

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2007-14344

(P2007-14344A)

(43) 公開日 平成19年1月25日(2007.1.25)

| (51) Int. Cl.                       | F I             | テーマコード (参考) |
|-------------------------------------|-----------------|-------------|
| <b>C12N 15/09 (2006.01)</b>         | C12N 15/00 ZNAA | 2G045       |
| <b>CO7K 14/47 (2006.01)</b>         | CO7K 14/47      | 4B024       |
| <b>CO7K 16/18 (2006.01)</b>         | CO7K 16/18      | 4B064       |
| <b>C12P 21/00 (2006.01)</b>         | C12P 21/00 B    | 4C084       |
| <b>A61K 48/00 (2006.01)</b>         | A61K 48/00      | 4C086       |
| 審査請求 有 請求項の数 24 O L (全 44 頁) 最終頁に続く |                 |             |

|              |                              |          |   |
|--------------|------------------------------|----------|---|
| (21) 出願番号    | 特願2006-211171 (P2006-211171) | (71) 出願人 | 591011502   |
| (22) 出願日     | 平成18年8月2日(2006.8.2)          |          | ワイス   |
| (62) 分割の表示   | 特願平7-47408の分割                |          | W y e t h   |
| 原出願日         | 平成7年3月7日(1995.3.7)           |          | アメリカ合衆国07940-0874 ニュージャージー州マディソン、ファイブ・ジラルダ・ファームズ              |
| (31) 優先権主張番号 | 207975                       | (71) 出願人 | 306018457   |
| (32) 優先日     | 平成6年3月8日(1994.3.8)           |          | ザ・トラスティーズ・オブ・コロンビア・ユニバーシティ・イン・ザ・シティ・オブ・ニューヨーク                 |
| (33) 優先権主張国  | 米国 (US)                      |          | アメリカ合衆国・ニューヨーク・10027・ニュー・ヨーク・ウエスト・ワンハンドレッドシックスティーンズ・ストリート・535 |
| (31) 優先権主張番号 | 312023                       |          |   |
| (32) 優先日     | 平成6年9月26日(1994.9.26)         |          |   |
| (33) 優先権主張国  | 米国 (US)                      |          |   |
| (31) 優先権主張番号 | 384524                       |          |   |
| (32) 優先日     | 平成7年2月13日(1995.2.13)         |          |   |
| (33) 優先権主張国  | 米国 (US)                      |          |   |
| 最終頁に続く       |                              |          |   |

(54) 【発明の名称】 ラパマイシンのエフェクタータンパク

## (57) 【要約】

【目的】免疫調節剤、抗再狭窄剤または抗腫瘍剤の同定、設計および合成のための新規な哺乳動物起源のラパマイシン-F K B P 1 2 結合タンパクを提供すること。

【構成】免疫調節剤、抗再狭窄剤または抗腫瘍剤の同定、設計および合成のための新規な哺乳動物起源のラパマイシン-F K B P 1 2 結合タンパクおよびそれらの断片、ならびに、これらタンパクに対応するDNA、cDNA、アンチセンスRNAおよびDNAセグメント。さらに、これらタンパクを単離する方法、ならびに、これらタンパクに関連する治療上の使用。

【効果】免疫調節剤、抗再狭窄剤または抗腫瘍剤の同定、設計および合成のための新規な哺乳動物起源のラパマイシン-F K B P 1 2 結合タンパクなどが提供される。

【選択図】なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

S D S - P A G E で測定した場合に分子量が約 2 1 0 k D a である単離されたタンパクまたはかかるタンパクの断片であって、ヒトから得ることができ、F K B P 1 2 - ラパマイシン複合体に結合するタンパクまたは断片。

## 【請求項 2】

F K B P 1 2 - ラパマイシン複合体との結合特性を示し、ヒト起源のタンパクのアミノ酸配列の少なくとも一部を含む、S D S - P A G E で測定した場合に分子量が約 2 1 0 k D a である、単離されたタンパクであって、ヒトから得ることができ、F K B P 1 2 - ラパマイシン複合体に結合するタンパクまたは断片。

10

## 【請求項 3】

請求項 1 に記載の単離されたタンパクまたはその断片、あるいは請求項 2 に記載の F K B P 1 2 - ラパマイシン複合体との結合特性を示す単離されたタンパクをコードする D N A。

## 【請求項 4】

D N A が c D N A である、請求項 3 記載の D N A。

## 【請求項 5】

請求項 4 にて定義される c D N A クローンより誘導されたアンチセンス R N A。

## 【請求項 6】

請求項 4 にて定義される c D N A クローンより誘導されたアンチセンス D N A。

20

## 【請求項 7】

請求項 4 に係る c D N A より誘導されたアンチセンス R N A。

## 【請求項 8】

請求項 4 に係る c D N A より誘導されたアンチセンス D N A。

## 【請求項 9】

請求項 1 または 2 のタンパクに特異的なモノクローナルまたはポリクローナル抗体。

## 【請求項 10】

新規な免疫調節および/または抗腫瘍活性試薬についてスクリーニングするための請求項 9 に記載のモノクローナルまたはポリクローナル抗体の使用。

## 【請求項 11】

免疫抑制薬を服用している個体から得られる生物学的試料中の親化合物および/または代謝産物を測定するための請求項 9 に記載のモノクローナルまたはポリクローナル抗体の使用。

30

## 【請求項 12】

S D S - P A G E で測定した場合に分子量が約 2 1 0 k D a であり、哺乳動物細胞由来の F K B P 1 2 - ラパマイシン複合体に結合する、タンパクを単離する方法であって、

a) 緩衝剤、キレート剤、プロテアーゼ阻害剤、および還元剤、好ましくは低濃度の塩の存在下、タンパク分解を最小限に抑える温度で、哺乳動物細胞を溶解し、未破壊細胞、細胞核、および、細胞膜画分と細胞破砕物を含む溶解物を生成させ、

b) タンパク分解を最小限に抑える温度で、該溶解物から未破壊細胞および細胞核を前除去し、前清澄化溶解物を調製し、

40

c) 該前清澄化溶解物に由来する、膜タンパクを含有する哺乳動物細胞の細胞膜画分を濃縮し、

d) タンパク分解を最小限に抑える温度で、タンパクの有害な変性を引き起こすことなく、タンパクを可溶化する界面活性剤を含有する緩衝液中に該膜タンパクを可溶化し、可溶化タンパクおよび哺乳動物細胞破砕物を得て、

e) 哺乳動物細胞破砕物から可溶化タンパクを分離し、

f) 緩衝剤、還元剤、1 種またはそれ以上のプロテアーゼ阻害剤、二価カチオン、好ましくは塩を含有する緩衝液中に可溶化タンパクを含有する溶液を、アフィニティマトリックスと共にインキュベートすることにより、該アフィニティマトリックスへの結合を

50

可能にし、かつ、タンパク分解を最小限に抑える温度で、該アフィニティマトリックスに対する結合親和性を有するタンパクを該アフィニティマトリックスに吸着させ、

g) タンパク分解を最小限に抑える温度で、工程(f)の溶液からアフィニティマトリックスを分離することにより、工程(f)のアフィニティマトリックスには結合しない可溶化タンパクを含有する溶液(g)を得て、

h) 溶液(g)を、分子量約210kDaの所望のタンパクの単離を促進するFKBP12のGST融合タンパクと複合体を形成したラパマイシンまたはラパマイシン類似物(LAFとの関係においてIC50<500nM)と共にインキュベートすることにより、融合FKBPタンパク：ラパマイシン複合体または融合FKBP12タンパク：ラパマイシン類似物複合体に結合した分子量約210kDaの所望のタンパクを含有する混合物(h)を得て、

10

i) 融合FKBP12タンパク：ラパマイシン複合体または融合FKBP12タンパク：ラパマイシン類似物複合体に結合した分子量約210kDaの所望のタンパクを含有する混合物(h)を、該融合タンパクに結合するアフィニティマトリックスと共に、アフィニティマトリックスへの結合を可能にし、かつ、タンパク分解を最小限に抑える温度および時間でインキュベートすることにより、融合FKBP12タンパク：ラパマイシン複合体または融合FKBP12タンパク：ラパマイシン類似物複合体に結合させ、

j) 結合した複合体を含むアフィニティマトリックス(i)を、分子量約210kDaの所望タンパク以外のタンパクの結合を解離する緩衝液ですすぎ、

k) 緩衝液を用いて、アフィニティマトリックス(j)から、分子量約210kDaのタンパク：FKBP12タンパク：ラパマイシンの複合体、あるいは、分子量約210kDaのタンパク：FKBP12タンパク：ラパマイシン類似物複合体を溶出させ、

20

l) 工程(k)で溶出したタンパクをサイズによって分離する、  
ことを含む、単離方法。

#### 【請求項13】

免疫調節剤あるいは抗真菌剤、抗増殖剤または抗腫瘍剤を同定する方法であって、

a) 試験物質を、FKBP12-ラパマイシン複合体に結合する請求項1に記載のタンパクと、好ましくは固体担体に結合しているタンパクと組み合わせる工程、

b) 該試験物質と、工程(a)の(好ましくは固形担体に結合させた)タンパクとを、該試験物質が該タンパクに結合するのに適当な条件下で維持する工程、および

30

c) 該試験物質の結合が工程(b)で発生したかどうかを決定する工程、  
を含む同定方法。

#### 【請求項14】

免疫調節剤あるいは抗真菌剤、抗増殖剤または抗腫瘍剤を同定する方法であって、

a) 試験物質を、FKBP12-ラパマイシン複合体に結合する請求項1に記載のタンパクと、好ましくは固形担体に結合しているタンパクと組み合わせる工程、

b) 該試験物質と、工程(a)の(好ましくは固形担体に結合させた)タンパクとを、該試験物質が該タンパクに結合するのに適当な条件下で維持する工程、および

c) 該試験物質の存在が、FKBP12-ラパマイシン複合体に結合するタンパクの活性を調節したかどうかを決定する工程、  
を含む同定方法。

40

#### 【請求項15】

FKBP12と複合体を形成した場合に、FKBP12-ラパマイシン複合体に結合する、SDS-PAGEで測定した分子量約210kDaの哺乳動物タンパクに結合する、生物学的試料中の、ラパマイシン、ラパマイシン類似物またはラパマイシン代謝物を検出する方法であって、

a) 生物学的試料をFKBP12と組み合わせ、ラパマイシンまたはラパマイシン類似物が該生物学的試料中に存在すれば、ラパマイシン：FKBP12複合体またはラパマイシン類似物：FKBP12複合体を含有する第1の混合物を形成させる工程；

b) その第1の混合物を、請求項1に記載のGST-FKBP12-ラパマイシン複合

50

体に結合するタンパクに、好ましくは固形担体に結合しているタンパクに添加することにより、第2の混合物を調製する工程；

c) 工程(b)の第2の混合物を、ラパマイシン：FKBP12複合体またはラパマイシン類似物：FKBP12複合体が、それらが存在するならば、GST-FKBP12-ラパマイシン複合体に結合するタンパクに結合するのに適当な条件下で維持する工程；および

d) ラパマイシン：FKBP12複合体、またはラパマイシン類似物：FKBP12複合体と、該タンパクとの結合が工程(c)で発生したかどうかを決定する工程、を含む、同定方法。

【請求項16】

10

移植拒絶反応、自己免疫疾患、炎症疾患、充実性腫瘍、T細胞白血病/リンパ腫、真菌感染および増殖過多血管疾患からなる群より選択される病状の治療に用いるための請求項4に記載のcDNAクローンから誘導されるアンチセンスRNA。

【請求項17】

移植拒絶反応、自己免疫疾患、炎症疾患、充実性腫瘍、T細胞白血病/リンパ腫、真菌感染および増殖過多血管疾患からなる群より選択される病状の治療用の医薬を調製するための請求項4に記載のcDNAから誘導される免疫調節量のアンチセンスRNAの使用。

【請求項18】

移植拒絶反応、自己免疫疾患、炎症疾患、充実性腫瘍、T細胞白血病/リンパ腫、真菌感染および増殖過多血管疾患からなる群より選択される病状の治療に用いるための請求項4に記載のcDNAから誘導されるアンチセンスDNA。

20

【請求項19】

移植拒絶反応、自己免疫疾患、炎症疾患、充実性腫瘍、T細胞白血病/リンパ腫、真菌感染および増殖過多血管疾患からなる群より選択される病状の治療用の医薬を調製するための請求項4に記載のcDNAから誘導される免疫調節量のアンチセンスDNAの使用。

【請求項20】

移植拒絶反応が腎臓、心臓、肝臓、肺、骨髄、脾臓(島細胞)、角膜、小腸、皮膚同種移植片または心臓弁異種移植片に拮抗するものである、請求項16または18にて特定される用途のためのアンチセンスRNAまたはDNA、あるいは請求項17または19記載の使用。

30

【請求項21】

自己免疫疾患が狼瘡、関節リウマチ、真性糖尿病、重症筋無力症および多発性硬化症からなる群より選択される、請求項16または18にて特定される用途のためのアンチセンスRNAまたはDNA、あるいは請求項17または19記載の使用。

【請求項22】

炎症疾患が乾癬、皮膚炎、湿疹、脂漏症、炎症性腸疾患および眼ブドウ膜炎からなる群より選択される、請求項16または18にて特定される用途のためのアンチセンスRNAまたはDNA、あるいは請求項17または19記載の使用。

【請求項23】

増殖過多血管疾患が再狭窄またはアテローム性動脈硬化症である、請求項16または18にて特定される用途のためのアンチセンスRNAまたはDNA、あるいは請求項17または19記載の使用。

40

【請求項24】

SDS-PAGEで測定した場合に分子量が約210kDaである単離されたポリペプチドであって、

(a) ヒト細胞材料の試料を準備し；

(b) 細胞膜タンパクを含む細胞材料の抽出物を調製し；

(c) 該抽出物を、

(i) ラパマイシン、および

(ii) FKBP12

50

の複合体を含むアフィニティー試薬と、該材料が該アフィニティー試薬と特異的に結合しうる条件下で接触させて、それと結合させ；

(d) アフィニティー試薬と結合しない材料をそのアフィニティー試薬およびそれと結合した材料より分離し；

(e) アフィニティー試薬と結合した材料をそこから解離させ；および

(f) 分子量が約 210 kDa のポリペプチドを、そのアフィニティー試薬より解離させた他の材料より分離する

ことを含む工程により調製されるポリペプチド。

#### 【発明の詳細な説明】

10

#### 【技術分野】

#### 【0001】

本発明は、ラパマイシンのエフェクタータンパクに関する。さらに詳しくは、本発明は、免疫調節剤、抗再狭窄剤または抗腫瘍剤の同定、設計および合成のための哺乳動物起源の新規なラパマイシン-FKB P 12 結合タンパクに関する。

