、活性成分を精製し、その誘導体を検討することができる。このような不均一な抽出物の分画法および精製法は当技術分野で周知である。望ましいならば、治療に有用な薬剤であることが判明した化合物を当技術分野で周知の方法にしたがって化学的に修飾する。治療上効果があることが判明した化合物は次に、哺乳類の血管発生モデルを用いて分析することができる。

【0093】

グリッドロックポリペプチド、グリッドロック遺伝子、およびグリッドロックの合成および機能の調節因子の投与

グリッドロックタンパク質、グリッドロック遺伝子、またはグリッドロック調節因子を、薬学的に許容される希釈剤、担体、または賦形剤に含めて単位投与剤として投与することができる。また通常の薬剤投与方法を用いて、中和作用をもつグリッドロック抗体またはグリッドロック抑制化合物（例えばアンチセンスのグリッドロックまたはグリッドロック優性抑制型変異体）を、グリッドロック関連疾患（大動脈弓疾患またはアテローム性動脈硬化症など）の患者に投与する、適切な剤形または組成物を提供することもできる。また上述したようにグリッドロックは血管新生にかかわる可能性がある。したがってグリッドロックポリペプチド、遺伝子、および調節因子を投与することで、血管新生を促進したり抑制したりすることができる。例えばこのような分子を投与することで静脈形成を抑制することができると思われる。投与は、患者の症状が発現する前または後に行うことができる。

【0094】

任意の適切な投与経路を採用することができる。例えば投与は、非経口投与、静脈内投与、動脈内投与、皮下投与、筋肉内注射、頭蓋内投与、眼窩内投与、点眼投与、脳室内投与、関節内投与、髄腔内投与、槽内投与、腹腔内投与、経鼻投与、エアゾルによる投与、坐剤による投与、または経口投与とすることができる。しかしながら上述したように、投与は大動脈または他の心血管組織などの患部組織に対して局所的とすることが好ましい。治療用の剤形は液状または懸濁液状

とすることができ、経口投与する場合は錠剤またはカプセル剤とすることができ、また経鼻投与する場合は粉末剤、点鼻液、またはエアゾル剤とすることができる。

【0095】

当技術分野で周知の製剤化法は、例えばレミントン薬理学 (Remington's Pharmaceutical Sciences) (第18版)、ジェンナーロ (A. Gennaro) 編、1990年、Mack Publishing Company、ペンシルバニア州イーストン、に記載されている。非経口投与用の剤形には例えば、賦形剤、滅菌水、または生理食塩水のほか、ポリエチレングリコールなどのポリアルキレングリコール、植物油、または水素処理されたナフタレンを含めることができる。生体適合性があり、生物分解性のある乳酸重合体、乳酸/グリコライド共重合体、またはポリオキシエチレン-ポリオキシプロピレン共重合体を用いて化合物の放出を制御することができる。グリッドロック調節化合物について有用と考えられる他の非経口的輸送系には、エチレン-ビニルアセテート共重合体粒子、浸透圧ポンプ、移植可能な注入システム、およびリポソームなどがある。吸入用の剤形には例えばラクトースなどの賦形剤を含めることができるほか、例えばポリオキシエチレン-9-ラウリルエーテル、グリココール酸、およびデオキシコール酸を含む水溶液とすることができる。また点鼻薬またはゲル剤として投与する油性溶液とすることができる。

【0096】

グリッドロックタンパク質、ポリペプチド、およびポリペプチド断片の合成

分子生物学分野に従事する者であれば、多様な発現システムを用いて組換えグリッドロックタンパク質を産生させることが可能であることを理解すると思われる。後に詳述するように、使用する宿主細胞の詳細は本発明に重要ではない。グリッドロックタンパク質は、原核生物宿主 (例えば大腸菌)、または真核生物宿主 (例えば出芽酵母 (*S. cerevisiae*)、Sf9細胞などの昆虫細胞、またはCOS-1、NIH 3T3、またはHeLa細胞などの哺乳類細胞) 中で産生させることができる。これらの細胞は、例えばアメリカンタイプカルチャーコレクション (American Type Culture Collection、メリーランド州ロックビル) から市販されている (前掲のAusubelらの論文参照)。形質転換法、および発現用溶媒 (例えば発現ベク

ター)の選択法は選択した宿主系によって変わる。形質転換およびトランスフェクションの方法は例えば前掲のオズベル(Ausubel)らの論文に記載されており、発現用輸送体は例えば前掲のポウウェルズ(Pouwels)らの論文に記載されたものから選択することができる。本発明に使用可能な発現系の特定の実施例については以下に詳述する。

【0097】

クローン化されたグリッドロック遺伝子の特性は、対象遺伝子を種々の細胞種に導入することで、またはインビトロの細胞外系を用いることで分析可能である。続いて、このような細胞または系で作製されるグリッドロックタンパク質の機能を、さまざまな生理学的条件下で調べることができる。あるいは細胞系列をグリッドロックの遺伝子産物を過剰に発現するように產生させることで、生化学的な特性解析、大量生産、抗体産生、および患者の治療に用いるグリッドロックの精製が可能となる。

【0098】

タンパク質を発現させるために、グリッドロックの遺伝子配列をプラスミドまたは他のベクターに導入してから生細胞を形質転換する真核生物または原核生物の発現系を構築することができる。発現プラスミドに正しい方向に挿入された全読み枠を含む完全長のグリッドロックcDNAである構築物を用いてタンパク質を発現させることができる。あるいは野生型または変異型のグリッドロック配列を含むグリッドロック遺伝子の一部分を挿入してもよい。原核生物または真核生物の発現系では、グリッドロックタンパク質のさまざまな重要な機能ドメインを望ましくは融合タンパク質として回収してから、結合試験、構造試験、および機能試験に使用することが可能であり、さらに抗体作製にも使用できる。

【0099】

典型的な発現ベクターは、ベクターに挿入された核酸分子に対応する大量のmRNAの合成を促すプロモーターを含む。ベクターはまた、宿主細胞内における自律的な複製を可能とする真核生物または原核生物に由来する複製起点、ベクターを含む細胞を薬剤存在下で選択可能とする、通常は毒性作用をもたらす薬剤に対する耐性を付与する配列、および合成されたmRNAの翻訳効率を高める配列も含む。

長期安定型ベクター (stable long-term vector) は、例えばウイルスの調節配列 (例えばエプスタイン・バーウイルスゲノムに由来するOriP配列) を用いることで、遊離の複製分子として維持される。細胞系列は、細胞のゲノムDNAに組み込まれたベクターが維持されるように作製することも可能であり、この方法では、遺伝子産物を細胞内で連続的に生産することができる。

【0100】

大腸菌などの細菌内において外来分子を発現させるためには、外来核酸分子 (例えばグリッドロック核酸分子) を細菌発現ベクターへ挿入する必要がある。このようなプラスミドベクターには、細菌内におけるプラスミドの増殖、および対象プラスミド内に含まれる外来DNAの発現に必要な複数の配列が含まれる。対象のプラスミドのみを保持する細菌を増殖させるためには、通常、対象プラスミドを保持する細菌を毒性作用をもたらす薬剤の存在下でも成長可能とする選択マーカーをコードする遺伝子をプラスミド内に導入する。このようなプラスミドはまた、外来DNAに由来する大量のmRNAの合成を促すことを可能とする転写プロモーターも含む。このようなプロモーターは、適切な条件下 (例えばプロモーターを活性化する薬剤の存在下) における培養の誘導に応じて転写を開始する誘導性プロモーターとすることができるが、それ以外のプロモーターでもよい。プラスミドはまた、対象遺伝子をベクター内で正しい方向に挿入しやすくするポリリンカーを含むことが好ましい。

【0101】

グリッドロック遺伝子、またはその断片、融合体、または変異体を含む適切な発現ベクターを構築した後、それを適切な宿主細胞に、例えばカルシウムリン酸トランスフェクション法、DEAEデキストラントランスフェクション法、エレクトロポレーション法、マイクロインジェクション法、プロトプラスト融合法、またはリポソームを用いたトランスフェクション法などの形質転換法で導入することができる。本発明のベクターを導入可能な宿主細胞には、大腸菌またはその他の細菌、酵母、真菌、昆虫細胞 (例えば発現用バキュロウイルスベクターの使用)、マウス、ヒト、または他の動物に由来する細胞を含めることができるがこれらに限定されない。哺乳類細胞を使用して、ウイルス発現系 (例えばワクシニアウ

イルスの発現系)を用いてグリッドロックタンパク質を発現させることもできる。これは例えば前掲のオーズベル(Ausubel)らの論文で説明されている。

【0102】

クローン化されたDNAにコードされるグリッドロックタンパク質、融合体、ポリペプチド断片、または変異体は、T7後期プロモーター発現系を用いることでインビトロで発現させることもできる。この系は、バクテリオファージT7のDNAにコードされた酵素であるT7 RNAポリメラーゼの調節型の発現に基づく。T7 RNAポリメラーゼは、T7後期プロモーターと呼ばれる特定の23-bpのプロモーター配列から転写を開始する。T7後期プロモーターのコピーはT7ゲノム上の複数の部位に位置するが、大腸菌の染色体DNA上には存在しない。その結果として、T7を感染させた大腸菌では、T7 RNAポリメラーゼはウイルス遺伝子の転写を触媒するが、大腸菌遺伝子の転写は触媒しない。この発現系では、最初に組換えの大腸菌細胞を、lacプロモーターの隣にT7 RNAポリメラーゼをコードする遺伝子をもつように作製する。このような細胞はIPTGの存在下でT7のポリメラーゼ遺伝子を高率で転写し、大量のT7 RNAポリメラーゼを合成する。この細胞を次に、T7後期プロモーターのコピーをもつプラスミドベクターで形質転換する。形質転換された大腸菌細胞を含む培養物にIPTGを添加すると、大量のT7 RNAポリメラーゼが産生される。このポリメラーゼは次に、プラスミド発現ベクター上のT7後期プロモーターに結合し、挿入されたcDNAの転写を高率で触媒する。個々の大腸菌細胞は多コピーの発現ベクターを含むので、クローン化されたcDNAに対応する大量のmRNAをこの系で産生させることが可能であり、結果として得られるタンパク質は放射標識することができる。

【0103】

後期プロモーターおよび、T3、T5、およびSP6などの類縁バクテリオファージに由来する対応するRNAポリメラーゼを含むプラスミドベクターを使用して、クローン化されたDNAに由来するタンパク質をインビトロで産生させることができる。大腸菌はまた、mGPI-2などのM13ファージを用いた発現にも使用することができる。さらに、ラムダファージの調節配列を含むベクター、または例えばマルトース結合タンパク質の融合タンパク質またはグルタチオン-S-トランスフェラ

ーゼの融合タンパク質などの融合タンパク質の発現を促すベクターを大腸菌における発現に使用できる。

【0104】

真核生物の発現系は、適切な翻訳後修飾を受けた発現タンパク質を回収するために有用である。グリッドロック遺伝子を含む発現プラスミドを、真核生物の宿主細胞へ一時的に導入することで、導入宿主細胞でグリッドロックを一時的に産生させることができる。グリッドロックタンパク質はまた、安定的に形質転換した真核生物（例えば哺乳類）の細胞系列で産生させることもできる。哺乳類細胞を安定して形質転換するために適した多くのベクターが一般に利用できる（例えばPouwelsら、「クローニングベクター：実験マニュアル（Cloning Vectors: A Laboratory Manual）」、1985、増補版、1987）、またこのような細胞を含む系列の構築方法については例えば前掲のオズベル（Ausubel）らの論文で説明されている。

【0105】

ある実施例では、グリッドロックタンパク質、融合体、変異体、またはポリペプチド断片をコードするcDNAを、ジヒドロ葉酸還元酵素（DHFR）遺伝子を含む発現ベクターにクローン化する。プラスミドへの組み込み、つまりグリッドロックをコードする遺伝子が宿主細胞の染色体へ組み込まれたか否かは、細胞培養物中に0.01～300 μ Mのメトトレキセートを添加することで判定される（Ausubelら、前掲）。このような優性選択法は大部分の細胞種を対象に採用可能である。組換えタンパク質の発現は、DHFRを用いて形質転換遺伝子を増幅することで上昇させることができる。遺伝子増幅法を含む細胞系列選択法は前掲のオズベル（Ausubel）らの論文で説明されている。このような方法は一般に、メトトレキセート濃度を徐々に上昇させた培養物中における長時間の培養を含む。最も広く使用されているDHFR含有発現ベクターはpCVSEII-DHFRおよびpAdD26SV(A)である（例えば前掲のAusubelらの論文に記載）。上述の宿主細胞、または好ましくはDHFR欠損CHO細胞系列（例えばCHO DHFR⁻細胞、ATCCアクセッション番号CRL 9096）は、安定に形質転換された細胞系列、またはDHFRに基づく遺伝子増幅法のDHFR選択法に極めて好ましい系列の一つである。

