

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号
WO2003/083139

発行日 平成17年8月4日 (2005.8.4)

(43) 国際公開日 平成15年10月9日 (2003.10.9)

(51) Int. Cl. ⁷	F 1
C 1 2 Q 1/68	C 1 2 Q 1/68 Z N A A
A 6 1 K 31/711	A 6 1 K 31/711
A 6 1 K 39/395	A 6 1 K 39/395 D
A 6 1 K 45/00	A 6 1 K 39/395 N
A 6 1 K 48/00	A 6 1 K 45/00
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 62 頁) 最終頁に続く	

出願番号	特願2003-580572 (P2003-580572)	(71) 出願人	597177471
(21) 国際出願番号	PCT/JP2003/002047		株式会社ジェノックス創業研究所
(22) 国際出願日	平成15年2月25日 (2003.2.25)		茨城県つくば市東光台5-1-3
(31) 優先権主張番号	特願2002-100908 (P2002-100908)	(71) 出願人	502196050
(32) 優先日	平成14年4月3日 (2002.4.3)		国立成育医療センター総長
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		東京都世田谷区大蔵2丁目10-1
(81) 指定国	AP (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SI, SK, TR), OA (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, B B, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, M Z, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW	(74) 代理人	100102978 弁理士 清水 初志
		(74) 代理人	100108774 弁理士 橋本 一憲
		(72) 発明者	松本 佳子 茨城県つくば市東光台5-1-3 エーザ イ株式会社 筑波研究所内
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 アレルギー性疾患の検査方法

(57) 【要約】

複数の健常者とアレルギー性疾患の患者の血液を採取し、ディファレンシャルディスプレイ法により発現に差の見られる遺伝子を探索した結果、患者群で有意に発現量が上昇する遺伝子B 1 7 9 9を同定することに成功した。この遺伝子は、特にT細胞で発現が高く、T細胞の活性化により発現が上昇した。本発明者らは、この遺伝子アレルギー性疾患の検査、およびアレルギー性疾患治療薬のスクリーニングに使用できることを見出した。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

次の工程を含む、アレルギー性疾患の検査方法であって、指標遺伝子が B 1 7 9 9 遺伝子である方法。

(a) 被検者の生体試料における該指標遺伝子の発現レベルを測定する工程

(b) 該発現レベルを、健常者の生体試料における該指標遺伝子の発現レベルと比較する工程

(c) 該被検者の生体試料における該指標遺伝子の発現レベルの有意な上昇が観察された場合に被検者がアレルギー性疾患を有すると判定する工程

【請求項 2】

10

アレルギー性疾患がアトピー性皮膚炎である、請求項 1 に記載の検査方法。

【請求項 3】

遺伝子の発現レベルを、c DNA の PCR によって測定する請求項 1 に記載の検査方法。

【請求項 4】

遺伝子の発現レベルを、該遺伝子によってコードされる蛋白質の検出によって測定する請求項 1 に記載の検査方法。

【請求項 5】

生体試料が末梢血 T 細胞を含む試料である請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

B 1 7 9 9 遺伝子の塩基配列またはその相補配列の連続する少なくとも 15 塩基の配列を含むポリヌクレオチドからなる、アレルギー性疾患検査用試薬。 20

【請求項 7】

B 1 7 9 9 遺伝子によってコードされるアミノ酸配列からなるポリペプチドに結合する抗体からなる、アレルギー性疾患検査用試薬。

【請求項 8】

次の工程を含む、アレルギー性疾患の治療薬のスクリーニング方法であって、指標遺伝子が B 1 7 9 9 遺伝子である方法。

(a) 該指標遺伝子を発現する細胞に候補化合物を接触させる工程

(b) 該指標遺伝子の発現レベルを測定する工程、および

(c) 該候補化合物を接触させない対照と比較して該指標遺伝子の発現レベルを低下させる化合物を選択する工程 30

【請求項 9】

細胞が T 細胞である請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

次の工程を含む、アレルギー性疾患の治療薬のスクリーニング方法であって、指標遺伝子が B 1 7 9 9 遺伝子である方法。

(a) 被験動物に候補化合物を投与する工程、

(b) 該被験動物の白血球における該指標遺伝子の発現レベルを測定する工程、および

(c) 該候補化合物を投与しない対照と比較して該指標遺伝子の発現レベルを低下させる化合物を選択する工程 40

【請求項 11】

次の工程を含む、アレルギー性疾患の治療薬のスクリーニング方法であって、指標遺伝子が B 1 7 9 9 遺伝子である方法。

(a) 該指標遺伝子の転写調節領域の制御下に連結されたレポーター遺伝子を含む細胞に候補化合物を接触させる工程、

(b) 該レポーター遺伝子の発現レベルを測定する工程、および

(c) 該候補化合物を接触させない対照と比較して該レポーター遺伝子の発現レベルを低下させる化合物を選択する工程

【請求項 12】

次の工程を含む、アレルギー性疾患の治療薬のスクリーニング方法であって、指標遺伝子 50

がB 1 7 9 9 遺伝子である方法。

(a) 該指標遺伝子またはそれと機能的に同等な遺伝子によってコードされる蛋白質と候補化合物とを接触させる工程、

(b) 該蛋白質の活性を測定する工程、および

(c) 該候補化合物を接触させない対照と比較して該蛋白質の活性を低下させる化合物を選択する工程

【請求項 1 3】

請求項 8、請求項 1 0、請求項 1 1、および請求項 1 2 のいずれかに記載のスクリーニング方法によって得ることができる化合物を主成分として含む、アレルギー性疾患の治療薬。

10

【請求項 1 4】

指標遺伝子のセンス鎖の塩基配列の連続する少なくとも 1 5 塩基の配列に対して相補的な配列を含むアンチセンス DNA を主成分として含む、アレルギー性疾患の治療薬であって、該指標遺伝子が B 1 7 9 9 遺伝子である治療薬。

【請求項 1 5】

指標遺伝子によってコードされる蛋白質に結合する抗体を主成分として含む、アレルギー性疾患の治療薬であって、該指標遺伝子が B 1 7 9 9 遺伝子である治療薬。

【請求項 1 6】

T 細胞における指標遺伝子またはそれと機能的に同等な遺伝子の発現レベルを上昇させたトランスジェニック非ヒト脊椎動物のアレルギー性疾患のモデル動物としての使用であって、該指標遺伝子が B 1 7 9 9 遺伝子である使用。

20

【請求項 1 7】

指標遺伝子の塩基配列またはその相補配列の連続する少なくとも 1 5 塩基の配列を含むポリヌクレオチド、および該指標遺伝子を発現する細胞を含む、アレルギー性疾患の治療薬をスクリーニングするためのキットであって、該指標遺伝子が B 1 7 9 9 遺伝子であるキット。

【請求項 1 8】

指標遺伝子によってコードされるアミノ酸配列からなるポリペプチドに結合する抗体、および該指標遺伝子を発現する細胞を含む、アレルギー性疾患の治療薬をスクリーニングするためのキットであって、該指標遺伝子が B 1 7 9 9 遺伝子であるキット。

30

【発明の詳細な説明】

技術分野

本発明は、アレルギー性疾患の検査方法およびアレルギー性疾患治療薬のスクリーニング方法に関する。

背景技術

アトピー性皮膚炎等のアレルギー性疾患は、多因子性の病気 (multifactorial diseases) と考えられている。これらの病気は多くの異なる遺伝子の発現の相互作用によって起こり、これらの個々の遺伝子の発現は、複数の環境要因によって影響を受ける。このため、特定の病気を起こす特定の遺伝子を解明することは、非常に困難である。またアレルギー性疾患には、変異や欠陥を有する遺伝子の発現、または特定の遺伝子の過剰発現や発現量の減少が関わっていると考えられている。病気に関して遺伝子発現が果たしている役割を解明するためには、遺伝子が発症にどのように関わり、薬剤などの外的な刺激が遺伝子発現をどのように変化させるのかを理解する必要がある。

40

現在アレルギー性疾患の診断においては、一般に、問診、家族歴、そして本人の既往症の確認が重要な要素となっている。またアレルギーをより客観的な情報に基づいて診断するために、血液を試料とする試験方法や、アレルゲンに対する患者の免疫学的な応答を観察する方法も実施されている。前者の例として、アレルゲン特異的 Ig E 測定、白血球ヒスタミン遊離試験、あるいはリンパ球幼若化試験等が挙げられる。アレルゲン特異的 Ig E の存在は、そのアレルゲンに対するアレルギー反応の証明である。しかし患者によっては、必ずしもアレルゲン特異的な Ig E を検出できるとは限らない場合もある。また、その

50

測定原理上、診断に必要なアレルゲンの全てに対して試験を実施しなければならない。白血球ヒスタミン遊離試験やリンパ球幼若化試験は、免疫システムのアレルゲンに対する反応を *in vitro* で観察する方法である。これらの方法は、操作が煩雑である。

一方、患者を実際にアレルゲンに接触させたときに観察される免疫応答をアレルギーの診断に役立てる方法も公知である。プリック・テスト、スクラッチ・テスト、パッチ・テスト、皮内反応、あるいは誘発試験等が、この種の試験に含まれる。これらの試験方法は、患者のアレルギー反応を直接診断することができる反面、実際に被検者をアレルゲンに曝露する侵襲性を伴った検査である。

この他、アレルゲンに関わらず、アレルギー反応の関与を証明するための試験方法も試みられている。たとえば、血清 Ig E 値が高値である場合、その患者にはアレルギー反応が 10
起きていると推定することができる。血清 Ig E 値は、アレルゲン特異 Ig E の総量に相当する情報である。アレルゲンの種類に関わらず Ig E の総量を決定することは容易であるが、非アトピー型気管支炎等の疾患を持つ患者では、Ig E が低値となる場合がある。好酸球数と ECP 値は、I 型アレルギーに引き続いて起きる遅延型反応や、アレルギー性炎症反応に関連する診断項目である。好酸球の数は、アレルギー症状の進展を反映するとされている。また、好酸球の顆粒に含まれる蛋白質である ECP (eosinophil cationic protein) も、喘息患者の発作に伴って強く活性化される。これらの診断項目は、確かにアレルギー症状を反映するものではある。しかし、実際に診断の指標とできる範囲は限られている。

したがって、患者に対する侵襲が少なく、しかも診断に必要な情報を容易に得ることが 20
できる、アレルギー性疾患のマーカーが提供されれば有用である。このようなマーカーは、アレルギー性疾患の発症に深く関与していると考えられるので、診断のみならず、アレルギー症状のコントロールにおいても、重要な標的となる可能性がある。

発明の開示

本発明は、アレルギー性疾患の検査を可能とする指標遺伝子を提供することを課題とする。さらに、本発明は該遺伝子の発現を指標とした、アレルギー性疾患の検査方法およびアレルギー性疾患治療薬のスクリーニング方法を提供することを課題とする。

本発明者らは、既に確立された「蛍光 DD (Fluorescent DD) 法」(T. Ito ら, 1994, FEBS Lett. 351:231-236) の手順に基づき、 30
複数のヒトの血液から調製した T 細胞 RNA サンプルを解析できる DD システムを開発した。本出願人は、この DD システムを利用して、花粉症患者の末梢血の血液細胞において発現レベルが変化している次の遺伝子の単離に成功し、特許出願している。

花粉症関連遺伝子 3 7 3 (W000/65046) 花粉症関連遺伝子 4 1 9 (W000/65045)

花粉症関連遺伝子 5 1 3 (W000/65049) 花粉症関連遺伝子 5 8 1 (W000/65048)

花粉症関連遺伝子 7 9 5 (W000/65050) 花粉症関連遺伝子 6 2 7 (W000/65051)

花粉症関連遺伝子 4 4 1 (W000/73435) 花粉症関連遺伝子 4 6 5 (W000/73439)

花粉症関連遺伝子 7 8 7 (W000/73440)

40

また同様にしてディファレンシャルディスプレイ法によりアレルギー性疾患の患者末梢血 T 細胞と健常者の間で発現に差の見られる遺伝子を探索した結果、患者群で有意に発現量が上昇する遺伝子 B 1 1 5 3 を見出し特許出願した (W002/50269)。

本発明者らは、このシステムをアレルギー性疾患特異的に発現量が異なる遺伝子の単離に応用した。すなわち、まず本発明者らは、健常者およびアレルギー性疾患 (アトピー性皮膚炎患者およびアレルギー性喘息患者) の患者から血液を採取し、その血液から T 細胞を分離して、前記システムを利用し、健常者群と患者群で発現量が変化する遺伝子のスクリーニングを行った。その結果、患者群において有意に高い発現量を示す遺伝子 B 1 7 9 9 の同定に成功した。単離されたこの遺伝子は、K I A A 0 6 0 3 (GenBank アクセ 50
ッション No. AB011175) と同一の遺伝子であった。K I A A 0 6 0 3 (Gen

Bank アクセション No. AB011175) のマウスホモログについては、ゲノム配列情報と組織における発現データが示されている (Genomics 2002 Feb; 79 (2) : 154-61 Candidate genes required for embryonic development: a comparative analysis of distal mouse chromosome 14 and human chromosome 13q22. Kurihara LJ, Semenova E, Miller W, Ingram RS, Guan XJ, Tilghman SM. Howard Hughes Medical Institute and Department of Molecular Biology, Princeton University, Princeton, New Jersey 08544, USA.)。この報告においては、Endothelin B receptor をコードする近傍を配列決定し、マウスホモログはこの領域に含まれる複数の遺伝子の一つとして示されている。この領域を欠損するとマウスの胎生致死となる領域であり、それらの遺伝子がなんらかの関与をするかもしれないと判断している。免疫、アレルギーと関連した情報は含まれていない。

単離されたヒト B1799 遺伝子は、1299 アミノ酸残基からなる蛋白質をコードし、その蛋白質は GTPase activating protein の特徴を有していることから、細胞の分化、細胞周期制御に関与することが示唆された。B1799 遺伝子の発現は、健常者よりアトピー性皮膚炎患者での発現が高く、特に中等症患者での発現が高いことが判明した。様々なタイプの白血球において、この遺伝子の発現を調べたところ、特に T 細胞での発現が高く、その中でもメモリー T 細胞における発現が高かった (CD4⁺ かつ CD45RO⁺ の表現形を示す細胞)。また、in vitro 刺激実験の結果、本発明者らは T 細胞の活性化細胞死の過程で B1799 の mRNA 発現が誘導されることを見出した。T 細胞受容体からの刺激やカルシウムイオノフォア (イオノマイシン) の刺激などの T 細胞が活性化される条件で、B1799 の mRNA 発現が誘導された。B1799 遺伝子の発現と T 細胞の活性化状態との相関は、この遺伝子のアレルギー性疾患への関与を裏付ける。そして本発明者らは、この遺伝子の発現量を指標として、アレルギー性疾患の検査、およびアレルギー性疾患治療薬候補化合物のスクリーニングを行うことが可能であることを見出し、本発明を完成した。

すなわち本発明は、アレルギー性疾患患者で高い発現を示す遺伝子 B1799 の発現を指標としたアレルギー性疾患の検査方法およびアレルギー性疾患治療薬のスクリーニング方法に関する。より具体的には、以下のアレルギー性疾患検査方法、そのためのキット、並びにアレルギー性疾患治療薬のスクリーニング方法に関する。

〔1〕次の工程を含む、アレルギー性疾患の検査方法であって、指標遺伝子が B1799 遺伝子である方法、

(a) 被検者の生体試料における該指標遺伝子の発現レベルを測定する工程

(b) 該発現レベルを、健常者の生体試料における該指標遺伝子の発現レベルと比較する工程

(c) 該被検者の生体試料における該指標遺伝子の発現レベルの有意な上昇が観察された場合に被検者がアレルギー性疾患を有すると判定する工程

〔2〕アレルギー性疾患がアトピー性皮膚炎である、〔1〕に記載の検査方法、

〔3〕遺伝子の発現レベルを、cDNA の PCR によって測定する〔1〕に記載の検査方法、

〔4〕遺伝子の発現レベルを、該遺伝子によってコードされる蛋白質の検出によって測定する〔1〕に記載の検査方法、

〔5〕生体試料が末梢血 T 細胞を含む試料である〔1〕に記載の方法。

〔6〕B1799 遺伝子の塩基配列またはその相補配列の連続する少なくとも 15 塩基の配列を含むポリヌクレオチドからなる、アレルギー性疾患検査用試薬、

〔7〕B1799 遺伝子によってコードされるアミノ酸配列からなるポリペプチドに結合する抗体からなる、アレルギー性疾患検査用試薬、

〔８〕次の工程を含む、アレルギー性疾患の治療薬のスクリーニング方法であって、指標遺伝子がB 1 7 9 9 遺伝子である方法、

- (a) 該指標遺伝子を発現する細胞に候補化合物を接触させる工程
- (b) 該指標遺伝子の発現レベルを測定する工程、および
- (c) 該候補化合物を接触させない対照と比較して該指標遺伝子の発現レベルを低下させる化合物を選択する工程