#### 【背景技術】

#### 【0002】

ラパマイシンは、ストレプトマイセス・ハイグロスコピカス (*Streptomyces hygroscopicus*) によって生産されるマクロライド系抗生物質であり、最初は、抗真菌剤としてのその性質によって特徴付けられた。カンジダ・アルビカンス (*Candida albicans*) やマイクロスポラム・ジブセウム (*Microsporum gypseum*) などのカビの増殖に悪影響を及ぼす。ラパマイシン、その製造およびその抗生物質活性については、特許文献 1 (スレンドラ・セーガル (Surendra Sehgal) ら、1975年12月30日付で発行) に記載されている。1977年には、マーテル、アール・アール (Martel, R.R.) らにより、非特許文献 1 に、実験的なアレルギー脳炎およびアジュバント関節炎に対するラパマイシンの免疫抑制性が報告された。1989年には、非特許文献 2 ならびに非特許文献 3 が、別々に、同種異系移植手術におけるインビボでの拒絶反応を阻害する際のラパマイシンの有効性について報告した。続いて、ラパマイシンの免疫抑制性および拒絶反応阻害性について記載する数多くの論文が発表されたが、臨床研究については、ヒトにおける移植手術の際の拒絶反応を阻害するのにラパマイシンを使用することから始まった。

20

30

#### 【0003】

ラパマイシンは、単独 (特許文献 2) で、あるいは、ピシバニルと組み合わせて (特許文献 3)、抗腫瘍活性を有することが示されている。非特許文献 4 は、ラパマイシンが、実験的なアレルギー脳脊髄炎モデル、多発性硬化症のモデル、アジュバント関節炎モデル、慢性関節リウマチのモデルに有効であり、IgE 様抗体の形成を効果的に阻害したことを開示した。

#### 【0004】

ラパマイシンの免疫抑制効果は、非特許文献 5 に開示されている。シクロスポリン A や FK-506 などのマクロ環状分子もまた、免疫抑制剤として有効であることが示されており、それゆえ、移植組織の拒絶反応を予防するのに有用である (非特許文献 5 ; 非特許文献 6 ; 非特許文献 7 ; および特許文献 4)。

40

#### 【0005】

ラパマイシンは、全身性エリテマトーデス (特許文献 5)、肺炎 (特許文献 6)、インシュリン依存性糖尿病 (非特許文献 8)、ならびに血管損傷後の平滑筋細胞増殖および内膜肥大化 (非特許文献 9) を防止したり、治療したりするのに有用であることが示されている。

#### 【0006】

ラパマイシンのモノおよびジアシル化誘導体 (28 位および 43 位でエステル化) は、抗真菌剤として有用であることが示されており (特許文献 7)、ラパマイシンの水溶性プロドラッグを製造するのに用いられている (特許文献 8)。最近、ラパマイシンの番号付

50

けの規約が変更された；それゆえ、ケミカル・アブストラクツの命名法に従えば、上記のエステルは、31位および42位におけるものになる。特許文献9は、免疫抑制剤、抗炎症剤、抗真菌剤、および抗腫瘍剤として有用な、ラパマイシンのカーバメートを開示している。特許文献10は、ラパマイシンのフッ素化エステルを開示している。特許文献11は、ラパマイシンのアミドエステルを開示している。特許文献12は、ラパマイシンのアミノエステルを開示している。特許文献13は、ラパマイシンのスルホネートおよびスルファメートを開示している。特許文献14は、ラパマイシンのスルホニルカーバメートを開示している。

#### 【0007】

特許文献4（カルネ（Calne））は、ラパマイシンならびにその誘導体およびプロドラッグを用いて哺乳動物における移植組織の拒絶反応を阻害する方法を開示している。ラパマイシンと共に用いるために挙げられている他の化学療法剤は、アザチオプリン、コルチコステロイド、シクロスポリン（およびシクロスポリンA）、およびFK-506、あるいはその組合せである。

10

#### 【0008】

ラパマイシンは、細胞内のシグナルトランスダクションを遮断することによって、免疫抑制効果を生じる。ラパマイシンは、T細胞およびマスト細胞におけるカルシウム依存性シグナルカスケードを干渉するようである（非特許文献10）。ラパマイシンは、FK-506結合タンパク（FKBP）系統群のメンバーである幾つかのイムノフィリン（immunophilin）に結合することが知られている。特に、ラパマイシンは、結合タンパクFKBP12、FKBP13、FKBP25（非特許文献11および非特許文献12；非特許文献13）、およびFKBP52（特許文献15）に結合することが知られている。

20

#### 【0009】

ラパマイシンは、マイトジェン誘発のT細胞およびB細胞の増殖、ならびに、IL-2、IL-3、IL-4およびIL-6を含む数種のサイトカインによって誘発される増殖を阻害することができる（非特許文献14）。それはまた、抗体産生を阻害することができる。ラパマイシンは、細胞周期の進行に伴うタンパク合成を減少させるラパマイシンの能力と互いに関係があると思われるp70<sup>S6</sup>キナーゼのサイトカイン誘発活性化を遮断することが示されている（非特許文献15；非特許文献16；非特許文献17；非特許文献18）。それはまた、cdk2/サイクリンE複合体の活性化を阻害する（非特許文献19；非特許文献20；非特許文献21）。ラパマイシンの効果は、p70<sup>S6</sup>キナーゼやcdk2/サイクリンEへの直接結合によって媒介されるのではなく、これらキナーゼの活性化状態を調節する上流成分へのラパマイシン-FKBP複合体の作用による。

30

#### 【0010】

一般に、ラパマイシン、シクロスポリンおよびFK506などの免疫抑制剤の作用が、それらの各々の細胞内受容体タンパク（イムノフィリンと呼ばれる）との複合体の形成に依存することは受け入れられている。これらの免疫抑制剤がそれらの各々のイムノフィリンと結合することは、イムノフィリンのシス-トランスペプチジルプロリルイソメラーゼ（PPIase）活性を阻害するが、PPIase阻害は、免疫抑制活性を媒介するほど充分ではない（非特許文献22）。ディールス-アルダー付加物である2種のラパマイシン類似物（一方は4-フェニル-1,2,4-トリアゾリン-3,5-ジオンとの付加物であり、他方は4-メチル-1,2,4-トリアゾリン-3,5-ジオンとの付加物）は、FKBPに結合し、そのPPIase活性を阻害したが、検出可能な免疫抑制活性を示さなかった。モル大過剰のフェニル-トリアゾリンジオン・ディールス-アルダー付加物は、マイトジェン誘発のマウス胸腺細胞増殖におけるDNA合成へのラパマイシンの効果を競合的に阻害することが示されている（非特許文献23）。最近の証拠は、シクロフィリン-シクロスポリンAやFKBP-FK506などのバイナリーイムノフィリン-薬物複合体が、特定の標的タンパクに作用することによってシグナルトランスダクションを遮断することを可能にする新しい機能を獲得していることを示唆している。シクロフィリン-シクロスポリンAおよびFKBP-FK506複合体の両方の分子標的は、Ca<sup>2+</sup>/カルモデュリン（calmodulin）依

40

50

存性セリン/スレオニンホスファターゼカルシネウリン (calcineurin) として同定されている (非特許文献 24 ; 非特許文献 25 ; 非特許文献 26 ; 非特許文献 27 ; 非特許文献 28)。

【0011】

ラパマイシンの抗菌活性および免疫抑制活性は、ラパマイシンと、FK506 結合タンパク (FKBP) 系統群のあるメンバーと、少なくとも 1 種の付加的な第 3 のタンパク (ラパマイシンの標的 (TOR) と呼ばれる) とからなる複合体によって媒介される。FKBP の系統群については、アーミステッド (Armistead) およびハーディング (Harding) によって総説が与えられている (非特許文献 29)。ラパマイシンの抗菌活性における関連 FKBP 分子は、FKBP12 であることが示されている (非特許文献 30)。哺乳動物細胞について、関連 FKBP は研究中である。2 種の TOR タンパク (TOR1 および TOR2) は酵母において同定されているが (非特許文献 31)、ヒト細胞中におけるラパマイシンの標的は、不明のままである。酵母 TOR2 のカルボキシ末端は、2 種のタンパク (すなわち、ホスファチジルイノシトール 3-キナーゼの p110 サブユニットおよび VPS34) と、20% の同一性を有することが示され、また、酵母液胞選別タンパクは PI3K 活性を有することが示されている。しかし、ジェイ・ブレニス (J. Blenis) らは、ラパマイシン-FKBP12 複合体が、p110, p85 PI3K 複合体によって、PDGF 刺激された細胞に対するその効果を直接媒介しないことを報告している。

10

【特許文献 1】米国特許第 3,929,992 号

【特許文献 2】米国特許第 4,885,171 号

20

【特許文献 3】米国特許第 4,401,653 号

【特許文献 4】米国特許第 5,100,899 号

【特許文献 5】米国特許第 5,078,999 号

【特許文献 6】米国特許第 5,080,899 号

【特許文献 7】米国特許第 4,316,885 号

【特許文献 8】米国特許第 4,650,803 号

【特許文献 9】米国特許第 5,118,678 号

【特許文献 10】米国特許第 5,100,883 号

【特許文献 11】米国特許第 5,118,677 号

【特許文献 12】米国特許第 5,130,307 号

30

【特許文献 13】米国特許第 5,117,203 号

【特許文献 14】米国特許第 5,194,447 号

【特許文献 15】WO 93/07269

【非特許文献 1】カナディアン・ジャーナル・オブ・フィジオリジカル・ファーマコロジー (Canadian Journal of Physiological Pharmacology) 55,48-51(1977)

【非特許文献 2】カルネ、アール・ワイ (Calne, R.Y.) ら、ランセット (Lancet) 1989, no.2, p.227

【非特許文献 3】モリス、アール・イー (Morris, R.E.) およびメイザー、ビー・エム (Meiser, B.M.)、メディカル・サイエンス・リサーチ (Medical Science Research) 1989, No.17, p.609-10

40

【非特許文献 4】アール・アール・マーテル (R.R. Martel) ら、カナディアン・ジャーナル・オブ・フィジオリジック・アンド・ファーマコロジー (Can. J. Physiol. Pharmacol.) 55,48(1977)

【非特許文献 5】FASEB 3,3411(1989)

【非特許文献 6】FASEB 3,5256(1989)

【非特許文献 7】アール・ワイ・カルネ (R.Y. Calne) ら、ランセット (Lancet) 1183(1978)

【非特許文献 8】フィフス・イント・コンフ・インフラム・レス・アソク (Fifth Int. Conf. Inflamm. Res. Assoc.) 121(要約), (1990)

【非特許文献 9】モリス、アール (Morris, R.) ジャーナル・オブ・ハート・アンド・ラ

50

- ング・トランスプラント (J. Heart Lung Transplant) 11(pt.2) : 197(1992)
- 【非特許文献 1 0】シュライバー (Schreiber) ら、(1992)テトラヘドロン (Tetrahedron) 48 : 2545-2558
- 【非特許文献 1 1】ガラト・エイ (Galat A.) ら、(1992)バイオケミストリー (Biochemistry) 31(8) ; 2427-2437
- 【非特許文献 1 2】フェレラ・エイ (Ferrera A) ら、(1992)ジーン (Gene) 113(1) : 125-127
- 【非特許文献 1 3】アーミステッド (Armistead) およびハーディング (Harding)、アニュアル・リポーツ・イン・メディカル・ケミストリー (Ann. Reports in Med. Chem.) 28 : 207-215,1993
- 【非特許文献 1 4】セーガル (Sehgal) らによる総説 ; メディカル・リサーチ・レビュー (Med. Research Rev.) 14 : 1-22,1994
- 【非特許文献 1 5】カルボ (Calvo) ら、プロシーディングズ・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ユー・エス・エイ (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) 89 : 7571-7575,1992
- 【非特許文献 1 6】チュング (Chung) ら、セル (Cell) 69 : 1227-1236,1992
- 【非特許文献 1 7】クオ (Kuo) ら、ネイチャー (Nature) 358 : 70-73,1992
- 【非特許文献 1 8】プライス (Price) ら、サイエンス (Science) 257 : 973-977,1992
- 【非特許文献 1 9】フラナガン (Flanagan) ら、アナルズ・オブ・ニューヨーク・アカデミー・オブ・サイエンシズ (Ann. N.Y. Acad. Sci.) 印刷中
- 【非特許文献 2 0】フラナガン (Flanagan) ら、モレキュラー・アンド・セルラー・バイオロジー (Mol. Cell Biol.) 印刷中
- 【非特許文献 2 1】フラナガン (Flanagan) ら、ジャーナル・オブ・セル・バイオケミストリー (J. Cell Biochem.) 17A : 292,1993
- 【非特許文献 2 2】アーミステッド (Armistead) およびハーディング (Harding)、アニュアル・リポーツ・イン・メディカル・ケミストリー (Annual Reports in Med. Chem.) 28 : 207-215 : 1993
- 【非特許文献 2 3】オケイン (Ocain) ら、バイオケミカル・アンド・バイオフィジカル・リサーチ・コミュニケーションズ (Biochem. Biophys. Res. Commun.) 192 : 1340,1993
- 【非特許文献 2 4】ジェイ・リウ (J. Liu) ら、セル (Cell) 66,807,1991
- 【非特許文献 2 5】ジェイ・リウ (J. Liu) ら、バイオケミストリー (Biochemistry) 31,3896,1992
- 【非特許文献 2 6】ダブリュー・エム・フラナガン (W.M. Flanagan) ら、ネイチャー (Nature) 352,803,1992
- 【非特許文献 2 7】マックヤフリー (McCaffrey) ら、ジャーナル・オブ・バイオリジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.) 268,3747,1993
- 【非特許文献 2 8】マックヤフリー (McCaffrey) ら、サイエンス (Science) 262 : 750,1993
- 【非特許文献 2 9】アニュアル・リポーツ・イン・メディカル・ケミストリー (Annual Reports in Med. Chem.) 28 : 207-215 : 1993
- 【非特許文献 3 0】ハイトマン (Heitman) ら、サイエンス (Science) 253 : 905-909 : 1993
- 【非特許文献 3 1】クンツ (Kunz) ら、セル (Cell) 73 : 585-596 : 1993
- 【発明の開示】
- 【発明が解決しようとする課題】
- 【0012】
- 免疫調節剤、抗再狭窄剤または抗腫瘍剤の同定、設計および合成のための新規な哺乳動物起源のラパマイシン-F K B P 1 2 結合タンパクの提供が望まれている。
- 【課題を解決するための手段】
- 【0013】

10

20

30

40

50

本発明は、G S T - F K B P 1 2 -ラパマイシンの複合体に結合する単離され、クローン化され、かつ、発現されたタンパクに関する。これらタンパクは、モルト (Molt) 4 T 細胞白血病の膜調製物から単離される。4 種の新規なタンパクのサイズは、P A G E 移動法によって、 $125 \pm 12$  キロダルトン (kDa)、 $148 \pm 14$  kDa、 $208 \pm 15$  kDa および  $210 \pm 20$  kDa であると推定され、それぞれ、 $125$  kDa、 $148$  kDa、 $208$  kDa、および  $210$  kDa として表されている。これら 4 種のタンパクは、エフェクタータンパクとも呼ばれる。