【0106】

別の好ましい真核生物発現系は、例えばクロンテック (Clontech) (カリフォルニア州パロアルト) から入手可能なpBacPAK9などのベクターを用いるバキュロウィルスの系である。望ましいならば、同系は例えばエバン (Evan) らの論文 (Molecular and Cellular Biology 5 : 3610 ~ 3616、1985) に記載されたmycタグ法などの他のタンパク質発現法と併せて使用することができる。

【0107】

組換えタンパク質が発現したら、細胞溶解法とそれに続く、アフィニティークロマトグラフィー法などのタンパク質精製法で発現細胞から単離することができる。この例では、本明細書に記載された方法で作製可能な抗グリッドロック抗体をカラムに結合させて、組換えグリッドロックタンパク質の単離に使用することができる。アフィニティークロマトグラフィー法に先行するグリッドロックタンパク質をもつ細胞の溶解法および分画法は、標準的な方法で実施することができる (例えば前掲のAusubelらの論文を参照)。望ましいならば、単離後に組換えタンパク質を例えば高速液体クロマトグラフィー法 (HPLC ; 例えばFisher、「生化学および分子生物学における実験技術 (Laboratory Techniques In Biochemistry and Molecular Biology)」、Work and Burden編、Elsevier、1980を参照) でさらに精製することができる。

【0108】

本発明のポリペプチド、特に短いグリッドロック断片および、グリッドロックタンパク質のN末端およびC末端のより長い断片も、化学的合成法 (例えば「固相タンパク質合成 (Solid Phase Peptide Synthesis)」、第2版、1984、The Pierce Chemical Co.、イリノイ州ロックフォード、に記載された方法) で作製することができる。ポリペプチドを発現させて精製するこのような一般的な方法を用いることでも、本明細書に記載された有用なグリッドロックポリペプチド断片または類似体を作製および単離することができる。

【0109】

上述したように、グリッドロックタンパク質を発現する真核細胞を用いて、グリッドロック関連疾患に対する薬物の有効性を同定および検討することができる。

。このような細胞を用いて、上記の方法に使用するグリッドロックポリペプチドを産生させることもできる。真核細胞でグリッドロックタンパク質を発現させることで、グリッドロック遺伝子および遺伝子産物の研究がさらに進む。これには、生物学的活性に必要な適切な発現および翻訳後修飾の決定、ならびにグリッドロック遺伝子の5'側、3'側、およびイントロン領域に位置する調節配列の同定、ならびに組織におけるグリッドロックタンパク質発現の調節における役割の決定などが含まれる。またこれにより、単離および精製するための正常タンパク質および変異型タンパク質の大量生産、ならびに対象タンパク質に対して生じる抗体の機能アッセイ系としてグリッドロックタンパク質を発現する細胞の使用が可能となる。グリッドロックタンパク質、融合体、変異体、およびポリペプチド断片を真核細胞内で発現させることで、正常な完全長タンパク質、同タンパク質の特定の部分、または天然の多型および人工的に産生させた変異型タンパク質の機能を調べることも可能となる。グリッドロックDNA配列は、制限エンドヌクレアーゼによる切断、DNAポリメラーゼによるギャップの充填、エキソヌクレアーゼによる末端欠失、末端デオキシヌクレオチドトランスフェラーゼによる伸長、合成されたDNAまたはクローン化されたDNA配列の連結、ならびに特異的なオリゴヌクレオチドおよびPCR法による部位特異的な配列変更などの当技術分野で周知の手法で変更することができる。

【0110】

グリッドロック断片

グリッドロックタンパク質のさまざまな部分を含むポリペプチド断片は、タンパク質間相互作用および転写などの生物学的活性に重要な役割を果たすグリッドロックドメインを同定する際に有用である。本明細書に記載されたヌクレオチド配列を用いて、このような断片を作製する方法は当技術分野で周知である（例えば前掲のAusubelの論文を参照）。例えばグリッドロックタンパク質断片は、所望のグリッドロック核酸分子の断片を、グリッドロック核酸配列を元に設計されたオリゴヌクレオチドプライマーを用いてPCR法で増幅して作製することができる。オリゴヌクレオチドプライマーは、増幅後の断片を発現ベクター（例えば哺乳類の発現ベクター、上述）のクローニング部位へ容易に挿入するそれぞれ1か

所しかない制限酵素切断部位を含むことが望ましい。このようなベクターは次に、本明細書に記載された方法を始めとする当技術分野で周知の任意のさまざまな手法を用いた方法で細胞（例えば哺乳類細胞、上述）に導入することができる。この結果、グリッドロックポリペプチド断片が発現ベクターを含む細胞内で産生される。

【0111】

グリッドロックポリペプチド断片（例えばキメラの融合タンパク質）はまた、例えば後述する方法により、グリッドロックのさまざまな領域に特異的な抗体を産生させる際にも使用することができる。好ましいグリッドロック断片には、YR PWモチーフを含むC末端ドメインに対応する断片、保存領域外に位置する断片、およびそれらの断片などが含まれるがこれらに限定されない。

【0112】

グリッドロック抗体

ポリクローナル抗体を調製するためには、グリッドロックタンパク質、グリッドロックタンパク質の断片、またはグリッドロックタンパク質の特定の部分を含む融合タンパク質を例えば細菌中で、適切なクローニング輸送体に含まれる対応DNA配列を発現させることによって合成することができる。通常は、融合タンパク質が抗体産生に用いられる抗原の供給源として使用される。大腸菌で広く使用されている発現系は、pURシリーズのベクターを用いるlacZ融合体と、pATHベクターを用いるtrpE融合体である。タンパク質は精製後に担体タンパク質と結合させ、（被接種動物における抗原応答を促進するために）フロインドアジュバントと混合し、さらにウサギを始めとする実験動物に注入することができる。またタンパク質は、グリッドロックを発現する培養細胞から単離することができる。2週間毎に行うブースター注射に続いて、ウサギを始めとする実験動物から採血して血清を分離する。この血清は直接使用できるほか、プロテインA-セファロース、抗原セファロース、および抗マウスIgセファロースなどの試薬を用いるアフィニティクロマトグラフィー法を含むさまざまな方法で使用前に精製することができる。この血清を用いて次に、タンパク質抽出物を、ポリアクリルアミドゲル電気泳動法で分画したグリッドロック発現組織から探索することでグリッドロック

タンパク質を同定することができる。あるいは、タンパク質の抗原性部分に対応する合成ペプチドを作製して、動物への接種に用いることができる。

【0113】

ペプチドまたは完全長のタンパク質を例えばグリッドロックに特異的な抗体産生用に作製するためには、グリッドロックをコードする配列をC末端またはN末端におけるグルタチオンSトランスフェラーゼ（GST、Smithら、Gene 67, 31～40、1988）との融合体として発現させる。このような融合タンパク質は、グルタチオン-セファロースビーズ上で精製し、グルタチオンで溶出し、さらにトロンピンや第Xa因子などのプロテアーゼで（作出された切断部位において）切断し、さらにウサギを良好に免疫化するのに必要な程度まで精製する。初回免疫は、フロインド完全アジュバントを用いて実施し、それに続く免疫はフロインド不完全アジュバントを用いて実施するとよい。抗体の力価は、GST-グリッドロック融合タンパク質をプロテアーゼで切断したグリッドロック断片を用いるウェスタンブロット法および免疫沈降法でモニタリングすることができる。免疫血清は、CNBrセファロースに結合させたグリッドロックタンパク質を用いてアフィニティ精製することができる。抗血清の特異性は、非類縁のGST融合タンパク質のパネルを用いて決定することができる。

【0114】

あるいはモノクローナルグリッドロック抗体は、グリッドロックを発現する培養細胞から単離されたグリッドロックタンパク質または組織から単離されたグリッドロックタンパク質を抗原として用いて産生させることができる。グリッドロックタンパク質を含む細胞抽出物または組換えタンパク質抽出物は例えばフロインドアジュバントとともにマウスに注射することができる。注射から数日後にマウスの脾臓を切除し、組織をばらばらにし、脾臓細胞をリン酸緩衝食塩水（PBS）に懸濁させる。脾臓細胞はリンパ球の供給源となる。リンパ球の一部は、適切な特異性をもつ抗体を産生すると考えられる。これらを次に、持続的に成長しているパートナーとしてのミエローマ細胞と融合させ、融合産物を数多くの組織培養用ウェルにヒポキサンチン、アミノプテリン、およびチミジンなどの選択用試薬（HAT）の存在下でプレーティングする。次にこれらのウェルを対象にELISA法

でスクリーニングを行い、グリッドロックタンパク質、そのポリペプチド断片、または変異体に対する結合能力を有する抗体を作る細胞を含むウェルを同定する。次にこれらの細胞を再プレーティングして成長させた後に、同細胞を含むウェルのスクリーニングを再び行って抗体産生細胞を同定する。90%以上のウェルが、特定の抗体産生について陽性を示す単一のクローンを含むようになるまで複数のクローニング法を実施するとよい。この手順により、抗体を産生する安定なクローン系列を確立することができる。次にモノクローナル抗体を、プロテインAセファロースを用いるアフィニティクロマトグラフィー法、およびイオン交換クロマトグラフィー法、ならびにこれらの手法を改変したり組み合わせることで精製することができる。モノクローナル抗体の産生が認められたら、ウェスタンブロット法または免疫沈降法によって特異的なグリッドロックタンパク質が認識されるか否かの検討も行う（例えばKohlerら、Nature 256 : 495、1975 ; Kohlerら、European Journal of Immunology 6 : 511、1976、Kohlerら、European Journal of Immunology 6、292、1976 ; Hammerlingら、「モノクローナル抗体およびT細胞ハイブリドーマ (Monoclonal Antibodies and T Cell Hybridomas)」、Elsevier、ニューヨーク州ニューヨーク、1981 ; Ausubelら、前掲、を参照）。

【0115】

代替法または、GST融合タンパク質に対する補助的な免疫源として、グリッドロックの比較的特有な親水性領域に対応するペプチドを作製して、C末端に導入したりジンを介してキーホールリンペットヘモシニアン (KLH) に結合させることができる。これらのペプチドのそれぞれに対する抗血清は同様に、BSAに結合させたペプチド上でアフィニティ精製することが可能であり、また特異性はペプチドコンジュゲートを用いるELISA法およびウェスタンブロット法、ならびに例えばGDT融合タンパク質として発現させたグリッドロックタンパク質を用いるウェスタンブロット法および免疫沈降法で検討することができる。

【0116】

本発明の抗体は、ジェイムソン (Jameson) らの論文 (CABIOS 4 : 181、1988) に記載されているアルゴリズムを用いたペプチド構造プログラム (Peptide Structure Program) (Genetics Computer Group Sequence Analysis Package、Prog

ram Manual for the GCG Package、バージョン7、1991)で提供される基準に基づく分析から、高度に保存された領域内には存在しないで、また抗原性が強いと考えられるグリッドロックアミノ酸配列を用いて作製することができる。このような断片は標準的な手法、例えばPCR法やpGEX発現ベクターへのクローン化によって作製することができる。GST融合タンパク質を大腸菌で発現させ、グルタチオン-アガロースのアフィニティマトリックスを用いて精製することができる(Ausubelら、前掲)。ウサギのポリクローナル抗体を作製し、グリッドロックに対して非特異的な抗血清または親和性の低い結合を示す抗血清が回収される可能性を最小とするためには、各タンパク質について2種または3種の融合体を作製し、各融合体を少なくとも2匹のウサギに注射する。好ましくは少なくとも3回のブースター注射を含む連続的な注射を行うことで抗血清が得られる。

【0117】

完全なモノクローナルおよびポリクローナルの抗グリッドロック抗体に加えて、本発明は遺伝子工学的手法で作製されたさまざまな抗体、ヒト化抗体、およびF(ab')₂、Fab'、Fab、Fv、およびsFvの各断片を含む抗体断片を特徴とする。例えば短縮型のモノクローナル抗体は、所望のモノクローナル抗体断片(または断片群)を適切な宿主で発現させるプラスミドを作製する組換え法で作製することができる。抗体は当技術分野で周知の方法でヒト化することができる。例えば所望の結合特異性を有するモノクローナル抗体は、ヒト化されたものが市販されている(Scotgene、スコットランド、Oxford Molecular、カリフォルニア州パロアルト)。トランスジェニック動物で発現させる抗体などの完全なヒト化抗体も本発明に含まれる(Greenら、Nature Genetics: 13~21、1994)。