〔９〕細胞がT細胞である〔７〕に記載の方法、

〔１０〕次の工程を含む、アレルギー性疾患の治療薬のスクリーニング方法であって、指標遺伝子がB 1 7 9 9 遺伝子である方法、

- (a) 被験動物に候補化合物を投与する工程、
- (b) 該被験動物の白血球における該指標遺伝子の発現レベルを測定する工程、および
- (c) 該候補化合物を投与しない対照と比較して該指標遺伝子の発現レベルを低下させる化合物を選択する工程

10

〔１１〕次の工程を含む、アレルギー性疾患の治療薬のスクリーニング方法であって、指標遺伝子がB 1 7 9 9 遺伝子である方法、

- (a) 該指標遺伝子の転写調節領域の制御下に連結されたレポーター遺伝子を含む細胞に候補化合物を接触させる工程、
- (b) 該レポーター遺伝子の発現レベルを測定する工程、および
- (c) 該候補化合物を接触させない対照と比較して該レポーター遺伝子の発現レベルを低下させる化合物を選択する工程

20

〔１２〕次の工程を含む、アレルギー性疾患の治療薬のスクリーニング方法であって、指標遺伝子がB 1 7 9 9 遺伝子である方法、

- (a) 該指標遺伝子またはそれと機能的に同等な遺伝子によってコードされる蛋白質と候補化合物とを接触させる工程、
- (b) 該蛋白質の活性を測定する工程、および
- (c) 該候補化合物を接触させない対照と比較して該蛋白質の活性を低下させる化合物を選択する工程

〔１３〕〔８〕、〔１０〕、〔１１〕、および〔１２〕のいずれかに記載のスクリーニング方法によって得ることができる化合物を主成分として含む、アレルギー性疾患の治療薬

30

〔１４〕指標遺伝子のセンス鎖の塩基配列の連続する少なくとも１５塩基の配列に対して相補的な配列を含むアンチセンスDNAを主成分として含む、アレルギー性疾患の治療薬であって、該指標遺伝子がB 1 7 9 9 遺伝子である治療薬、

〔１５〕指標遺伝子によってコードされる蛋白質に結合する抗体を主成分として含む、アレルギー性疾患の治療薬であって、該指標遺伝子がB 1 7 9 9 遺伝子である治療薬、

〔１６〕T細胞における指標遺伝子またはそれと機能的に同等な遺伝子の発現レベルを上昇させたトランスジェニック非ヒト脊椎動物のアレルギー性疾患のモデル動物としての使用であって、該指標遺伝子がB 1 7 9 9 遺伝子である使用、

〔１７〕指標遺伝子の塩基配列またはその相補配列の連続する少なくとも１５塩基の配列を含むポリヌクレオチド、および該指標遺伝子を発現する細胞を含む、アレルギー性疾患の治療薬をスクリーニングするためのキットであって、該指標遺伝子がB 1 7 9 9 遺伝子であるキット、

40

〔１８〕指標遺伝子によってコードされるアミノ酸配列からなるポリペプチドに結合する抗体、および該指標遺伝子を発現する細胞を含む、アレルギー性疾患の治療薬をスクリーニングするためのキットであって、該指標遺伝子がB 1 7 9 9 遺伝子であるキット。

また本発明は、以下の(A)－(C)のいずれかに示す化合物を投与する工程を含む、アレルギー性疾患の治療方法に関する。あるいは本発明は、以下の(A)－(C)のいずれかに示す化合物のアレルギー性疾患の治療薬の製造における使用に関する。

(A) 〔８〕、〔１０〕、〔１１〕、および〔１２〕のいずれかに記載のスクリーニング方法によって得ることができる化合物

50

(B) B 1 7 9 9 遺伝子のセンス鎖の塩基配列の連続する少なくとも 1 5 塩基の配列に対して相補的な配列を含むアンチセンス DNA

(C) B 1 7 9 9 遺伝子によってコードされる蛋白質に結合する抗体

更に本発明は、非ヒト脊椎動物における T 細胞の B 1 7 9 9 または B 1 7 9 9 と機能的に同等な遺伝子の発現レベルを上昇させる工程を含む、アレルギー性疾患のモデル動物の製造方法に関する。あるいは本発明は、B 1 7 9 9 または B 1 7 9 9 と機能的に同等な遺伝子の発現レベルを上昇させたトランスジェニック非ヒト脊椎動物のアレルギー性疾患のモデル動物としての使用に関する。

本発明は、被検者の白血球における B 1 7 9 9 遺伝子の発現レベルを指標とする、アレルギー性疾患の検査方法に関する。本発明において、B 1 7 9 9 遺伝子は、健常者群とアレルギー性疾患の患者群との比較において、患者群で高い発現を示すことが証明された。従って、B 1 7 9 9 遺伝子の発現レベルを指標として、アレルギー性疾患の検査を行うことができる。本発明において B 1 7 9 9 遺伝子を、「指標遺伝子」と称する。本発明において、アレルギー性疾患 (allergic disease) とはアレルギー反応の関与する疾患の総称である。より具体的には、アレルゲンが同定され、アレルゲンへの曝露と病変の発症に深い結びつきが証明され、その病変に免疫学的な機序が証明されることと定義することができる。ここで、免疫学的な機序とは、アレルゲンの刺激によって白血球が免疫応答を示すことを意味する。アレルゲンとしては、ダニ抗原や花粉抗原等を例示することができる。

代表的なアレルギー性疾患には、アトピー性皮膚炎、アレルギー性鼻炎、花粉症、気管支喘息、あるいは昆虫アレルギー等を示すことができる。アレルギー素因 (allergic diathesis) とは、アレルギー性疾患を持つ親から子に伝えられる遺伝的な因子である。家族性に発症するアレルギー性疾患はアトピー性疾患とも呼ばれ、その原因となる遺伝的に伝えられる因子がアトピー素因である。喘息は、アレルギー性疾患のうち、特に呼吸器症状を伴う疾患に対して与えられた総称である。

本発明において B 1 7 9 9 遺伝子とは、本実施例において同定されたヒト B 1 7 9 9 遺伝子およびそれと同一の遺伝子座または他生物において相同の遺伝子座にある遺伝子を言う。例えば本発明において B 1 7 9 9 遺伝子は、本実施例において同定されたヒト B 1 7 9 9 遺伝子と同じまたは相同の遺伝子座にある任意の対立遺伝子が含まれる。本実施例において同定されたヒト B 1 7 9 9 遺伝子がコードする転写産物の塩基配列を配列番号：1 に、この遺伝子がコードする蛋白質のアミノ酸配列を配列番号：2 に示す。本発明において B 1 7 9 9 遺伝子には、具体的には、本実施例において同定されたヒト B 1 7 9 9 遺伝子 (配列番号：1)、その多型 (SNP を含む)、変異体、スプライシングバリエーション、および他生物のホモログを含む。これらの遺伝子は、配列番号：1 に記載のヒト B 1 7 9 9 遺伝子と実質的に同一または類似の発現制御を受けていると考えられることから、それらの発現を検出することにより、本発明のアレルギー性疾患の検査を行うことが可能である。

具体的には、本発明において B 1 7 9 9 遺伝子は、以下の核酸からなる内在性遺伝子と実質的に同一の遺伝子である。内在性遺伝子とは、自然界の生物が元来保持している、人の手により改変されていない遺伝子を言い、それと同一の塩基配列からなる遺伝子は、内在性遺伝子と実質的に同一の遺伝子である。また「遺伝子」とは、ここでは転写産物またはそれをコードする核酸 (DNA または RNA など) を言う。

(a) 配列番号：1 に記載の塩基配列から選択された塩基配列を含む核酸。

(b) 配列番号：1 のコード配列の塩基配列において、1 または複数の塩基が置換、欠失、および/または挿入した塩基配列を含む核酸。

(c) 配列番号：2 に記載のアミノ酸配列の連続した少なくとも 1 5 アミノ酸をコードする核酸。

(d) 配列番号：2 に記載のアミノ酸配列において、1 または複数のアミノ酸が置換、欠失、および/または挿入したアミノ酸配列を含む蛋白質をコードする核酸。

(e) 配列番号：1 に記載の連続した少なくとも 5 0 塩基を含み、配列番号：1 に記載し

た塩基配列以外の配列を含まない核酸と、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸。

(a) に記載の核酸には、好ましくは配列番号：1 (より好ましくは配列番号：1 のコード配列；塩基位置 3 4 8 ~ 4 2 4 4) に記載の塩基配列の連続した少なくとも 4 0 塩基、より好ましくは 6 0 塩基以上、より好ましくは 1 0 0 塩基以上、より好ましくは 2 0 0 塩基以上、より好ましくは 5 0 0 塩基以上、より好ましくは 1 0 0 0 塩基以上、最も好ましくは 5 9 2 2 塩基 (すなわち全長) を含む核酸が含まれる。このような核酸には、主に同一種内の遺伝子の多型、変異体、およびスプライシングバリエーションが含まれ得る。また (a) に記載の核酸としては、配列番号：1 に記載の塩基配列の連続した少なくとも 3 0 塩基、より好ましくは 3 5 塩基以上、より好ましくは 4 0 塩基以上、より好ましくは 4 5 塩基以上、より好ましくは 5 0 塩基以上の塩基配列を含む核酸が挙げられる。塩基配列は、配列番号：1 のコード配列 (塩基位置 3 4 8 ~ 4 2 4 4) から選択することが好ましい。塩基配列は、任意の数を選択することができる。複数の塩基配列を選択する場合には、オーバーラップしないように 2 箇所以上、好ましくは 3 箇所以上、より好ましくは 4 箇所以上、より好ましくは 5 箇所以上の連続した塩基配列を含む核酸がより好ましい。

(b) に記載の核酸には、好ましくは配列番号：1 のコード配列 (配列番号：1 の塩基位置 3 4 8 ~ 4 2 4 4) において、全塩基数の 1 5 % 以内、より好ましくは 1 0 % 以内、より好ましくは 8 % 以内、より好ましくは 5 % 以内、より好ましくは 1 % 以内の塩基が置換、欠失、および/または挿入した塩基配列を含む核酸が含まれる。このような核酸には、近縁の他種生物のカウンターパートの遺伝子、その多型、その変異体、およびそのスプライシングバリエーションなどが含まれ得る。このような核酸は、好ましくは配列番号：1 のコード配列と 8 5 % 以上、より好ましくは 9 0 % 以上、より好ましくは 9 2 % 以上、より好ましくは 9 5 % 以上、より好ましくは 9 9 % 以上の同一性を有する塩基配列を含む核酸である。

塩基配列またはアミノ酸配列の同一性は、例えば BLAST プログラム (Altschul, S. F. et al., 1990, J. Mol. Biol. 215:403-410) を用いて決定することができる。具体的には、塩基配列の同一性を決定するには blastn プログラム、アミノ酸配列の同一性を決定するには blastp プログラムを用い、例えば NCBI (National Center for Biotechnology Information) の BLAST のウェブサイトにおいて Low complexity を含むフィルターは全て OFF にして、デフォルトのパラメータを用いて検索を行う (Altschul, S. F. et al. (1993) Nature Genet. 3:266-272; Madden, T. L. et al. (1996) Meth. Enzymol. 266:131-141; Altschul, S. F. et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389-3402; Zhang, J. & Madden, T. L. (1997) Genome Res. 7:649-656)。例えば 2 つの配列の比較を行う blast2sequences プログラム (Tatiana A et al. (1999) FEMS Microbiol Lett. 174:247-250) により、2 配列のアライメントを作成し、配列の同一性を決定することができる。ギャップはミスマッチと同様に扱い、配列番号：1 のコード配列全体に対する同一性の値を計算する。

(c) に記載の核酸には、好ましくは配列番号：2 に記載のアミノ酸配列の連続した少なくとも 2 0 アミノ酸、より好ましくは 3 0 アミノ酸以上、より好ましくは 5 0 アミノ酸以上、より好ましくは 1 0 0 アミノ酸以上、より好ましくは 3 0 0 アミノ酸以上、より好ましくは 5 0 0 アミノ酸以上、最も好ましくは 1 2 9 9 アミノ酸 (すなわち全長) をコードする核酸が含まれる。このような核酸には、上記の (a) と同様に、主に同一種内の遺伝子の多型、変異体、およびスプライシングバリエーションが含まれ得る。また (c) に記載の核酸としては、配列番号：2 に記載の塩基配列の連続した少なくとも 8 アミノ酸、より好ましくは 1 0 アミノ酸以上、より好ましくは 1 5 アミノ酸以上、より好ましくは 2 0 アミノ酸以上、より好ましくは 2 5 アミノ酸以上のアミノ酸配列をコードする塩基配列部分を

、オーバーラップしないように2箇所以上、好ましくは3箇所以上、より好ましくは4箇所以上、より好ましくは5箇所以上含む核酸がより好ましい。

(d)に記載の核酸には、好ましくは配列番号：2に記載のアミノ酸配列において、全アミノ酸数の15%以内、より好ましくは10%以内、より好ましくは8%以内、より好ましくは5%以内、より好ましくは1%以内のアミノ酸が置換、欠失、および／または挿入したアミノ酸配列を含む蛋白質をコードする核酸が含まれる。この核酸は、非翻訳配列を含んでよい。このような核酸には、近縁の他種生物のカウンターパートの遺伝子、その多型、その変異体、およびそのスプライシングバリエーションなどが含まれ得る。このような核酸は、好ましくは配列番号：2に記載のアミノ酸配列と85%以上、より好ましくは90%以上、より好ましくは92%以上、より好ましくは95%以上、より好ましくは99%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含む蛋白質をコードする核酸である。ギャップはミスマッチと同様に扱い、配列番号：2のアミノ酸配列全体に対する同一性の値を計算する。アミノ酸配列の同一性は上記に従って決定することができる。

(e)に記載の核酸には、好ましくは配列番号：1（より好ましくは配列番号：1のコード配列；塩基位置348～4244）に記載の連続した少なくとも80塩基、より好ましくは100塩基以上、より好ましくは120塩基以上、より好ましくは200塩基以上を含み、配列番号：1（より好ましくは配列番号：1のコード配列；塩基位置348～4244）に記載した塩基配列以外の配列を実質的に含まない核酸と、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸が含まれる。このような核酸は、例えば配列番号：1に記載の塩基配列を含む核酸を鋳型にして作製されたプローブと、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸であってよい。50塩基から数百塩基の長さのプローブは、例えばDNA合成により合成することもできるし、あるいはランダムプライム法、ニックトランスレーション、またはPCR法などにより作製することができる。

(e)に記載の核酸における、ストリンジェントな条件とは、好ましくは0.5～0.9 M程度のNaClを含むハイブリダイゼーション溶液中、60℃、好ましくは62℃、より好ましくは65℃でハイブリダイゼーションを行い、その後ハイブリダイゼーションと同じ温度で1×SSC中、好ましくは0.5×SSC中、より好ましくは0.2×SSC中、より好ましくは0.1×SSC中で、1時間洗浄する条件である。但し、ストリンジェンシーを大きく左右するハイブリダイゼーションや洗浄の温度条件は、プローブの融解温度（ T_m ）に応じて調整することができる。 T_m はハイブリダイズする塩基対に占める構成塩基の割合、プローブの鎖長、ハイブリダイゼーション溶液組成（塩濃度およびホルムアミド濃度）によって変動する。したがって、当業者であればこれらの条件を考慮して同等のストリンジェンシーを与える条件を経験的に設定することができる。ハイブリダイゼーション溶液としては、例えば4×SSC、または好ましくはExpress Hyb（登録商標）Hybridization Solution（Clontech社製）などを用いることができる。

B1799遺伝子は、好ましくはGTPase activating protein（GAP）をコードしている。GAPはGTP結合蛋白質に結合する蛋白質である。GAPが相互作用することにより、GTP結合蛋白質のGTPase活性は増強される（Scheffzek, K. et al., Trends Biochem. Sci., 1998, 23(7):257-262）。シグナル伝達で重要な役割を担うGTP結合蛋白質はGTP結合型がシグナル伝達における活性型であり、結合しているGTPがGDPに変換されると不活性型となる。GTP結合蛋白質自身がGTPase活性を有しており、GAPはそのGTPase活性を増強する働きを持つ。GAPはGTP結合蛋白質が不活性化型に変換することを助けることによって、シグナル伝達の制御を行っている。また本発明においてB1799遺伝子は、好ましくはリン酸化チロシン結合領域で蛋白質間結合に関与するホスフォチロシン相互作用ドメイン（Phosphotyrosine interaction domain；PTB/PID）およびTBCドメインを持つ蛋白質をコードしている。PTB/PIDはリン酸化チロシンと相互作用する蛋白質に保存されたドメインであり、細胞表面受容体または蛋白質輸送などにおけるシグナル伝達を含む種

々の生物学的プロセスに参与する一群の蛋白質に見出される (Bork, P. and Margolis, B., 1995, Cell 80 (5) : 693-694)。TBCドメインはTbc1 (Richardson, P. M. and Zon, L. I., 1995, Oncogene 11 (6) : 1139-1148)で見出されたドメインで、オンコジーン *trc-2* ならびに酵母の細胞周期制御因子 BUB2 および *cdc16* に共通している。TBCドメインはGyp6やGyp7に存在し、Rab-like GTPaseのGAPに広く存在するドメインと考えられている (Neuwald, A. F., 1997, Trends Biochem. Sci. 22 (7) : 243-244)。