#### 【0014】

本発明のタンパクは、酵素阻害剤アッセイや結合アッセイなどのスクリーニングアッセイに用いて、内因性の複合体およびリガンド、ならびに、それらの機能を調節する新規な外因性の化合物 (ラパマイシン様) を同定することができる。それらは、再狭窄や免疫調節に対して、また、抗腫瘍剤として、治療上の利点を有する化合物を同定するアッセイに用いることもできる。本発明のタンパクをクローニングすることは、これらタンパクを大量に生産することを可能にするだけでなく、関連のアンチセンス療法を開発する基礎をも提供する。免疫調節活性 (移植手術の拒絶反応、対宿主性移植片病、狼瘡などの自己免疫疾患、重症筋無力症、多発性硬化症、慢性関節リウマチ、I 型糖尿病、ならびに、乾癬、皮膚炎、湿疹、脂漏症、炎症性腸疾患、肺炎、喘息、および眼のブドウ膜炎などの炎症疾患に対する使用)、抗再狭窄活性および抗腫瘍活性を用いてアンチセンス療法を実施するための cDNA クローンの使用は、本発明の範囲内に含まれる。

#### 【0015】

本発明のタンパクは、T 細胞白血病細胞系モルト 4 の細胞 (ATCC1582、アメリカン・タイプ・セル・カルチャー (American Type Cell Culture)、12301パークローン・ドライブ (Parklawn Drive)、ロックビル (Rockville)、MD、USA、20852)、B 細胞リンパ腫、B J A B、または正常なヒト T 細胞などの哺乳動物細胞から単離することができる。これらの哺乳動物細胞は、低張圧緩衝液 A ( $100$  mM H E P E S、 $pH 7.5$ 、 $20$  mM K C l、 $1$  mM E D T A、 $0.4$  mM P M S F および  $2$  mM  $\beta$ -メルカプトエタノール (2-ME)) などの、プロテアーゼ阻害剤および還元剤 (2-ME) を含有する緩衝液中で溶解させることができる。細胞核および未破壊細胞は、タンパク分解を最小限に抑える温度で遠心分離によって取り除かれる。次いで、これら細胞の膜画分は、 $100,000$  g の超遠心分離によって濃縮またはペレット化することができる。膜ペレットの界面活性剤による可溶化は、C H A P S O (3-[(3-コラミドプロピル)ジメチルアンモニオ]-1-プロパンスルホネート;  $12$  mM) またはトリトン X 100 (ポリエチレングリコール 4-イソオクチルフェニルエーテル) を含む緩衝液 B ( $50$  mM T r i s、 $pH 7.2$ 、 $100$  mM N a C l、 $20$  mM K C l、 $0.2$  mM P M S F、 $1$  mM 2-ME、 $2$  mM C a C l<sub>2</sub>、 $2$  mM M g C l<sub>2</sub>、 $5 \mu g/ml$  アプロチニン、ロイペプチン、ペプスタチン A およびアンチペイン) などの界面活性剤含有緩衝液中で実施する。次いで、可溶化された膜タンパクは、タンパク分解を最小限に抑える温度で  $100,000$  g の超遠心分離によって、破碎物から分離することができる。次いで、可溶化された膜タンパクを含有する上清を、タンパク分解を最小限に抑える温度で、プロテアーゼ阻害剤の存在下、グルタチオン樹脂などのアフィニティー樹脂に前吸着させる。上清から樹脂を除去するために遠心分離した後、この上清を、次いで、タンパク分解を最小限に抑える温度で、F K B P に複合体化したラパマイシンまたはラパマイシン類似物、例えば、G S T - F K B P 1 2 --ラパマイシンと共にインキュベートする。次いで、F K B P に複合体化したラパマイシンまたはラパマイシン類似物、例えば、G S T - F K B P 1 2 --ラパマイシンと共にインキュベートした可溶化膜タンパクの混合物は、タンパク分解を最小限に抑える温度で、アフィニティー樹脂とインキュベートして、ラパマイシンまたはラパマイシン類似物、F K B P 融合タンパクおよび結合タンパクの複合体を結合させることができる。最も非特異的なタンパクを、界面活性剤含有緩衝液、例えば、緩衝液 C ( $50$  mM T r i s、 $pH 7.2$ 、 $100$  mM N a C l、 $20$  mM K C l、 $0.2$  mM P M S F、 $1$  mM 2-ME または  $10$  mM ジチオスレイトール、 $0 \sim 5$  mM C a C l<sub>2</sub>、 $0 \sim 5$  mM M g C l<sub>2</sub>、 $5 \mu$

10

20

30

40

50

g/ml アプロチニン、ロイペプチン、ペプスタチン A およびアンチペイン、ならびに 0.1% トリトン X 100 (ポリエチレングリコール 4-イソオクチルフェニルエーテル) を用いて、すすいだ後、これらタンパクを、樹脂から解離させるのに十分な界面活性剤を含有する緩衝液 (例えば、ラエムリ (Laemli)、ネイチャー (Nature) 227: 680, 1970 に記載の、必要に応じてグリセロールまたは色素を含むラエムリ緩衝液) などの変性条件下で、または、5 mM グルタチオンなどのアフィニティーカラムに適当な溶出化合物を含有する緩衝液などの非変性条件下で、樹脂から溶出させる。次いで、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) を用いて、これらタンパクをサイズによって分離することができる。

**【0016】**

本発明はまた、上記タンパクのゲノム DNA 配列、ならびに、上記タンパクの遺伝子に対応する cDNA およびアンチセンス RNA および DNA 配列を含む。本発明はさらに、上記タンパクと少なくとも機能的に相同または等価である他の哺乳動物種のタンパク、ならびに、かかる相同または等価タンパクの DNA 遺伝子配列、およびかかる相同または等価タンパクの遺伝子に対応する cDNA およびアンチセンス RNA および DNA 配列を含む。

10

**【0017】**

本発明の目的に対して、本発明のタンパクの等価物は、上記タンパクに対して実質的に類似しているが、同一ではないアミノ酸配列を有する、タンパク、タンパク断片および/または切断された形態であると見なされ、かかる等価物は上記タンパクに類似したラパマイシン-FKB P 複合体に結合する特性および機能を示す。それゆえ、本明細書では、本発明の 125 kDa、148 kDa、208 kDa、および 210 kDa タンパクに言及することは、上記の 125 kDa、148 kDa、208 kDa、および 210 kDa タンパクと実質的に類似しているが、同一ではないアミノ酸配列を有する、相同または等価タンパク、ならびに、断片化および/または切断された形態を示し、含むものと理解すべきである。

20

**【0018】**

これらタンパクあるいは相同または等価タンパクは、様々な細胞タイプから同様の方法によって、および/または、組換え DNA 法によって、生成させることができ、また、部位特異的変異誘発処理を含む手法によって改変してもよい。例えば、本発明の遺伝子は、これらタンパクの 1 つまたは全部を、単離に有利な融合相手 (例えば、HIS オリゴマー、免疫グロブリン Fc、グルタチオン S-トランスフェラーゼ、FLAG など) との融合タンパクとして発現するように構築することができる。可溶性になる変異や切断を部位特異的変異誘発処理によって導入することができ、これにより単離が有利になりうる。

30

**【0019】**

本発明はさらに、結合親和性を保持しているが、活性タンパクのアミノ酸配列より少ないアミノ酸配列を有する、オリゴペプチド断片、切断形およびタンパク断片を含む。本発明はまた、これらタンパクに特異的なモノクローナルおよびポリクローナル抗体と、それらの使用とを含む。このような使用には、免疫調節および/または抗腫瘍活性のための新規な薬剤をスクリーニングする方法や、免疫抑制薬を服用している個体から得た生物学的試料中の親化合物および/または代謝物を測定する方法が含まれる。免疫調節活性 (移植手術の拒絶反応、対宿主性移植片病、狼瘡などの自己免疫疾患、重症筋無力症、多発性硬化症、慢性関節リウマチ、I型糖尿病、ならびに、乾癬、皮膚炎、湿疹、脂漏症、炎症性腸疾患、肺炎、喘息、および眼のブドウ膜炎などの炎症疾患に対する使用)、および抗腫瘍活性を用いてアンチセンス療法 (ミリガン (Milligan) ら、ジャーナル・オブ・メディシナル・ケミストリー (J. Med. Chem.) 36: 1923-1936, 1993) を実施するための cDNA クローンの使用も、本発明の範囲内に含まれる。

40

**【0020】**

本発明のタンパクは、当業者に周知の組換え DNA 技術によって製造することもできる。つまり、課題のタンパクの遺伝子は、このタンパクを、リシン C などのプロテアーゼで

50

切断することによって部分的なアミノ酸配列を得て、得られたタンパク断片を微孔 H P L C によって単離した後、断片の配列決定 (マツダイラ (Matsudaira)、ア・ブラクティカル・ガイド・トゥー・プロテイン・アンド・ペプチド・ピュリフィケーション・フォア・マイクロシーケンシング (A Practical Guide To Protein and Peptide Purification for Microsequencing) 中、アカデミック・プレス (Academic Press) (サンディエゴ, CA, 1989)) を行うことによってクローン化することができる。次いで、決定された配列は、ヒト c D N A ライブラリーを直接スクリーニングしたり、ポリメラーゼ連鎖反応によってプローブを生成させたりするのに用いることができるオリゴヌクレオチドプローブを製造するのに用いることができる。ライブラリーはヒト T 細胞または細胞系モルト (Molt) 4、ジュルカット (Jurkat)、あるいはその他のものなどから作成して、クローンを得ること  
10  
ことができる。これらのクローンを用いて、タンパクの全長遺伝子、つまり完全オープンリーディングフレームがクローン化されるまで、付加的な配列を含む付加的なクローンを同定することができる。

#### 【 0 0 2 1 】

ある種のタンパクが、タンパクのサイズから当初予想されたものより長いオープンリーディングフレームによってコードされ得ることは当該分野でよく知られている。これらタンパクは、完全なオープンリーディングフレームから翻訳された前駆体タンパク (例えば、I L - 1 ) や、下流の開始コドンを用いて翻訳されたタンパク (例えば、B 型肝炎表面抗原) の切断産物を表す場合がある。この知見を考慮して、ここで用いる「c D N A」なる用語は、上で考察したように、本発明のタンパクまたはタンパク断片を、同時にまた  
20  
または別々に、あるいは切断された形でコードする遺伝子の完全なオープンリーディングフレームに対する c D N A またはその任意の部分の意味するものと理解される。

#### 【 0 0 2 2 】

相補的な方策では、本発明のタンパクに対する遺伝子は、F K B P 1 2 : R A P A をクローニング用トラップとして用いたインタラクティブ酵母クローニング (interactive yeast cloning) 技術によって同定してもよい。これらの方策を組み合わせると、クローンの同定を早めることもできる。

#### 【 0 0 2 3 】

4 つのタンパクのいずれかの遺伝子をコードする関連 c D N A クローンは、当該技術分野で標準的な発現ベクターを用いて、イー・コリ (E. coli)、酵母、またはバキュロウイルス感染細胞あるいは哺乳動物細胞で発現させることができる。単離は、上記のように実施することができ、c D N A は、単離に有利な融合相手 (例えば、H I S オリゴマー、免疫グロブリン F c、グルタチオン S - トランスフェラーゼなど) との融合タンパクを発現するように製造することができる。可溶性になる変異を部位特異的変異誘発処理によって導入することができ、これにより単離が有利になりうる。

#### 【 0 0 2 4 】

このような c D N A クローンの使用には、組換えタンパクの製造が含まれる。さらに、このような組換えタンパク、または哺乳動物細胞から単離された対応の天然タンパク、あるいはその断片 (ペプチドオリゴマーを含む) は、これらタンパクに対する抗体の生成に有用である。簡単に言えば、モノクローナルまたはポリクローナル抗体は、当該技術分野  
40  
で標準的な技術を用いて、組換えタンパク、または哺乳動物細胞から単離された対応の天然タンパク、あるいはその断片 (担体タンパク (例えば、キーホールリンペットヘモシアニンまたはウシ血清アルブミン) に結合したペプチドオリゴマーを含む) で動物を免疫することによって誘発される。これらの抗体は、哺乳動物細胞から単離された天然タンパク、あるいは、イー・コリ (E. coli)、酵母、またはバキュロウイルス感染細胞あるいは哺乳動物細胞、あるいは細胞産物に由来する組換えタンパクの精製法に用いることができる。

#### 【 0 0 2 5 】

このような c D N A クローンの使用には、組換えタンパクの製造が含まれる。さらに、このような組換えタンパク、または哺乳動物細胞から単離された対応の天然タンパクは、  
50

免疫調節および/または抗腫瘍活性のための合成化合物、天然物、外因性または内因性の物質などの新規な薬剤をスクリーニングする方法に有用である。スクリーニングする天然物には、細胞溶解物、細胞上清、植物抽出物、および真菌や最近の天然プロスが含まれるが、これらには限定されない。競合結合アッセイの一例としては、マトリックスに（共有結合的にまたは非共有結合的に）結合させたこれらタンパクの1つを、上記の化合物、天然物、細胞溶解物または細胞上清、および標識したラパマイシン：FKBP複合体を含む緩衝液と共にインキュベートすることができる。これら化合物、天然物、外因性または内因性の物質が、この複合体または特異的抗体の結合を競合的に阻害する能力を評価することができる。複合体を標識する方法の例には、放射標識、蛍光または化学ルミネセンス標識、ルシフェラーゼなどのFKBPとの融合タンパク、および、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、アセチルコリンエステラーゼ（ACHE）などの酵素への結合が含まれる。酵素アッセイの一例としては、上記タンパクは、合成化合物、天然物、外因性または内因性の物質などの新規な薬剤の存在下または非存在下で、基質と共にインキュベートされ、タンパクの酵素活性が評価することができる。免疫抑制薬を服用している個体から得た生物学的試料中の親化合物および/または代謝物を測定する方法は、これらタンパクを用いて評価することができる。

10

## 【0026】

本発明は、免疫抑制剤または抗腫瘍剤として有用でありうる物質を同定する方法を含む。かかる方法は、以下の工程を利用している：

- a) 試験物質を、本発明の4つの哺乳動物タンパク（約125kDa、約148kDa、約208kDa、または約210kDa；固形担体に結合されている）の1つと組み合わせる工程、
- b) 該試験物質と、工程（a）の固形担体に結合させたタンパクとを、該試験物質が該タンパクに結合するのに適当な条件下で維持する工程、および
- c) 該試験物質の結合が工程（b）で発生したかどうかを決定する工程。

20

## 【0027】

本発明はまた、以下の工程を伴う、免疫抑制剤または抗腫瘍剤として有用でありうる物質を同定する方法を含む。

- a) 試験物質を、本発明の哺乳動物タンパク（固形担体に結合されている）の1つと組み合わせる工程、
- b) 該試験物質と、工程（a）の固形担体に結合させたタンパクとを、該試験物質が該タンパクに結合するのに適当な条件下で維持する工程、および
- c) 該試験物質の存在が、哺乳動物タンパクの活性を調節したかどうかを決定する工程。

30

## 【0028】

本発明はさらに、FKBPと複合体を形成した場合に、本発明の4つの上記タンパクの1つと結合するラパマイシン、ラパマイシン類似物またはラパマイシン代謝物を、生物学的試料中に検出する方法を含む。かかる方法は、以下の工程からなる：