【0118】

ラドナー(Ladner)(米国特許第4,946,778号および第4,704,692号)は1本のポリペプチド鎖からなる抗体の調製法を説明している。ワード(Ward)ら(Nature 341、544~546、1989)は、著者らが「シングルドメイン抗体」と呼ぶ抗原結合親和性が高い抗体の重鎖可変ドメインの調製法を説明している。マッカファティ(McCafferty)ら(Nature 348: 552~554、1990)は完全抗体のVドメインがfdバクテリオファージの表面に呈示可能であること、同ファージが抗原に特異的

に結合すること、また極めて少数のファージ（数百万個に一つ）がアフィニティークロマトグラフィーで単離可能であることを報告している。ボス（Boss）ら（米国特許第4,816,397号）は一つの細胞宿主で、免疫グロブリン、および少なくとも重鎖および軽鎖の可変ドメインを含む免疫学的に機能するそれらの断片を作製するさまざまな方法を説明している。キャビリー（Cabilly）ら（米国特許第4,816,567号）はキメラ抗体の調製法を説明している。

【0119】

グリッドロック抗体の用途

上述した通り、グリッドロックタンパク質に対する抗体を用いてグリッドロックタンパク質を検出することができるほか、グリッドロックタンパク質の生物学的活性を抑制することができる。例えば、抗体または抗体の一部をコードする核酸分子を細胞内で発現させてグリッドロック機能を抑制することができる。また、このような抗体は、診断または治療に用いるために放射性核種およびリポソームなどの化合物に結合させることができる。グリッドロックの細胞外ドメインを特異的に認識する抗体は、上記のような結合成分を、グリッドロックのポリペプチドドメインを表面に呈示する細胞に誘導する際に有用である。本明細書に記載されたグリッドロックポリペプチドの活性を抑制する抗原はまた、野生型または変異型のグリッドロック遺伝子の不適当な発現に起因する疾患の発症を防いだり緩やかにするためにも有用である。

【0120】

グリッドロック遺伝子発現の検出

上述した通り、上記の抗体を用いてグリッドロックタンパク質の発現をモニタリングすることができる。RNAを対象としたインサイチュハイブリダイゼーション法で、グリッドロック遺伝子の発現を検出することができる。RNAインサイチュハイブリダイゼーション法は、特異的に標識された核酸プローブと、個々の細胞または組織内における細胞RNAとのハイブリッドの形成を基礎とする。したがってRNAインサイチュハイブリダイゼーション法は、組織特異的および時間特異的な遺伝子発現を調べる強力な方法である。この方法では、オリゴヌクレオチド、クローン化されたDNA断片、またはグリッドロック遺伝子の固有の部分

に対応する、クローン化されたDNA断片のアンチセンスのRNA転写産物を用いて、特定のmRNA種を例えばマウスなどの動物組織内で、さまざまな発生段階において検出する。当業者に周知の他の遺伝子発現検出法を用いてグリッドロック遺伝子発現を検出することもできる。

【0121】

他のグリッドロック遺伝子の同定

ポリメラーゼ連鎖反応法（PCR法）およびDNAハイブリダイゼーション法などの標準的な手法を用いて、他の種におけるグリッドロック相同体、およびヒトにおけるグリッドロック関連遺伝子をクローン化することができる。グリッドロック関連遺伝子および相同体は、ヒトのグリッドロックプローブまたはプライマーを用いて、厳密性の低いDNAハイブリダイゼーション法、または厳密性の低いPCR法で容易に同定することができる。ヒトのグリッドロックのアミノ酸配列またはヒトのグリッドロック関連アミノ酸配列をコードする縮重プライマーを用いることで、他のグリッドロック関連遺伝子および相同体をRT-PCR法でクローン化することができる。

【0122】

トランスジェニック動物およびノックアウト動物の作製

グリッドロック遺伝子の特性解析を行うことで、グリッドロックノックアウト動物モデルを相同組換えにより作製可能とするための情報が得られる。グリッドロックノックアウト動物は哺乳類であることが好ましく、マウスであることが最も好ましい。同様に、グリッドロックを過剰に生産する動物モデルは、一つまたは複数のグリッドロック配列を動物ゲノムに標準的なトランスジェニック手法で組み込むことで作製することができる。またグリッドロック遺伝子の変異（例えば優性遺伝子変異）の影響は、変異型グリッドロックの外来遺伝子をもつトランスジェニックマウスを対象とすることで、またはそのような変異を内因性グリッドロック遺伝子に標準的な相同組換え法で導入することで検討可能である。

【0123】

ノックアウトモデルの作製に使用可能な置換型の標的ベクターは、同質遺伝子のゲノムクローン、例えば129/Svなどのマウス系列（Stratagene Inc.、カリフ

オルニア州ラホーヤ)に由来するクローンを用いて構築することができる。このような標的ベクターを、適切に由来する系列の胚幹細胞(ES細胞)にエレクトロポレーション法により導入することで、グリッドロック遺伝子の末端に大きな欠損部分をもつES細胞系列を作ることが可能である。キメラの始祖(founder)マウスを作製するためには、標的化細胞系列をマウスの胞胚期の胚に注入する。ヘテロ接合の子孫を同系交配することでホモ接合の個体を得ることができる。グリッドロックノックアウトマウスは、胚発生および疾患にグリッドロックが果たす役割を調べるためのツールとなる。またこのようなマウスを用いて、インビボにおいて、グリッドロックに依存する経路、またはグリッドロックが影響を及ぼす経路がかかわる疾患または症状を改善させる治療化合物を検討することができる。

【0124】

実験結果

grl遺伝子はポジショナルクローニング法で単離した。grlは、新規の塩基性ヘリックス・ループ・ヘリックス(bHLH)タンパク質をコードする。このタンパク質は、bHLHタンパク質のヘアリー関連ファミリーに特徴的なC末端モチーフをもつ。このようなbHLHタンパク質は、他の細胞種の細胞運命の決定に重要な役割を果たすことがわかっている。ショウジョウバエの神経系では、例えばヘアリーファミリーのタンパク質は神経前駆細胞のパターン形成および「等価グループ(equivalence group)」の確立を補助する転写抑制因子として作用する。grlが血管芽細胞で同様の役割を果たし、動脈特異的なマーカーとして機能する可能性は高い。またgrlが、血管形成に重要であると考えられるVEGF/FLK経路で機能する可能性もある(Fouquetら、Developmental Biology 183:37~48、1997; Liaoら、Development 124:381~389、1997)。

【0125】

grl^{m145}変異体は、bHLHタンパク質のヘアリー関連ファミリーに特徴的なカルボキシル末端モチーフに続く停止コドン上に変異をもつことが知られている。この変異体は、野生型のgrl mRNAを注入することで相補されるが、カルボキシル末端モチーフを欠くgrl mRNAでは相補されない。

【0126】

grlは初期胚の側板中胚葉で発現し、血管を形成すると予想され、その後は大動脈で選択的に発現した。grlの変異は、内腔の形成前または血流開始の前でも、新生大動脈の細胞を明瞭に示しており、静脈では発現しないことから、集合前であっても血管芽細胞が異なることを示唆している。この変異は大動脈の集合を乱すが、体軸方向の静脈または頭部の血管には影響を及ぼさない。したがってgrlは大動脈特異的な内皮細胞の運命を決定する。

【0127】

上述したように、大動脈は複数の先天性疾患の影響を受ける領域である。それらのうちいくつかは発生学的には、前部大動脈分岐部に相同な領域（grlの変異により最も大きな影響を受ける領域）を乱す。このような疾患（狭窄症など）の一部は同胞再現率が高いことから、遺伝学素因の存在が疑われている。

【0128】

grl遺伝子のポジショナルクローニング

grl変異のクローニングのために、一本鎖長多型（SSLP）マーカーおよびランダム増幅多型DNA（RAPD）分子を用いて、まずその位置をゼブラフィッシュ遺伝地図で確認し、続いてこの領域の物理地図を酵母人工染色体（YAC）および細菌人工染色体（BAC）を用いて作製した（図1；G、H、I、J、KおよびLはYAC、BACおよびPACの末端に対応する）。変異領域における局所的な放射線ハイブリッド（RH）地図、遺伝地図および物理地図の統合のためにいくつかの多型ランドマーカー（landing marker）を用いて、これらのマーカーが対応する位置で相関していることを示した（図1）。マーカーとグリッドロック遺伝子座との間の組換え数を染色体ラインの下に示している。RHパネル上での遺伝子型判定にはいくつかの遺伝マーカーが用いられたが、これらのマーカー間の距離（cM）がRHラインの下に表記されている。

【0129】

グリッドロックm145対立遺伝子は遺伝マーカーz536とz9794との間の連鎖群20にマッピングされており、1,200種の変異体から2,400の有益な減数分裂が得られた。マーカーz536は染色体歩行のために用いられ、単離されて、大規模な分離解

析によってグリッドロック遺伝子座に連結された。1200種の変異体の中から、マーカーz536およびz9794を用いてそれぞれ5種および12種の組換え体を同定した。組換え解析により、変異を含む0.71cMの区間が特定された。

【0130】

続いて、グリッドロック変異を含む領域にまたがる約2メガベース (Mb) のYAC地図を構築した。YACコンティグをYAC5、YAC121、YAC133、YAC187およびYAC140から構築し、YAC末端を自己環状化 (self-circularization) によってレスキューし (Zhongら、Genomics 48 : 136 ~ 138、1998)、シーケンシングを行った。YACのサイズはパルスフィールドゲル電気泳動によって決定され、300Kbから1.2Mbであった。レスキューしたYAC末端配列から一本鎖高次構造多型 (SSCP) を用いて組換えファインマッピング解析 (Recombinant fine mapping analysis) を行った。SSCP解析によってYAC187およびYAC133の双方のT3末端から多型が検出され、変異の後に1種の組換え体、変異の前に3種の組換え体がそれぞれ同定された。これらの実験により、 grl^{m145} をYAC133およびYAC187のT末端の間の500Kbの区間内に物理的に局在化させた。

【0131】

この500Kb区間をさらに精緻化 (refine) するために、YAC133のT3末端を開始点として用いて、3種のBACおよび3種のPACからBAC/PACコンティグを集合させた。PAC14、BAC11およびPAC11からの末端配列のSSCP解析により、変異前に1つの組換え体、遺伝子座に2種の0組換え体、変異後に2つの組換え体が同定され、それぞれ組換え点zP14、zB11a、zB11bおよびzP11に対応した。このように、2,400の減数分裂における組換え頻度を用いるファインマッピングにより、500Kbの区間をBAC14およびPAC14の重複部分で囲まれる120Kbに精緻化することができた (図1)。レスキューしたBACおよびPACの末端配列からの一本鎖立体構造多型 (SSCP) を用いて組換えファインマッピング解析を行った。BAC/PAC末端は逆PCRによってレスキューされるか、直接シーケンシングされた。

【0132】

grl 遺伝子を同定するために、 grl 変異を含むBAC14およびPAC14から構築したゲノムライブラリーから、5倍のショットガンシーケンシングを行った。ソニッ

クディスメンブレーター (Sonic Dismembrator) (8×12") を用いて剪断DNAからBAC14およびPAC14の10倍のショットガンライブラリーを作製した後に、マングビーンヌクレアーゼ処理、アガロースゲル上での2回のサイズ選別、および平滑末端連結を行った。Qiagene Robot 9600を用いて高処理ミニプレップを行い、5倍の適用範囲を提供すると推定されるショットガンシーケンシングをABI 377シーケンサーを用いて行った。2,000個のショットガン配列を用いて大きなコンティグを集合させた。ベクターの隣接配列はクロスマッチ (CrossMatch) を用いて削除した。BAC14およびPAC14の両方の配列をphred/phrap/consedプログラムによって解析し、11個の配列コンティグを確認した。配列コンティグをPhrapを用いて集合させ、Consedにより編集した。計算アルゴリズム (GenescanとBlast Searchの組み合わせ) により、エキソン、イントロンおよびエキソン-イントロン境界が同定され、grl領域における4つの推定遺伝子を形成していた (遺伝子A~Dと命名)。