また、B1799遺伝子は、好ましい態様において、天然のヒト細胞において配列番号：1に記載の塩基配列からなるmRNAをコードするゲノムDNAの転写を制御するプロモーターから転写される転写産物または他の生物におけるそのカウンターパートのプロモーターから転写される転写産物をコードする核酸である。

10

本発明のアレルギー性疾患の検査方法は、具体的には、(a)被検者の生体試料における指標遺伝子(すなわちB1799遺伝子)の発現レベルを測定する工程、(b)該発現レベルを健常者の対応する生体試料における該遺伝子の発現レベルと比較する工程、および(c)該被検者の生体試料における該指標遺伝子の発現レベルが上昇していた場合に被検者がアレルギー性疾患を有すると判定する工程、を含む。本発明においてB1799遺伝子は検査の指標とすることができることから、本発明においてB1799遺伝子を単に指標遺伝子とも言う。上記のように、本発明において、B1799遺伝子は、ヒト遺伝子のみならず他種におけるホモログを含む。したがって、ヒト以外の種におけるB1799遺伝子とは、特に断らないときには、ヒトB1799遺伝子のその種における内因性ホモログを言う。被検者および健常者におけるB1799遺伝子の発現レベルの比較の結果、被検者の発現レベルが健常者のそれに比べ有意に高ければ、被検者はアレルギー性疾患と判定される。あるいは、健常者におけるB1799遺伝子の発現レベルに基づいて、予め標準値を設定しておき、被検者の発現レベルを、この標準値に対して比較してもよい。指標遺伝子の測定値に基づいて、標準値や許容範囲を設定する手法は公知である。たとえば±2 S. D. の範囲を許容範囲とすることもできる。被検者における指標遺伝子の発現レベルが許容範囲にあれば、その被検者はアレルギー性疾患に関して正常と予想され、高ければ、その被検者はアレルギー性疾患と判定される。

20

本発明の検査は、B1799遺伝子のみを用いるのではなく、アレルギー性疾患の指標となる他の遺伝子と組み合わせて用いて実施することもできる。複数の遺伝子を組み合わせてそれらの遺伝子の発現を測定することによって検査精度を高めることができる。アレルギー性疾患患者は、多くの場合ヘテロジニアス(不均一)な集団なので、複数の遺伝子を指標とすることにより、より確実な診断を行うことができる。

30

本発明において指標遺伝子の発現には転写および翻訳が含まれる。すなわち、指標遺伝子の発現レベルは、指標遺伝子のmRNAレベルまたは蛋白質レベルであってよい。従って、本発明によるアレルギー性疾患の検査方法は、該遺伝子に対応するmRNAレベル、あるいは該遺伝子によってコードされる蛋白質レベルの比較に基づいて行うことができる。mRNAレベルの測定は、公知の遺伝子解析方法にしたがって実施することができる。具体的には、たとえばこの遺伝子にハイブリダイズする核酸をプローブとしたハイブリダイゼーション技術、またはこの遺伝子にハイブリダイズするDNAをプライマーとした遺伝子増幅技術等を利用することができる。

40

本発明の検査に用いられるプローブまたはプライマーは、前記指標遺伝子の塩基配列に基づいて設定することができる。例えば、本実施例において同定されたヒトB1799遺伝子の塩基配列、並びに該遺伝子によってコードされる蛋白質のアミノ酸配列として、それぞれ配列番号：1および2を示すことができる。なお一般に高等動物の遺伝子は、高い頻度で多型を伴う。また、スプライシングの過程で相互に異なるアミノ酸配列からなるアイソフォームを生じる分子も多く存在する。多型や選択的スプライシング等によって塩基配列が上記と異なる遺伝子であっても、本発明において指標遺伝子として用いることができる。

50

プライマーあるいはプローブには、B 1 7 9 9 遺伝子の塩基配列またはその相補配列の連続した少なくとも15ヌクレオチド、好ましくは少なくとも20ヌクレオチド、さらに好ましくは少なくとも30ヌクレオチド、さらに好ましくは少なくとも35ヌクレオチドを含むポリヌクレオチドを利用することができる。ここで「相補配列」とは、A:T (またはA:U) および/またはG:Cの塩基対からなる2本鎖ポリヌクレオチドの一方の鎖の塩基配列に対する他方の鎖の塩基配列を指す。また、このようなポリヌクレオチドは、上記のB 1 7 9 9 遺伝子の塩基配列またはその相補配列の一部以外に他の塩基配列を含んでいてもよい。また、B 1 7 9 9 遺伝子の塩基配列またはその相補配列の連続した少なくとも20個、好ましくは30個、さらに好ましくは35個、さらに好ましくは40個の連続したヌクレオチドの塩基配列と少なくとも70%、好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上の塩基配列上の同一性を有するポリヌクレオチドも、本発明のアレルギー性疾患検査用試薬として用いることができる。塩基配列の相10同性は、B L A S T等のアルゴリズムにより決定することができる。上記ポリヌクレオチドは、指標遺伝子に特異的にハイブリダイズすることによりこの遺伝子の検出を可能にする。特異的なハイブリダイゼーションとは、上記のストリンジェントなハイブリダイゼーションの条件下で、他の遺伝子をコードするDNAおよび/またはRNAとクロスハイブリダイゼーションが有意に生じないことにより確認することができる。

このようなポリヌクレオチドは、該指標遺伝子を検出するためのプローブとして、また該指標遺伝子を増幅するためのプライマーとして利用することができる。プライマーとして用いる場合には、通常、15bp~100bp、好ましくは15bp~35bpの鎖長を有する。また、プローブとして用いる場合には、該指標遺伝子の少なくとも一部若しくは全部の配列（またはその相補鎖）を有し、少なくとも15bpの鎖長のDNAが用いられる。プライマーとして用いる場合、3'側の領域は相補的である必要があるが、5'側には制限酵素認識配列やタグなどを付加することができる。

なお、本発明における「ポリヌクレオチド」は、DNAあるいはRNAであることができる。これらポリヌクレオチドは、合成されたものでも天然のものでもよい。ハイブリダイゼーションに用いるプローブは、通常、標識したものが用いられる。標識方法としては、例えば次のような方法を示すことができる。なお用語オリゴヌクレオチドは、ポリヌクレオチドのうち、重合度が比較的低いものを意味している。オリゴヌクレオチドの鎖長は、例えば100ヌクレオチド以内である。なおオリゴヌクレオチドは、ポリヌクレオチドに30含まれる。

- ・DNAポリメラーゼIを用いるニックトランスレーションによる標識
- ・ポリヌクレオチドキナーゼを用いる末端標識
- ・クレノウフラグメントによるフィルイン末端標識 (Berger SL, Kimmel AR. (1987) Guide to Molecular Cloning Techniques, Method in Enzymology, Academic Press; Hames BD, Higgins SJ (1985) Genes Probe: A Practical Approach. IRL Press; Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. (1989) Molecular Cloning: a Laboratory Manual, 2nd Edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press)
- ・RNAポリメラーゼを用いる転写による標識 (Melton DA, Krieg, PA, Rebagkati MR, Maniatis T, Zinn K, Green MR. (1984) Nucleic Acid Res., 12, 7035-7056)
- ・放射性同位体を用いない修飾ヌクレオチドをDNAに取り込ませる方法 (Kricka LJ. (1992) Nonisotopic DNA Probing Techniques. Academic Press)

ハイブリダイゼーション技術を利用したアレルギー性疾患の検査は、例えば、ノーザンハイブリダイゼーション法、ドットプロット法、DNAマイクロアレイを用いた方法などを使用して行うことができる。さらには、RT-PCR法等の遺伝子増幅技術を利用するこ50

とができる。R T - P C R法においては、生物試料からR N Aを抽出し、これを逆転写してc D N Aを調製し、得られたc D N Aを鋳型にP C Rを行うことにより遺伝子発現レベルを測定する。R T - P C R法においては、遺伝子の増幅過程においてP C R増幅モニター法を用いることにより、遺伝子発現のより定量的な解析を行うことが可能である。

P C R遺伝子増幅モニター法においては、両端を互いの蛍光を打ち消し合う異なった蛍光色素で標識したプローブを用い、検出対象（D N AもしくはR N Aの逆転写産物）にハイブリダイズさせる。P C R反応が進んでT a qポリメラーゼの5' - 3' エキソヌクレアーゼ（e x o n u c l e a s e）活性により同プローブが分解されると二つの蛍光色素が離れ、蛍光が検出されるようになる。この蛍光の検出をリアルタイムに行う。検出対象についてコピー数の明らかな標準試料について同時に測定することにより、P C R増幅の直線性のあるサイクル数で目的試料中の検出対象のコピー数を決定する（H o l l a n d , P . M . e t a l . , 1991, P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 88 : 7276 - 7280 ; L i v a k , K . J . e t a l . , 1995, P C R M e t h o d s a n d A p p l i c a t i o n s 4 (6) : 357 - 362 ; H e i d , C . A . e t a l . , G e n o m e R e s e a r c h 6 : 986 - 994 ; G i b s o n , E . M . U . e t a l . , 1996, G e n o m e R e s e a r c h 6 : 995 - 1001）。P C R増幅モニター法においては、例えば、A B I P R I S M 7700（P E バイオシステムズ社）を用いることができる。

また本発明のアレルギー性疾患の検査方法は、本発明における指標遺伝子によりコードされる蛋白質を検出することにより行うこともできる。以下、本明細書において、本発明における指標遺伝子によりコードされる蛋白質を指標蛋白質と記載する。このような検査方法としては、例えば、これら指標蛋白質に結合する抗体を利用したウェスタンブロッティング法、免疫沈降法、E L I S A法などを利用することができる。

この検出に用いる、前記指標蛋白質に結合する抗体は、当業者に周知の技法を用いて得ることができる。本発明に用いる抗体は、ポリクローナル抗体、あるいはモノクローナル抗体（M i l s t e i n C , e t a l . , 1983, N a t u r e 305 (5934) : 537 - 40）であることができる。例えば、指標蛋白質に対するポリクローナル抗体は、抗原を感作した哺乳動物の血液を取り出し、この血液から公知の方法により血清を分離する。ポリクローナル抗体としては、ポリクローナル抗体を含む血清を使用することができる。あるいは必要に応じてこの血清からポリクローナル抗体を含む画分をさらに単離することもできる。また、モノクローナル抗体を得るには、上記抗原を感作した哺乳動物から免疫細胞を取り出して骨髓腫細胞などと細胞融合させる。こうして得られたハイブリドーマをクローニングして、その培養物から抗体を回収しモノクローナル抗体とすることができる。

指標蛋白質の検出には、これらの抗体を適宜標識して用いればよい。また、この抗体を標識せずに、該抗体に特異的に結合する物質、例えば、プロテインAやプロテインGを標識して間接的に検出することもできる。具体的な検出方法としては、例えば、E L I S A法を挙げることができる。

抗原に用いる蛋白質もしくはその部分ペプチドは、例えばこの蛋白質もしくはその一部をコードする遺伝子を発現ベクターに組み込み、これを適当な宿主細胞に導入して、形質転換体を作成し、該形質転換体を培養して組み換え蛋白質を発現させ、発現させた組み換え蛋白質を培養体または培養上清から精製することにより得ることができる。あるいは、この蛋白質のアミノ酸配列の部分アミノ酸配列からなるオリゴペプチドを化学的に合成し、免疫原として用いることもできる。

また本発明においては、白血球に含まれる指標蛋白質の活性を指標として、アレルギー性疾患の検査を行うこともできる。指標蛋白質の活性とは、該蛋白質が備える生物学的な活性を言う。具体的には、本発明における指標蛋白質の活性としてG A P活性、すなわちG T P結合蛋白質の活性化を挙げることができる。また、G T P結合蛋白質との相互作用を活性の指標とすることもできる。該指標蛋白質の活性の検出は、公知の方法に基づいて行うことができる。具体的には、G A Pの活性測定は、この蛋白質が作用する特異的なG T

P結合蛋白のGTPase活性を測定することで可能である。例えば、Gyp6蛋白はGTP結合蛋白であるYpt6蛋白に特異的に作用してそのGTPase活性を上昇させる。従って、Ypt6蛋白のGTPase活性の上昇を測定することによってGyp6蛋白の活性を測定することができる (Strom, M. et al., 1993, Nature 361 (6414): 736-739)。本発明における指標蛋白質B1799においても、この蛋白質が作用する特異的GTP結合蛋白の活性を測定することにより、指標蛋白質の活性を検出することができる。

本発明の検査方法においては、通常、被検者の生体試料を試料とする。生体試料としては、末梢血T細胞等を用いることができる。検査を行う白血球は精製試料でも粗精製試料でもよい。検査試料は、好ましくは被検者の末梢血白血球、より好ましくは末梢血T細胞である。T細胞は、末梢血から公知の方法によって調製することができる。すなわち、たとえばヘパリン採血した血液を希釈してフィコールを利用して遠心分離によって分画し、PBMCを分離する。分離されたPBMCは、そのまま本発明によるアレルギー性疾患の検査に用いることができる。PBMCには、リンパ球 (lymphocyte) や単球 (monocyte) が含まれる。しかし、実施例にも示すように、これらの血液細胞においては、指標遺伝子はT細胞で高い発現が見られる。T細胞以外の細胞から大きな影響を受けずに発現レベルを測定することができる。純粋なT細胞集団ではなく、リンパ球分画を試料として直接分析することにより、ベッドサイドにおける簡便な検査が可能となる。あるいは抗CD3抗体を固定したマイクロビーズでT細胞を特異的に吸着し分離することもできる。

血液細胞を破壊し、細胞中の指標遺伝子のmRNA、あるいは指標蛋白質を測定することができる。また血中に存在する指標蛋白質を測定することもできる。T細胞のライセートやmRNAの抽出には、市販のキットを利用すると便利である。例えば、RNeasy Mini (登録商標) (Qiagen製) またはISOGEN (登録商標) (ニッポンジーン) 等を用いることができる。

被検生体試料における指標遺伝子の発現レベルの測定値は、公知の方法によって補正することができる。補正により、該生体試料における遺伝子の発現レベルの変化を比較することができる。測定値の補正は、該生体試料に発現し、かつ細胞の状態に関わらず発現レベルが大きく変動しない遺伝子 (ハウスキーピング遺伝子など) の発現レベルの測定値に基づいて、本発明において指標とすべき遺伝子の発現レベルの測定値を補正することによって行うことができる。このような遺伝子としては、 β -アクチン (β -actin) 遺伝子、およびグリセルアルデヒド3リン酸脱水素酵素 (GAPDH) 遺伝子が挙げられる。本発明の検査においては、被検者の白血球および健常者の対応する白血球における指標遺伝子の発現レベルを測定する。そして、被検者の白血球における発現レベルが、健常者のそれに比べ上昇しているかを調べる。被検者の白血球における指標遺伝子の発現レベルの上昇はアレルギー性疾患と関連付けられる。

本発明におけるアレルギー性疾患の検査とは、たとえば以下のような検査が含まれる。アレルギー性疾患様の症状を示しながら、一般的な検査ではアレルギー性疾患と判定できない患者であっても、本発明に基づく検査を行えばアレルギー性疾患の患者であることが容易に判定できる。より具体的には、アレルギー性疾患が疑われる症状を示す患者における指標遺伝子の発現の上昇は、その症状の原因がアレルギー性疾患である可能性が高いことを示している。アレルギー性疾患様の症状としては、具体的には、皮膚炎 (かゆみ、発赤)、鼻炎 (はなづまり、鼻水、くしゃみ)、喘息 (喘鳴、呼吸困難) 等を示すことができる。また、本発明におけるアレルギー性疾患の検査とは、たとえば上記のようなアレルギー性疾患様の症状がアレルギー反応に起因するものであるかどうかを判断するための検査が挙げられる。これらの症状は、それぞれ皮膚乾燥症、かぜ症候群 (鼻風邪)、気管支炎などでも認められるが、本発明の検査方法により、その症状がアレルギー反応に起因しているのかどうかを判別可能である。また本発明のアレルギーの検査方法には、アレルギー素因を有するか否かを判断するための検査が含まれる。すなわち顕著な症状を示していない被検者に対して検査を行い、指標遺伝子の発現の上昇が認められればアレルギー素因を

有すると判断される。あるアレルギー性疾患様の症状が、アレルギー反応が原因となっているか否かを診断することは、治療上、非常に重要な工程である。本発明の検査方法は、疾患原因の特定において、きわめて重要な情報を提供することができる。また、症状に関する情報を参照せずに被検者試料を検査して、指標遺伝子の発現が高い試料をスクリーニングすることによりアレルギー性疾患患者のスクリーニングを実施することもできる。

あるいは本発明の検査は、アレルギー症状が改善に向かっているのかどうかを判断するために有用である。本発明の指標遺伝子は、アレルギー性疾患の患者のPBMCに含まれるT細胞において発現量の増加を示した。T細胞は免疫応答において司令塔としての役割を果たす細胞である。したがって、アレルギー性疾患と診断された患者における指標遺伝子の発現の低下は、アレルギーの症状の改善を示唆し、指標遺伝子の発現の上昇は、アレルギーの症状が進行している可能性が高いことを示唆する。 10