- a) 生物学的試料をFKBPと組み合わせ、ラパマイシン、ラパマイシン類似物またはラパマイシン代謝物が該生物学的試料中に存在すれば、ラパマイシン：FKBP複合体、ラパマイシン類似物：FKBP複合体、またはラパマイシン代謝物：FKBP複合体を含む第1の混合物を得る工程、
- b) 第1の混合物を本発明のタンパク（固形担体に結合されている）の1つに添加することにより、第2の混合物を調製する工程、
- c) 工程（b）の第2の混合物を、ラパマイシン：FKBP複合体、ラパマイシン類似物：FKBP複合体、またはラパマイシン代謝物：FKBP複合体が、存在するならば、本発明のタンパクに結合するのに適当な条件下で維持する工程、および
- d) ラパマイシン：FKBP複合体、ラパマイシン類似物：FKBP複合体、またはラパマイシン代謝物：FKBP複合体と、該タンパクとの結合が工程（c）で発生したかどうかを決定する工程。

40

50

## 【0029】

また、アンチセンス治療剤を生成するためにcDNAクローンを使用することも本発明に包含される。これは、ミリガン (Milligan) ら、ジャーナル・オブ・メディシナル・ケミストリー (J. Med. Chem.) 36:14:1924-1936に記載されているような当該分野の技術を用いることにより達成することができる。この開示および特許請求の範囲の目的のために、アンチセンスRNAおよびDNAは、天然のバックボーンを有するまたは修飾されたバックボーンを利用する本発明の4つのタンパク (125 kDa、148 kDa、208 kDaまたは210 kDa) のうちの1つをコードするcDNAクローン由来のRNAおよびDNA鎖を包含すると理解される。RNAおよびDNAバックボーンのかかる修飾は、ミリガン (Milligan) ら、ジャーナル・オブ・メディシナル・ケミストリー (J. Med. Chem.) 36:14:1924-1936に記載されている。最近開示された (ミリガン (Milligan) ら、ジャーナル・オブ・メディシナル・ケミストリー (J. Med. Chem.) 36:14:1924-1936) 当該分野の技術により創製されるアンチセンス化合物は、免疫応答を調節するのに有用であり、従って腎臓、心臓、肝臓、肺、骨髄、脾臓 (島細胞)、角膜、小腸および皮膚同種移植および心臓弁異種移植のような移植拒絶の治療または抑制に；狼瘡、慢性関節リウマチ、糖尿病、重症筋無力症および多発性硬化症のような自己免疫疾患および乾癬、皮膚炎、湿疹、脂漏症、炎症性腸疾患および眼ブドウ膜炎のような炎症性疾患の治療または抑制に有用であり得る。本発明のアンチセンス分子は、抗腫瘍、抗真菌活性および抗増殖活性を有し得る。したがって、本発明の化合物は固形腫瘍、成人T細胞白血病/リンパ腫、真菌感染症および再発狭窄症およびアテローム性動脈硬化症のような過増殖血管疾患の治療にも有用であり得る。したがって、本発明はまた、哺乳動物、好ましくはヒトにおける上記疾患および症状の治療法よりなる。該方法は、本発明の関連するアンチセンス治療剤の有効量を、投与の必要な哺乳動物に投与することよりなる。

## 【0030】

上記疾患状態の治療または抑制のために投与する場合には、本発明のアンチセンス分子は、哺乳動物に経口的、非経口的、鼻内、気管支内、経皮的、局所的、腔内、または直腸内に投与することができる。

## 【0031】

本発明のアンチセンス分子を免疫抑制剤または抗炎症剤として用いる場合、それらは1またはそれ以上の他の免疫調節剤と組み合わせて投与できると考えられる。かかる他の免疫調節剤には、アゼチオプリン、プレドニゾンおよびメチルプレドニゾンのようなコルチコステロイド、シクロホスファミド、ラパマイシン、シクロスポリンA、FK-506、OKT-3およびATGが含まれるがこれらに限定されるものではない。本発明の複合体を、免疫抑制を誘導するまたは炎症症状を治療するためのかかる他の薬または剤と組み合わせることにより、所望の効果を得るために必要な該剤のそれぞれの量はより少量ですむ。かかる併用療法の基礎はステプコウスキー (Stepkowski) により確立されており、彼の結果が示すところによると、下治療用量 (subtherapeutic dose) のラパマイシンおよびシクロスポリンAの併用により、心臓同種移植生存時間を著しく延長した (トランスプランテーション・プロシーディングズ (Transplantation Proc.) 23:507(1991))。

## 【0032】

一般にこれらのアンチセンス化合物での治療は、該化合物の最適用量未満の少用量で開始する。その後、該条件下で最適効果に到達するまで投与量を増やす。正確な投与量は、治療される個々の対象についての経験に基づき、投与する医師が決定する。一般に、本発明のアンチセンス化合物は、有害な副作用を全く起こさずに有効な結果を与える濃度にて最も望ましく投与される。

## 【0033】

また、上記アンチセンス化合物の治療価値に鑑みれば、本発明は、本発明の125 kDa、148 kDa、208 kDaおよび210 kDaのタンパクをコードするcDNAクローン由来のアンチセンスRNAおよびアンチセンスDNA化合物を含有する医薬組成物

をも包含する。

【0034】

また、本発明は、本発明のタンパクを単離するための以下の方法並びにそれから単離されるタンパクよりなる。

哺乳動物細胞からタンパクを単離する方法は以下の工程からなる。

1. 関心のある哺乳動物細胞を増殖させ収穫する。上記のとおり、該細胞はT細胞由来（例えば、T細胞リンパ腫、白血病、正常ヒトT細胞）、B細胞由来（例えば、EBV形質転換B細胞、正常ヒトB細胞）、肥満細胞、またはラパマイシンに感受性の他の細胞源であってもよい。該細胞は、収穫後直ちに加工しても、または加工前に例えばペレットにて凍結保存してもよい。凍結保存した細胞は、 $-70 \sim -80$  で凍結保存されるドライアイスおよびエタノール浴中で使用するまで保存してもよい。関心の細胞を増殖させ収穫するこの工程は、本方法の第1工程または本方法のための単なる予備工程と考えてもよい。

10

【0035】

2. タンパク分解を最小限に抑える温度（例えば、 $4$ ）で緩衝剤（例えば、HEPES、トリス、 $\text{pH } 7.5$ ）、低塩（例えば、 $10 \sim 50 \text{ mM NaCl}$  または  $\text{KCl}$ ）、キレート剤（例えば、 $1 \sim 2 \text{ mM EDTA}$ ）、プロテアーゼ阻害剤（例えば、 $0.4 \text{ mM PMSF}$ ）および還元剤（例えば、 $2 \text{ mM } 2\text{-ME}$  または  $1 \sim 20 \text{ mM}$  ジチオスレイトール）を含有する緩衝液中で細胞を溶解する。哺乳動物細胞は、音波溶解、ダウンシング（douncing）などの細胞溶解を起こすことのできるいずれの方法で処理してもよいと理解されるべきである。

20

【0036】

3. タンパク分解を最小限に抑える温度（例えば、 $4$ ）にて遠心分離することにより、ライゼートから破壊されていない細胞または細胞核を前除去する。例えば  $1600 \text{ g}$ 、 $10$  分間の遠心分離が、破壊されていない細胞および細胞核をライゼートから前除去するのに十分であることが判明した。この工程は強制的なものではないが、後続する工程のためのより清澄な調製物を与える。

【0037】

4. ついで、前清澄化ライゼート中の膜画分を、例えば超遠心分離により濃縮する。この濃縮の一例として、 $100,000 \text{ g}$  で  $1 \sim 1.5$  時間の超遠心分離が挙げられる。

【0038】

5. ついで膜タンパク（例えば、貫膜、内因性および膜結合タンパク）を可溶化する。これは、タンパク分解を最小限に抑える温度（例えば、 $4$ ）にて、タンパクを有害に変性することなくこれを可溶化する界面活性剤、緩衝剤（例えば、 $20 \sim 50 \text{ mM}$  トリスまたは  $\text{HEPES}$ 、 $\text{pH } 7.2$ ）、塩（例えば、 $100 \sim 200 \text{ mM NaCl} + 20 \text{ mM KCl}$ ）、還元剤（例えば、 $1 \sim 2 \text{ mM } 2\text{-ME}$  または  $1 \sim 20 \text{ mM}$  ジチオスレイトール）、プロテアーゼ阻害剤（例えば、 $0.2 \text{ mM PMSF}$ 、 $5 \mu\text{g/ml}$  アプロチニン、リユーペプチン、ペプスタチンAおよびアンチパイン）、二価カチオン（例、 $0 \sim 5 \text{ mM CaCl}_2$ 、 $0 \sim 5 \text{ mM MgCl}_2$ ）を含有する緩衝液中、工程4のペレットをインキュベートすることにより行ってもよい。この工程で有用な界面活性剤としては、例えば、 $\text{CHAPS}$ （ $3\text{-}[(3\text{-コラミドプロピル})\text{ジメチルアンモニオ}]\text{-1-プロパンスルホナート}$ ）またはトリトンX100（ポリエチレングリコール4-イソオクチルフェニルエーテル）が挙げられる。この工程の後、該混合物は可溶化膜タンパクおよび非可溶化細胞破片を含有する。

30

40

【0039】

6. 該可溶化膜タンパクを、タンパク分解を最小にする温度（例えば、 $4$ ）にて、例えば超遠心分離（例えば、 $100,000 \text{ g}$ 、 $1 \sim 1.5$  時間）により非可溶化細胞破片から分離する。

【0040】

7. アフィニティー樹脂に直接結合するタンパクの吸収を許容し、タンパク分解を最小限に抑える温度（例えば、 $4$ ）および時間にて、緩衝剤（例えば、 $20 \sim 50 \text{ mM}$  トリ

50

すまたは HEPES, pH 7.2)、塩 (例えば、100 ~ 200 mM NaCl + 20 mM KCl)、還元剤 (例えば、1 ~ 2 mM 2-ME または 10 ~ 20 mM ジチオスレイトール)、プロテアーゼ阻害剤 (例えば、0.2 mM PMSF、5 µg/ml アプロチニン、ロイペプチン、ペプスタチン A および アンチペイン)、二価カチオン (例えば、0 ~ 5 mM CaCl<sub>2</sub>、0 ~ 5 mM MgCl<sub>2</sub>) を含有する緩衝液中、可溶化膜タンパクを含有する上清をアフィニティー樹脂と共にインキュベートする。

【0041】

8. ついで、タンパク分解を最小限に抑える温度 (例えば、4 ) で、遠心分離により上清から該樹脂を除去する。

【0042】

9. ついで、エフェクタータンパクの融合 FKB P タンパク : ラパマイシンまたは類似物複合体に対する結合を許容し、タンパク分解を最小限に抑える温度および時間 (例えば、4 および 1 ~ 2 時間) にて、緩衝剤 (例えば、20 ~ 50 mM トリスまたは HEPES, pH 7.2)、塩 (例えば、100 ~ 200 mM NaCl + 20 mM KCl)、還元剤 (例えば、1 ~ 2 mM 2-ME または 1 ~ 20 mM ジチオスレイトール)、プロテアーゼ阻害剤 (例えば、0.2 mM PMSF、5 µg/ml アプロチニン、ロイペプチン、ペプスタチン A および アンチペイン)、二価カチオン (例えば、0 ~ 5 mM CaCl<sub>2</sub>、0 ~ 5 mM MgCl<sub>2</sub>) を含有する緩衝液中、FKB P 12 + タンパク [これは所望のエフェクタータンパクの単離を促進し、また、これにより融合タンパクがアフィニティー樹脂またはアフィニティーカラム (例えば、GST-FKB P 12、ヒスチジノリゴマー-FKB P 12、ビオチン-FKB P 12 など) に結合する] の融合タンパクに複合体化させたラパマイシンまたはラパマイシン類似物 (LAF において IC<sub>50</sub> < 500 nM) と共に該上清をインキュベートする。

【0043】

10. エフェクタータンパクおよび融合 FKB P タンパク : ラパマイシンまたはアナログの複合体のアフィニティー樹脂に対する結合を許容し、タンパク分解を最小にする温度および時間 (例えば、4 および 0.5 ~ 2 時間) にて、エフェクタータンパクおよび融合 FKB P タンパク : ラパマイシン複合体を含有する工程 9 の混合物を、アフィニティー樹脂と共にインキュベートする。

【0044】

11. 非特異的タンパクの結合を解離するが所望のタンパクおよび RAPA - FKB P 間の複合化を解離しない緩衝液、例えば緩衝剤 (例えば、20 ~ 50 mM トリスまたは HEPES, pH 7.2)、塩 (例えば、100 ~ 1000 mM NaCl、KCl)、還元剤 (例えば、1 ~ 2 mM 2-ME または 10 ~ 20 mM ジチオスレイトール)、プロテアーゼ阻害剤 (例えば、0.2 mM PMSF、5 µg/ml アプロチニン、ロイペプチン、ペプスタチン A および アンチペイン)、二価カチオン (例えば、0 ~ 5 mM CaCl<sub>2</sub>、0 ~ 5 mM MgCl<sub>2</sub>) および非特異的タンパクの結合を解離するが該 4 つのタンパクおよび RAPA - 融合 FKB P タンパク間の複合化を解離しない界面活性剤 (例えば、トリトン X 100 (ポリエチレングリコール 4 -イソオクチルフェニルエーテル)) を含有する緩衝液を用いて、ほとんどの非特異的タンパクを該樹脂から洗い流す。

【0045】

12. 該樹脂から該エフェクタータンパクおよび融合 FKB P タンパク : ラパマイシン複合体を、それを樹脂から解離するのに十分な界面活性剤を含有する緩衝液 (例えば、グリセロールまたは染料を含むまたは含まないラエムリ (Laemli) 緩衝液、ラエムリ (Laemli)、ネーチャー (Nature) 227:680, 1970) のような適当な緩衝液、またはグルタチオン、ヒスチジンのようなアフィニティーカラム用の適当な溶出化合物を用いて溶出させる。

【0046】

13. ついで、該エフェクタータンパクをサイズにより分離する。これは、ポリアクリルアミドゲル電気泳動およびサイズ排除カラムクロマトグラフィーを包含する (しかし、これに限定されるわけではない)、該タンパクをサイズにより分離するいずれの方法で行

10

20

30

40

50

ってもよい。

【0047】

また、工程8において、LAFにおいて $IC_{50} < 500 \text{ nM}$ であるラパマイシンまたはラパマイシンアナログを緩衝液に置換する方法である対照法により単離されたタンパクを比較することも有用であり得、ラパマイシン：FKBP複合体に結合するタンパクをより容易に識別するために使用することができる。