【0133】

次にBACおよびPACをプローブとして用いて胚cDNAライブラリーをスクリーニングした。cDNAを全載 (whole mount) インサイチュハイブリダイゼーションおよび組織分析によって単離した。24時間cDNAライブラリーを、ゲノム反復抑制カクテル (5×SSC、2.5 μg/μlのゲノムDNA、0.5 μg/μlのCA oligoおよびGT oligo、0.5 μg/μlのmermaidリピートおよびepdリピート) 中で一晩プレアニーリングさせたα³²P標識されたBAC14またはPAC14を用いて、ハイブリダイゼーションバッファー (6×SSC、0.5% SDS、100 μg/μlウシ胸腺DNA) 中にてスクリーニングした。フィルターを2×SSC/0.1% SDS、0.2×SSC/0.1% SDS中で洗浄した。一塩基多型 (SNPs) を用いたその後のファインマッピングにより、遺伝子Bがgrl領域の外側にあることが示された。他の3つの遺伝子を野生胚および変異胚から配列決定し、それらの発現パターンを検討した。遺伝子CはヒトPex7のゼブラフィッシュ相同分子種 (ortholog) と考えられ、遺伝子Dは新規であると思われた。変異胚におけるCおよびDのコード領域中には一致した変異は認められず、CおよびDの発現パターンに大動脈また周囲組織との関連はなかった。

【0134】

遺伝子Aは両側性背側大動脈の合流領域 (merging region) で発現していた。grl変異体は両側性背側大動脈から一本の中線 (midline) 背側大動脈への合流過程に欠陥があるため、遺伝子Aは有望な候補であると考えられた。ゲノム配列解析によって、遺伝子Aの6つのコードエキソンおよびイントロン-エキソン境界が特定された。変異を検索するために、grl^{m145}変異体および同種野生型子孫における遺伝子Aのすべてのエキソンおよびイントロン-エキソン境界のシーケンシングを行った。単一のTからAへの転換変異も同定され、またRT-PCRによって単離したgrl変異体のシーケンシングによっても見出された。

【0135】

このように、遺伝子Aは重要な区間 (図1) にマッピングされ、かつgrl^{m145}変異胚において存在するが、野生型子孫には存在しない変異を有していた。さらに、以下に示す通り、遺伝子Aは両側性背側大動脈の合流領域にある大動脈で選択的に発現しており、これはgrl表現型に一致し、かつこれに合成野生型RNAを微量注入するとgrl変異はレスキューされた。したがって、遺伝子Aはgrl遺伝子である。

【0136】

grlによってコードされるタンパク質

grlゲノムDNAおよびcDNA配列の翻訳により、ゼブラフィッシュgrlは301アミノ酸からなる新規タンパク質をコードすると予想された (図2A; 配列番号: 2)。hgrlと命名したgrlのヒト相同分子種 (図2A; 配列番号: 4) もまたESTデータベース検索によって同定され、かつヒトEST AI727779およびAA116067から集合させた。予想されるヒトおよびゼブラフィッシュのgrlのアミノ酸配列のアラインメントにより、全体的な同一性は78%であり、bHLH (100%) およびオレンジ (95%) ドメインにおいてさらに同一性が高いことが示された。これらのドメインを除くとgrlタンパク質間の同一性は65%であった。grlタンパク質のカルボキシ末端にはYRPWタンパク質相互作用ドメインモチーフがある。

【0137】

grl遺伝子には、hesr (hairy/enhancer of split-related) bHLH遺伝子 (Fisherら、Molecular and Cellular Biology、2670~2677、1996; Kokuboら、Bioche

mical Biophysical Research Communications 260 : 459 ~ 465、1999) との配列類似性が認められた。hesr遺伝子(図2Bおよび図2D)はヘアリー関連bHLH遺伝子のサブグループである。他のヘアリー遺伝子と同様、これらはN末端bHLHドメイン、オレンジドメインおよびカルボキシ末端付近にタンパク質-タンパク質相互作用モチーフを有すると予想される。図2Bはgrl遺伝子とhesr遺伝子のbHLHドメイン、オレンジドメインおよびC末端モチーフの配列比較を示す。特に、オレンジドメインにおいてgrlタンパク質とhesrタンパク質との間で6アミノ酸が異なる。配列アラインメントをGCGパッケージのPileup(バージョン10)を用いて行い、表示にはMacBoxshade 2.15のインターフェースを用いた。grl遺伝子は、同じくbHLH遺伝子のhesr遺伝子ファミリーのメンバーであるマウスHey2/HRT-2遺伝子とも関連性がある(Leimeisterら、Mechanisms of Development 85 : 173 ~ 177、1999)。

【0138】

カルボキシ末端モチーフはヘアリータンパク質の作用には重要であるが、hesrタンパク質においては大きく異なっている。hesrタンパク質は、塩基性ドメインにおけるグリシン-プロリン置換、およびカルボキシ末端WRPWモチーフのYRPWへの変化という点でヘアリー関連ファミリーの他のメンバーとは異なり、後者は13アミノ酸のhesrモチーフ内に含まれる。grlはhesr、hesおよびヘアリータンパク質とbHLHドメインにおいて最も高い類似性(85%)を示し、オレンジドメインにおいてある程度の類似性(55%)を示し、カルボキシ末端においてYRPWモチーフ、タンパク質-タンパク質相互作用ドメインも有する。保存領域以外では、grlタンパク質のhesrタンパク質との同一性は約21%に過ぎない。これらのタンパク質の間の全体的類似性が低い(25% ~ 43%)ことは、それらが異なる遺伝子ファミリーに属することを示す。

【0139】

grl変異胚のゲノム配列には、野生型と比較すると一貫したTからAへの転換変異が認められ、このために不変の停止コドンがグリシンに変化し、更なる44アミノ酸が野生型タンパク質に付加されていた(図2C)。変異は検討した8種のgrl変異胚すべてのゲノム領域に認められ、10種の変異胚のプール由来のcDNAのRT-PCR

においてもまた認められた。YRPWドメインに隣接するカルボキシ末端にある変異の位置から、タンパク質-タンパク質相互作用における役割が示唆されたが、タンパク質の安定性もまた影響を受ける可能性がある。

【0140】

grl mRNAの発現

ゼブラフィッシュ胚発生過程におけるgrl発現パターンを検討するために、さまざまな時点で全載インサイチュールNAハイブリダイゼーションを行った。grl転写産物は血管形成の前に、10体節期に側板中胚葉の前部および後部領域においてまず検出され、左右対称の縞として出現した（図3A、背側像）。

【0141】

全量（whole amount）RNAインサイチュールNAハイブリダイゼーションを記載された通りに行った（Jowettら、Trends Genet. 10：73～74、1994）。ORFおよび3'UTRの両方を含むcDNAの1891bpの断片をインビトロ転写のためにサブクローニングした。組織学的分析用に標本を4%パラホルムアルデヒドで固定し、脱水し、プラスチックで包埋した（JB-4）。ノマルスキー顕微鏡写真撮影はEctachrome160Tフィルム（Zeiss）を用いてAxiophotにより行った。低倍率の顕微鏡写真の撮影には、ニコンのカメラを装着したWild M5およびM10解剖顕微鏡を用いた。胚のステージングはキンメル（Kimmel）ら（Dev.Dyn. 203：253～310、1995）に従って行った。

【0142】

14体節期までに、grl発現細胞は腹側中線に沿って集束し始め、脊索のすぐ腹側に背側大動脈の原基を形成した。大動脈の下方の体軸静脈（axial vein）の前駆領域にはgrl発現細胞は全く認められなかった。30体節期にはgrlは背側大動脈全体で強く発現した（図3B～図3C、体幹前部、体幹後部および尾部の側面像、背側大動脈にgrl転写産物が認められる；図3D、体幹後部の組織矢状断面。背側大動脈の内腔にgrl発現が認められ、体軸静脈にはgrl陰性細胞が認められる）。前部ではgrlは大動脈対の内皮細胞で発現したが、両側性主要静脈では発現しなかった（図3E；体幹前部の組織横断面、grl発現が脊索下方の背側大動脈対に認められる）。体幹ではgrl発現は中線大動脈に認められたが、体軸静脈には認めら

れなかった（図3F～図3G；体幹後部の組織横断面、grl発現は中線背側大動脈および体節間動脈の内皮細胞に認められ、体軸静脈の内皮細胞ではgrl発現が認められない）。対照的に、初期内皮マーカーであるfliは動脈および静脈の両方で発現した（図3H～図3I）。体幹前部では、grlはgrl変異による影響が最も大きい領域である大動脈分岐部で選択的に発現した。さらに、grlは心臓、大動脈弓および体節側部に一過的に発現し、パターンはマウスHeyおよびHRT遺伝子に関して記載されたものと類似していた（Leimeisterら、Mechanisms of Development 85 : 173～177、1999）。

【0143】

grlの異所性発現はgrl変異体をレスキューする

grl遺伝子におけるm145変異がゼブラフィッシュ変異胚の大動脈形態形成異常の原因であるならば、野生型grl RNAによって変異体表現型がレスキューされるはずである。

【0144】

野生型grlがgrl^{m145}変異の欠陥をレスキューしうるか否かを確かめるために、野生型grlタンパク質（grl^{wt}）またはYRPWモチーフ前のアミノ酸250を切断された変異型grlタンパク質（grl^{del}）をコードするインビトロ転写grl RNAを、grl系統間交配による1～4細胞期の野生胚および変異胚に微量注入した。さまざまな用量のmRNAを検討し、約55pgのmRNAを注入に用いた。55pgのgrl^{wt}またはgrl^{del}を注入された野生胚のうち平均で90%が正常に発生した。高用量のmRNA（約200pg）は、野生胚の約60%に発生異常をもたらした。野生型grlおよび、C末端切断を有するgrl RNAのHindIII消化後に、17 RNAポリメラーゼおよびmMESSAGE mMACHINEシステム（Ambion）を用いて注入用のセンスキャップRNAを合成した。注入はマイクロインジェクター（Microinjector）5242を用いて行った。

【0145】

微量注入を行った胚を変異の表現型に基づいてスコア化し、遺伝子型を判定した。grl^{m145}変異は完全に浸透性の（penetrant）劣性変異であり、最も顕著な表現型は血管造影的に示すことのできる体幹への循環が48時間時点で認められないことである（図4A～図4B）。微小血管造影を、別の記載の通りに行った（Weinst

einら、Nature Medicine 1: 1143~1147、1995)。表現型分析を体幹および尾部の循環状態に基づいて行い、一部の胚を受精48時間後に造影して分析した。注入した胚を、正常な尾部循環があれば表現型的に野生型と分類し、尾部循環がなければ変異型と分類した。すべての注入胚を密接にリンクしたマイクロサテライトマーカーによって遺伝子型判定し、遺伝子型を判定した胚の一部を配列分析によってさらに確認した。

【0146】

図4A～図4Cは、微小血管造影によるgrl変異の表現型の相補性を示している。図4Aは野生胚の表現型を示しており、背部大動脈（矢印）を通して血流が体幹に流れ、体軸静脈（矢印）を通して戻ることを示している。図4Bは、背側大動脈対の大動脈接合部における閉塞のために体幹での循環がみられないgrl変異胚を示している。図4Cは、体幹への循環が回復した、表現型的には野生型であるが遺伝子型は変異型である胚を示している。4つの野生型、4つの変異型および4つのレスキュー胚におけるgrlのC末端ヌクレオチド配列をそれぞれ右に示している。野生型配列と比較すると、grl変異胚およびレスキューされたgrl変異胚には、TからAへの点変異が1つある。

【0147】

【表1】 RNA注入によるgrl変異体のレスキュー

注入RNA	胚の総数	表現型変異型	表現型野生型
		遺伝子型変異型	遺伝子型変異型
grl ^{wt}	151	29	10
grl ^{del}	66	16	0

【0148】

表1および図4A～図4Cに示す通り、野生型grl RNAを注入された一群では、grl変異体表現型を呈する胚の推定数が26%減少した。これに対して、YRPWモチーフを含む、カルボキシ末端領域が除去されたgrl切断型変異体遺伝子は、表1に示す通り、m145変異をレスキューすることはできなかった。

【0149】

外見的には野生型であるレスキューされた胚が遺伝子型的には変異体であることが、配列解析によって確認された。grl変異胚およびレスキューされたgrl変異胚には、野生型配列と比較してTからAへの点変異が1つあった。

【0150】

上記の通り、grlは、他の細胞種において細胞運命決定に重要な、bHLHタンパク質のヘアリー関連ファミリーのメンバーである。例えば、ショウジョウバエ神経系では、ヘアリーファミリーのメンバーはノッチ（Notch）の下流で転写抑制因子として作用し、神経前駆細胞の等価集団のパターン化および確立を助ける。本発明者らの研究は、grlが特に大動脈血管芽細胞に関しても類似の役割を果たしていることを示しており、このことはbHLH遺伝子が血管形成に一定の役割を果たすことを示すものである。

【0151】

その他の態様

本明細書に記載したすべての刊行物および特許出願は、それぞれの独立した刊行物または特許出願が参照として組み入れられることが特におよび個々に示されている場合と同程度に、参照として本明細書に組み入れられる。