また指標遺伝子B1799は、リンパ球の中でもT細胞での発現が高く、その中でも特にCD4⁺かつCD45RO⁺の表現形を示すT細胞すなわち、メモリーT細胞における発現が高いことが判明した。従って、該指標遺伝子はこれらのT細胞に対するマーカーとして利用することができる。また該指標遺伝子は、T細胞の活性化細胞死において発現が顕著に誘導される。また、イオノマイシンなどによる活性化刺激によっても発現が誘導される。このように該指標遺伝子の発現はT細胞の活性化状態を反映していることから、T細胞における該指標遺伝子の発現を測定することにより、T細胞の活性化レベルを知ることができる。

また本発明は、T細胞における、指標遺伝子B1799またはB1799遺伝子と機能的 20
に同等な遺伝子の発現レベルを上昇させたトランスジェニック非ヒト動物のアレルギー性疾患モデル動物としての使用に関する。アレルギー性疾患モデル動物は、アレルギーにおける生体内の変化を明らかにするために有用である。更に、本発明のアレルギー性疾患モデル動物は、アレルギー性疾患の治療薬の評価に有用である。

本発明によって、T細胞において前記指標遺伝子の発現レベルが、上昇することが明らかとなった。したがって、T細胞においてB1799遺伝子、またはB1799遺伝子と機能的に同等な遺伝子の発現レベルを人為的に増強した動物は、アレルギー性疾患のモデル動物として利用することができる。本発明においてトランスジェニック動物とは、ゲノムDNAにおける1または複数のヌクレオチドの挿入、置換、および/または欠失を伴う、 30
遺伝的に改変された動物 (genetically modified animals)
)を言う。このアレルギー性疾患モデル動物は、アレルギーにおける生体内の変化を明らかにするために有用である。更に、本発明のアレルギー性疾患モデル動物は、アレルギー性疾患の治療薬の評価およびスクリーニングに有用である。なおT細胞における発現レベルの上昇とは、血液細胞全体における指標遺伝子の発現レベルの上昇を含む。すなわち、前記指標遺伝子の発現レベルを上昇させるのはT細胞のみである場合のみならず、血液細胞全体において、あるいは全身性に前記遺伝子の発現レベルが上昇している場合を含む。

本発明においてB1799遺伝子と機能的に同等な遺伝子とは、指標遺伝子B1799によってコードされる蛋白質(指標蛋白質)の活性と同等の活性を備えた蛋白質をコードする遺伝子である。このような遺伝子としては、ヒトB1799遺伝子または他の生物のその 40
のカウンターパートの人為的な改変体などが含まれる。例えば、ある遺伝子を発現ベクターに挿入する場合には、N末端またはC末端の数アミノ酸を欠失させたり、タグペプチドの配列または発現ベクター由来の他のアミノ酸配列を付加することが頻繁に行われる。このような蛋白質は天然の細胞が持つ内在性蛋白質とアミノ酸配列が異なるが、その活性は実質的に内因性蛋白質と同等である。本発明においてこのような蛋白質をコードする遺伝子は、内因性遺伝子と機能的に同等な遺伝子と称する。

本発明における指標蛋白質の活性としてはGAP活性が挙げられる。例えば配列番号：2に記載のヒトB1799蛋白質の1または複数のアミノ酸を欠失、挿入、および/または置換した蛋白質であって、GAP活性を有する蛋白質をコードする遺伝子を、本発明のトランスジェニックモデル動物の作製のために用いることができる。このような改変体蛋白質は、ヒトB1799蛋白質のアミノ酸配列に対して、たとえば90%以上、望ましくは 50

95%以上、更に望ましくは99%以上の相同性を有する蛋白質である。また、配列番号：1とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を含む遺伝子であって、GAP活性を有する蛋白質をコードする遺伝子も、B1799遺伝子と機能的に同等な遺伝子として用いることができる。

本発明のモデル動物は、例えば(a)該モデル動物の表現型を検出する工程、および(b)該モデル動物と比べT細胞における該指標遺伝子の発現レベルが低い動物(対照)の対応する表現型に対する違いをアレルギー疾患と関連付ける工程により、アレルギー疾患のモデルとして使用することができる。対照の動物としては、該モデル動物と同じ遺伝背景を持つ非トランスジェニック動物、または空のベクターを導入したトランスジェニック動物などが挙げられる。表現型としては、例えば皮膚炎、鼻炎、または喘息等のアレルギー症状、あるいは免疫系細胞の活性化または遺伝子発現の変化などを含む、所望の表現型が挙げられる。

本発明において、指標遺伝子B1799のT細胞における発現レベルを上昇させることによって得ることができるトランスジェニック動物をアレルギー性疾患モデル動物として使用し、この遺伝子の役割や、この遺伝子を標的とする薬剤を評価することには大きな意義がある。また本発明によるアレルギー性疾患モデル動物は、後に述べるアレルギー性疾患の治療または予防のための医薬品のスクリーニングに有用であると同時に、アレルギー性疾患のメカニズムの解明、さらにはスクリーニングされた化合物の安全性の試験にも有用である。たとえば本発明によるアレルギー性疾患モデル動物がアトピー性皮膚炎またはアレルギー性喘息を発症したり、何らかのアレルギー性疾患に関連した測定値の変化を示せば、それを回復させる作用を持った化合物を探索するスクリーニングシステムが構築できる。

本発明において、発現レベルの上昇とは、目的とする遺伝子が外来遺伝子として導入され強制発現している状態、宿主が備える遺伝子の転写および/または蛋白質への翻訳が増強されている状態、並びに翻訳産物である蛋白質の分解が抑制された状態のいずれかを意味する。遺伝子の発現レベルは、たとえば実施例に示すような定量的なPCRにより確認することができる。また翻訳産物である蛋白質の発現量または活性は、正常な状態と比較することにより確認することができる。

代表的なトランスジェニック動物は、目的とする遺伝子を導入し強制発現させた動物である。この他のトランスジェニック動物には、たとえばmRNAの非翻訳領域(UTR)の配列などからRNA不安定化の要因となる配列を除去してmRNAの半減期を伸ばしたりすることができる。また、指標遺伝子のコード領域に変異を導入し、その活性を増強したり、あるいは分解されにくいアミノ酸配列に改変することなどを示すことができる。アミノ酸配列の変異には、置換、欠失、挿入、あるいは付加を示すことができる。その他、遺伝子の転写調節領域を変異させることにより、指標遺伝子の発現そのものを上昇させることもできる。

特定の遺伝子を対象として、トランスジェニック動物を得る方法は公知である。すなわち、遺伝子と卵を混合してリン酸カルシウムで処理する方法や、位相差顕微鏡下で前核期卵の核に、微小ピペットで遺伝子を直接導入する方法(マイクロインジェクション法、米国特許第4873191号)、胚性幹細胞(ES細胞)に遺伝子を導入する方法などによってトランスジェニック動物を得ることができる。その他、レトロウイルスベクターに遺伝子を挿入し、卵に感染させる方法、および、精子を介して遺伝子を卵に導入する精子ベクター法等も開発されている。精子ベクター法とは、精子に外来遺伝子を付着またはエレクトロポレーション等の方法で精子細胞内に取り込ませた後に、この精子を卵子に受精させることにより、外来遺伝子を導入する遺伝子組換え法である(M. Lavitrano et al., Cell, 57, 717, 1989)。

本発明のアレルギー性疾患モデル動物として用いるトランスジェニック動物は、ヒト以外のあらゆる脊椎動物を利用して作成することができる。具体的には、マウス、ラット、ウサギ、ミニブタ、ヤギ、ヒツジ、サル、あるいはウシ等の脊椎動物において様々な遺伝子の導入や発現レベルを改変されたトランスジェニック動物が作り出されている。

また本発明は、アレルギー性疾患治療薬のスクリーニング方法に関する。本発明において指標遺伝子は、アレルギー性疾患により統計学的に有意に発現レベルが上昇している。したがって、これらの遺伝子の発現レベルを低下させることができる化合物を選択することによって、アレルギー性疾患の治療薬を得ることができる。本発明において遺伝子の発現レベルを低下させる化合物とは、遺伝子の転写、翻訳、転写産物 (mRNA) または翻訳産物 (蛋白質) の安定性、および蛋白質の作用などの遺伝子機能の発現の過程のいずれかのステップに対して阻害的に作用する活性を持つ化合物である。

本発明のアレルギー性疾患治療薬のスクリーニング方法は、*in vivo*で行なうことも *in vitro*で行うこともできる。*in vivo*のスクリーニングは、たとえば以下のような工程にしたがって実施することができる。

(a) 被験動物に候補化合物を投与する工程、

(b) 被験動物の白血球において、本発明における指標遺伝子の発現レベルを測定する工程、および

(c) 該候補化合物を投与しない対照と比較して、該指標遺伝子の発現レベルを低下させる化合物を選択する工程

本発明のスクリーニング方法における被験動物としては、本発明における指標遺伝子を発現する所望の動物を用いることができる。具体的には、例えばマウス、ラット、モルモット、ウサギ、ネコ、ブタ、ミニブタ、ヤギ、ウシ、ヒツジ、およびサルなどが挙げられる。スクリーニングには、特に指標遺伝子の発現が亢進した個体を用いることが好適である。また、アレルギー症状を発症した個体を用いることにより、症状に対する候補化合物の

効果も評価することができる。被験動物に薬剤候補化合物を投与し、該動物の白血球における指標遺伝子の発現に対する化合物の作用をモニターすることにより、指標遺伝子の発現レベルに与える薬剤候補化合物の影響を検出することができる。被験動物の白血球における指標遺伝子の発現レベルの変動は、上記の本発明の検査方法と同様の手法によってモニターすることができる。更にこの検出の結果に基づいて、指標遺伝子の発現レベルを低下させる薬剤候補化合物を選択すれば、アレルギー性疾患に対する薬剤候補化合物をスクリーニングすることができる。より具体的には、候補化合物を投与した被験動物から白血球を採取し、前記指標遺伝子の発現レベルを該化合物未投与の動物から採取した対応する白血球における該遺伝子の発現レベル (対照) と比較することにより、本発明によるスクリーニングを実施することができる。白血球としては粗精製試料でも精製試料でもよく、PBMC、あるいは精製T細胞等を利用することができる。好ましくは精製T細胞が用いられる。これらの生体試料の採取方法、および調製方法は公知である。

このようなスクリーニングにより、指標遺伝子の発現に様々な形で関与する薬剤を選択することができる。具体的には、たとえば次のような作用を持つ薬剤候補化合物を見出すことができる。

指標遺伝子の転写活性を低下させる作用、

指標遺伝子の転写産物からの翻訳を低下させる作用、

指標遺伝子の翻訳産物の活性を阻害する作用、

指標遺伝子の転写産物の安定化を低下もしくは分解を促進する作用等、

また前記スクリーニング方法において、候補化合物の投与前および/または投与後に、被験動物をアレルゲンで刺激する工程を含む方法も本発明に含まれる。候補化合物の投与前にアレルゲンで刺激した場合には、候補化合物の、アレルゲン刺激後の免疫応答を抑制する作用を検出することができる。このようなスクリーニングによって得ることができる化合物には、アレルギー性疾患の治療効果を期待できる。また候補化合物の投与後にアレルゲンで刺激した場合には、候補化合物の、アレルゲン刺激による免疫応答の開始を抑制する作用を検出することができる。このようなスクリーニングによって得ることができる化合物には、アレルギー性疾患の予防効果を期待できる。本発明のスクリーニング方法に用いることができるアレルゲンとしては、公知のアレルゲン性の物質を用いることができる。具体的には、ダニ、ハウスダスト、植物の花粉、あるいは各種の食品由来のタンパク質

等がアレルゲン性物質として公知である。これらのアレルゲンは、天然に由来するものであっても良いし、遺伝子組換えなどの手法によって合成されたものであっても良い。またアレルゲンは、タンパク質の断片であることもできる。精製アレルゲンの調製方法も公知である。

たとえば人間のアトピー性皮膚炎に近いモデルとして、NC/Ngaマウスを用いた皮膚炎自然発症モデルが報告されている。このマウスの耳介にダニ抗原 ($5 \mu\text{g}$ /耳) を2-3日間隔で計8回投与すると、2週間以降にはヒトのアトピー性皮膚炎に酷似した症状を誘発することができる。この系に候補化合物を投与し、本発明の指標遺伝子の発現レベルの変化を追跡することによって本発明によるスクリーニングを実施することができる。

また、*in vitro*でのスクリーニングにおいては、例えば、指標遺伝子を発現する細胞に候補化合物を接触させ、指標遺伝子の発現レベルを低下させる化合物を選択する方法が挙げられる。このスクリーニングは、たとえば以下のような工程にしたがって実施することができる。

- (a) 指標遺伝子を発現する細胞に候補化合物を接触させる工程
- (b) 該指標遺伝子の発現レベルを測定する工程、および
- (c) 該候補化合物を接触させない対照と比較して、該指標遺伝子の発現レベルを低下させる化合物を選択する工程

指標遺伝子を発現する細胞として、たとえば末梢血白血球細胞や白血球由来株化細胞を用いることができる。白血球細胞としては、特にT細胞を例示することができる。株化T細胞としてMolt 4細胞およびJurkat細胞を例示できる。ヒト急性白血病T細胞Jurkat (ATCC Number TIB-152) は、ATCCより購入することができる。

本発明のスクリーニングの方法は、まず該細胞に候補化合物を添加する。その後、該細胞における指標遺伝子の発現レベルを測定し、該候補化合物を接触させない場合の該細胞における該遺伝子の発現レベル (対照) と比較して該遺伝子の発現レベルを低下させる化合物を選択する。

なお本発明のスクリーニング方法において、指標遺伝子の発現レベルは、これらの遺伝子から転写されるmRNAレベルまたは該遺伝子がコードする蛋白質レベルを検出することにより比較することができる。mRNAによって発現レベルの比較を行うには先に述べたように細胞からmRNA試料を調製する工程を実施する。また蛋白質によって発現レベルの比較を行うには、細胞から蛋白質試料を調製する工程を実施する。mRNAおよび蛋白質の検出は、先に述べたような公知の方法によって実施することができる。

さらに本発明の開示に基づいて本発明の指標遺伝子の転写調節領域を取得し、レポーターアッセイ系を構築することができる。レポーターアッセイ系とは、転写調節領域の下流に配置したレポーター遺伝子の発現レベルを指標として、該転写調節領域の転写活性を調節する化合物をスクリーニングするアッセイ系をいう。このようなスクリーニングは、具体的には以下の工程を含む。

- (a) 指標遺伝子の転写調節領域の制御下に連結されたレポーター遺伝子を含む細胞に候補化合物を接触させる工程、
- (b) 該レポーター遺伝子の発現レベルを測定する工程、および
- (c) 該候補化合物を接触させない対照と比較して該レポーター遺伝子の発現レベルを低下させる化合物を選択する工程

転写調節領域としては、指標遺伝子の転写開始点付近から上流0.5 kbから5 kb程度の領域のDNAを利用することができる。転写調節領域には、既知の転写因子結合配列、転写調節エレメント、さらには、通常プロモーター領域に見られるCAATボックス、およびTATAボックス等が含まれていてよい。レポーター遺伝子としては、CAT (chloramphenicol acetyltransferase) 遺伝子、ルシフェラーゼ (luciferase) 遺伝子、成長ホルモン遺伝子等を利用することができる。これらのレポーター遺伝子の発現レベルは、発現した蛋白質の活性を検出することにより測定することが可能である。これらの蛋白質の活性を検出する方法はよく知られている

。候補化合物を接触させない場合の該細胞における該レポーター遺伝子の発現レベル（対照）と比較して、該候補化合物を接触させた場合に該レポーター遺伝子の発現レベルを低下させる化合物を選択する。

ヒトB1799遺伝子をコードするゲノム配列（GenBank Acc. No. AL139230）が明らかにされており、その配列を基にして、転写開始点や上流のプロモーター配列を決定することが可能である。この配列情報を基にB1799遺伝子のプロモーター領域をPCR等により増幅し、その下流にレポーター遺伝子を連結してレポーター構築物を作製することができる。具体的には、たとえば、本発明のスクリーニングに用いる転写調節領域を次のようにして取得することもできる。すなわち、まず本発明で開示した指標遺伝子の塩基配列または上記のB1799遺伝子のプロモーター領域の配列に基づいて、BACライブラリー、YACライブラリー等のヒトゲノムDNAライブラリーから、PCRまたはハイブリダイゼーションを用いる方法によりスクリーニングを行い、該cDNAの配列を含むゲノムDNAクローンを得る。得られたゲノムDNAの配列を基に、本発明で開示したcDNAの上流から転写調節領域を取得する。得られた転写調節領域を、レポーター遺伝子上流に位置するようにクローニングしてレポーターコンストラクトを構築する。得られたレポーターコンストラクトを培養細胞株等に導入してスクリーニング用の形質転換体とする。この形質転換体に候補化合物を接触させ、レポーター遺伝子の発現を制御する化合物のスクリーニングを行うことができる。