【0048】

また、本発明のタンパクは、当業者によく知られている組換えDNA技術により製造することができる。すなわち、タンパクを適当なエンドペプチダーゼ（例えば、リシンC）で消化することにより部分アミノ酸配列を得、得られたタンパク断片を小口径HPLCにより単離し、ついで断片を配列決定することにより、問題のタンパクの遺伝子をクローニングすることができる（マツダイラ（Matsudaira）、ア・プラクティカル・ガイド・ツー・プロテイン・アンド・ペプチド・ピュリフィケーション・フォー・マイクロシーケンシング（A Practical Guide to Protein and Peptide Purification for Microsequencing）、アカデミック・プレス（Academic Press）、サンジエゴ（San Diego）CA, 1989）。ついで、決定された配列を用いて、ヒトcDNAライブラリー（例えば、ヒトT細胞、モルト（Molt）4、ジュルカト（Jurkat）などについてのも）をスクリーニングするために使用することができるオリゴヌクレオチドプローブを作製しクローンを得ることができる（サムブルック（Sambrook）、フリッチュ（Fritsch）およびマニアタス（Maniatis）、モレキュラー・クローニング（Molecular Cloning）、ア・ラボラトリー・マニュアル（A Laboratory Manual）、コールド・スプリング・ハーバー・プレス（Cold Spring Harbor Press）1989）。タンパクの全遺伝子をクローニングするまで、これらのクローンを用いて追加的配列を含有する追加的クローンを同定することができる（サムブルック（Sambrook）、フリッチュ（Fritsch）およびマニアタス（Maniatis）、モレキュラー・クローニング（Molecular Cloning）、ア・ラボラトリー・マニュアル（A Laboratory Manual）、コールド・スプリング・ハーバー・プレス（Cold Spring Harbor Press）1989）。補足的な戦略においては、クローニングのためのトラップとしてFKBP12：RAPAを用いて、相互作用する酵母クローニング技術により遺伝子を同定してもよい（チエン（Chien）ら、プロシーディングズ・オブ・ナチュラール・アカデミック・サイエンシーズ（Proc. Natl. Acad. Sci.）88:9578-9582, 1991）。また、これらの戦略を組み合わせると該クローンの同定を速めてもよい。

【0049】

また、大腸菌、酵母またはバクテリオファグ感染細胞または哺乳動物細胞中、当該分野における発現ベクターを用いて、関連するcDNAクローンを発現させることもできる。単離は上記のとおりに行うことができ、あるいは該cDNAは単離において利点を与える融合相手（例えば、HISオリゴマー、免疫グロブリンFc、グルタチオンS-トランスフェラーゼなど）との融合タンパクとして作製することができる。また、可溶性を生じさせる突然変異は、特定部位の突然変異誘発により起こすことができ、単離における利点を与えるであろう。

【0050】

同様の手法を用いて、マウス、ラット、サル、イヌおよび他の哺乳動物種における相同体を得ることができる。さらに、該タンパクのヒトクローンの単離の際には、該クローンを用いて他の哺乳動物種における相同体についてスクリーニングすることができる。また、これらの相同体を用いて、免疫調節活性を有する化合物、内因性リガンド、外因性リガンドについて結合測定法を進め、ハイスループットスクリーニングアッセイ（high throughput screening assay）を行うことができる。

【0051】

かかる免疫調節活性を有する化合物、内因性リガンドおよび外因性リガンドは、免疫応答を調節するのに有用であり、従って腎臓、心臓、肝臓、肺、骨髄、脾臓（島細胞）、角膜、小腸および皮膚同種移植および心臓弁異種移植のような移植拒絶の治療または抑制に

；狼瘡、慢性関節リウマチ、糖尿病、重症筋無力症および多発性硬化症のような自己免疫疾患および乾癬、皮膚炎、湿疹、脂漏症、炎症性腸疾患および眼ブドウ膜炎のような炎症性疾患の治療または抑制に有用であり得る。

#### 【0052】

また、上記の化合物、内因性リガンドおよび外因性リガンドは、抗腫瘍、抗真菌活性および抗増殖活性を有する。従って、本発明の化合物は固形腫瘍、成人T細胞白血病/リンパ腫、真菌感染症および再発狭窄症およびアテローム性動脈硬化症のような過増殖血管疾患の治療にも有用であり得る。

#### 【発明の効果】

#### 【0053】

本発明によれば、免疫調節剤、抗再狭窄剤または抗腫瘍剤の同定、設計および合成のための新規な哺乳動物起源のラパマイシン-FKBP12結合タンパクなどが提供される。

#### 【実施例】

#### 【0054】

##### 実施例1

本発明のタンパクは、グルタチオン S-トランスフェラーゼ-FK506結合タンパク12 (GST-FKBP) の融合タンパクを利用して単離した。GST-FKBPは、プラスミド、pGEX-FKBPを含有する組換え大腸菌により生産される。該細胞を増殖させ、IPTGで誘導し、ディー・ビー・スミス (D.B. Smith) およびケイ・エス・ジョンソン (K.S. Johnson)、ジーン (Gene) 67,31,1988およびケイ・エル・グアン (K.L. Guan) およびジェイ・イー・ディクソン (J.E. Dixon)、アナリティカル・バイオケミストリー (Anal. Biochem.) 192,262,1991に記載の標準的な技術を用いて該融合タンパクを単離した。セントリコン10フィルトレーションユニット (Centricon 10 filtration unit) (アミコン (Amicon)) を用いてグルタチオンおよびGST-FKBP12を含有する溶液を5回交換してグルタチオンを除去し緩衝液を交換した。

#### 【0055】

標準培地 (100 U/ml ペニシリン、100 ug/ml L-グルタミン、10% FCS を含有する RPMI 1640) 中でモルト4細胞 ( $1 \times 10^9$ ) を増殖させた。該細胞を収穫し、PBS (50 mM リン酸緩衝液、pH 7.0、150 mM NaCl) で3回洗浄し、ドライアイス-エタノール浴中でフラッシュ凍結し、-80 で保存した。氷上、該細胞を解かし、B乳棒の付きダウンス (dounce) ホモジナイザーを用いて5 ml の緩衝液 A (10 mM ヘプス、pH 7.5、20 mM KCl、1 mM EDTA、0.4 mM PMSF および 2 mM 2-ME) 中で溶解した。1600 g で10分間遠心分離することにより破片を清澄化し、100,000 g 遠心分離 (1時間) により膜画分を濃縮した後、12 mM CHAPS を含有する 3 ml の緩衝液 B (50 mM トリス、pH 7.2、100 mM NaCl、20 mM KCl、0.2 mM PMSF、1 mM 2-ME、2 mM CaCl<sub>2</sub>、2 mM MgCl<sub>2</sub>、5 ug/ml アプロチニン、ロイペプチン、ペプスタチン A および アンチペイン) 中、4 で2時間、100,000 g ペレットをインキュベートした。該可溶性膜タンパクを100,000 g 遠心分離により該破片から分離した。緩衝液 B 中で膨潤させた 0.4 ml グルタチオンセファロース樹脂に上清を3~18時間前吸収させた後、4 で2時間、複合化ラパマイシン-GST-FKBP12 (緩衝液 B 中 4 にて 1~2時間、660 ug GST-FKBP + 60 ug RAPA をインキュベートすることにより行った) と共に上清をインキュベートした。ついで、該上清を100 ul グルタチオン樹脂 (1:1 緩衝液 B) と共に 4 で2時間インキュベートした。非特異的タンパクを緩衝液 C (緩衝液 B + 0.1% トリトン x 100) で5回洗浄し、95 で3分間インキュベートしミクロ遠心分離することにより、ラエムリ (Laemli) 緩衝液中樹脂から該タンパクを溶出した。該タンパクは、7% SDS-PAGE、ついで銀染色を用いてサイズにより分離した。210 kDa、208 kDa、148 kDa および 125 kDa の分子量のタンパクに相当する4つの帯が、RAPA + GST-FKBP12 (対 GST-FKBP 単独) を含有する試料中、より高濃度で存在した。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 5 6 】

L A F と称されるマイトジェン刺激胸腺細胞増殖検定は、ラパマイシンまたはデメトキシラパマイシンのようなアナログにより抑制され、免疫抑制におけるラパマイシンアナログの相対活性を示す。免疫抑制アナログであるデメトキシラパマイシン（表 1）と複合体化させた G S T - F K B P を用いて同一のタンパクを単離した。ディールスアルダー付加体は F K B P 1 2 に結合し F K B P 1 2 の P P I アーゼ活性を阻害したが、検出可能な免疫抑制活性を示さず、従ってラパマイシンの標的に結合しない。類似の単離方法（すなわちラパマイシン：G S T - F K B P 1 2 を置換する）において G S T - F K B P 1 2 と複合体化しているこれらの 2 個の化合物を用いることにより、2 1 0 k D a タンパクのバックグラウンド値が得られた（ラパマイシン無し）（表 1）。F K 5 0 6 は、F K B P に結合し

10

## 【 0 0 5 7 】

## 【表 1】

ラパマイシンアナログ—F K B P 1 2 複合体の 2 1 0 k D a タンパクへの結合比較

| 化合物                      | 2 1 0 k D a | L A F        | P P l a s e (K i) |
|--------------------------|-------------|--------------|-------------------|
| R A P A                  | +++         | 6 nM         | 0. 1 2 nM         |
| デメトキシラパマイシン              | +++         | 5 8 nM       | 4. 4 nM           |
| ディールス—アルダー<br>アダクツ（フェニル） | ±           | > 1 0 0 0 nM | 1 2 nM            |
| ディールス—アルダー<br>アダクツ（メチル）  | ±           | > 1 0 0 0 nM | 1 2 nM            |
| F K 5 0 6                | ±           | 3 nM*        | 0. 4 nM           |
| 無（F K B P）               | ±           |              |                   |

20

（\* 作用機構が異なる）

30

## 【 0 0 5 8 】

ラパマイシンがその効果を媒介するためには多種の F K B P と結合しなければならないことが知られている。本発明のタンパクが R A P A - G S T - F K B P 複合体に結合し、ラパマイシンまたは F K B P 1 2 の個々に結合しないことを実証するために、単離修飾操作を用いた。その修飾操作は、（ 1 ）ラパマイシンの代わりにラパマイシン - 4 2 - ビオチングリシナートエステル（両方共、L A F 検定にて等しい免疫抑制活性を示す）、（ 2 ）非外因性 F K B P および（ 3 ）グルタチオン - 樹脂の代わりにストレパタビジン - 複合樹脂を用いることからなる。バックグラウンドレベルの 2 1 0 k D a タンパクだけをこの修飾単離操作を用いて単離した。

40

## 【 0 0 5 9 】

2 1 0 k D a タンパクを、G S T -- F K B P 1 2 --ラパマイシン複合体を用い、B J A B 細胞（B 細胞リンパ腫）ならびにフィコール・ハイパック（Ficoll-Hypaque）および T 細胞カラムを介して精製された正常なヒト T リンパ球から単離した。

## 【 0 0 6 0 】

部分アミノ酸組成物の分析結果を以下の表 2 に示す。塩基性アミノ酸の割合は測定しなかった。

## 【 0 0 6 1 】

【表 2】

| ピーク<br>番号 | 成分名     | 保持時間  | ピーク<br>面積 | 応答因子    | ピーク高    | 濃度値/<br>50 $\mu$ l |
|-----------|---------|-------|-----------|---------|---------|--------------------|
|           |         | 9.38  |           |         |         |                    |
|           |         | 11.09 |           |         |         |                    |
| 1         | Asp/Asn | 12.06 | 12.47076  | 0.02344 | 0.05142 | 0.30               |
| 2         | Thr     | 13.05 | 2.92898   | 0.00000 | 0.00985 | 0.068              |
| 3         | Ser     | 13.78 | 6.43968   | 0.00000 | 0.01995 | 0.15               |
|           |         | 15.68 |           |         |         |                    |
| 4         | Glu/Gln | 16.87 | 25.47273  | 0.00000 | 0.05285 | 0.59               |
|           | Prp     | 18.24 |           |         |         | 0.14               |
| 5         | Gly     | 22.35 | 21.50384  | 0.00000 | 0.04645 | 0.44               |
|           |         | 22.90 |           |         |         |                    |
| 6         | Ala     | 23.73 | 16.69160  | 0.00000 | 0.03113 | 0.36               |
|           |         | 26.06 |           |         |         |                    |
|           |         | 28.81 |           |         |         |                    |
| 7         | Val     | 29.39 | 4.83196   | 0.00000 | 0.00605 | 0.11               |
|           | Met     | 32.28 |           |         |         |                    |
| 8         | Ile     | 34.10 | 3.00560   | 0.2326  | 0.00782 | 0.0699             |
| 9         | Leu     | 35.09 | 5.73202   | 0.02331 | 0.01372 | 0.1383             |
| 10        | nLeu    | 36.27 | 20.48232  | 0.02174 | 0.04286 | 0.4453             |
| 11        | Tyr     | 38.33 | 1.44792   | 0.02618 | 0.00226 | 0.0379             |
| 12        | Phe     | 40.05 | 1.25017   | 0.02703 | 0.00187 | 0.0338             |
| 13        | His     | 47.79 | 1.50905   | 0.02553 | 0.00580 | 0.0385             |
| 14        |         | 51.80 | 12.66136  | 0.00000 | 0.01960 | 0.0000             |
| 15        | Lys     | 53.34 | 9.90767   | 0.02283 | 0.02274 | 0.2262             |
| 合計        |         |       | 146.53645 |         | 0.33436 |                    |
| 測定せず      |         |       | 144.29    |         |         |                    |

10

20

30

40

50

## 【0062】

## 実施例 2

本発明の 210 kDa (210  $\pm$  20 kDa) タンパクを、前記のように、アフィニティーマトリックス操作を用い、4  $\times$  10<sup>11</sup> 個のモルト (Molt) 4 細胞から単離した。結合タンパクをグリセロールおよび色素不含の 1  $\times$  ラエムリ (Laemli) 緩衝液 (0.0625 M トリス-HCl、pH 6.8、2% SDS、0.37 M  $\beta$ -メルカプトエタノール) でアフィニティーマトリックスから溶出し、セントリコン (centricon) 100 (マサチューセッツ州、ビバリー、アミコン (Amicon)) を用いる遠心分離操作により 3 回連続して、最初の 2 回は 4 で、3 回目は 18 で濃縮した。濃縮試料は、最初の 2 回はグリセロールおよび色素不含の等容量の 2  $\times$  ラエムリ緩衝液で、3 回目は等容量の 2  $\times$  ラエムリ緩衝液で、室温で 2 時間インキュベートすることにより、セントリコン 100 フィルターより溶出した。試料中のタンパクを 1.5 mm 厚の 7% ポリアクリルアミドゲル (38:1) の PAGE により分離した。該タンパクを、4 で一夜、50 mA で 0.037% SDS 含有の 10  $\times$  トリス/グリシン緩衝液 (カリフォルニア州、ハーキュレス、バイオラッド (Biorad)) 中のポリビニリジン ジフルオリド、PVD F (バイオラッド) に移動させた。PVD F 上のタンパクを、10% エタノール、2% 酢酸中、アミドブラック (バイオラッド) で染色し、適当なバンドを取り出し、PBS および水でリンスし、凍結貯蔵し