【0152】

本発明をその特定の態様とともに説明してきたが、さらなる改変が可能であり、かつ本出願は、本発明の原理に一般に準拠し、本発明が属する技術分野の範囲内にある周知または習慣的な実践からの本開示のそのような逸脱を含む、発明の任意の変更、用途または適合物に及ぶことが意図されており、上記の本明細書記載の本質的な特徴および添付の特許請求の範囲に従って適用されることが理解されるべきである。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION

<120> Gridlock Nucleic Acid Molecules,
Polypeptides, and Diagnostic and Therapeutic Methods

<130> 00786/378W02

<150> US 60/163,903

<151> 1999-11-05

<160> 4

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 1598

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

```

tcggcgctccg agcttccggc cgggctgtgc ccgcgcgggt cttcgccggg atgaagcgcc 60
cctgcgagga gacgacctcc gagagcgaca tggacgagac catcgacgtg gggagcgaga 120
acaattactc ggggcaaaagt actagctctg tgattagatt gaattctcca acaacaacat 180
ctcagattat ggcaagaaa gaaaggagag ggattataga gaaaaggcgt cgggatcggg 240
taaataacag ttatctgag ttgagaagac ttgtgccaac tgcctttgaa aaacaaggat 300
ctgcaaaagt agaaaaagct gaaatattgc aaatgacagt ggatcatttg aagatgcttc 360
aggcaacagg gggtaaaggc tactttgacg cacacgctct tgccatggac ttcattgagca 420
taggattccg agagtgccta acagaagttg cgcggtaacc gagctccgtg gaaggcctgg 480
actcctcgga tccgctgcgg gtgcgggttg tgtctcatct cagcacttgc gccaccagc 540
gggaggcggc ggccatgaca tccctccatgg cccaccacca tcatecgctc caccgcgcatc 600
actggggcgc cgccttcac caactgcgcg cagcctgct ccagcccaac ggctccatg 660
cctcagagtc aaccccttgt cgcctctcca caacttcaga agtgcctcct gccacggct 720
ctgtctctct caccggccacg tttgccatg cggattcagc cctccgaatg ccateccagg 780
gcagcgtcgc cccctgcgtg ccacctctct ccacctctct cttgtccctc tctgccaccg 840
tccacgcgcg agccgcagca gccacggcgg ctgcacacag cttccctctg tcttgcggcg 900
gggcattccc catgcttccc ccaaacgcag cagcagcagt ggcgcgggcc acagccatca 960
gcccgcctt gtcagtatca gccacgtcca gtccctcagca gaccagcagt ggaacaaaca 1020
ataaacctta ccgaccctgg gggacagaag ttggagcttt ttaaattttt cttgaacttc 1080
ttgcaatagt aactgaatgt cctccatttc agagtccagt taaaacctct gccacctgaa 1140
ggtagccata cagatgcoga cagatccaca aaggaacaat aaagctattt gagacacaaa 1200
cctcacgagt ggaaatgtgg tattctcttt tttttctctc ccttttttgt ttggttcaag 1260
gcagctcggt aactgacatc agcaactttt gaaaacttca cacttggtac catttagaag 1320
tttcctggaa aatatatgga ccgtaccatc cagcagtgca tcagtatgtc tgaattgggg 1380
aagtaaaatg ccttgactga attctcttga gactagatgg gacatacata tatagagaga 1440
gagtgagaga gtctgttttc gtaagtgcct gagcttagga agttttcttc tggatatata 1500
acattgcaca agggaagacg agtgtggagg ataggttaag aaaggaaagg gacagaagtc 1560

```

ttgcaatagg ctgcagacat ttttaatacca tgccagag

1598

<210> 2

<211> 337

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Lys Arg Pro Cys Glu Glu Thr Thr Ser Glu Ser Asp Met Asp Glu
 1 5 10 15
 Thr Ile Asp Val Gly Ser Glu Asn Asn Tyr Ser Gly Gln Ser Thr Ser
 20 25 30
 Ser Val Ile Arg Leu Asn Ser Pro Thr Thr Thr Ser Gln Ile Met Ala
 35 40 45
 Arg Lys Lys Arg Arg Gly Ile Ile Glu Lys Arg Arg Arg Asp Arg Ile
 50 55 60
 Asn Asn Ser Leu Ser Glu Leu Arg Arg Leu Val Pro Thr Ala Phe Glu
 65 70 75 80
 Lys Gln Gly Ser Ala Lys Leu Glu Lys Ala Glu Ile Leu Gln Met Thr
 85 90 95
 Val Asp His Leu Lys Met Leu Gln Ala Thr Gly Gly Lys Gly Tyr Phe
 100 105 110
 Asp Ala His Ala Leu Ala Met Asp Phe Met Ser Ile Gly Phe Arg Glu
 115 120 125
 Cys Leu Thr Glu Val Ala Arg Tyr Leu Ser Ser Val Glu Gly Leu Asp
 130 135 140
 Ser Ser Asp Pro Leu Arg Val Arg Leu Val Ser His Leu Ser Thr Cys
 145 150 155 160
 Ala Thr Gln Arg Glu Ala Ala Ala Met Thr Ser Ser Met Ala His His
 165 170 175
 His His Pro Leu His Pro His His Trp Ala Ala Ala Phe His His Leu
 180 185 190
 Pro Ala Ala Leu Leu Gln Pro Asn Gly Leu His Ala Ser Glu Ser Thr
 195 200 205
 Pro Cys Arg Leu Ser Thr Thr Ser Glu Val Pro Pro Ala His Gly Ser
 210 215 220
 Ala Leu Leu Thr Ala Thr Phe Ala His Ala Asp Ser Ala Leu Arg Met
 225 230 235 240
 Pro Ser Thr Gly Ser Val Ala Pro Cys Val Pro Pro Leu Ser Thr Ser
 245 250 255
 Leu Leu Ser Leu Ser Ala Thr Val His Ala Ala Ala Ala Ala Thr
 260 265 270
 Ala Ala Ala His Ser Phe Pro Leu Ser Phe Ala Gly Ala Phe Pro Met
 275 280 285
 Leu Pro Pro Asn Ala Ala Ala Ala Val Ala Ala Ala Thr Ala Ile Ser
 290 295 300
 Pro Pro Leu Ser Val Ser Ala Thr Ser Ser Pro Gln Gln Thr Ser Ser
 305 310 315 320
 Gly Thr Asn Asn Lys Pro Tyr Arg Pro Trp Gly Thr Glu Val Gly Ala
 325 330 335
 Phe

<210> 3
 <211> 1898
 <212> DNA
 <213> Danio rerio

<400> 3
 ggaatgaagt ttgagacctc cattcgacgg ctgggggggt gttttctatt ttttttttac 60
 ggtgggtgtt ccggaagcag gacgtggggc tgaatgtgag actgaggctc cagcggttcg 120
 tgggaaaagg gctcagagag tttttggtgt ctgtacctgc gcgcactgca tcatgaagcg 180
 gccctgtgag gacagcacgt ccgacagcga catggatgaa accattgatg tgggcagcca 240
 gaataactac tctggccaaa gcaatgggtc atttataaga tgtgggtcac ctacaacgac 300
 atcccaagtc atggccagaa agaagcggag agggatcatt gaaaaaagaa gaagggaccg 360
 gataaataat agcttatcag agttgcgtcg tctggtgcca acagcttttg agaaacaggg 420
 atctgccaa gttggagaa gggaaatatt gcagatgaca gtggatcatc tgaagatgct 480
 tcaggccaca ggaggaaa gatatctcga cgtcattctt ctggccatgg acttcttgag 540
 cattggcttc cgggagtgte tgactgaagt ggccagggtt ttgagctctg tggaaaggcct 600
 ggactccage gacctctctc gtgtccgtct ggtttctcac ctccagcagc gtgcttcgca 660
 gaggggaagca gccgccatga ccacatccat agcccatcac cagcaggccc ttcacccgca 720
 ccaactgggt gcgctttgac atcccatctc tgtgtcgttc ctgcagcaga gcggacttcc 780
 ctctccagag agtcctccg gcaggctgtc tgaggctcct caaagagggt cagccctttt 840
 ctcccatagt gactcggcac tcagagcgcc ctctactgga agtgtggctc cttgcgtgcc 900
 accgctgtcc acttctctgc tttcgttacc agcagccgtt cagcagcag ctgctgcagc 960
 tgcagctcaa accctccctc tateatttcc cgtcggatcc cactcttcca gccccagcgt 1020
 tacagcatct tcaagggtt ctccaccgtt gactcttcc gtttccacat ccaccacatc 1080
 ccaacagagc agcgggagca acagtaaac ataccgaccg tggggaaactg aagtgggagc 1140
 gtttttaaag ttggatttaa atgttgagc tcttccatgc tttgtacata aaggaaagca 1200
 gcggctattg tgcctgtctc ggtcagcagc atgggctttt gtcttctctc acacttgtgc 1260
 acatatgcag cgtcaaacct aagccaacat tctgggaaga aaagaaagag tttttacacg 1320
 tcgcaactgt ttggaaaccg taaaggaagt ttgtttctgt tttaacagtg cctgcataaa 1380
 cactgctaac atgctgcatt tgagatgtat gctttgatat catctgactt ccacaaacac 1440
 ccaacagcag ctttagagtg aacagcttgt tctgaaacaa accaaagttt tgcagataat 1500
 cactaaagtg aggtgtttgt ttttttatct ctgatttaac aatccagttt gtaaatctgt 1560
 acatgtgtaa gattgtaact agagtttata ttgaaattag ttcattggtt tgatgcactt 1620
 caatcactac tgtttgtttg gggggagaca ggatcttctc cgatttatac aataggccta 1680
 ctgaagtgtt ttttttaaaa taacattcac taatactcat gtgagatttt tctactactg 1740
 taactgtgtt aataaccacc ctctgtgaaga tgaacctttt tctatgcaa aaaaacaaat 1800
 gtccttcaag aacgaactga gtgtgttttg ttttcattct gacacacgct aataaaacca 1860
 tctttccact agccttcacc acaacacatc gtggaatg 1898

<210> 4
 <211> 324
 <212> PRT
 <213> Danio rerio

<400> 4
 Met Lys Arg Pro Cys Glu Asp Ser Thr Ser Asp Ser Asp Met Asp Glu
 1 5 10 15
 Thr Ile Asp Val Gly Ser Gln Asn Asn Tyr Ser Gly Gln Ser Asn Gly

	20		25		30										
Ser	Phe	Ile	Arg	Cys	Gly	Ser	Pro	Thr	Thr	Thr	Ser	Gln	Val	Met	Ala
	35						40					45			
Arg	Lys	Lys	Arg	Arg	Gly	Ile	Ile	Glu	Lys	Arg	Arg	Arg	Asp	Arg	Ile
	50					55						60			
Asn	Asn	Ser	Leu	Ser	Glu	Leu	Arg	Arg	Leu	Val	Pro	Thr	Ala	Phe	Glu
	65				70					75				80	
Lys	Gln	Gly	Ser	Ala	Lys	Leu	Glu	Lys	Ala	Glu	Ile	Leu	Gln	Met	Thr
			85						90					95	
Val	Asp	His	Leu	Lys	Met	Leu	Gln	Ala	Thr	Gly	Gly	Lys	Gly	Tyr	Phe
			100						105					110	
Asp	Ala	His	Ser	Leu	Ala	Met	Asp	Phe	Leu	Ser	Ile	Gly	Phe	Arg	Glu
	115						120						125		
Cys	Leu	Thr	Glu	Val	Ala	Arg	Tyr	Leu	Ser	Ser	Val	Glu	Gly	Leu	Asp
	130					135						140			
Ser	Ser	Asp	Pro	Leu	Arg	Val	Arg	Leu	Val	Ser	His	Leu	Ser	Ser	Cys
	145				150					155				160	
Ala	Ser	Gln	Arg	Glu	Ala	Ala	Ala	Met	Thr	Thr	Ser	Ile	Ala	His	His
			165						170					175	
Gln	Gln	Ala	Leu	His	Pro	His	His	Trp	Ala	Ala	Ala	Ala	Leu	His	Pro
		180						185						190	
Pro	Ala	Ala	Phe	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Leu	Pro	Ser	Ser	Glu	Ser	Ser
	195						200					205			
Ser	Gly	Arg	Leu	Ser	Glu	Ala	Pro	Gln	Arg	Gly	Ala	Ala	Leu	Phe	Ser
	210					215					220				
His	Ser	Asp	Ser	Ala	Leu	Arg	Ala	Pro	Ser	Thr	Gly	Ser	Val	Ala	Pro
	225				230					235				240	
Cys	Val	Pro	Pro	Leu	Ser	Thr	Ser	Leu	Leu	Ser	Leu	Ser	Ala	Thr	Val
			245						250					255	
His	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Gln	Thr	Phe	Pro	Leu	Ser	Phe
		260						265					270		
Pro	Ala	Gly	Phe	Pro	Leu	Phe	Ser	Pro	Ser	Val	Thr	Ala	Ser	Ser	Val
	275						280					285			
Ala	Ser	Ser	Thr	Val	Ser	Ser	Ser	Val	Ser	Thr	Ser	Thr	Thr	Ser	Gln
	290					295					300				
Gln	Ser	Ser	Gly	Ser	Asn	Ser	Lys	Pro	Tyr	Arg	Pro	Trp	Gly	Thr	Glu
	305				310					315				320	
Val	Gly	Ala	Phe												