また、指標遺伝子の転写調節領域の制御下に連結されたレポーター遺伝子を含む細胞は、いわゆるノックイン動物の細胞であってもよい。ノックイン動物とは、内在性標的遺伝子の蛋白質コード領域に他の外来遺伝子が挿入された遺伝子改変動物を言う。ノックインされたこの外来遺伝子は、標的遺伝子の転写調節領域の下流に挿入されるため、内在性標的遺伝子と同様の発現制御を受けて発現する。ノックイン遺伝子としてレポーター遺伝子を用い、得られたノックイン動物またはその動物から得た細胞を使ってスクリーニングを行うことができる。ノックイン動物を用いてスクリーニングを行う方法は、（a）指標遺伝子部位にレポーター遺伝子がノックインされた動物に候補化合物を投与する工程、（b）該レポーター遺伝子の発現レベルを測定する工程、および（c）該候補化合物を投与しない対照と比較して該レポーター遺伝子の発現レベルを低下させる化合物を選択する工程、を含む。例えば候補化合物を投与した場合および投与しない場合で、該ノックイン動物の白血球好ましくはT細胞における該レポーター遺伝子の発現レベルを測定し、その発現を低下させる化合物を選択する。またノックイン動物からの細胞を用いたスクリーニングは、（a）指標遺伝子部位にレポーター遺伝子がノックインされた動物からの細胞に候補化合物を接触させる工程、（b）該レポーター遺伝子の発現レベルを測定する工程、および（c）該候補化合物を接触させない対照と比較して該レポーター遺伝子の発現レベルを低下させる化合物を選択する工程、を含む。例えば候補化合物の存在下または非存在下でノックイン動物から得た白血球好ましくはT細胞における該レポーター遺伝子の発現レベルを測定し、該発現レベルを低下させる化合物を選択する。これらのスクリーニングは本発明の方法に含まれる。特に個体を用いたスクリーニングにおいては、指標遺伝子本来の機能を完全に欠損させないように、片方のアレルは正常のままにして指標遺伝子が発現するようにして、もう片方のアレルにレポーター遺伝子がノックインされているヘテロノックイン接合体を用いてスクリーニングを行うことが好ましい。

*in vitro*での本発明によるスクリーニング方法として、指標蛋白質の活性に基づくスクリーニング方法を利用することもできる。すなわち本発明は、次の工程を含む、アレルギー性疾患の治療薬のスクリーニング方法に関する。

（a）本発明における指標遺伝子またはそれと機能的に同等な遺伝子によってコードされる蛋白質と候補化合物とを接触させる工程、

（b）該蛋白質の活性を測定する工程、および

（c）該候補化合物を接触させない対照と比較して該蛋白質の活性を低下させる化合物を選択する工程

ここで指標遺伝子と機能的に同等な遺伝子としては、上記のように内在性B1799遺伝

子の人為的な改変体などが含まれる。

このようなスクリーニングは、例えば指標遺伝子を外来的に細胞で発現させ、その細胞内における指標蛋白質の活性を測定することにより実施することができる。このためには、指標遺伝子を発現ベクターに挿入し、該ベクターを適当な哺乳動物細胞などに導入する。ベクターの宿主への導入方法としては、生物学的方法、物理的方法、化学的方法などを示すことができる。生物学的方法としては、例えば、ウイルスベクターを使用する方法、特異的受容体を利用する方法、細胞融合法（H V J（センダイウイルス）、ポリエチレングリコール（P E G）、電気的細胞融合法、微少核融合法（染色体移入））が挙げられる。また、物理的方法としては、マイクロインジェクション法、エレクトロポレーション法、
10 ジーンパーティクルガン（gene gun）を用いる方法が挙げられる。化学的方法としては、リン酸カルシウム沈殿法、リボソーム法、D E A E デキストラン法、プロトプラス

ト法、赤血球ゴースト法、赤血球膜ゴースト法、マイクロカプセル法が挙げられる。このスクリーニングにおいて測定される指標蛋白質の活性としては、例えばG T P 結合蛋白質に対する結合活性、またはG A P 活性などが挙げられる。また該指標蛋白質は、たとえばT細胞の細胞内シグナル伝達の制御に関与し、T細胞の分化または増殖を調節していることが示唆される。これらの活性を指標として、その活性を阻害する活性を有する化合物をスクリーニングすることができる。このようにして得ることができる化合物は、該指標蛋白質の働きを抑制する。その結果、T細胞において発現が誘導された該指標蛋白質の活性の阻害を通じて、アレルギー性の免疫応答を抑制することができる。

本発明による各種のスクリーニング方法に必要な、ポリヌクレオチド、抗体、細胞株、あるいはモデル動物は、予め組み合わせキットとすることができる。より具体的には、たとえば指標遺伝子を発現する細胞（培養細胞または個体など）と、これらの指標遺伝子の発現レベルを測定するための試薬とで構成される。指標遺伝子の発現レベルを測定するための試薬としては、たとえば指標遺伝子の塩基配列またはその相補配列の連続した少なくとも15ヌクレオチドを有するオリゴヌクレオチドが用いられる。あるいは指標蛋白質のアミノ酸配列を含むポリペプチドに結合する抗体を試薬として用いることができる。これらのキットには、標識の検出に用いられる基質化合物、細胞の培養のための培地や容器、陽性や陰性の標準試料、更にはキットの使用方法を記載した指示書等をパッケージしておくこともできる。

これらスクリーニングに用いる候補化合物としては、免疫抑制物質等の既存の化学的方法により合成された化合物標品、コンビナトリアルケミストリーにより合成された化合物標品のほか、動・植物組織の抽出物もしくは微生物培養物等の複数の化合物を含む混合物、またそれらから精製された標品などが挙げられる。

本発明のスクリーニング方法によって選択される化合物は、アレルギー性疾患の治療薬として有用である。あるいは、本発明における指標遺伝子の発現を抑制することができるアンチセンスDNAも、アレルギー性疾患の治療薬として有用である。好ましくはこのようなアンチセンスDNAは、本発明における指標遺伝子のセンス鎖の塩基配列の連続する少なくとも20塩基、より好ましくは25塩基以上、より好ましくは30塩基以上、より好ましくは40塩基以上、より好ましくは50塩基以上、より好ましくは100塩基以上の配列に対して相補的な配列を含むアンチセンスDNAである。アンチセンス領域としては、指標遺伝子の転写産物（プロセッシング前、中間産物、またはプロセッシング後のいずれの転写産物でもよい）の任意の部位のアンチセンスであってもよい。このような部位としては、例えば翻訳開始コドンを含む領域などが挙げられる。更に、本発明における指標遺伝子によってコードされる蛋白質に結合する抗体は、アレルギー性疾患の治療薬として有用である。抗体は、例えばG T P 結合蛋白質との相互作用ドメインに結合する抗体などが好ましく、例えばT B C ドメイン（配列番号：2の965～1184番目のアミノ酸領域またはその相同領域）に対する抗体、特にG T P a s e 活性化部位として必須なA r g 残基（例えば配列番号：2の973番目のA r g 残基）を含むペプチドをエピトープとする抗体などが例示できる。またホスフォチロシン相互作用ドメイン（P T D / P I D）（配列番号：2の167～237番目のアミノ酸領域、415～487番目のアミノ酸領域
50

、またはそれらの相同領域)に対する抗体なども好ましい。本発明のアレルギー性疾患の治療薬は、前記スクリーニング方法によって選択された化合物、該アンチセンスDNA、または該抗体を少なくとも1つの主成分として含み、生理学的に許容される担体、賦形剤、あるいは希釈剤等と混合することによって製造することができる。本発明のアレルギー性疾患の治療剤は、アレルギー症状の改善を目的として、経口、あるいは非経口的に投与することができる。

経口剤としては、顆粒剤、散剤、錠剤、カプセル剤、溶剤、乳剤、あるいは懸濁剤等の剤型を選択することができる。注射剤には、皮下注射剤、筋肉注射剤、あるいは腹腔内注射剤等を示すことができる。

また、投与すべき化合物が蛋白質である場合には、それをコードする遺伝子を遺伝子治療の手法を用いて生体に導入することにより、治療効果を達成することができる。治療効果をもたらす蛋白質をコードする遺伝子を生体に導入し、発現させることによって、疾患を治療する手法は公知である。

あるいはアンチセンスDNAは、それ自体を投与することができる。その場合は、5'末端および/または3'末端の修飾等により細胞膜透過性または安定性を高めることができる。あるいはアンチセンスDNAは、適当なプロモーター配列の下流に組み込み、アンチセンスRNA発現ベクターとして投与することができる。この発現ベクターをアレルギー性疾患患者のT細胞へ導入すれば、標的遺伝子のアンチセンスを発現し、当該遺伝子の発現レベルの低下によってアレルギーの治療効果を達成することができる。T細胞への発現ベクターの導入としては、*in vivo*、あるいは*ex vivo*で行う方法が公知である。

本発明のアレルギー疾患の治療薬の投与量は、患者の年齢、性別、体重および症状、治療効果、投与方法、処理時間、あるいは該医薬組成物に含有される活性成分の種類などにより異なるが、通常成人一人あたり、一回につき0.1mgから500mgの範囲で、好ましくは0.5mgから20mgの範囲で投与することができる。しかし、投与量は種々の条件により変動するため、上記投与量よりも少ない量で十分な場合もあり、また上記の範囲を超える投与量が必要な場合もある。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を実施例により具体的に説明するが、本発明はこれら実施例に制限されるものではない。なお本明細書において引用された全ての先行技術文献は、参照として本明細書に組み入れられる。

〔実施例1〕B1799の同定

ディファレンシャルディスプレイ(DD)法(Liang and Pardee, Science, 1992, 257:967-971; T. Ito et al., 1994, F E B S L e t t . 351:231-236)により、アトピー性皮膚炎患者およびアレルギー性喘息患者のT細胞において健常者のT細胞よりも強く発現される、164bpのDNA断片(クローンB1799-01)(配列番号:3;プライマー配列は除いてある)を見出した。この断片を検出したDD解析において用いたアンカープライマーはGT15C(配列番号:5)、任意プライマーはAG00189(TCTCTGGAGT/配列番号:6)である。この断片が由来する遺伝子をB1799と名付けた。

〔実施例2〕B1799のクローニング

DD配列を利用して、ヒト白血球cDNAライブラリーを鋳型にして、5'-RACE法によるPCRクローニングを行った結果、全長486bpのDNA断片を得た(配列番号:4)。公共データベースでBLAST検索を行った結果、この塩基配列の塩基番号27~255の領域の配列が、かずさDNA研究所で同定された遺伝子KIAA0603(GenBankアクセッションNo. AB011175)の配列と100%一致することが判明した。KIAA0603は5922bpのcDNAであり、ORF中にメチオニンで始まる1299アミノ酸残基からなる蛋白質をコードする。相同性配列領域はKIAA0603遺伝子のORF領域内で塩基番号2152~2380領域である。また486bp配列は13番染色体ゲノム配列であるGenBankアクセッションNo. AL1625

71の塩基番号128071～127586領域（逆鎖）と完全に一致した。

〔実施例3〕B1799の定量的PCRによる発現定量

DD配列はKIAA0603遺伝子由来の未成熟なmRNAのイントロン領域に由来すると判断された。以後、B1799はKIAA0603遺伝子と同一であると判断して、KIAA0603遺伝子を解析した。KIAA0603のORF領域内に以下に示したmRNA定量用のプライマー、プローブを設計し、発現定量に用いた。TQ1799orfはTaqMan法による遺伝子発現定量に使用したTaqManプローブで、5'端はFAM(6-carboxyfluorescein)で、3'端はTAMRA(6-carboxy-tetramethyl-rhodamine)で蛍光標識されている。ABI-PRISM7700を用いてDNA増幅をリアルタイムに検出した。

10

1799orf-f: AAGACAGTGGAGCAACTCCGG (配列番号: 7)

1799orf-r: CAGCAACAGGTCACAATTGGC (配列番号: 8)

TQ1799orf: AGCTGCTGCCCGCGGATGCT (配列番号: 9)

〔実施例4〕病態関連性

アトピー性皮膚炎患者のT細胞から調製したRNAにおけるB1799遺伝子の発現を、実施例3に記載の方法により測定した。結果を表1に示した。健常者とアトピー性皮膚炎患者の2群に分けてt-検定を行ったところ、患者群での発現量が有意差($p < 0.05$)に高いことが判明した。

20

表1

アトピー性皮膚炎患者におけるB1799の発現量

病状	B1799(copy/ngRNA)	病状	B1799(copy/ngRNA)
1 健常	5196.77	21 中等症	3865.66
2 健常	2813.08	22 中等症	3931.79
3 健常	4443.58	23 中等症	6614.39
4 健常	4115.51	24 中等症	6352.02
5 健常	3890.60	25 中等症	15627.77
6 健常	1897.45	26 中等症	4516.00
7 健常	2163.33	27 中等症	8289.22
8 健常	154.31	28 中等症	17001.41
9 健常	3542.13	29 中等症	5502.07
10 健常	1647.13	30 中等症	21914.55
11 軽症	1176.89	31 重症	2645.44
12 軽症	10222.95	32 重症	3492.70
13 軽症	15579.36	33 重症	5810.25
14 軽症	18515.82	34 重症	13260.42
15 軽症	3200.39	35 重症	736.77
16 軽症	1862.32	36 重症	6562.17
17 軽症	5031.60	37 重症	11227.19
18 軽症	5999.48	38 重症	5974.82
19 軽症	5382.48	39 重症	3249.61
20 軽症	1019.33	40 重症	609.08

30

40

特に、健常者および軽症患者と比べて中等症患者で発現が高かった。具体的には、アトピー 50

一性皮膚炎を、軽症、中等症、重症で群分けし、健常群を加えて4群で分散分析を行った。その結果、4群の中の発現量に有意差 ($p < 0.05$) があることが判明した。FisherのPLSD法を用いてポストホック検定を行い、群間差を比較した結果、以下の群わけで有意差および傾向があることが判明した。群わけでの発現を図1に示した。

健常者<軽症 (傾向 $p < 0.1$)

健常者<中等症 (有意差 $p < 0.01$)

重症<中等症 (傾向 $p < 0.1$)

以上のように、健常者よりアトピー性皮膚炎患者での発現が高く、特に中等症患者での発現が高いことが判明した。

〔実施例5〕各種免疫細胞での発現量

10

T細胞、B細胞、好酸球、単球、および好中球での発現量をそれぞれ5人に由来するRNA試料を用いて測定した。その結果、T細胞での発現が最も高かった(図2)。その中ではCD4⁺、CD45RO⁺の表現形を示すT細胞すなわち、メモリーT細胞における発現が高いことが判明した(図3)。

〔実施例6〕T細胞活性化における発現変化

成熟T細胞が一度抗原刺激を受けた後に、さらに抗原刺激を受けるとアポトーシスを起こすことが知られ、T細胞の活性化細胞死と言われている。T細胞の活性化細胞死は末梢における免疫寛容や免疫反応の制御に関与していると考えられている(Yilli Yang et al., J. Exp. Med. 181:1673-1682, 1995)。これらの制御におけるB1799の役割を検討するため、T細胞活性化細胞死とグルココルチコイドによる細胞死におけるB1799の発現変動を測定した。末梢血由来T細胞は、5%FCS含有RPMI1640に、1mMピルビン酸ナトリウム、2mM L-グルタミン、100u/mlペニシリン、および100μg/mlストレプトマイシンを加え、さらに200u/mlのIL-2(イムネース、塩野義製薬)を添加した培地を用い、5%二酸化炭素、湿度95%、37℃で培養した。まず、末梢から分離したCD3⁺細胞を抗CD3抗体(OKT3, ヤンセン協和)をコートしたプレートで5日間培養し、続いて、抗CD3抗体のない状態で3日間培養した。得られたT細胞を、再度抗CD3抗体をコートしたプレートで刺激培養し活性化細胞死を測定した。経時的に細胞を回収し、常法によってRNAを抽出し、定量的PCRに使用した。無刺激コントロールは抗CD3抗体をコートしないプレートを用いた。

20

30

また、T細胞にアポトーシスを誘導するグルココルチコイド(Kofler R., Histochem. Cell Biol., 2000 Jul;114(1):1-7)としてデキサメサゾン(100nM、シグマ)を無刺激コントロールに添加し、その影響を検討した。

図4aに示したように、抗CD3抗体を用いてヒト末梢血由来T細胞に、T細胞受容体からの2度目の刺激をかけると、刺激をかけた49時間後から明らかな細胞死が誘導された。このT細胞活性化の過程でB1799は刺激後2時間において顕著に誘導を受けた。一方、デキサメサゾンでは末梢血T細胞には顕著な細胞死は誘導されず、B1799の発現にも変動は認められなかった(図4b"DEX")。同様な実験で、T細胞をいろいろな薬剤で刺激すると、抗CD3抗体のほかに、カルシウムイオノフォアであるイオノマイシン1μg/ml(シグマ)単独の刺激(図中"イオノマイシン")、あるいはイオノマイシンとフォルボル12-ミリステート13-アセテート25ng/ml(PMA、シグマ)の刺激(図中"io+PMA")によってもB1799の顕著な発現誘導が認められた(図5)。以上から、B1799はT細胞の活性化に伴って発現が上昇することが明らかとなった。さらに、その後に起こる活性化細胞死になんらかの関わりを持つ可能性が示された。