た。

【0063】

配列決定操作

P V D F 膜上のタンパク (約 3  $\mu$ g) を、ジェイ・フェルナンデス (J. Fernandez) らがアナリティカル・バイオケミストリー (Anal. Biochem.) 201:255-64, 1992 に記載する変法を用い、トリプシンでその場で消化した。簡単には、湿らす前に、P V D F を 1 mm<sup>2</sup> の断片に切断し、該タンパクを 37 で 6 時間、0.2  $\mu$ g トリプシンを含む 10% アセトニトリル、および 1% 還元トリトン (カルバイオケム (CalBiochem)) 含有の 100 mM トリス-HCl, pH 緩衝液中に消化し、つづいて 0.2  $\mu$ g のトリプシンを加え、一夜インキュベートした。フラグメントを音波処理で該膜より溶出し、該フラグメント含有の緩衝液をマイクロフュージ遠心分離操作により分離した。該膜を 2  $\times$  逆抽出した (すなわち、50  $\mu$ l の緩衝液を膜に加え、音波処理し、マイクロフュージにて遠心分離に付し、溶液を溶出フラグメント含有の原緩衝液と一緒にプールした)。試料 (140-145  $\mu$ l) を、ダブリュ・レーン (W. Lane) らがジャーナル・オブ・プロテイン・ケミストリー (J. Protein Chem.), 10(2):151-60, 1991 にて前記するように、40 ダイオードアレイ検出器を備えたフューレット・パッカー (Hewlett Packard) HPLC 1090 上のバイダック (Vydac) C18 2.1 mm  $\times$  150 mm 逆相カラムを用いる細孔高性能液体クロマトグラフィーにより分離した。複数のフラクションを収集し、複数の波長 (210、277 および 292 nm) で吸収について測定した。分解、シンメトリーおよび紫外線吸収およびスペクトル (210 nm、277 nm および 292 nm) に基づき、配列決定 20 についての最適フラクションを選択した。最適フラクションのアリコート (5%) を、フィニガン・レーザーマット (Finnigan Lasermat) 上の、マトリックス・アシステッド・レーザー・デソープション・タイム・オブ・フライト・マス・スペクトロメトリー、MALDE-TOF-MS により、フラグメントの均一性および長さについて分析した。選択した最適フラクションを、マイクロカートリッジおよび製造者が推奨するケミストリーサイクルを用い、アブライド・バイオシステム 477A タンパクシーケンサー上の自動エドマン (Edman) デグラデーションにより配列決定した。

【0064】

配列比較

インテリジェネティックス・スーツ (カリフォルニア州、インテリジェネティックス) 30 を用いて比較した。

【0065】

配列

前記方法を用い、本発明の 210 kDa (210  $\pm$  20 kDa) タンパクがペプチドフラグメントを含有し、そのうちの 4 個が以下に示すアミノ酸配列を有すると決定した:

- a) I L L N I E H R ;
- b) L I R P Y M E P I L K ;
- c) D X M E A Q E ; および
- d) Q L D H P L P T V H P Q V T Y A Y M ( K )

【0066】

当業者であれば、当該アミノ酸についての一文字記号が解るであろう (その定義はまた、ラバート・ストライヤー (Lubert Stryer) によるダブリュ・エッチ・フリーマン・アンド・カンパニー (W.H. Freeman and Company) 1988、ザ・テキスト・バイオケミストリー (the text Biochemistry) 第 3 版の 21 頁に記載されている)。当業者であればさらに、配列 c) における X が今だ未同定アミノ酸を示唆し、配列 d) 中の括弧はその位置にあるアミノ酸がおそらくリジンであることを示唆することがわかるであろう。

【0067】

前記したように、本発明は本明細書に記載のタンパクの断片形または切形を包含する。これは、前記 a) ~ d) に挙げた 4 個のうち 1 またはそれ以上の配列をそのアミノ酸配列の一部または全部として有するタンパクを包含する。後に示す請求の範囲のために、1 ま 50

たはそれ以上の「内部アミノ酸配列」を包含すると称されるタンパクは、該タンパクが全体として1またはそれ以上の配列 a) ~ d) からなるとしても、または前記した1またはそれ以上の配列が該タンパクのいずれかの部分を形成するとしても、前記した配列の一つを含有するいずれかのタンパクであると理解される。これは、限定されるものではないが、タンパクのアミノ酸連鎖を開始および停止するタンパクのセクションを包含するタンパクのアミノ酸配列上のすべての位置を包含すると解される。

## 【0068】

これらの部分アミノ酸配列を遺伝子銀行のデータベースにおける配列と比較した。受入番号 L 3 4 0 7 5 (ブラウン (Brown) ら、ネイチャー (Nature) 3 6 9, 7 5 6 - 7 5 8 (1 9 9 4)) と配列が同じであった。S E P 遺伝子の c D N A を以下のようにクローンした: 1 単位の T a q ポリメラーゼ (パーキン・エルマー (Perkin Elmer) を有する 1 × P C R 緩衝液 (1 0 m M トリス-H C l、p H 8 . 3、5 0 m M K C l、1 m M M g C l、2 0 0 μ M d A T P、2 0 0 μ M d T T P、2 0 0 μ M d C T P、2 0 0 μ M d G T P; パーキン・エルマー) 中、2 μ g のモルト (Molt) 4 c D N A (カリフォルニア州、パロアルト、クロンテク (Clontech)) を、次のオリゴマー対の1つを含有する3つの別々の反応により、9 4 で 3 0 秒間、3 0 サイクルについて 6 6 で 4 分間、7 2 で 1 0 分間、ポリメラーゼ連鎖反応 (P C R) により増幅した:

## 【0069】

## 【化1】

CGATCGGTCGACTGCGAGCACTTTGGGGATTGTGCTCTC および  
GCGGCCGCGAGCTTTCTTCATGCATGACAACAGCCCAGGC; または  
GCGGCCGCAAGCTTCAAGTATGCAAGCCTGTGCGGCAAGA および  
CGATCGGTCGACACCTTCTGCATCAGAGTCAAGTGGTCA; または  
GCGGCCGCAAGCTTCTCAGCTCACATCCTTAGAGCTGCA および  
CGATCGGTCGACTTATTACCAGAAAAGGGCACCAGCCAATATA

## 【0070】

オリゴヌクレオチドを以前に記載されている方法であって、当該分野における公知方法により合成し、単離した (ケミカル・アンド・エンザイマティック・シンセシス・オブ・ジン・フラグメント (Chemical and Enzymatic Synthesis of Gene Fragments)、エッチ・ジー・ガッシンおよびアン・ラング (H.G. Gassin および Anne Lang), ベルラグ・ケミー (Verlag Chemie), F L A, 1982)。各々、S E P 3、S E P 4 および S E P 5 と命名した P C R 生成物を、T 4 D N A リガーゼ (1 単位) および P C R 生成物を効果的に連結するように修飾された 5 0 n g の p c l l (カリフォルニア州、サンディエゴ、インビトロゲン、T A クローニングキット) 含有の緩衝液中、1 5 で一夜インキュベートし、P C R - p c l l 生成物を得た。P C R - p c l l 生成物をインビトロゲンから入手可能なコンピテント・イー・コリ・I N V F 細胞に形質転換した。ミニプレブ (miniprep) D N A をキアゲン・ミニプレブ・キット (カリフォルニア州、チャトスワース、キアゲン (Quiagen)) を用いて調製し、適当な大きさの生成物含有のクローンを、市販されている H i n d I I I または S a l I での制限酵素消化、電気泳動、および標品との比較により同定した。S e p 1 および S e p 1 の c D N A を、オリゴ d T (0 . 1 3 μ g) および、各々、2 5 0 ピコモルの

## 【化2】

CGATCGGTCGACCAAGATGAGCACATCATAGCGCTGATGA または  
CGATCGGTCGACAAATTCAAAGCTGCCAAGCGTTCGGAG

を含有する第一の鎖合成反応で、タイム・セイバー・c D N A ・シンセシス・キット (Time Saver cDNA synthesis kit) (ニュージャージー州、ピスカタウェイ、ファーマシア (Pharmacia)) を用いて製造した。S e p 2 および S e p 1 の第二の鎖合成は、各々、2 5 0 ピコモルの

## 【化3】

GCGGCCGCAAGCTTTGGCTCGAGCAATGGGGCCAGGCAまたは  
GCGGCCGCAAGCTTAAGATGCTTGAACCGCACCTGCCG

を添加してタイム・セイバー・cDNA・シンセシス・キットを用いて行った。ついで、そのSep 2およびSep 1 cDNAを、前記したように、各々、

## 【化4】

CGATCGGTCGACCAAGCTTTGGCTCGAGCAATGGGGCCAGGCAおよび  
GCGGCCGCAAGCTTTGGCTCGAGCAATGGGGCCAGGCAまたは  
GCGGCCGCAAGCTTAAGATGCTTGAACCGCACCTGCCGおよび  
CGATCGGTCGACAAATTCAAAGCTGCCAAGCGTTCGGAG,

を用いるPCRにより増幅した。Sep 2 PCR生成物をTAクローニングキット（インビトロゲン）を用いてpcIIにクローンした。Sep 1 PCR生成物をHindIIIおよびSalIで消化し、アガロース電気泳動によりpcIIベクターより分離した。Sep 1（HindIII-SalI）フラグメントをファーマシア市販のセファグラス（Sephaglas）バンドプロブ・キットを用いて単離し、記載されているように、pUC19のHindIIIおよびSalI部位にクローンした（サムブロック（Sambrook）ら、モレキュラー・クローニング・コールド・スプリング・ハーバー（Molecular Cloning Cold Spring Harbor），1989）。単離したSep 2（HindIII、AspI）とSep 3（AspI、SalI）フラグメントまたはSep 4（HindIII、AccII/MroI）とSep 5（AccIII/MroI、SalI）フラグメントのpUC18（HindIII、SalI）ベクターへの連結およびコンピテント・イー・コリ・INV細胞（インビトロゲン）の形質転換を、当業者に公知の技術（サムブロックら、モレキュラー・クローニング・コールド・スプリング・ハーバー，1989）を介して行い、pUC18-Sep 23およびpUC18-Sep 45を得た。それは、各々、添付した配列番号1に示される全長クローンのヌクレオチド1468-5326および4964-7653を含有する。pUC19-Sep 1（EcoRV、SalI）、Sep 23（EcoRV、BstEII）およびSep 45（BstEII、SalI）フラグメントの連結およびコンピテント・イー・コリ・INV F細胞（インビトロゲン）の形質転換は、当該分野における当業者に公知の方法（サムブロックら、モレキュラー・クローニング・コールド・スプリング・ハーバー，1989）により行い、全長クローンを得ることができる。このタンパクをコードする核酸配列を配列番号1に示す。

## 【0071】

グルタチオンSトランスフェラーゼ-シロリマスエフェクタータンパク、GST-SEP、と称される縮合タンパクは、以下に示すように、Sep 4およびSep 5フラグメントをプラスミド、pGEX-KG（グアン・ケイおよびジキソン・ジェイ・イー（Guan, K.およびDixon, J.E.）（1991）アナリティカル・バイオケミストリー（Anal. Biochem.）192,262-267）にサブクローンすることにより操作した。簡単には、Sep 4を市販のHindIII制限酵素で消化し、その制限部位をDNAポリメラーゼのクレノーフラグメント（ギブコ（Gibco））で満たし、DNAをフェノール-クロロホルムおよびエタノールで抽出し、当該分野における当業者に公知の技法を用いて沈降させた（サムブロックら、モレキュラー・クローニング・コールド・スプリング・ハーバー，1989）。SEP 4（HindIII-クレノー）をさらにMroI制限酵素で消化し、アガロース電気泳動によりpcIIベクターより単離し、SEP 4-HindIII-クレノー-MroIフラグメントとして単離した。Sep 5フラグメントをSalIおよびMroIで消化し、アガロース電気泳動によりpcIIベクターから単離し、SEP 5-SalI-MroIとして単離することにより製造した。pGEX-KG（グアン・ケイおよびジキソン・ジェイ・イー（Guan, K.およびDixon, J.E.）（1991）アナリティカル・バイオケミストリー192,262-2679）をNcoIで消化し、DNAポリメラーゼのクレノーフラグメントで満たし、DNAをフェノール-クロロホルムおよびエタノールで抽出し、当該分野における公知技術を用いて沈降させた（サムブロックら、モレキュラー・クローニング・コールド・スプリング・ハーバー，1989）。pGEX-KG（NcoI、クレノー）をさらにSalIで消化し、アガロース電気泳動により未消化ベクタ

10

20

30

40

50

ーより分離し、当該分野における公知操作を用いて、ベクター p G E X - K G - N c o I - クレノー - S a l I とし単離した。当該分野における公知操作を用いて、該ベクター、 p G E X - K G - N c o I - クレノー - S a l I と S e p 4 ( H i n d I I I , M r o I ) および S e p 5 ( M r o I , S a l I ) フラグメントの連結ならびにイー・コリ株 I N V F 細胞 ( インピトロゲン ) への形質転換によりプラスミド、 p G E X - S e p 4 5 を得た。この縮合タンパクの D N A およびタンパク配列を配列番号 2 に示す。

【 0 0 7 2 】

フラグ ( flag ) 配列を、 A s p T y r L y s A s p A s p A s p A s p L y s についてのコーディング配列からなるオリゴヌクレオチドを用い、 S E P 範囲内のアミノ酸末端で、または S E P 、 S E P 4 、 5 もしくは他のフラグメントのカルボキシ末端で加えることができる。縮合タンパクは、コネチカット州、ニューヘーブンの I B I から市販されているキットを用い、抗-フラグ特異的抗体を用いるアフィニティークロマトグラフィーにより単離できる。

10

【 0 0 7 3 】

配列番号 1 に示すような、 p U C 1 9 - S e p 1 ( E c o R V , S a l I ) 、 S e p 2 3 ( E c o R V , B s t E I I ) および S e p 4 5 ( B s t E I I , S a l I ) フラグメントを含有する形質転換宿主細胞はまた、アメリカ合衆国、メリーランド 2 0 8 5 2 、ロックビル、パークラウン・ドライブ・1 2 3 0 1 番のジ・アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション ( A T C C ) に寄託され、すでに A T C C 名称が与えられている。

【 0 0 7 4 】

20

実施例 3

本発明の 2 1 0 k D a タンパクはまた、次のラパマイシンアナログを用い、実施例 1 に記載の操作により単離できる：

a ) 4 2 - デオキシ - 4 2 - [ 1 - ( 1 , 1 - ジメチルエトキシ ) - 2 - オキソエトキシ ] ラパマイシン ( 米国特許第 5, 233, 036 号に記載 ) ；

b ) 4 2 - [ O - ( 1 , 1 - ジメチルエチル ) ジメチルシリル ] ラパマイシン ( 米国特許第 5, 12 0, 842 号に記載 ) ；

c ) N - [ 1 , 1 - ジメチルエトキシ ] カルボニル ] - N - メチルグリシンとのラパマイシン 4 2 - エステル ( 米国特許第 5, 130, 307 号に記載 ) ；

d ) 5 - [ 1 , 1 - ジメチルエトキシ ] - 2 - [ [ ( 1 , 1 - ジメチルエトキシ ) カルボニル ] アミノ ] - 5 N - オキソペンタン酸酢酸エチル溶媒和物 3 / 4 水和物とのラパマイシン 4 2 - エステル ( 米国特許第 5, 130, 307 号参照 ) ；

30

e ) N - [ 1 , 1 - ジメチルエトキシ ] カルボニル ] グリシルグリシンとのラパマイシン 4 2 - エステル ( 米国特許第 5, 130, 307 号参照 ) ；

f ) N 2 , N 6 - ビス [ ( 1 , 1 - ジメチルエトキシ ) カルボニル ] - L - リジンとのラパマイシン 4 2 - エステル ( 米国特許第 5, 130, 307 号参照 ) ；