【図面の簡単な説明】

【図1】 ゼブラフィッシュグリッドロック領域の局所遺伝子、物理的、および放射線ハイブリッドマップを示す図である。

【図2A】 ゼブラフィッシュgrlおよびヒトgrl（配列番号：2および配列番号：4）のアミノ酸配列の配置である。

【図2B】 塩基性ヘリックス・ループ・ヘリックス、オレンジ、およびYR PWドメインにおけるゼブラフィッシュおよびヒトのgrl、hHESR-1、mHESR-1、およびdHESR-1のアミノ酸配列配置である。

【図2C】 grl^{m145}変異の結果TからA変換が起こることを示す、核酸シーケンシング結果のグラフである。

【図2D】 ゼブラフィッシュおよびヒトのgrl、hHESR-1、mHESR-1、およびdHESR-1タンパク質のアミノ酸配列配置である。

【図3A】 10体節期（背側図）での両側の縞（矢印）としてのgrl mRNAの

発現を示す組織学的切片である。

【図3B～C】 背側大動脈（矢印）でのgrl転写物を示す動脈駆幹、後方駆幹、および尾部の側面図を示す組織学的切片である。

【図3D】 grl発現（矢印）および体軸動脈でのgrl陰性細胞（矢印）と共に背側大動脈の管腔を示す後方駆幹の矢状組織学的切片である。

【図3E】 脊索に対して腹側の一对の背側大動脈（矢印）でgrlが発現されるが、両側の重要な静脈（矢印の先）では発現されないことを示す、前方駆幹の横断組織学的切片である。

【図3F～G】 脊索の下（矢印の先）で、新芽に類似したもの（体節間動脈；小さい矢印）に伸長する正中線背側大動脈での内皮細胞におけるgrl発現を示すが、静脈では発現を示さない（矢印）後方駆幹の横断組織学的切片である。

【図3H】 正中線背側大動脈（矢印の先）および体軸静脈（矢印）の双方でのfli発現を示す後方駆幹の横断組織学的切片である。

【図3I】 第一体節のレベルで前方駆幹を通じた横断組織学的切片である；fliは、両側の共通の重要な静脈（矢印の先）および一对の背側大動脈（矢印）で発現される。

【図3J】 25体節期（矢印）での大動脈分岐でのgrlの選択的発現の背側図を示す前方駆幹の縦方向の組織学的切片である。

図3A～3Jに関し、(B)、(C)、(D)、(E)、(F)、(G)、(H)、および(I)では背側が上である；(B)、(C)、および(J)では前方が左である。インサイチュハイブリダイゼーションは、30体節（24時間）期で行った。N、脊索；da、背側大動脈；v、体軸静脈。

【図4A】 野生型胚の表現型を示す微小血管像である。

【図4B】 grl変異体の表現型を示す微小血管像である。

【図4C】 レスキューされたgrl変異体の表現型を示す微小血管像である。

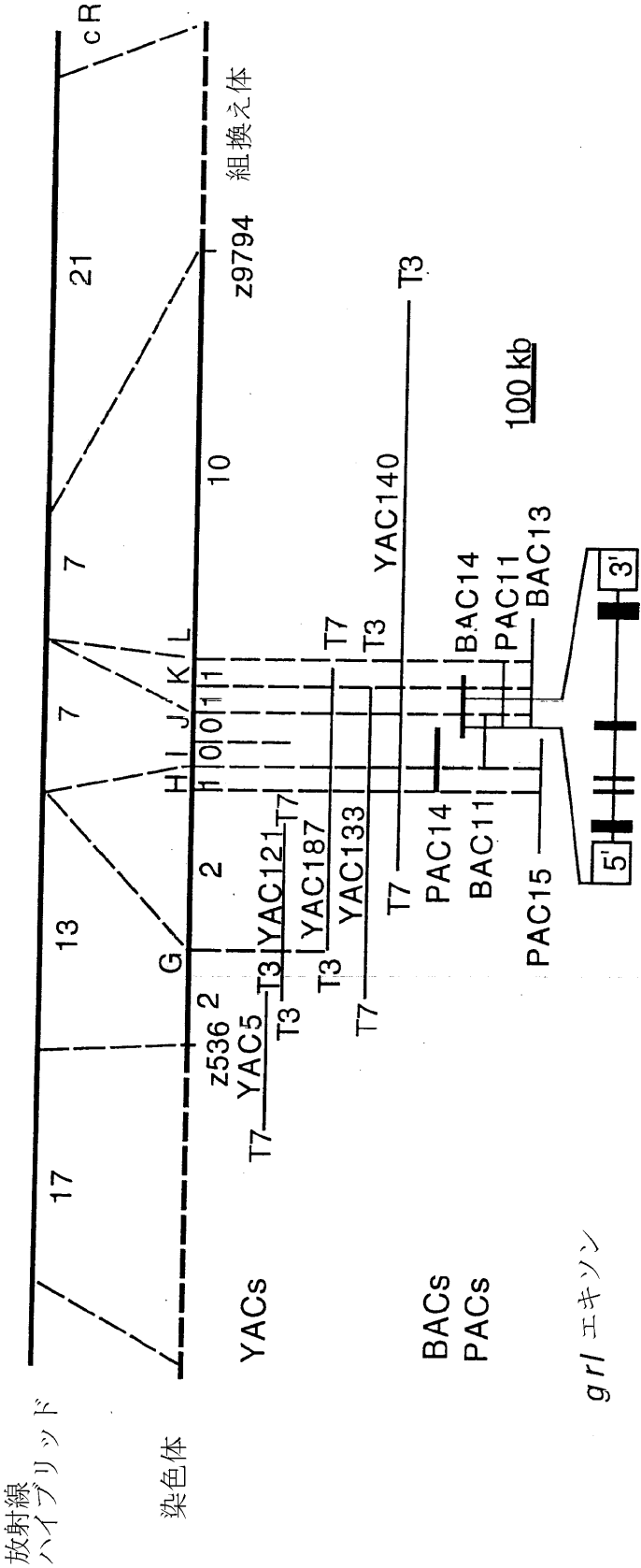
。

【図5A】 ヒトgrl遺伝子のDNA配列（配列番号：1）である。

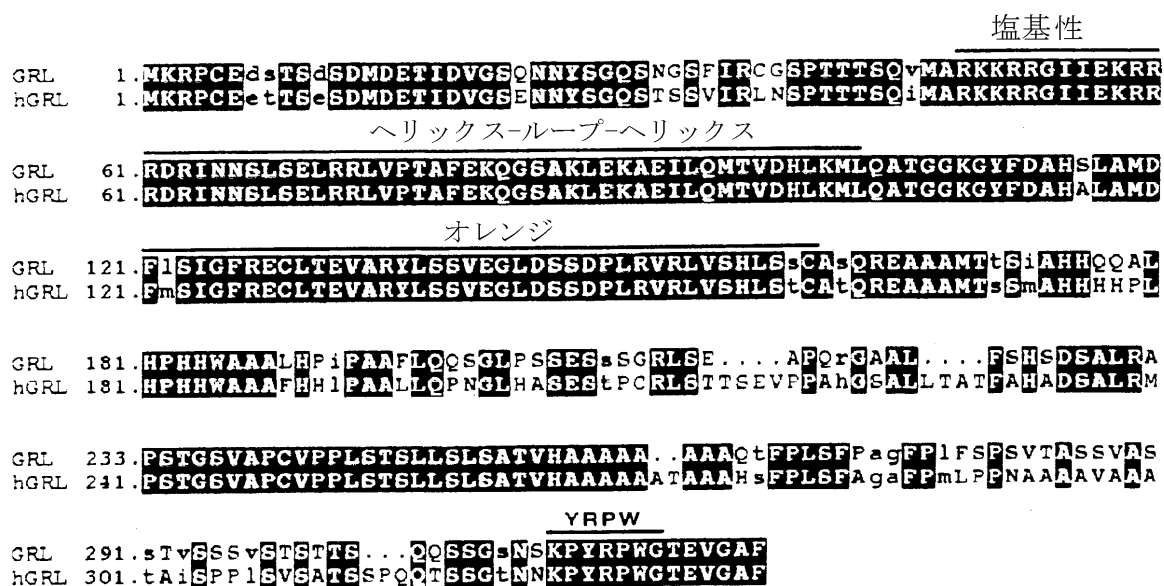
【図5B】 ゼブラフィッシュgrl遺伝子のDNA配列（配列番号：3）である。

。

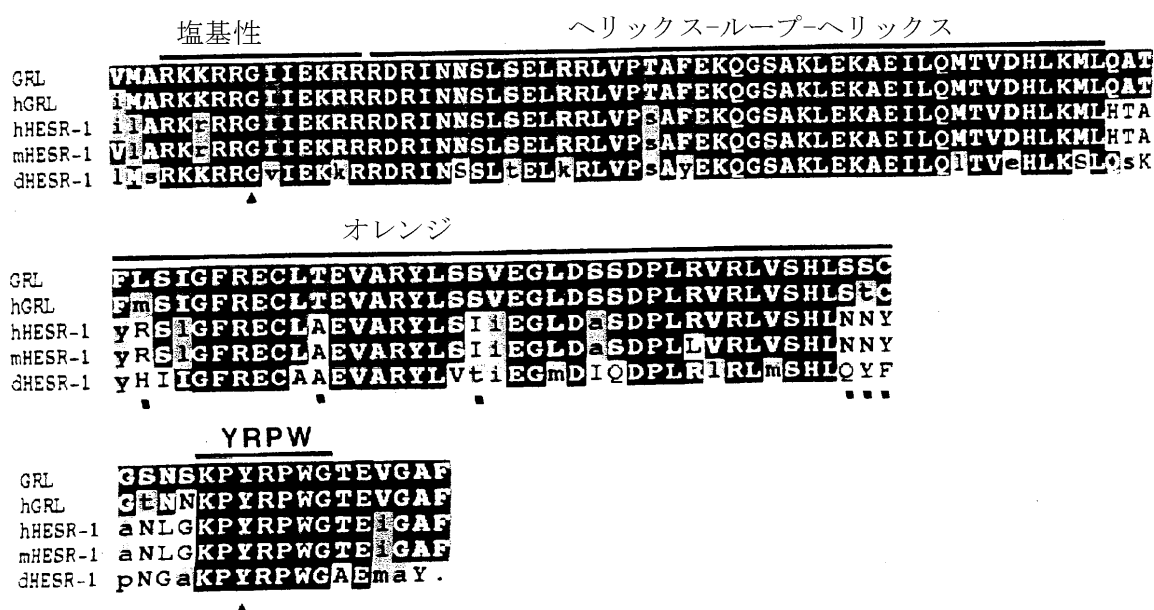
【図1】



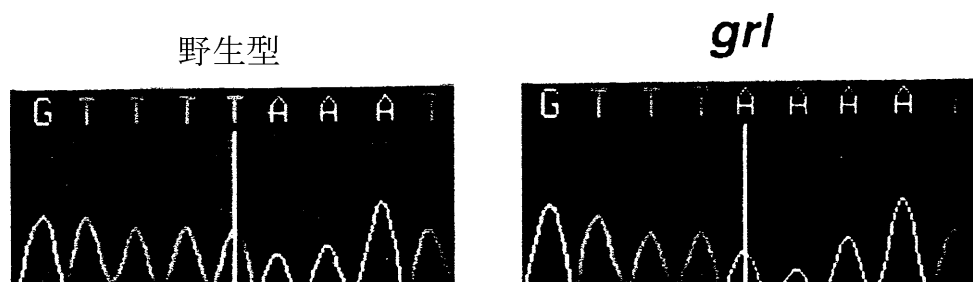
【図2A】



【図2B】



【図2C】



【図2D】

GRL 1:.....MKRIQEN.
 hGRL 1:.....MKRIQEN.
 hHESR-1 1:.....MKRAHPY
 mHESR-1 1:.....MKRAHPY
 dHESR-1 1:MDHNMHVNAFSLHHWGIAAGPGVVMFGATATTPQSHNVFPFQSHHGAHGNHSGHSGH