40

〔実施例7〕アミノ酸配列構造解析

B1799がコードする蛋白質の構造を図6に示した。リン酸化チロシン結合領域で蛋白質結合に関与するホスフォチロシン相互作用ドメイン(Phosphotyrosine interaction domain; PTB/PID)をN末領域に2箇所持つ。

50

C末側にTBCドメインを持つ。

このTBCドメインを含む886番目のアミノ酸から1237番目のアミノ酸の領域は、ヒト rab6 GTPase activating protein (Cuif, M. H. et al., EMBO J. : 18 (7) : 1772-82, 1999) (ACCESSION NP_036329) とBLAST検索において31%の相同性を示す。また、853番目のアミノ酸から1107番目のアミノ酸領域は酵母GTPase activating protein (GAP) であるGyp1p蛋白 (ACCESSION NP_014713) とBLAST検索において21%の相同性が認められた。結晶構造が決定されているGyp1pのGTPase活性化部位構造を基にして (Rak, A. et al., EMBO J. 19 : 5105-5113, 2000)、B1799蛋白質の構造を予測すると図7のように非常に似た立体構造をとりうることが判明した。B1799蛋白質のArg973残基はGyp1pのGTPase活性化部位として必須なArg343残基に相当する。従って、B1799蛋白質はGTPase activating proteinである可能性が高く、しかもArg973残基がその活性に重要な役割を果たすことが予測された。

シグナル伝達で重要な役割を担うGTP結合蛋白質はGTP結合型がシグナル伝達における活性型であり、結合しているGTPがGDPに変換されると不活性型となる。GTP結合蛋白質自身がGTPase活性を有しており、GTPase activating proteinはそのGTPase活性を増強する働きを持つ。GTPase activating proteinはGTP結合蛋白質が不活性化型に変換することを助けることによって、シグナル伝達の制御を行っている。

以上から、B1799はGTP結合蛋白質の活性を制御することでT細胞が活性化されるシグナル伝達経路のなかで重要な役割を果たしていると考えられる。

また、B1799がコードするアミノ酸配列は全領域にわたってマウスTbc1と高い相同性を示した。Tbc1はマスト細胞分化で変動する遺伝子として発見され、細胞の分化、細胞周期抑制に関与することが示唆されている (Paul M. Richardson and Leonard I. Zon., Oncogene 11 : 1139-1148, 1995)。Tbc1と同様にB1799も細胞の分化、細胞周期抑制に関与する可能性がある。

産業上の利用の可能性

本発明により、健常者とアレルギー性疾患の患者との間で発現に差が見られる遺伝子が提供された。本発明の遺伝子の発現を指標とすることにより、アレルギー性疾患の検査、および治療薬候補化合物のスクリーニングを行うことが可能となった。本発明は指標遺伝子の発現レベルの測定により簡便に検査を実施することが可能で、アレルギー反応の病態を迅速に把握することができる。また本発明によるアレルギーの検査方法は、末梢血白血球などの生体試料を試料としてその発現レベルを解析することができるので、患者に対する侵襲性が低い。しかも遺伝子発現解析に関しては、微量サンプルによる高感度な測定が可能である。遺伝子解析技術は、年々ハイスループット化、低価格化が進行している。したがって本発明によるアレルギーの検査方法は、近い将来、ベッドサイドにおける重要な診断方法となることが期待される。この意味でこれらの病態関連遺伝子の診断的価値は高い。また、本発明のスクリーニング方法は、新たなアレルギー性疾患治療薬の開発への応用が期待できる。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Genox Research, Inc.

JAPAN AS REPRESENTED BY GENERAL DIRECTOR OF AGENCY OF NATIONAL
CENTER FOR CHILD HEALTH AND DEVELOPMENT

<120> Method for examination of allergic disease

10

<130> G1-A0117P

<140>

<141>

20

<150> JP 2002-100908

<151> 2002-04-03

<160> 9

<170> PatentIn Ver. 2.1

30

<210> 1

<211> 5922

<212> DNA

<213> Homo sapiens

40

<220>

<221> CDS

<222> (348)..(4244)

<400> 1

gcggccgcgg ggaccctcgg cgtggtcctc tgaccctgca aaccgcgcac ggaggaaggg 60

gaggtcctgc ccgaggcgcc agcccgagga ggaggatgcc catttaacc gccctgcct 120

10

gccgggcgct tgctcgggtg cccgcgcgcg gagcctccga gccgcgccg tggaagtgc 180

gcatggggca gggtcgtga agcgcggagt tcggggtcgc gccgtccca ggcaggcgcg 240

ggagcccggt gcggcagttg gcacagtctt gcgggcgcct tctgcgcgg agtggggggc 300

20

gcggtgcgcc cggccggcct ccgcggtgcc ctggtgaggc gagagtt atg gag ccg 356

Met Glu Pro

1

ccc agc tgc att cag gat gag ccg ttc ccg cac ccc ctg gag ccc gag 404

30

Pro Ser Cys Ile Gln Asp Glu Pro Phe Pro His Pro Leu Glu Pro Glu

5

10

15

ccg ggc gtc tca gct cag ccc ggc ccc ggg aag cca agc gat aag cgg 452

Pro Gly Val Ser Ala Gln Pro Gly Pro Gly Lys Pro Ser Asp Lys Arg

20

25

30

35

40

ttc cgg ctg tgg tac gtt ggg ggg tcg tgc ctg gac cac agg acc acg 500
 Phe Arg Leu Trp Tyr Val Gly Gly Ser Cys Leu Asp His Arg Thr Thr
 40 45 50

ctg cct atg ctg ccc tgg ctc atg gcc gag atc cgc agg cgc agc cag 548
 Leu Pro Met Leu Pro Trp Leu Met Ala Glu Ile Arg Arg Arg Ser Gln
 55 60 65

aag ccc gag gcg ggc ggc tgc ggg gcg ccg gcg gcc cga gag gtg atc 596
 Lys Pro Glu Ala Gly Gly Cys Gly Ala Pro Ala Ala Arg Glu Val Ile
 70 75 80

ctg gtg ctc agc gcg ccc ttc ctg cgt tgc gtc ccc gcg ccg ggc gct 644
 Leu Val Leu Ser Ala Pro Phe Leu Arg Cys Val Pro Ala Pro Gly Ala
 85 90 95

ggg gcc tcg ggg ggc act agt ccg tcg gcc acg cag ccc aac ccg gcg 692
 Gly Ala Ser Gly Gly Thr Ser Pro Ser Ala Thr Gln Pro Asn Pro Ala
 100 105 110 115

gta ttc atc ttc gag cac aag gcg cag cat atc tcg cgc ttc atc cac 740
 Val Phe Ile Phe Glu His Lys Ala Gln His Ile Ser Arg Phe Ile His
 120 125 130

aac agc cac gac ctc acc tac ttt gcc tac ctg atc aag gcg cag ccc 788
 Asn Ser His Asp Leu Thr Tyr Phe Ala Tyr Leu Ile Lys Ala Gln Pro

10

20

30

40

135	140	145		
gac gac ccc gag tcg cag atg gcc tgc cac gtt ttc cgc gcc aca gac	836			
Asp Asp Pro Glu Ser Gln Met Ala Cys His Val Phe Arg Ala Thr Asp				
150	155	160		
ccc agc cag gtt cct gat gtt att agc agc ata agg caa tta tct aaa	884			10
Pro Ser Gln Val Pro Asp Val Ile Ser Ser Ile Arg Gln Leu Ser Lys				
165	170	175		
gcg gcc atg aaa gag gat gcc aaa ccc agc aaa gat aat gag gac gcc	932			
Ala Ala Met Lys Glu Asp Ala Lys Pro Ser Lys Asp Asn Glu Asp Ala				
180	185	190	195	20
ttt tac aac tct cag aag ttc gaa gtc ctg tac tgt gga aag gtg acc	980			
Phe Tyr Asn Ser Gln Lys Phe Glu Val Leu Tyr Cys Gly Lys Val Thr				
200	205	210		
gtg acc cac aag aag gcc ccc tca agc ctc atc gat gac tgc atg gag	1028			30
Val Thr His Lys Lys Ala Pro Ser Ser Leu Ile Asp Asp Cys Met Glu				
215	220	225		
aag ttc agc ctg cac gaa cag cag cgc ctg aag atc caa ggc gag cag	1076			
Lys Phe Ser Leu His Glu Gln Gln Arg Leu Lys Ile Gln Gly Glu Gln				
230	235	240		40

cgc ggt ccg gac cca gga gag gac ctg gct gac ttg gag gtg gtg gtg 1124

Arg Gly Pro Asp Pro Gly Glu Asp Leu Ala Asp Leu Glu Val Val Val

245

250

255

ccc ggg tcc ccc gga gac tgc ctg ccg gag gag gct gac ggc acc gac 1172

Pro Gly Ser Pro Gly Asp Cys Leu Pro Glu Glu Ala Asp Gly Thr Asp

260

265

270

275

10

acc cac ctt ggc tta cct gcc ggg gcc agc cag cct gcc ctg acc agc 1220

Thr His Leu Gly Leu Pro Ala Gly Ala Ser Gln Pro Ala Leu Thr Ser

280

285

290

tct cgg gtc tgc ttc cct gag cgg att ttg gaa gat tct ggc ttt gat 1268

Ser Arg Val Cys Phe Pro Glu Arg Ile Leu Glu Asp Ser Gly Phe Asp

295

300

305

20

gag cag cag gag ttt cgg tct cgg tgc agc agt gtc acc ggc gtg caa 1316

Glu Gln Gln Glu Phe Arg Ser Arg Cys Ser Ser Val Thr Gly Val Gln

310

315

320

30

cgg aga gtt cac gag ggc agc cag aaa tcc cag ccg cga cgg aga cac 1364

Arg Arg Val His Glu Gly Ser Gln Lys Ser Gln Pro Arg Arg Arg His

325

330

335

gcg agc gca ccc agt cac gtc cag ccc tcg gac tcg gag aag aac agg 1412

Ala Ser Ala Pro Ser His Val Gln Pro Ser Asp Ser Glu Lys Asn Arg

40

340	345	350	355	
acc atg ctc ttc cag gtt ggg cga ttt gag att aac ctt atc agt cca				1460
Thr Met Leu Phe Gln Val Gly Arg Phe Glu Ile Asn Leu Ile Ser Pro				
	360	365	370	
gac act aaa tca gtt gtg cta gaa aag aat ttt aaa gat atc tcc tct				1508
Asp Thr Lys Ser Val Val Leu Glu Lys Asn Phe Lys Asp Ile Ser Ser				10
	375	380	385	
tgt tct cag ggt ata aag cat gtg gat cac ttt ggc ttt atc tgc cgg				1556
Cys Ser Gln Gly Ile Lys His Val Asp His Phe Gly Phe Ile Cys Arg				
	390	395	400	20
gag tct cca gag cct gga ctt agc cag tat att tgt tat gta ttc cag				1604
Glu Ser Pro Glu Pro Gly Leu Ser Gln Tyr Ile Cys Tyr Val Phe Gln				
	405	410	415	
tgt gcc agc gaa tct ctg gtt gat gag gta atg ctg act ctg aaa cag				1652
Cys Ala Ser Glu Ser Leu Val Asp Glu Val Met Leu Thr Leu Lys Gln				30
420	425	430	435	
gcc ttc agt acg gcg gct gcc ctg cag agt gcc aag acg cag att aaa				1700
Ala Phe Ser Thr Ala Ala Ala Leu Gln Ser Ala Lys Thr Gln Ile Lys				
	440	445	450	40

ctg tgt gag gcc tgc ccg atg cac tct ttg cat aag ctc tgt gaa agg 1748

Leu Cys Glu Ala Cys Pro Met His Ser Leu His Lys Leu Cys Glu Arg

455

460

465

att gaa ggt ctc tac cca cca aga gcc aag ctg gtg ata cag agg cat 1796

Ile Glu Gly Leu Tyr Pro Pro Arg Ala Lys Leu Val Ile Gln Arg His

470

475

480

10

ctc tca tca ctg aca gat aat gag caa gct gac atc ttt gaa aga gtt 1844

Leu Ser Ser Leu Thr Asp Asn Glu Gln Ala Asp Ile Phe Glu Arg Val

485

490

495

cag aaa atg aag cca gtc agt gac cag gaa gaa aat gaa ctt gtg att 1892

Gln Lys Met Lys Pro Val Ser Asp Gln Glu Glu Asn Glu Leu Val Ile

500

505

510

515

20

tta cac ctg agg cag ctg tgt gaa gcc aag cag aag aca cac gtg cac 1940

Leu His Leu Arg Gln Leu Cys Glu Ala Lys Gln Lys Thr His Val His

520

525

530

30

atc ggg gaa ggc cct tct act att tca aat agt aca atc cca gaa aat 1988

Ile Gly Glu Gly Pro Ser Thr Ile Ser Asn Ser Thr Ile Pro Glu Asn

535

540

545

gca aca agc agt gga agg ttc aaa ctt gac att ctg aaa aat aaa gct 2036

Ala Thr Ser Ser Gly Arg Phe Lys Leu Asp Ile Leu Lys Asn Lys Ala

40

550	555	560		
aag aga tcc tta act agc tcc ctg gaa aat atc ttc tca agg gga gct	2084			
Lys Arg Ser Leu Thr Ser Ser Leu Glu Asn Ile Phe Ser Arg Gly Ala				
565	570	575		
aac aga atg aga ggt cgg ctt gga agt gtg gac agt ttt gaa cgg tcc	2132			10
Asn Arg Met Arg Gly Arg Leu Gly Ser Val Asp Ser Phe Glu Arg Ser				
580	585	590	595	
aac agt ctt gct tca gag aag gac tac tca cca ggg gat tct cca cca	2180			
Asn Ser Leu Ala Ser Glu Lys Asp Tyr Ser Pro Gly Asp Ser Pro Pro				
600	605	610		20
ggg aca ccg cca gcg tcc cca ccg tcc tca gct tgg caa acg ttt ccc	2228			
Gly Thr Pro Pro Ala Ser Pro Pro Ser Ser Ala Trp Gln Thr Phe Pro				
615	620	625		
gaa gag gat tcc gac tcc ccg cag ttt cga aga cgg gca cac acg ttc	2276			30
Glu Glu Asp Ser Asp Ser Pro Gln Phe Arg Arg Arg Ala His Thr Phe				
630	635	640		
agc cac cca cct tca agc aca aag aga aag ctg aat ttg cag gat ggg	2324			
Ser His Pro Pro Ser Ser Thr Lys Arg Lys Leu Asn Leu Gln Asp Gly				
645	650	655		40

agg gct cag ggt gtg cgt tcc cct ctg ctg agg cag agc tcc agt gaa 2372
 Arg Ala Gln Gly Val Arg Ser Pro Leu Leu Arg Gln Ser Ser Ser Glu
 660 665 670 675

cag tgc agc aat ctt tcg tca gtt cga cgc atg tac aag gag agt aat 2420
 Gln Cys Ser Asn Leu Ser Ser Val Arg Arg Met Tyr Lys Glu Ser Asn
 680 685 690

tct tcc tcc agt ctt cca agt ctt cac act tcc ttc tct gcc cct tcc 2468
 Ser Ser Ser Ser Leu Pro Ser Leu His Thr Ser Phe Ser Ala Pro Ser
 695 700 705

ttc act gcc ccc tct ttc ctg aaa agc ttt tac cag aat tca ggt aga 2516
 Phe Thr Ala Pro Ser Phe Leu Lys Ser Phe Tyr Gln Asn Ser Gly Arg
 710 715 720

ctg tcc cca cag tat gaa aat gaa atc aga caa gac act gct tca gaa 2564
 Leu Ser Pro Gln Tyr Glu Asn Glu Ile Arg Gln Asp Thr Ala Ser Glu
 725 730 735

tca agt gat gga gaa ggg aga aaa agg acc tca tct acc tgc agc aat 2612
 Ser Ser Asp Gly Glu Gly Arg Lys Arg Thr Ser Ser Thr Cys Ser Asn
 740 745 750 755

gag tcc cta agt gtg gga gga acc tct gtc act cct cgc cgg atc tcc 2660
 Glu Ser Leu Ser Val Gly Gly Thr Ser Val Thr Pro Arg Arg Ile Ser