【 0 0 7 5 】

[ 配列表 ]

配列番号： 1

配列の長さ： 7 6 5 3

40

配列の型： 核酸

鎖の数： 二本鎖

トポロジー： 直鎖状

配列の種類： c D N A t o m R N A

ハイボセティカル配列： N o

アンチセンス： N o

起源

生物名： モルト 4 ヒト T 細胞白血病細胞

株名： A T C C C R L 1 5 8 2 株

配列：

50

|   |     |    |
|---|-----|----|
| AAG ATG CTT GGA ACC GGA CCT GCC GCC GCC ACC ACC GCT GCC ACC ACA | 48  |    |
| Met Leu Gly Thr Gly Pro Ala Ala Ala Thr Thr Ala Ala Thr Thr     |     |    |
| 1 5 10 15   |     |    |
| TCT AGC AAT GTG AGC GTC CTG CAG CAG TTT GCC AGT GGC CTA AAG AGC | 96  |    |
| Ser Ser Asn Val Ser Val Leu Gln Gln Phe Ala Ser Gly Leu Lys Ser |     |    |
| 20 25 30  |     |    |
| CGG AAT GAG GAA ACC AGG GCC AAA GCC GCC AAG GAG CTC CAG CAC TAT | 144 | 10 |
| Arg Asn Glu Glu Thr Arg Ala Lys Ala Ala Lys Glu Leu Gln His Tyr |     |    |
| 35 40 45  |     |    |
| GTC ACC ATG GAA CTC CGA GAG ATG AGT CAA GAG GAG TCT ACT CGC TTC | 192 |    |
| Val Thr MET Glu Leu Arg Glu MET Ser Gln Glu Glu Ser Thr Arg Phe |     |    |
| 50 55 60  |     |    |
| TAT GAC CAA CTG AAC CAT CAC ATT TTT GAA TTG GTT TCC AGC TCA GAT | 240 |    |
| Tyr Asp Gln Leu Asn His His Ile Phe Glu Leu Val Ser Ser Ser Asp |     | 20 |
| 65 70 75  |     |    |
| GCC AAT GAG AGG AAA GGT GGC ATC TTG GCC ATA GCT AGC CTC ATA GGA | 288 |    |
| Ala Asn Glu Arg Lys Gly Gly Ile Leu Ala Ile Ala Ser Leu Ile Gly |     |    |
| 80 85 90 95   |     |    |
| GTG GAA GGT GGG AAT GCC ACC CGA ATT GGC AGA TTT GCC AAC TAT CTT | 336 |    |
| Val Glu Gly Gly Asn Ala Thr Arg Ile Gly Arg Phe Ala Asn Tyr Leu |     |    |
| 100 105 110   |     |    |
| CGG AAC CTC CTC CCC TCC AAT GAC CCA GTT GTC ATG GAA ATG GCA TCC | 384 | 30 |
| Arg Asn Leu Leu Pro Ser Asn Asp Pro Val Val MET Glu MET Ala Ser |     |    |
| 115 120 125   |     |    |
| AAG GCC ATT GGC CGT CTT GCC ATG GCA GGG GAC ACT TTT ACC GCT GAG | 432 |    |
| Lys Ala Ile Gly Arg Leu Ala MET Ala Gly Asp Thr Phe Thr Ala Glu |     |    |
| 130 135 140   |     |    |
| TAC GTG GAA TTT GAG GTG AAG CGA GCC CTG GAA TGG CTG GGT GCT GAC | 480 |    |
| Tyr Val Glu Phe Glu Val Lys Arg Ala Leu Glu Trp Leu Gly Ala Asp |     | 40 |
| 145 150 155   |     |    |
| CGC AAT GAG GGC CGG AGA CAT GCA GCT GTC CTG GTT CTC CGT GAG CTG | 528 |    |
| Arg Asn Glu Gly Arg Arg His Ala Ala Val Leu Val Leu Arg Glu Leu |     |    |
| 160 165 170 175   |     |    |
| GCC ATC AGC GTC CCT ACC TTC TTC TTC CAG CAA GTG CAA CCC TTC TTT | 576 |    |
| Ala Ile Ser Val Pro Thr Phe Phe Phe Gln Gln Val Gln Pro Phe Phe |     |    |
| 180 185 190   |     |    |
| GAC AAC ATT TTT GTG GCC GTG TGG GAC CCC AAA CAG GCC ATC CGT GAG | 624 | 50 |



|   |      |     |
|---|------|-----|
| GCT GCA TTC CGA CCT TCT GCC TTC ACA GAT ACC CAG TAT CTC CAA GAT | 1248 |     |
| Ala Ala Phe Arg Pro Ser Ala Phe Thr Asp Thr Gln Tyr Leu Gln Asp |      |     |
| 400   | 405  | 410 |
| 415   |      |     |
| ACC ATG AAC CAT GCC CTA AGC TGT GTC AAG AAG GAG AAG GAA CGT ACA | 1296 |     |
| Thr MET Asn His Ala Leu Ser Cys Val Lys Lys Glu Lys Glu Arg Thr |      |     |
|   | 420  | 425 |
|   |      | 430 |
| GCG GCC TTC CAA GCC CTG GGG CTA CTT TCT GTG GCT GTG AGG TCT GAG | 1344 | 10  |
| Ala Ala Phe Gln Ala Leu Gly Leu Leu Ser Val Ala Val Arg Ser Glu |      |     |
|   | 435  | 440 |
|   |      | 445 |
| TTT AAG GTC TAT TTG CCT CGC GTG CTG GAC ATC ATC CGA GCG GCC CTG | 1392 |     |
| Phe Lys Val Tyr Leu Pro Arg Val Leu Asp Ile Ile Arg Ala Ala Leu |      |     |
|   | 450  | 455 |
|   |      | 460 |
| CCC CCA AAG GAC TTC GCC CAT AAG AGG CAG AAG GCA ATG CAG GTG GAC | 1440 |     |
| Pro Pro Lys Asp Phe Ala His Lys Arg Gln Lys Ala MET Gln Val Asp |      |     |
|   | 465  | 470 |
|   |      | 475 |
| 480   |      |     |
| GCC ACA GTC TTC ACT TGC ATC AGC ATG CTG GCT CGA GCA ATG GGG CCA | 1488 |     |
| Ala Thr Val Phe Thr Cys Ile Ser MET Leu Ala Arg Ala MET Gly Pro |      |     |
|   | 485  | 490 |
|   |      | 495 |
| GGC ATC CAG CAG GAT ATC AAG GAG CTG CTG GAG CCC ATG CTG GCA GTG | 1536 |     |
| Gly Ile Gln Gln Asp Ile Lys Glu Leu Leu Glu Pro MET Leu Ala Val |      |     |
|   | 500  | 505 |
|   |      | 510 |
| GGA CTA AGC CCT GCC CTC ACT GCA GTG CTC TAC GAC CTG AGC CGT CAG | 1584 | 30  |
| Gly Leu Ser Pro Ala Leu Thr Ala Val Leu Tyr Asp Leu Ser Arg Gln |      |     |
|   | 515  | 520 |
|   |      | 525 |
| ATT CCA CAG CTA AAG AAG GAC ATT CAA GAT GGG CTA CTG AAA ATG CTG | 1632 |     |
| Ile Pro Gln Leu Lys Lys Asp Ile Gln Asp Gly Leu Leu Lys MET Leu |      |     |
|   | 530  | 535 |
|   |      | 540 |
| TCC CTG GTC CTT ATG CAC AAA CCC CTT CGC CAC CCA GGC ATG CCC AAG | 1680 |     |
| Ser Leu Val Leu MET His Lys Pro Leu Arg His Pro Gly MET Pro Lys |      |     |
|   | 545  | 550 |
|   |      | 555 |
| 40  |      |     |
| GGC CTG GCC CAT CAG CTG GCC TCT CCT GGC CTC ACG ACC CTC CCT GAG | 1728 |     |
| Gly Leu Ala His Gln Leu Ala Ser Pro Gly Leu Thr Thr Leu Pro Glu |      |     |
|   | 560  | 565 |
|   |      | 570 |
|   |      | 575 |
| GCC AGC GAT GTG GGC AGC ATC ACT CTT GCC CTC CGA ACG CTT GGC AGC | 1776 |     |
| Ala Ser Asp Val Gly Ser Ile Thr Leu Ala Leu Arg Thr Leu Gly Ser |      |     |
|   | 580  | 585 |
|   |      | 590 |
| TTT GAA TTT GAA GGC CAC TCT CTG ACC CAA TTT GTT CGC CAC TGT GCG | 1824 | 50  |



|   |      |     |
|---|------|-----|
| GCA ACA ATA GGA GAA TTG GCA CAG GTT AGT GGC CTG GAA ATG AGG AAA | 2448 |     |
| Ala Thr Ile Gly Glu Leu Ala Gln Val Ser Gly Leu Glu MET Arg Lys |      |     |
| 800   | 805  | 810 |
| 815   |      |     |
| TGG GTT GAT GAA CTT TTT ATT ATC ATC ATG GAC ATG CTC CAG GAT TCC | 2496 |     |
| Trp Val Asp Glu Leu Phe Ile Ile Ile MET Asp MET Leu Gln Asp Ser |      |     |
|   | 820  | 825 |
|   |      | 830 |
| TCT TTG TTG GCC AAA AGG CAG GTG GCT CTG TGG ACC CTG GGA CAG TTG | 2544 | 10  |
| Ser Leu Leu Ala Lys Arg Gln Val Ala Leu Trp Thr Leu Gly Gln Leu |      |     |
|   | 835  | 840 |
|   |      | 845 |
| GTG GCC AGC ACT GGC TAT GTA GTA GAG CCC TAC AGG AAG TAC CCT ACT | 2592 |     |
| Val Ala Ser Thr Gly Tyr Val Val Glu Pro Tyr Arg Lys Tyr Pro Thr |      |     |
|   | 850  | 855 |
|   |      | 860 |
| TTG CTT GAG GTG CTA CTG AAT TTT CTG AAG ACT GAG CAG AAC CAG GGT | 2640 |     |
| Leu Leu Glu Val Leu Leu Asn Phe Leu Lys Thr Glu Gln Asn Gln Gly |      |     |
|   | 865  | 870 |
|   |      | 875 |
| ACA CGC AGA GAG GCC ATC CGT GTG TTA GGG CTT TTA GGG GCT TTG GAT | 2688 |     |
| Thr Arg Arg Glu Ala Ile Arg Val Leu Gly Leu Leu Gly Ala Leu Asp |      |     |
| 880   | 885  | 890 |
|   |      | 895 |
| CCT TAC AAG CAC AAA GTG AAC ATT GGC ATG ATA GAC CAG TCC CGG GAT | 2736 |     |
| Pro Tyr Lys His Lys Val Asn Ile Gly MET Ile Asp Gln Ser Arg Asp |      |     |
|   | 900  | 905 |
|   |      | 910 |
| GCC TCT GCT GTC AGC CTG TCA GAA TCC AAG TCA AGT CAG GAT TCC TCT | 2784 | 30  |
| Ala Ser Ala Val Ser Leu Ser Glu Ser Lys Ser Ser Gln Asp Ser Ser |      |     |
|   | 915  | 920 |
|   |      | 925 |
| GAC TAT AGC ACT AGT GAA ATG CTG GTC AAC ATG GGA AAC TTG CCT CTG | 2832 |     |
| Asp Tyr Ser Thr Ser Glu MET Leu Val Asn MET Gly Asn Leu Pro Leu |      |     |
|   | 930  | 935 |
|   |      | 940 |
| GAT GAG TTC TAC CCA GCT GTG TCC ATG GTG GCC CTG ATG CGG ATC TTC | 2880 |     |
| Asp Glu Phe Tyr Pro Ala Val Ser MET Val Ala Leu MET Arg Ile Phe |      |     |
|   | 945  | 950 |
|   |      | 955 |
| CGA GAC CAG TCA CTC TCT CAT CAT CAC ACC ATG GTT GTC CAG GCC ATC | 2928 |     |
| Arg Asp Gln Ser Leu Ser His His His Thr MET Val Val Gln Ala Ile |      |     |
| 960   | 965  | 970 |
|   |      | 975 |
| ACC TTC ATC TTC AAG TCC CTG GGA CTC AAA TGT GTG CAG TTC CTG CCC | 2976 |     |
| Thr Phe Ile Phe Lys Ser Leu Gly Leu Lys Cys Val Gln Phe Leu Pro |      |     |
|   | 980  | 985 |
|   |      | 990 |
| CAG GTC ATG CCC ACG TTC CTT AAT GTC ATT CGA GTC TGT GAT GGG GCC | 3024 | 50  |

|   |      |      |
|---|------|------|
| Gln Val MET Pro Thr Phe Leu Asn Val Ile Arg Val Cys Asp Gly Ala |      |      |
| 995   | 1000 | 1005 |
| ATC CGG GAA TTT TTG TTC CAG CAG CTG GGA ATG TTG GTG TCC TTT GTG | 3072 |      |
| Ile Arg Glu Phe Leu Phe Gln Gln Leu Gly MET Leu Val Ser Phe Val |      |      |
| 1010  | 1015 | 1020 |
| AAG AGC CAC ATC AGA CCT TAT ATG GAT GAA ATA GTC ACC CTC ATG AGA | 3120 |      |
| Lys Ser His Ile Arg Pro Tyr MET Asp Glu Ile Val Thr Leu MET Arg |      |      |
| 1025  | 1030 | 1035 |
| GAA TTC TGG GTC ATG AAC ACC TCA ATT CAG AGC ACG ATC ATT CTT CTC | 3168 |      |
| Glu Phe Trp Val MET Asn Thr Ser Ile Gln Ser Thr Ile Ile Leu Leu |      |      |
| 1040  | 1045 | 1050 |
| 1055  |      |      |
| ATT GAG CAA ATT GTG GTA GCT CTT GGG GGT GAA TTT AAG CTC TAC CTG | 3216 |      |
| Ile Glu Gln Ile Val Val Ala Leu Gly Gly Glu Phe Lys Leu Tyr Leu |      |      |
| 1060  | 1065 | 1070 |
| CCC CAG CTG ATC CCA CAC ATG CTG CGT GTC TTC ATG CAT GAC AAC AGC | 3264 |      |
| Pro Gln Leu Ile Pro His MET Leu Arg Val Phe MET His Asp Asn Ser |      |      |
| 1075  | 1080 | 1085 |
| CCA GGC CGC ATT GTC TCT ATC AAG TTA CTG GCT GCA ATC CAG CTG TTT | 3312 |      |
| Pro Gly Arg Ile Val Ser Ile Lys Leu Leu Ala Ala Ile Gln Leu Phe |      |      |
| 1090  | 1095 | 1100 |
| GGC GCC AAC CTG GAT GAC TAC CTG CAT TTA CTG CTG CCT CCT ATT GTT | 3360 |      |
| Gly Ala Asn Leu Asp Asp Tyr Leu His Leu Leu Leu Pro Pro Ile Val |      |      |
| 1105  | 1110 | 1115 |
| AAG TTG TTT GAT GCC CCT GAA GCT CCA CTG CCA TCT CGA AAG GCA GCG | 3408 |      |
| Lys Leu Phe Asp Ala Pro Glu Ala Pro Leu Pro Ser Arg Lys Ala Ala |      |      |
| 1120  | 1125 | 1130 |
| 1135  |      |      |
| CTA GAG ACT GTG GAC CGC CTG ACG GAG TCC CTG GAT TTC ACT GAC TAT | 3456 |      |
| Leu Glu Thr Val Asp Arg Leu Thr Glu Ser Leu Asp Phe Thr Asp Tyr |      |      |
| 1140  | 1145 | 1150 |
| GCC TCC CGG ATC ATT CAC CCT ATT GTT CGA ACA CTG GAC CAG AGC CCA | 3504 |      |
| Ala Ser Arg Ile Ile His Pro Ile Val Arg Thr Leu Asp Gln Ser Pro |      |      |
| 1155  | 1160 | 1165 |
| GAA CTG CGC TCC ACA GCC ATG GAC ACG CTG TCT TCA CTT GTT TTT CAG | 3552 |      |
| Glu Leu Arg Ser Thr Ala MET Asp Thr Leu Ser Ser Leu Val Phe Gln |      |      |
| 1170  | 1175 | 1180 |
| CTG GGG AAG AAG TAC CAA ATT TTC ATT CCA ATG GTG AAT AAA GTT CTG | 3600 |      |
| Leu Gly Lys Lys Tyr Gln Ile Phe Ile Pro MET Val Asn Lys Val Leu |      |      |
| 1185  | 1190 | 1195 |