Basic

GRL 8:STSDSDMDDETIDVGSNNYSOGSNGSFIKCSPTTTSQVMAKKKRIIEKENETINN
 hGRL 8:STSDSDMDDETIDVGSNNYSOGSNGSFIKCSPTTTSQVMAKKKRIIEKENETINN
 hHESR-1 9:STSDSDMDDETIDVGSNNYSOGSNGSFIKCSPTTTSQVMAKKKRIIEKENETINN
 mHESR-1 9:STSDSDMDDETIDVGSNNYSOGSNGSFIKCSPTTTSQVMAKKKRIIEKENETINN
 dHESR-1 60:SHGIGS KRTISEGDC LYS ESKKQIS SEPGEQIM RKKKRG IFK RRRRNS

Helix-Loop-Helix

GRL 67:SLSELRLRVETAFKQGSARLEKAEILOMTVDHLKMLQATGCKGY.FCAHSLAMTFISI
 hGRL 67:SLSELRLRVETAFKQGSARLEKAEILOMTVDHLKMLQATGCKGY.FCAHSLAMTFISI
 hHESR-1 68:SLSELRLRVETAFKQGSARLEKAEILOMTVDHLKMLHTAGCKGY.FCAHSLAMTFISI
 mHESR-1 68:SLSELRLRVETAFKQGSARLEKAEILOMTVDHLKMLHTAGCKGY.FCAHSLAMTFISI
 dHESR-1 119:SLSELRLRVETAFKQGSARLEKAEILOMTVDHLKMLHTAGCKGY.FCAHSLAMTFISI

Orange

GRL 125:GFRECLTEVAVYLSVFGISSLDPRLVRIVSHISSCASQREAAAMTTSIAHHQQAALHPH
 hGRL 125:GFRECLTEVAVYLSVFGISSLDPRLVRIVSHISSCASQREAAAMTTSIAHHQQAALHPH
 hHESR-1 126:GFRECLTEVAVYLSVFGISSLDPRLVRIVSHISSCASQREAAAMTTSIAHHQQAALHPH
 mHESR-1 126:GFRECLTEVAVYLSVFGISSLDPRLVRIVSHISSCASQREAAAMTTSIAHHQQAALHPH
 dHESR-1 178:GFRECLTEVAVYLSVFGISSLDPRLVRIVSHISSCASQREAAAMTTSIAHHQQAALHPH

GRL 184:HWAAL...HPITAAF...QSBLSSESSSSORISE...APQCGAAL...FSHSDSALR
 hGRL 184:HWAAL...HPITAAF...QSBLSSESSSSORISE...APQCGAAL...FSHSDSALR
 hHESR-1 179:PWTVFGHHPHIAHPLLPQNGHGNAG...SPTETHQQRIGSAH..PEAPALR
 mHESR-1 179:PWTVFGHHPHIAHPLLPQNGHGNAG...SPTETHQQRIGSAH..PEAPALR
 dHESR-1 235:...SGYQFPNCAAPYDSYAPNPGYVSSYPTLSAEPQQQQQLGGRTSVSRGGS

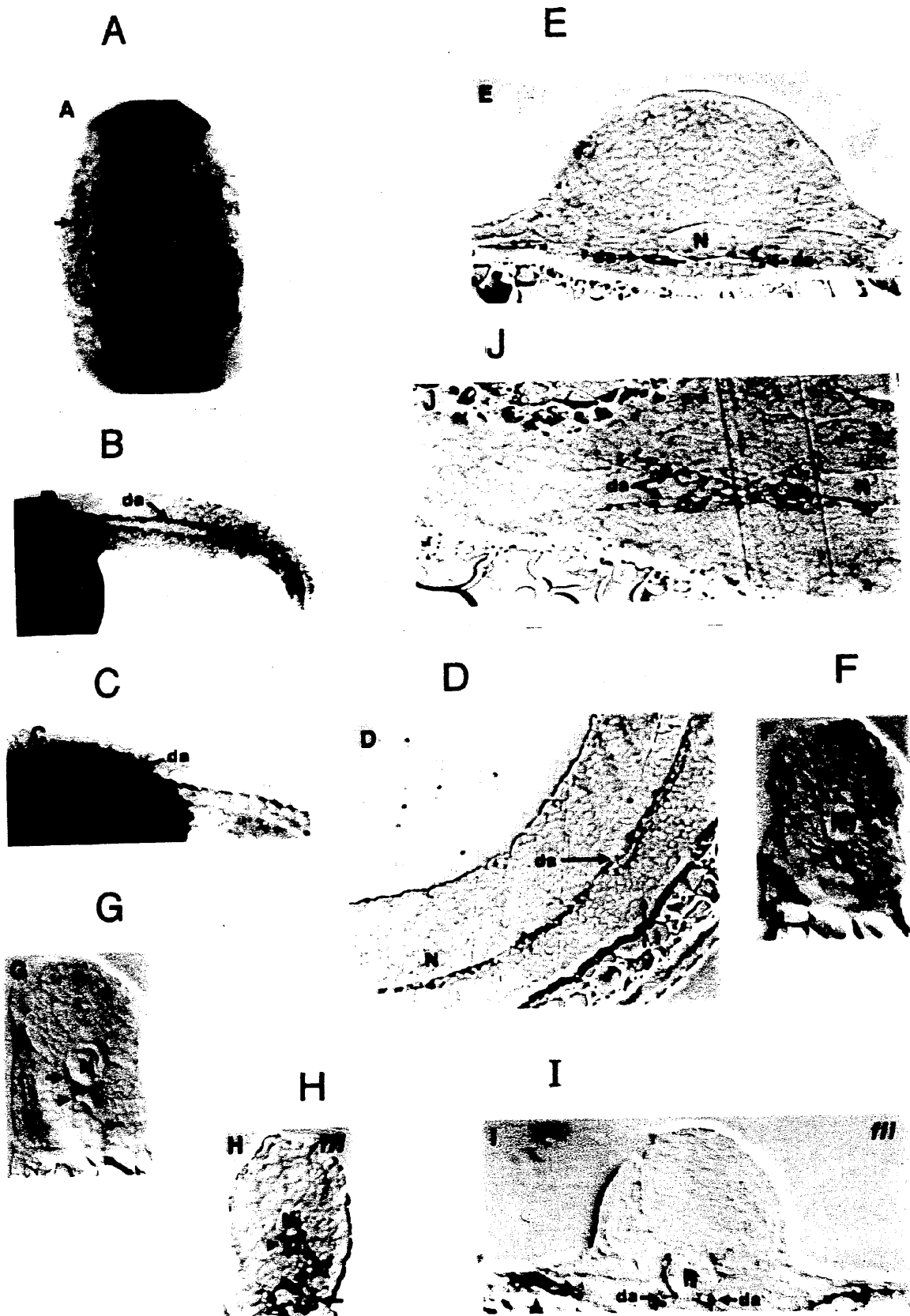
GRL 232:APSTGSAVAPVFFLSTSLSATV.....
 hGRL 240:MFSTGSAVAPVFFLSTSLSATV.....
 hHESR-1 231:APPQS...VL...VESASKLSP...
 mHESR-1 231:APPQS...VL...VESASKLSP...
 dHESR-1 292:AVESLPNDHSDS...SQQQQQQQQQQQQQQQHQQQQHQQQQQRTQTTPQPTQQQHYTH

GRL 256:HAHAHA...AAATFFPLSFPAAGFPLFSPVTASSVASSIVSSSVSTST...TS...QOSS
 hGRL 264:HAHAHAATAAAHFFPLSFPAAGFPLFSPVTASSVASSIVSSSVSTST...TS...QOSS
 hHESR-1 254:LVA LBA...FPFSP.GSFHLLSPNALPSAPQA.....
 mHESR-1 254:LVA LBA...FPFSP.GSFHLLSPNALPSAPQA.....
 dHESR-1 351:DHAVHEQQVPTYIELTNSNRPAAGSDSLYSAAPOYPVSQLPQQDYNNSSVLQY

YRPW

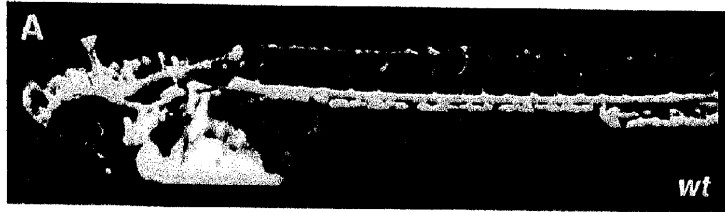
GRL 308:GNSKIYRIWTEVGAF
 hGRL 321:GNSKIYRIWTEVGAF
 hHESR-1 288:NLGKPYRIWTEVGAF
 mHESR-1 283:NLGKPYRIWTEVGAF
 dHESR-1 410:PNGKPYRIWTEVGAF

【図3】



【図4】

A

grl 表現型*grl* 遺伝子型

1. AGCGTTTTAAATGTT
 2. AGCGTTTTAAATGTT
 3. AGCGTTTTAAATGTT
 4. AGCGTTTTAAATGTT

B

grl 表現型*grl* 遺伝子型

1. AGCGTTTAAAATGTT
 2. AGCGTTTAAAATGTT
 3. AGCGTTTAAAATGTT
 4. AGCGTTTAAAATGTT

C

grl 表現型*grl* 遺伝子型

1. AGCGTTTAAAATGTT
 2. AGCGTTTAAAATGTT
 3. AGCGTTTAAAATGTT
 4. AGCGTTTAAAATGTT

【図5A】

GRL/ ヒト /1598 bp.

tcggcggtccgagcttccggccgggctgtgccccgcgcggctcctcgccgggatgaagcggccctgcgaggagacgacctcc
gagagcgacatggacgagaccatcgacgtggggagcgaacaattactcggggcaaagtactagctctgtgattagatt
gaattctccaacaacaacatctcagattatggcaagaaagaaaaggagagggattatagagaaaaggcgtcgggatcgga
taaataacagtttatctgagttgagaagacttgtgccaactgctttgaaaaacaaggatctgcaaagttagaaaaagct
gaaatattgcaaatacagtgatcattgaagatgcttcaggcaacaggggtaaaggctactttgacgcacacgctct
tgccatggacttcatgagcataggattccgagagtgcctaacagaagttgcgcggtacctgagctccgtggaaggcctgg
actcctcggatccgctgcgggtgcggcttgtgtctcatctcagcacttgcgccaccagcgggagggcggcgccatgaca
tctccatggcccaccaccatcatccgctccaccgcacactggggccgcccctccaccacctgcccgcagccctgct
ccagcccaacggcctccatgctcagagtcaaccccttgctgctctccacaacttcagaagtgcctcctgcccacggct
ctgctctctcacggccacgtttgccatgcggattcagccctccgaatgccatccacggcagcgtcgcgccctgcgtg
ccacctctctccacctctctctgtccctctctgccaccgtccacgccgcagccgcagcagccaccgcggctgcacacag
cttccctctgtccttcgcgggggcatccccatgcttccccaaacgcagcagcagcagtgccgcggccaacgccatca
gcccgccttgtagtatcagccacgtccagtcctcagcagaccagcagtggaacaaacaataaaccttaccgacctgg
gggacagaagtggagcttttaaattttctgaacttctgcaatagtaactgaatgtcctcatttcagagtcagct
taaaacctctgcaccctgaaggtagccatacagatgccgacagatccacaaaggaacaataaagctatttgagacacaaa

cctcagagtggaatgtggtattctctttttctctccctttttgtttggtcaaggcagctcggttaactgacatc
agcaacttttgaaaacttcacactgttaccatttagaagtttcttgaaaaatatggaccgtaccatccagcagtgca
tcagtatgtctgaattggggaagttaaataccctgactgaattctcttgagactagatgggacatacatatagagaga
gagtgagagagtcgtttcgttaagtcctgagcttaggaagtttctcttgatatataacattgcacaagggaagacg
agtgtggaggatagggttaagaaaggaaaggacagaagtcctgcaataggctgcagacatttaataccatgccagag

【図5B】

GRL/<sup>ゼブラ
フィッシュ</sup>/1898 bp.