10

20

30

40

760	765	770	
tgg cgg cag cgc att ttc ctc agg gtt gct tct ccc atg aac aaa tct			2708
Trp Arg Gln Arg Ile Phe Leu Arg Val Ala Ser Pro Met Asn Lys Ser			
775	780	785	
ccc tca gca atg caa cag caa gat gga ttg gac agg aac gag ctg ctg			2756
Pro Ser Ala Met Gln Gln Gln Asp Gly Leu Asp Arg Asn Glu Leu Leu			
790	795	800	10
cca ctg tcc ccc ctc tct cca acc atg gag gag gaa ccg ctg gtt ata			2804
Pro Leu Ser Pro Leu Ser Pro Thr Met Glu Glu Glu Pro Leu Val Ile			
805	810	815	20
ttc ctg tct ggg gag gat gac cca gaa aag att gaa gaa aga aag aaa			2852
Phe Leu Ser Gly Glu Asp Asp Pro Glu Lys Ile Glu Glu Arg Lys Lys			
820	825	830	835
tca aaa gaa ctg agg agc ttg tgg aga aaa gct ata cac caa caa atc			2900
Ser Lys Glu Leu Arg Ser Leu Trp Arg Lys Ala Ile His Gln Gln Ile			
840	845	850	30
ttg tta ctt cga atg gaa aaa gaa aac cag aaa ctt gaa gga gca agc			2948
Leu Leu Leu Arg Met Glu Lys Glu Asn Gln Lys Leu Glu Gly Ala Ser			
855	860	865	40

aga gat gaa ctc cag tcc aga aaa gtt aaa tta gac tat gaa gaa gtt 2996
 Arg Asp Glu Leu Gln Ser Arg Lys Val Lys Leu Asp Tyr Glu Glu Val
 870 875 880

ggt gca tgt cag aaa gag gtc tta ata act tgg gat aag aag ttg tta 3044
 Gly Ala Cys Gln Lys Glu Val Leu Ile Thr Trp Asp Lys Lys Leu Leu
 885 890 895

aac tgc aga gct aaa atc aga tgt gat atg gaa gat att cat act ctt 3092
 Asn Cys Arg Ala Lys Ile Arg Cys Asp Met Glu Asp Ile His Thr Leu
 900 905 910 915

ctt aaa gaa gga gtt ccc aaa agt cga cga gga gaa att tgg cag ttt 3140
 Leu Lys Glu Gly Val Pro Lys Ser Arg Arg Gly Glu Ile Trp Gln Phe
 920 925 930

ctg gct tta cag tac cga ctc aga cac aga ttg cct aat aaa caa cag 3188
 Leu Ala Leu Gln Tyr Arg Leu Arg His Arg Leu Pro Asn Lys Gln Gln
 935 940 945

cct cct gac ata tcc tat aag gaa ctt ttg aag cag ctc act gct cag 3236
 Pro Pro Asp Ile Ser Tyr Lys Glu Leu Leu Lys Gln Leu Thr Ala Gln
 950 955 960

cag cat gcg att ctc gtg gat tta gga agg acg ttt cct act cac cct 3284
 Gln His Ala Ile Leu Val Asp Leu Gly Arg Thr Phe Pro Thr His Pro

10

20

30

40

965	970	975	
tac ttt tca gta cag ctt ggg cca gga cag ctg tca ctg ttt aac ctc 3332			
Tyr Phe Ser Val Gln Leu Gly Pro Gly Gln Leu Ser Leu Phe Asn Leu			
980	985	990	995
ctg aaa gcc tat tct ttg ctg gac aaa gaa gtg gga tac tgt cag ggg 3380			
Leu Lys Ala Tyr Ser Leu Leu Asp Lys Glu Val Gly Tyr Cys Gln Gly			
	1000	1005	1010
atc agc ttt gtg gct gga gtc ctg ctt ctg cac atg agt gaa gag caa 3428			
Ile Ser Phe Val Ala Gly Val Leu Leu Leu His Met Ser Glu Glu Gln			
	1015	1020	1025
gcc ttt gaa atg ctg aaa ttc ctc atg tat gac ctc ggc ttc cgc aag 3476			
Ala Phe Glu Met Leu Lys Phe Leu Met Tyr Asp Leu Gly Phe Arg Lys			
	1030	1035	1040
cag tac aga cct gac atg atg tcg ctg cag att caa atg tac cag ctg 3524			
Gln Tyr Arg Pro Asp Met Met Ser Leu Gln Ile Gln Met Tyr Gln Leu			
	1045	1050	1055
tcc agg ctc ctt cat gac tat cac aga gat ctc tac aat cac ctt gaa 3572			
Ser Arg Leu Leu His Asp Tyr His Arg Asp Leu Tyr Asn His Leu Glu			
1060	1065	1070	1075

10

20

30

40

gaa aat gaa atc agc ccc agt ctt tat gct gcc ccc tgg ttc ctc aca 3620
Glu Asn Glu Ile Ser Pro Ser Leu Tyr Ala Ala Pro Trp Phe Leu Thr
1080 1085 1090

ttg ttt gcc tct cag ttt tca tta gga ttt gta gcc aga gtt ttt gat 3668
Leu Phe Ala Ser Gln Phe Ser Leu Gly Phe Val Ala Arg Val Phe Asp
1095 1100 1105 10

att att ttt ctt cag gga act gaa gtt ata ttc aag gtt gca ctc agc 3716
Ile Ile Phe Leu Gln Gly Thr Glu Val Ile Phe Lys Val Ala Leu Ser
1110 1115 1120

cta ctg agc agc caa gag aca ctt ata atg gaa tgt gag agc ttt gaa 3764 20
Leu Leu Ser Ser Gln Glu Thr Leu Ile Met Glu Cys Glu Ser Phe Glu
1125 1130 1135

aat att gtt gag ttt ctt aaa aac acg cta cct gat atg aat acc tct 3812
Asn Ile Val Glu Phe Leu Lys Asn Thr Leu Pro Asp Met Asn Thr Ser
1140 1145 1150 1155 30

gaa atg gaa aaa att att acc cag gtt ttt gag atg gat att tct aag 3860
Glu Met Glu Lys Ile Ile Thr Gln Val Phe Glu Met Asp Ile Ser Lys
1160 1165 1170

cag ttg cat gcc tat gag gtg gaa tat cat gtg cta cag gat gag ctt 3908 40
Gln Leu His Ala Tyr Glu Val Glu Tyr His Val Leu Gln Asp Glu Leu

1175	1180	1185		
cag gaa tct tca tat tcc tgt gag gat agt gaa act ttg gag aag ctg			3956	
Gln Glu Ser Ser Tyr Ser Cys Glu Asp Ser Glu Thr Leu Glu Lys Leu				
1190	1195	1200		
gag agg gcc aat agc caa ctg aaa aga caa aac atg gac ctc cta gaa			4004	10
Glu Arg Ala Asn Ser Gln Leu Lys Arg Gln Asn Met Asp Leu Leu Glu				
1205	1210	1215		
aaa tta cag gta gct cat act aaa atc cag gcc ttg gaa tca aac ctg			4052	
Lys Leu Gln Val Ala His Thr Lys Ile Gln Ala Leu Glu Ser Asn Leu				
1220	1225	1230	1235	20
gaa aat ctt ttg acg aga gag acc aaa atg aag tct tta atc cgg acc			4100	
Glu Asn Leu Leu Thr Arg Glu Thr Lys Met Lys Ser Leu Ile Arg Thr				
1240	1245	1250		
ctg gaa caa gaa aaa atg gct tat caa aag aca gtg gag caa ctc cgg			4148	30
Leu Glu Gln Glu Lys Met Ala Tyr Gln Lys Thr Val Glu Gln Leu Arg				
1255	1260	1265		
aag ctg ctg ccc gcg gat gct cta gcc aat tgt gac ctg ttg ctg aga			4196	
Lys Leu Leu Pro Ala Asp Ala Leu Ala Asn Cys Asp Leu Leu Leu Arg				
1270	1275	1280		40

gac cta aac tgc aac cct aac aac aaa gcc aag ata gga aat aag cca 4244

Asp Leu Asn Cys Asn Pro Asn Asn Lys Ala Lys Ile Gly Asn Lys Pro

1285

1290

1295

taattgaaga ggcacggcct cagcagaaag tgctccttag aatactacag agaggaagag 4304

cctgcatgtc gctggcccaa ggcctggaccc tgaagctgat ggaaccacct aatactgggtg 4364

10

ctgagctcct agtcacagca ggtggacctc gtgctcatca gagcatgcca atcctaagcc 4424

attggacata thtagactgg tttttgttgt tgctatgtac atataaatat atatataaaa 4484

tgaacatagt tcatgctttc agataaaatg agtagatgta tatttagatt aattttttta 4544

20

gtcagaactt catgaaatcc acaccaaagg aaaggtaaac tgaaatttcc cttggacata 4604

tgtgaaatct ttttgtcttt atagtgaac aaagccagag catctttgta tattgcaata 4664

tacttgaaaa aaatgaatgt atttttttct ccaaagaaca gcatgtttca ctcaatgggtg 4724

30

aaaaggtgga aacatttatg taactttatg tgtatctgtc ttgatatcta ctgacattgt 4784

ctatatgagg aaaatgatta ctggctcatgc tcctgtgagt tttttgggaa ggtagggtca 4844

tttctccctg cctgctttgt gccaaactagc atgttgcatc tacatgcatt atgagtctgg 4904

40

ttaggcatta ctttaaacad acataaagag acagtaggac attgtggctg agtctacceca 4964

gctcaaggta aaggagaatg ttgctaattt tttagcaaac tagaccagca ttattactca 5024

aactaaaaat atcacacctg aaaaatttaa tttaggacct aaaatgtcta gattagcttt 5084

ctgctttttt tatttgaata actcattcag ttgtgaatga attcctcttt atttggtgcc 5144

10

acagtcacca aatgacaagg atttgccact tcccaccaa attgtgagtg cttgtaattt 5204

aggctctctt accttaaatt cagtataagg aaacgtaatt atgattgatt ttttccaaag 5264

atgacaagct gtgttgaaat acattttttc ttttgaccaa ttgacagaat ctaataagct 5324

20

ttaataatct tcccctttta tgtgaaaagt ttgagaact gtgaaatgtt taggaacaaa 5384

ctgttgaaat ccattggaag ggaaaaaaga aagtgttacc agtgttacca gctcaactaa 5444

aacctgcaat tctgcatttc aactcttcac ttcctcagcc tacaaatagc tcattagatg 5504

30

acattcacgc atgctgggta taggcaagga aagtaatttt caaagtacat ttgcagttct 5564

ctttttcaga gatgattcta tgatagtgcc tctgaaagtt gatgcagcat ttttgccttt 5624

ccaaaaagta tttatcctca ctgctttttg cagtacttgt attttcacag atggattatc 5684

40

tggggtaatt ttcttcaaag ggagtttggt atacacagtg aaaatgtatt atagagtaga 5744

atagtaaagc tctagggggt tcagaaagct ttgatgaaca gatgacaaac atctgaaacc 5804

ccctcgcac tgttaccag tgtgtatata atgacttggt atagctcagt gtgcccttga 5864

atccatacag tttcttaaaa gacaataaaa tcttattaat aaagttaatg taacttct 5922

10

<210> 2

<211> 1299

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20

<400> 2

Met Glu Pro Pro Ser Cys Ile Gln Asp Glu Pro Phe Pro His Pro Leu

1

5

10

15

Glu Pro Glu Pro Gly Val Ser Ala Gln Pro Gly Pro Gly Lys Pro Ser

30

20

25

30

Asp Lys Arg Phe Arg Leu Trp Tyr Val Gly Gly Ser Cys Leu Asp His

35

40

45

Arg Thr Thr Leu Pro Met Leu Pro Trp Leu Met Ala Glu Ile Arg Arg

40

50

55

60

Arg Ser Gln Lys Pro Glu Ala Gly Gly Cys Gly Ala Pro Ala Ala Arg

65

70

75

80

Glu Val Ile Leu Val Leu Ser Ala Pro Phe Leu Arg Cys Val Pro Ala

85

90

95

Pro Gly Ala Gly Ala Ser Gly Gly Thr Ser Pro Ser Ala Thr Gln Pro

10

100

105

110

Asn Pro Ala Val Phe Ile Phe Glu His Lys Ala Gln His Ile Ser Arg

115

120

125

Phe Ile His Asn Ser His Asp Leu Thr Tyr Phe Ala Tyr Leu Ile Lys

20

130

135

140

Ala Gln Pro Asp Asp Pro Glu Ser Gln Met Ala Cys His Val Phe Arg

145

150

155

160

Ala Thr Asp Pro Ser Gln Val Pro Asp Val Ile Ser Ser Ile Arg Gln

30

165

170

175

Leu Ser Lys Ala Ala Met Lys Glu Asp Ala Lys Pro Ser Lys Asp Asn

180

185

190

Glu Asp Ala Phe Tyr Asn Ser Gln Lys Phe Glu Val Leu Tyr Cys Gly

40

195	200	205	
Lys Val Thr Val Thr His Lys Lys Ala Pro Ser Ser Leu Ile Asp Asp			
210	215	220	
Cys Met Glu Lys Phe Ser Leu His Glu Gln Gln Arg Leu Lys Ile Gln			10
225	230	235	240
Gly Glu Gln Arg Gly Pro Asp Pro Gly Glu Asp Leu Ala Asp Leu Glu			
	245	250	255
Val Val Val Pro Gly Ser Pro Gly Asp Cys Leu Pro Glu Glu Ala Asp			20
	260	265	270
Gly Thr Asp Thr His Leu Gly Leu Pro Ala Gly Ala Ser Gln Pro Ala			
275	280	285	
Leu Thr Ser Ser Arg Val Cys Phe Pro Glu Arg Ile Leu Glu Asp Ser			30
290	295	300	
Gly Phe Asp Glu Gln Gln Glu Phe Arg Ser Arg Cys Ser Ser Val Thr			
305	310	315	320
Gly Val Gln Arg Arg Val His Glu Gly Ser Gln Lys Ser Gln Pro Arg			40
	325	330	335

Arg Arg His Ala Ser Ala Pro Ser His Val Gln Pro Ser Asp Ser Glu

340

345

350

Lys Asn Arg Thr Met Leu Phe Gln Val Gly Arg Phe Glu Ile Asn Leu

355

360

365

Ile Ser Pro Asp Thr Lys Ser Val Val Leu Glu Lys Asn Phe Lys Asp

10

370

375

380

Ile Ser Ser Cys Ser Gln Gly Ile Lys His Val Asp His Phe Gly Phe

385

390

395

400

Ile Cys Arg Glu Ser Pro Glu Pro Gly Leu Ser Gln Tyr Ile Cys Tyr

20

405

410

415

Val Phe Gln Cys Ala Ser Glu Ser Leu Val Asp Glu Val Met Leu Thr

420

425

430

Leu Lys Gln Ala Phe Ser Thr Ala Ala Ala Leu Gln Ser Ala Lys Thr

30

435

440

445

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

450

455

460

Cys Glu Arg Ile Glu Gly Leu Tyr Pro Pro Arg Ala Lys Leu Val Ile

40

465

470

475

480

Gln Arg His Leu Ser Ser Leu Thr Asp Asn Glu Gln Ala Asp Ile Phe

485

490

495

Glu Arg Val Gln Lys Met Lys Pro Val Ser Asp Gln Glu Glu Asn Glu

500

505

510

Leu Val Ile Leu His Leu Arg Gln Leu Cys Glu Ala Lys Gln Lys Thr

10

515

520

525

His Val His Ile Gly Glu Gly Pro Ser Thr Ile Ser Asn Ser Thr Ile

530

535

540

Pro Glu Asn Ala Thr Ser Ser Gly Arg Phe Lys Leu Asp Ile Leu Lys

20

545

550

555

560

Asn Lys Ala Lys Arg Ser Leu Thr Ser Ser Leu Glu Asn Ile Phe Ser

565

570

575

Arg Gly Ala Asn Arg Met Arg Gly Arg Leu Gly Ser Val Asp Ser Phe

30

580

585

590

Glu Arg Ser Asn Ser Leu Ala Ser Glu Lys Asp Tyr Ser Pro Gly Asp

595

600

605

Ser Pro Pro Gly Thr Pro Pro Ala Ser Pro Pro Ser Ser Ala Trp Gln

40

610	615	620	
Thr Phe Pro Glu Glu Asp Ser Asp Ser Pro Gln Phe Arg Arg Arg Ala			
625	630	635	640
His Thr Phe Ser His Pro Pro Ser Ser Thr Lys Arg Lys Leu Asn Leu			10
	645	650	655
Gln Asp Gly Arg Ala Gln Gly Val Arg Ser Pro Leu Leu Arg Gln Ser			
	660	665	670
Ser Ser Glu Gln Cys Ser Asn Leu Ser Ser Val Arg Arg Met Tyr Lys			20
	675	680	685
Glu Ser Asn Ser Ser Ser Ser Leu Pro Ser Leu His Thr Ser Phe Ser			
	690	695	700
Ala Pro Ser Phe Thr Ala Pro Ser Phe Leu Lys Ser Phe Tyr Gln Asn			30
	705	710	715
			720
Ser Gly Arg Leu Ser Pro Gln Tyr Glu Asn Glu Ile Arg Gln Asp Thr			
	725	730	735
Ala Ser Glu Ser Ser Asp Gly Glu Gly Arg Lys Arg Thr Ser Ser Thr			40
	740	745	750