ggaatgaagttgagacctccattcgacggctcggggcgtgtttctatttttttacggtgggtgtcccgaagcag
gacgtgggcgtgaatgtgagactgaggctccagcgggtcgtgggaaaggcgtcagagagttttgggtgtgtacctgc
gcgcactgcatcatgaagcggccctgtgaggacagcacgtccgacagcgacatggatgaaaccattgatgtgggcagcgc
gaataactactctggccaaagcaatggttcatttataagatgtggctcacctacaacgacatcccaagtcattggccagaa
agaagcggagagggatcattgaaaaagaagaagggaccggataaataatagcttatcagagttgcgtcgtctgtgcca
acagcttttgagaaacagggatctgccaagttggagaaagcggaaatattgcagatgacagtggatcatctgaagatgt
tcaggccacaggaggaaaaggatatttcacgctcattctctggccatggacttcttgagcattggctccgggagtgtc
tgactgaagtggccaggatatttgagctctgtggaaggcctggactccagcgaccctctccgtgtccgtctgtttctcac
ctcagcagctgtgcttcgagagggaagcagccgcatgaccacatccatagcccatcaccagcaggcccttcaccgcga
ccactgggctgccgctttgcatccattctctgtgcgttctgcagcagagcggacttccctcctcagagagctcctccg
gcaggctgtctgaggtcctcaaagaggtgcagcccttttcccatagtactcggcactcagagcgccctctactgga
agtgtggtccttgcgtgccaccgtgtccacttctctgtttcgttatcagcgaccgttcacgcagcagctgctgcagc
tgagctcaaaccttccctctatcatttccgctggattccactcttcagccccagcgttacagcatcttcagtggctt
cttccaccgtgagctcttccgtttccacatccaccacatcccaacagagcagcgggagcaacagtaaaccataccgaccg
tggggaactgaagtgggagcgttttaaatgttggatttaaatgttggacgtcttccatgctttgtacataaaggaaagca
gcggctattgtcctgcttcggctcagcagcatgggctttgtcttctctacactgtgcacatatgcagcgtcaaactt
aagccaacattctgggaagaaaagaaagagttttacacgtcgcactgtgttgaaaccgtaaaggaaagtttgttctgt
tttaacagtgcctgcataaacactgctaactgctgcatttgagatgtatgctttgatcatctgacttccacaaacac
ccaacagcagcttttagagtgaacagcttgttctgaaacaaacaaagttttgcagataatcactaaagtgaggtgtttgt
tttttatctctgatttaacaatccagtttgtaaactgtacatgtgtaagattgtaactagagtttatattgaaattag
ttcattgggtatgatgcacttcaatcactactgtttgttggggggagacaggatcttctccgatttatacaataggccta
ctgaagttgttttttaaaataacattcactaatactcatgtgagattttctactactgtaactgtgtaataaccacc
ctctgtaagatgtaaccttttctatgcaaaaaacaaatgtccctcaagaacgaactgagtgtgtttgttttcattct
gacacacgctaataaaaccatccttccactagccttcaccacaacacatcgtggaatg

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US00/30439												
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : C 07 K 1/00; C 07 H 21/04; A 01N 43/04. US CL : 530/350; 536/23.5; 514/44. According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC														
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 530/350; 536/23.5; 514/44. Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) USPatfull; STN; SEQUENCE SEARCH.														
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1"> <thead> <tr> <th>Category *</th> <th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>LEIMEISTER, C. et al. Hey genes: a novel subfamily of hairy-and Enhancer of split related genes specifically expressed during mouse embryogenesis. Mechanisms of Development. 1999, Vol. 85, pages 173-177, Fig 1 has 100% similarity to SEQ. ID. NO: 2, and claim 2.</td> <td>1-9 and 14-18</td> </tr> <tr> <td>T</td> <td>ZHONG, T. et al. Gridlock, an HLH Gene Required for Assembly of the Aorta in Zebrafish. Science. 10 March 2000, Vol. 287, pages 1820-1824.</td> <td>10-11</td> </tr> <tr> <td>T</td> <td>CHIN, M.T. Cardiovascular basic helix loop helix factor 1, novel transcriptional repressor expressed preferentially in the developing and adult cardiovascular system. J. Biol. Chem. 2000, Vol. 275, No. 9, pages 6381-6387.</td> <td>12-13, 38-41</td> </tr> </tbody> </table>			Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X	LEIMEISTER, C. et al. Hey genes: a novel subfamily of hairy-and Enhancer of split related genes specifically expressed during mouse embryogenesis. Mechanisms of Development. 1999, Vol. 85, pages 173-177, Fig 1 has 100% similarity to SEQ. ID. NO: 2, and claim 2.	1-9 and 14-18	T	ZHONG, T. et al. Gridlock, an HLH Gene Required for Assembly of the Aorta in Zebrafish. Science. 10 March 2000, Vol. 287, pages 1820-1824.	10-11	T	CHIN, M.T. Cardiovascular basic helix loop helix factor 1, novel transcriptional repressor expressed preferentially in the developing and adult cardiovascular system. J. Biol. Chem. 2000, Vol. 275, No. 9, pages 6381-6387.	12-13, 38-41
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.												
X	LEIMEISTER, C. et al. Hey genes: a novel subfamily of hairy-and Enhancer of split related genes specifically expressed during mouse embryogenesis. Mechanisms of Development. 1999, Vol. 85, pages 173-177, Fig 1 has 100% similarity to SEQ. ID. NO: 2, and claim 2.	1-9 and 14-18												
T	ZHONG, T. et al. Gridlock, an HLH Gene Required for Assembly of the Aorta in Zebrafish. Science. 10 March 2000, Vol. 287, pages 1820-1824.	10-11												
T	CHIN, M.T. Cardiovascular basic helix loop helix factor 1, novel transcriptional repressor expressed preferentially in the developing and adult cardiovascular system. J. Biol. Chem. 2000, Vol. 275, No. 9, pages 6381-6387.	12-13, 38-41												
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.														
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family														
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report 26 APR 2001												
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703)305-3230		Authorized officer Eleonor Sorbello Telephone No. 703-308-0196												

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US00/30439

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

This international report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claim Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claim Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claim Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

Group I: Claims 1-18, 38-41 drawn to nucleic acids encoding gridlock polypeptides, vectors, cells, and method of prevention and treatment. Group II: Claims 19-22 drawn to a non-human transgenic animal. Group III: Claims 23-24 drawn to probes.

Group IV: Claims 25-28 drawn to antibodies. Group V: Claims 29-37 drawn to methods of diagnostics and kits.

Group VI: Claim 42 drawn to a method of identifying compounds.

The inventions listed as Groups I, II, III, IV, V and VI do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons: Group I is directed to Nucleic acids, Group II to a non-transgenic animal, Group III to probes, Group IV to antibodies, Group V to methods of diagnosis and Group VI to a method of identifying compounds.

Rule 1.47(b) does not provide for multiple products or methods.

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 1-18 and 38-41

Remark on Protest☐

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☐

No protest accompanied the payment of additional search fees.

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マコ-ト [*] (参考)
A 6 1 K	38/00 39/395 48/00	A 6 1 K 39/395 48/00 A 6 1 P 9/00 9/10	N 4 C 0 8 5 4 C 0 8 6 4 C 0 8 7 4 H 0 4 5
A 6 1 P	9/00 9/10	C 0 7 K 14/47 16/18	
C 0 7 K	14/47 16/18	C 1 2 N 1/15 1/19 1/21	
C 1 2 N	1/15 1/19 1/21 5/10	C 1 2 Q 1/68	A Z
C 1 2 Q	1/68	G 0 1 N 33/15 33/50 33/53	Z Z D
G 0 1 N	33/15 33/50 33/53 33/566	33/566 C 1 2 N 15/00 5/00	M Z N A A A B
		A 6 1 K 37/02	
(81)指定国	E P (A T , B E , C H , C Y , D E , D K , E S , F I , F R , G B , G R , I E , I T , L U , M C , N L , P T , S E , T R) , O A (B F , B J , C F , C G , C I , C M , G A , G N , G W , M L , M R , N E , S N , T D , T G) , A P (G H , G M , K E , L S , M W , M Z , S D , S L , S Z , T Z , U G , Z W) , E A (A M , A Z , B Y , K G , K Z , M D , R U , T J , T M) , A E , A G , A L , A M , A T , A U , A Z , B A , B B , B G , B R , B Y , B Z , C A , C H , C N , C R , C U , C Z , D E , D K , D M , D Z , E E , E S , F I , G B , G D , G E , G H , G M , H R , H U , I D , I L , I N , I S , J P , K E , K G , K P , K R , K Z , L C , L K , L R , L S , L T , L U , L V , M A , M D , M G , M K , M N , M W , M X , M Z , N O , N Z , P L , P T , R O , R U , S D , S E , S G , S I , S K , S L , T J , T M , T R , T T , T Z , U A , U G , U Z , V N , Y U , Z A , Z W		

F ターム(参考) 2G045 AA25 AA29 AA40 BA11 BA13
BB03 BB20 CA25 CB01 CB17
CB20 CB21 DA12 DA13 DA14
DA36 DA77 FB02 FB03 FB04
4B024 AA01 AA11 BA44 BA80 CA04
DA02 DA05 DA11 EA02 EA03
EA04 FA02 GA01 GA11 HA01
HA03 HA11
4B063 QA01 QA13 QA18 QQ01 QQ42
QQ52 QR08 QR42 QR55 QR62
QR82 QS16 QS25 QS34 QS36
QX02
4B065 AA01X AA57X AA90X AA93Y
AB01 AB02 BA01 BA08 CA24
CA25 CA44 CA46
4C084 AA02 AA07 AA13 BA01 BA22
BA23 CA17 CA18 ZA36 ZA45
4C085 AA13 AA14 BB31 CC21 EE01
4C086 AA01 EA16 MA01 MA04 NA14
ZA36 ZA45
4C087 BB33 BC83 CA12 CA16 NA14
ZA36 ZA45
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10
CA40 DA00 DA76 EA20 EA50
FA72 FA74 GA26

专利名称(译)	格子锁核酸分子，多肽，诊断和治疗方法		
公开(公告)号	JP2003516728A	公开(公告)日	2003-05-20
申请号	JP2001537347	申请日	2000-11-03
[标]申请(专利权)人(译)	通用医疗公司		
申请(专利权)人(译)	总医院集团		
[标]发明人	フィッシュマンマークシー チョンタオ		
发明人	フィッシュマン マーク シー. チョン タオ		
IPC分类号	A01K67/027 A61K31/7088 A61K35/12 A61K35/76 A61K38/00 A61K39/395 A61K48/00 A61P9/00 A61P9/10 C07K14/47 C07K16/18 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/566		
CPC分类号	C07K16/18 A61K38/00 C07K14/47		
FI分类号	A01K67/027 A61K31/7088 A61K35/12 A61K35/76 A61K39/395.D A61K39/395.N A61K48/00 A61P9/00 A61P9/10 C07K14/47 C07K16/18 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12Q1/68.A C12Q1/68.Z G01N33 /15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566 C12N15/00.ZNA.A C12N5/00.A C12N5 /00.B A61K37/02		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/AA29 2G045/AA40 2G045/BA11 2G045/BA13 2G045/BB03 2G045/BB20 2G045 /CA25 2G045/CB01 2G045/CB17 2G045/CB20 2G045/CB21 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/DA77 2G045/FB02 2G045/FB03 2G045/FB04 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024 /BA44 4B024/BA80 4B024/CA04 4B024/DA02 4B024/DA05 4B024/DA11 4B024/EA02 4B024/EA03 4B024/EA04 4B024/FA02 4B024/GA01 4B024/GA11 4B024/HA01 4B024/HA03 4B024/HA11 4B063 /QA01 4B063/QA13 4B063/QA18 4B063/QQ01 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QR08 4B063/QR42 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QR82 4B063/QS16 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063 /QX02 4B065/AA01X 4B065/AA57X 4B065/AA90X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AB02 4B065 /BA01 4B065/BA08 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA07 4C084/AA13 4C084/BA01 4C084/BA22 4C084/BA23 4C084/CA17 4C084/CA18 4C084/ZA36 4C084 /ZA45 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BB31 4C085/CC21 4C085/EE01 4C086/AA01 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/ZA36 4C086/ZA45 4C087/BB33 4C087/BC83 4C087 /CA12 4C087/CA16 4C087/NA14 4C087/ZA36 4C087/ZA45 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA00 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045 /FA72 4H045/FA74 4H045/GA26		
优先权	60/163903 1999-11-05 US		
其他公开文献	JP2003516728A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了新颖的基因网格锁和由该基因编码的蛋白质。 Gridlock参与血管的发育和建模，并且locklock的突变与狭窄（一种主动脉弓疾病）有关。 因此，僵局核酸分子和多肽可用于与僵局有关的疾病和病症如主动脉弓疾病的诊断，治疗和预防中。

【表1】 RNA注入によるgrl変異体のレスキュー

注入 RNA	胚の 総数	表現型変異型	表現型野生型
		遺伝子型変異型	遺伝子型変異型
grl ^{wt}	151	29	10
grl ^{del}	66	16	0