Cys Ser Asn Glu Ser Leu Ser Val Gly Gly Thr Ser Val Thr Pro Arg

755

760

765

Arg Ile Ser Trp Arg Gln Arg Ile Phe Leu Arg Val Ala Ser Pro Met

770

775

780

Asn Lys Ser Pro Ser Ala Met Gln Gln Gln Asp Gly Leu Asp Arg Asn

10

785

790

795

800

Glu Leu Leu Pro Leu Ser Pro Leu Ser Pro Thr Met Glu Glu Glu Pro

805

810

815

Leu Val Ile Phe Leu Ser Gly Glu Asp Asp Pro Glu Lys Ile Glu Glu

20

820

825

830

Arg Lys Lys Ser Lys Glu Leu Arg Ser Leu Trp Arg Lys Ala Ile His

835

840

845

Gln Gln Ile Leu Leu Leu Arg Met Glu Lys Glu Asn Gln Lys Leu Glu

30

850

855

860

Gly Ala Ser Arg Asp Glu Leu Gln Ser Arg Lys Val Lys Leu Asp Tyr

865

870

875

880

Glu Glu Val Gly Ala Cys Gln Lys Glu Val Leu Ile Thr Trp Asp Lys

40

885

890

895

Lys Leu Leu Asn Cys Arg Ala Lys Ile Arg Cys Asp Met Glu Asp Ile

900

905

910

His Thr Leu Leu Lys Glu Gly Val Pro Lys Ser Arg Arg Gly Glu Ile

915

920

925

Trp Gln Phe Leu Ala Leu Gln Tyr Arg Leu Arg His Arg Leu Pro Asn

10

930

935

940

Lys Gln Gln Pro Pro Asp Ile Ser Tyr Lys Glu Leu Leu Lys Gln Leu

945

950

955

960

Thr Ala Gln Gln His Ala Ile Leu Val Asp Leu Gly Arg Thr Phe Pro

20

965

970

975

Thr His Pro Tyr Phe Ser Val Gln Leu Gly Pro Gly Gln Leu Ser Leu

980

985

990

Phe Asn Leu Leu Lys Ala Tyr Ser Leu Leu Asp Lys Glu Val Gly Tyr

30

995

1000

1005

Cys Gln Gly Ile Ser Phe Val Ala Gly Val Leu Leu Leu His Met Ser

1010

1015

1020

Glu Glu Gln Ala Phe Glu Met Leu Lys Phe Leu Met Tyr Asp Leu Gly

40

1025	1030	1035	1040
Phe Arg Lys Gln Tyr Arg Pro Asp Met Met Ser Leu Gln Ile Gln Met			
1045	1050	1055	
Tyr Gln Leu Ser Arg Leu Leu His Asp Tyr His Arg Asp Leu Tyr Asn			
1060	1065	1070	10
His Leu Glu Glu Asn Glu Ile Ser Pro Ser Leu Tyr Ala Ala Pro Trp			
1075	1080	1085	
Phe Leu Thr Leu Phe Ala Ser Gln Phe Ser Leu Gly Phe Val Ala Arg			
1090	1095	1100	20
Val Phe Asp Ile Ile Phe Leu Gln Gly Thr Glu Val Ile Phe Lys Val			
1105	1110	1115	1120
Ala Leu Ser Leu Leu Ser Ser Gln Glu Thr Leu Ile Met Glu Cys Glu			
1125	1130	1135	30
Ser Phe Glu Asn Ile Val Glu Phe Leu Lys Asn Thr Leu Pro Asp Met			
1140	1145	1150	
Asn Thr Ser Glu Met Glu Lys Ile Ile Thr Gln Val Phe Glu Met Asp			
1155	1160	1165	40

Ile Ser Lys Gln Leu His Ala Tyr Glu Val Glu Tyr His Val Leu Gln

1170

1175

1180

Asp Glu Leu Gln Glu Ser Ser Tyr Ser Cys Glu Asp Ser Glu Thr Leu

1185

1190

1195

1200

Glu Lys Leu Glu Arg Ala Asn Ser Gln Leu Lys Arg Gln Asn Met Asp

10

1205

1210

1215

Leu Leu Glu Lys Leu Gln Val Ala His Thr Lys Ile Gln Ala Leu Glu

1220

1225

1230

Ser Asn Leu Glu Asn Leu Leu Thr Arg Glu Thr Lys Met Lys Ser Leu

20

1235

1240

1245

Ile Arg Thr Leu Glu Gln Glu Lys Met Ala Tyr Gln Lys Thr Val Glu

1250

1255

1260

Gln Leu Arg Lys Leu Leu Pro Ala Asp Ala Leu Ala Asn Cys Asp Leu

30

1265

1270

1275

1280

Leu Leu Arg Asp Leu Asn Cys Asn Pro Asn Asn Lys Ala Lys Ile Gly

1285

1290

1295

Asn Lys Pro

40

<210> 3

<211> 164

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 3

caaggtggat tgtgaattta tgctgtagcc aacttttagt tttgagaaac accataaaaa 60
caaattaagt tacctcattt actaggcgaa acaggcaagg ttaaggcata cacaaaaaga 120
agagttaatt cgtttgggtg gaaactcttt tgtttttcct ttca 164

10

<210> 4

<211> 486

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 4

aaagggtcc cttccgcttg tgtttcagga ctactcacca ggggattctc caccagggac 60
accgccagcg tccccaccgt cctcagcttg gcaaacgttt cccgaagagg attccgactc 120
cccgagttt cgaagacggg cacacacgtt cagccacca ccttcaagca caaagagaaa 180
gctgaatttg caggatggga gggctcaggg tgtgcgttcc cctctgctga ggcagagctc 240
cagtgaacag tgcaggtgag tetgacctc tccagaatga gacctagatt ctcaaggcac 300
acagttttga ttactctgga gtcaagggtg attgtgaatt tatgctgtag ccaactttta 360

20

30

gttttgagaa acaccataaa aacaaattaa gttacctcat ttactaggcg aaacaggcaa 420
ggttaaggca tacacaaaaa gaagagttaa ttcgtttggg tggaaactct ttgttttttc 480
ctttca 486

<210> 5

<211> 17

10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence

20

<400> 5

gttttttttt ttttttc

17

<210> 6

30

<211> 10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence

40

<400> 6

tctctggagt

10

<210> 7

<211> 21

<212> DNA

10

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence

20

<400> 7

aagacagtgg agcaactccg g

21

<210> 8

<211> 21

<212> DNA

30

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence

40

<400> 8

cagcaacagg tcacaattgg c

21

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

10

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence

20

<400> 9

agctgctgcc cgcggatgct

20

【図面の簡単な説明】

図1は、B1799のアトピー性皮膚炎患者試料における発現量を示す図である。

図2は、末梢血白血球細胞におけるB1799の発現量を示す図である。

図3は、末梢血由来T細胞亜集団でのB1799の発現量を示す図である。

図4は、T細胞活性化細胞死での死細胞率変化（a）およびT細胞活性化細胞死における
B1799の発現変化（b）を示す図である。 30

図5は、T細胞刺激によるB1799の発現変化を示す図である。

図6は、B1799の構造を示す図である。

図7は、B1799の蛋白質立体構造予測モデルを示す写真である。Gyp1pのArg
343とB1799のArg973を矢印で示した。

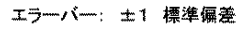
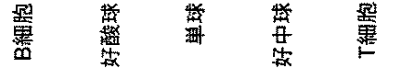


图 2



100

☒ 4

3



10

☒

【図 6】

図 6

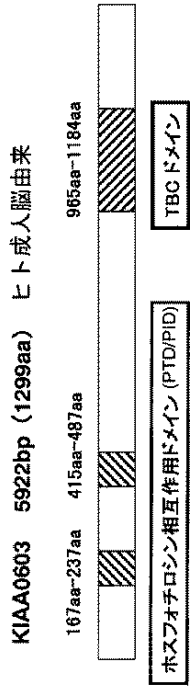
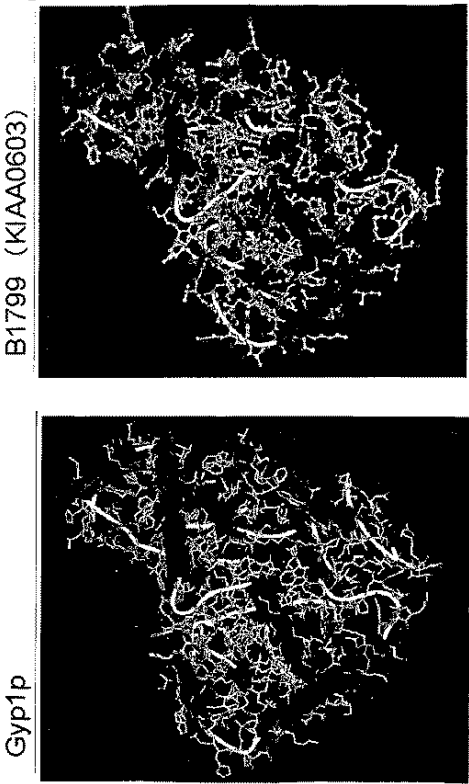


図 7

【図 7】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/02047

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int.Cl. ⁷ C12Q1/68, C12N15/00, G01N33/68, G01N33/53, A61K31/711, A61K39/395, A61P37/08 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) Int.Cl. ⁷ C12Q1/68, C12N15/00, G01N33/68, G01N33/53, A61K31/711, A61K39/395, A61P37/08 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) DDBJ/EMBL/GenBank/GeneSeq, WPI, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2002-095500 A (Genox Research, Inc.), 02 April, 2002 (02.04.02), (Family: none)	1-12, 14-18
A	WO 00/73440 A (Genox Research, Inc.), 07 December, 2000 (07.12.00), (Family: none)	1-12, 14-18
A	WO 00/66708 A (GENAERA CORP.), 09 November, 2000 (09.11.00), & EP 1181037 A & JP 2002-542814 A	1-12, 14-18
A	WO 99/37809 A (AXYS PHARM INC.), 29 July, 1999 (29.07.99), & EP 1049800 A & JP 2002-500895 A	1-21, 14-18
☒ 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 document but 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 "I" 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 03 April, 2003 (03.04.03)		Date of mailing of the international search report 15 April, 2003 (15.04.03)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/02047

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,A	WO 02/83946 A (Genox Research, Inc.), 24 October, 2002 (24.10.02), & JP 2002-306170 A	1-12, 14-18
P,A	WO 02/75304 A (Genox Research, Inc.), 26 September, 2002 (26.09.02), & JP 2002-277456 A	1-12, 14-18
P,A	WO 02/64832 A (Genox Research, Inc.), 22 August, 2002 (22.08.02), & JP 2002-238568 A	1-12, 14-18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/02047

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

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

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☒ Claims Nos.: 13
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:
It is completely unknown what specific compounds are involved in the scope of "a compound which can be obtained by a screening method" and what are not. Thus, this claim is described in an extremely unclear manner.
3. ☐ Claims 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 3 of first sheet)

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

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.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JPO3/02047	
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))			
Int. Cl ⁷ C12Q 1/68, C12N 15/00, G01N 33/68, G01N 33/53, A61K 31/711, A61K 39/395, A61P 37/08			
B. 調査を行った分野			
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))			
Int. Cl ⁷ C12Q 1/68, C12N 15/00, G01N 33/68, G01N 33/53, A61K 31/711, A61K 39/395, A61P 37/08			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの			
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) DDBJ/EMBL/GenBank/GeneSeq, WPI, BIOSIS			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号	
A	JP 2002-095500 A (株式会社ジェノックス創薬研究所) 2002.04.02 (ファミリーなし)	1-12, 14-18	
A	WO 00/73440 A (株式会社ジェノックス創薬研究所) 2000.12.07 (ファミリーなし)	1-12, 14-18	
A	WO 00/66708 A (GENAERA CORP) 2000.11.09 & EP 1181037 A & JP 2002-542814 A	1-12, 14-18	
☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。 ☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。			
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献			
国際調査を完了した日 03.04.03		国際調査報告の発送日 15.04.03	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 新見 浩一 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JPO3/02047
C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	WO 99/37809 A (AXYS PHARM INC) 1999.07.29 & EP 1049800 A & JP 2002-500895 A	1-12, 14-18
P、A	WO 02/83946 A (株式会社ジェノックス創薬研究所) 2002.10.24 & JP 2002-306170 A	1-12, 14-18
P、A	WO 02/75304 A (株式会社ジェノックス創薬研究所) 2002.09.26 & JP 2002-277456 A	1-12, 14-18
P、A	WO 02/64832 A (株式会社ジェノックス創薬研究所) 2002.08.22 & JP 2002-238568 A	1-12, 14-18

国際調査報告	国際出願番号 PCT/JPO3/02047
第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き) 法第8条第3項 (PCT17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。	
1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、 2. ☒ 請求の範囲 <u>13</u> は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、 「スクリーニング方法によって得ることができる化合物」に具体的にどのような化合物が包含されどのような化合物が包含されないのか全く不明であり、同項の記載は著しく不明確である。 3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。	
第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き) 次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。 1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。 2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。 3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。 4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意 ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。 ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。	

フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁷

F I

A 6 1 P 37/08
 C 1 2 Q 1/02
 G 0 1 N 33/15
 G 0 1 N 33/50
 G 0 1 N 33/53
 // C 1 2 N 15/09

A 6 1 K 48/00
 A 6 1 P 37/08
 C 1 2 Q 1/02
 G 0 1 N 33/15 Z
 G 0 1 N 33/50 Z
 G 0 1 N 33/53 M
 C 1 2 N 15/00 A

(72)発明者 今井 雪穂

東京都世田谷区玉川台2-2-8 株式会社メディネット 分子遺伝学研究所内

(72)発明者 吉田 寧

中国北京市朝阳区双橋双惠小区10号楼6单元201

(72)発明者 押田 忠弘

埼玉県戸田市市川岸2-2-50 田辺製薬株式会社 薬理研究所内

(72)発明者 杉田 雄二

茨城県つくば市御幸が丘21 山之内製薬株式会社 筑波研究センター内

(72)発明者 斎藤 博久

東京都世田谷区太子堂3-35-31 国立成育医療センター研究所 免疫アレルギー研究部内

(注) この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。

专利名称(译)	测试过敏性疾病的方法		
公开(公告)号	JPWO2003083139A1	公开(公告)日	2005-08-04
申请号	JP2003580572	申请日	2003-02-25
[标]申请(专利权)人(译)	杰弗里·诺克斯药物发现研究所 国家中心儿童健康和发展的 一般		
申请(专利权)人(译)	杰弗里·诺克斯药物发现研究所有限公司 国家中心儿童健康和发展的 一般		
[标]发明人	松本佳子 今井雪穗 吉田 寧 押田忠弘 杉田雄二 斎藤博久		
发明人	松本 佳子 今井 雪穗 吉田 寧 押田 忠弘 杉田 雄二 斎藤 博久		
IPC分类号	C12Q1/68 A61K31/711 A61K39/395 A61K45/00 A61K48/00 A61P37/08 C07K14/47 C12Q1/02 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/68 C12N15/09		
CPC分类号	G01N33/6893 A01K2217/05 A61K31/711 C07K14/4706 C07K14/4713 C12Q1/6883 C12Q2600/158 G01N33/505 G01N2800/24		
FI分类号	C12Q1/68.ZNA.A A61K31/711 A61K39/395.D A61K39/395.N A61K45/00 A61K48/00 A61P37/08 C12Q1/02 G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.M C12N15/00.A		
代理人(译)	清水初衷		
优先权	2002100908 2002-04-03 JP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

B1799基因，其表达水平在患者组中显著增加，通过筛选显示使用差异显示方法从多个健康受试者和过敏性疾病患者收集的血液中的表达差异的基因成功鉴定。基因表达水平在T细胞中特异性高并且由于T细胞活化而增加。该基因可用于检测过敏性疾病，也可用于筛选过敏性疾病的治疗剂。

	病状	B1799(copy/ngRNA)	病状	B1799(copy/ngRNA)
1	健全	5196.77	21 中等症	3865.66
2	健全	2813.08	22 中等症	3931.79
3	健全	4443.58	23 中等症	6614.39
4	健全	4115.51	24 中等症	6352.02
5	健全	3890.60	25 中等症	15627.77
6	健全	1897.45	26 中等症	4516.00
7	健全	2163.33	27 中等症	8289.22
8	健全	154.31	28 中等症	17001.41
9	健全	3542.13	29 中等症	5502.07
10	健全	1647.13	30 中等症	21914.55
11	軽症	1176.89	31 重症	2645.44
12	軽症	10222.95	32 重症	3492.70
13	軽症	15579.36	33 重症	5810.25
14	軽症	18515.82	34 重症	13260.42
15	軽症	3200.39	35 重症	736.77
16	軽症	1862.32	36 重症	6562.17
17	軽症	5031.60	37 重症	11227.19
18	軽症	5999.48	38 重症	5974.82
19	軽症	5382.48	39 重症	3249.61
20	軽症	1019.33	40 重症	609.08