10

20

30

40

50

|   |      |      |
|---|------|------|
| GTG CGA CAC CGA ATC AAT CAT CAG CGC TAT GAT GTG CTC ATC TGC AGA | 3648 |      |
| Val Arg His Arg Ile Asn His Gln Arg Tyr Asp Val Leu Ile Cys Arg |      |      |
| 1200  | 1205 | 1210 |
| 1215  |      |      |
| ATT GTC AAG GGA TAC ACA CTT GCT GAT GAA GAG GAG GAT CCT TTG ATT | 3696 |      |
| Ile Val Lys Gly Tyr Thr Leu Ala Asp Glu Glu Glu Asp Pro Leu Ile |      |      |
| 1220  | 1225 | 1230 |
| TAC CAG CAT CGG ATG CTT AGG AGT GGC CAA GGG GAT GCA TTG GCT AGT | 3744 | 10   |
| Tyr Gln His Arg MET Leu Arg Ser Gly Gln Gly Asp Ala Leu Ala Ser |      |      |
| 1235  | 1240 | 1245 |
| GGA CCA GTG GAA ACA GGA CCC ATG AAG AAA CTG CAC GTC AGC ACC ATC | 3792 |      |
| Gly Pro Val Glu Thr Gly Pro MET Lys Lys Leu His Val Ser Thr Ile |      |      |
| 1250  | 1255 | 1260 |
| AAC CTC CAA AAG GCC TGG GGC GCT GCC AGG AGG GTC TCC AAA GAT GAC | 3840 |      |
| Asn Leu Gln Lys Ala Trp Gly Ala Ala Arg Arg Val Ser Lys Asp Asp |      |      |
| 1265  | 1270 | 1275 |
| TGG CTG GAA TGG CTG AGA CGG CTG AGC CTG GAG CTG CTG AAG GAC TCA | 3888 |      |
| Trp Leu Glu Trp Leu Arg Arg Leu Ser Leu Glu Leu Leu Lys Asp Ser |      |      |
| 1280  | 1285 | 1290 |
| 1295  |      |      |
| TCA TCG CCC TCC CTG CGC TCC TGC TGG GCC CTG GCA CAG GCC TAC AAC | 3936 |      |
| Ser Ser Pro Ser Leu Arg Ser Cys Trp Ala Leu Ala Gln Ala Tyr Asn |      |      |
| 1300  | 1305 | 1310 |
| CCG ATG GCC AGG GAT CTC TTC AAT GCT GCA TTT GTG TCC TGC TGG TCT | 3984 | 30   |
| Pro MET Ala Arg Asp Leu Phe Asn Ala Ala Phe Val Ser Cys Trp Ser |      |      |
| 1315  | 1320 | 1325 |
| GAA CTG AAT GAA GAT CAA CAG GAT GAG CTC ATC AGA AGC ATC GAG TTG | 4032 |      |
| Glu Leu Asn Glu Asp Gln Gln Asp Glu Leu Ile Arg Ser Ile Glu Leu |      |      |
| 1330  | 1335 | 1340 |
| GCC CTC ACC TCA CAA GAC ATC GCT GAA GTC ACA CAG ACC CTC TTA AAC | 4080 |      |
| Ala Leu Thr Ser Gln Asp Ile Ala Glu Val Thr Gln Thr Leu Leu Asn |      |      |
| 1345  | 1350 | 1355 |
| TTG GCT GAA TTC ATG GAA CAC AGT GAC AAG GGC CCC CTG CCA CTG AGA | 4128 |      |
| Leu Ala Glu Phe MET Glu His Ser Asp Lys Gly Pro Leu Pro Leu Arg |      |      |
| 1360  | 1365 | 1370 |
| 1375  |      |      |
| GAT GAC AAT GGC ATT GTT CTG CTG GGT GAG AGA GCT GCC AAG TGC CGA | 4176 |      |
| Asp Asp Asn Gly Ile Val Leu Leu Gly Glu Arg Ala Ala Lys Cys Arg |      |      |
| 1380  | 1385 | 1390 |
| GCA TAT GCC AAA GCA CTA CAC TAC AAA GAA CTG GAG TTC CAG AAA GGC | 4224 | 50   |

|   |      |      |
|---|------|------|
| Ala Tyr Ala Lys Ala Leu His Tyr Lys Glu Leu Glu Phe Gln Lys Gly |      |      |
| 1395  | 1400 | 1405 |
| CCC ACC CCT GCC ATT CTA GAA TCT CTC ATC AGC ATT AAT AAT AAG CTA | 4272 |      |
| Pro Thr Pro Ala Ile Leu Glu Ser Leu Ile Ser Ile Asn Asn Lys Leu |      |      |
| 1410  | 1415 | 1420 |
| CAG CAG CCG GAG GCA GCG GCC GGA GTG TTA GAA TAT GCC ATG AAA CAC | 4320 |      |
| Gln Gln Pro Glu Ala Ala Ala Gly Val Leu Glu Tyr Ala MET Lys His |      |      |
| 1425  | 1430 | 1435 |
| TTT GGA GAG CTG GAG ATC CAG GCT ACC TGG TAT GAG AAA CTG CAC GAG | 4368 |      |
| Phe Gly Glu Leu Glu Ile Gln Ala Thr Trp Tyr Glu Lys Leu His Glu |      |      |
| 1440  | 1445 | 1450 |
| TGG GAG GAT GCC CTT GTG GCC TAT GAC AAG AAA ATG GAC ACC AAC AAG | 4416 |      |
| Trp Glu Asp Ala Leu Val Ala Tyr Asp Lys Lys MET Asp Thr Asn Lys |      |      |
| 1460  | 1465 | 1470 |
| GAC GAC CCA GAG CTG ATG CTG GGC CGC ATG CGC TGC CTC GAG GCC TTG | 4464 | 20   |
| Asp Asp Pro Glu Leu MET Leu Gly Arg MET Arg Cys Leu Glu Ala Leu |      |      |
| 1475  | 1480 | 1485 |
| GGG GAA TGG GGT CAA CTC CAC CAG CAG TGC TGT GAA AAG TGG ACC CTG | 4512 |      |
| Gly Glu Trp Gly Gln Leu His Gln Gln Cys Cys Glu Lys Trp Thr Leu |      |      |
| 1490  | 1495 | 1500 |
| GTT AAT GAT GAG ACC CAA GCC AAG ATG GCC CGG ATG GCT GCT GCA GCT | 4560 |      |
| Val Asn Asp Glu Thr Gln Ala Lys MET Ala Arg MET Ala Ala Ala Ala |      |      |
| 1505  | 1510 | 1515 |
| GCA TGG GGT TTA GGT CAG TGG GAC AGC ATG GAA GAA TAC ACC TGT ATG | 4608 |      |
| Ala Trp Gly Leu Gly Gln Trp Asp Ser MET Glu Glu Tyr Thr Cys MET |      |      |
| 1520  | 1525 | 1530 |
| ATC CCT CGG GAC ACC CAT GAT GGG GCA TTT TAT AGA GCT GTG CTG GCA | 4656 |      |
| Ile Pro Arg Asp Thr His Asp Gly Ala Phe Tyr Arg Ala Val Leu Ala |      |      |
| 1540  | 1545 | 1550 |
| CTG CAT CAG GAC CTC TTC TCC TTG GCA CAA CAG TGC ATT GAC AAG GCC | 4704 | 40   |
| Leu His Gln Asp Leu Phe Ser Leu Ala Gln Gln Cys Ile Asp Lys Ala |      |      |
| 1555  | 1560 | 1565 |
| AGG GAC CTG CTG GAT GCT GAA TTA ACT GCA ATG GCA GGA GAG AGT TAC | 4752 |      |
| Arg Asp Leu Leu Asp Ala Glu Leu Thr Ala MET Ala Gly Glu Ser Tyr |      |      |
| 1570  | 1575 | 1580 |
| AGT CGG GCA TAT GGG GCC ATG GTT TCT TGC CAC ATG CTG TCC GAG CTG | 4800 |      |
| Ser Arg Ala Tyr Gly Ala MET Val Ser Cys His MET Leu Ser Glu Leu |      |      |
| 1585  | 1590 | 1595 |

|   |      |           |
|---|------|-----------|
| GAG GAG GTT ATC CAG TAC AAA CTT GTC CCC GAG CGA CGA GAG ATC ATC | 4848 |           |
| Glu Glu Val Ile Gln Tyr Lys Leu Val Pro Glu Arg Arg Glu Ile Ile |      |           |
| 1600  | 1605 | 1610 1615 |
| CGC CAG ATC TGG TGG GAG AGA CTG CAG GGC TGC CAG CGT ATC GTA GAG | 4896 |           |
| Arg Gln Ile Trp Trp Glu Arg Leu Gln Gly Cys Gln Arg Ile Val Glu |      |           |
|   | 1620 | 1625 1630 |
| GAC TGG CAG AAA ATC CTT ATG GTG CGG TCC CTT GTG GTC AGC CCT CAT | 4944 | 10        |
| Asp Trp Gln Lys Ile Leu MET Val Arg Ser Leu Val Val Ser Pro His |      |           |
|   | 1635 | 1640 1645 |
| GAA GAC ATG AGA ACC TGG CTC AAG TAT GCA AGC CTG TGC GGC AAG AGT | 4992 |           |
| Glu Asp MET Arg Thr Trp Leu Lys Tyr Ala Ser Leu Cys Gly Lys Ser |      |           |
|   | 1650 | 1655 1660 |
| GGC AGG CTG GCT CTT GCT CAT AAA ACT TTA GTG TTG CTC CTG GGA GTT | 5040 |           |
| Gly Arg Leu Ala Leu Ala His Lys Thr Leu Val Leu Leu Leu Gly Val |      |           |
|   | 1665 | 1670 1675 |
|   |      | 20        |
| GAT CCG TCT CGG CAA CTT GAC CAT CCT CTG CCA ACA GTT CAC CCT CAG | 5088 |           |
| Asp Pro Ser Arg Gln Leu Asp His Pro Leu Pro Thr Val His Pro Gln |      |           |
| 1680  | 1685 | 1690 1695 |
| GTG ACC TAT GCC TAC ATG AAA AAC ATG TGG AAG AGT GCC CGC AAG ATC | 5136 |           |
| Val Thr Tyr Ala Tyr MET Lys Asn MET Trp Lys Ser Ala Arg Lys Ile |      |           |
|   | 1700 | 1705 1710 |
| GAT GCC TTC CAG CAC ATG CAG CAT TTT GTC CAG ACC ATG CAG CAA CAG | 5184 | 30        |
| Asp Ala Phe Gln His MET Gln His Phe Val Gln Thr MET Gln Gln Gln |      |           |
|   | 1715 | 1720 1725 |
| GCC CAG CAT GCC ATC GCT ACT GAG GAC CAG CAG CAT AAG CAG GAA CTG | 5232 |           |
| Ala Gln His Ala Ile Ala Thr Glu Asp Gln Gln His Lys Gln Glu Leu |      |           |
|   | 1730 | 1735 1740 |
| CAC AAG CTC ATG GCC CGA TGC TTC CTG AAA CTT GGA GAG TGG CAG CTG | 5280 |           |
| His Lys Leu MET Ala Arg Cys Phe Leu Lys Leu Gly Glu Trp Gln Leu |      |           |
|   | 1745 | 1750 1755 |
|   |      | 40        |
| AAT CTA CAG GGC ATC AAT GAG AGC ACA ATC CCC AAA GTG CTG CAG TAC | 5328 |           |
| Asn Leu Gln Gly Ile Asn Glu Ser Thr Ile Pro Lys Val Leu Gln Tyr |      |           |
| 1760  | 1765 | 1770 1775 |
| TAC AGC GCC GCC ACA GAG CAC GAC CGC AGC TGG TAC AAG GCC TGG CAT | 5376 |           |
| Tyr Ser Ala Ala Thr Glu His Asp Arg Ser Trp Tyr Lys Ala Trp His |      |           |
|   | 1780 | 1785 1790 |
| GCG TGG GCA GTG ATG AAC TTC GAA GCT GTG CTA CAC TAC AAA CAT CAG | 5424 | 50        |

|   |      |      |
|---|------|------|
| Ala Trp Ala Val MET Asn Phe Glu Ala Val Leu His Tyr Lys His Gln |      |      |
| 1795  | 1800 | 1805 |
| AAC CAA GCC CGC GAT GAG AAG AAG AAA CTG CGT CAT GCC AGC GGG GCC | 5472 |      |
| Asn Gln Ala Arg Asp Glu Lys Lys Lys Leu Arg His Ala Ser Gly Ala |      |      |
| 1810  | 1815 | 1820 |
| AAC ATC ACC AAC GCC ACC ACT GCC GCC ACC ACG GCC GCC ACT GCC ACC | 5520 |      |
| Asn Ile Thr Asn Ala Thr Thr Ala Ala Thr Thr Ala Ala Thr Ala Thr |      |      |
| 1825  | 1830 | 1835 |
|   |      | 10   |
| ACC ACT GCC AGC ACC GAG GGC AGC AAC AGT GAG AGC GAG GCC GAG AGC | 5568 |      |
| Thr Thr Ala Ser Thr Glu Gly Ser Asn Ser Glu Ser Glu Ala Glu Ser |      |      |
| 1840  | 1845 | 1850 |
|   |      | 1855 |
| ACC GAG AAC AGC CCC ACC CCA TCG CCG CTG CAG AAG AAG GTC ACT GAG | 5616 |      |
| Thr Glu Asn Ser Pro Thr Pro Ser Pro Leu Gln Lys Lys Val Thr Glu |      |      |
| 1860  | 1865 | 1870 |
| GAT CTG TCC AAA ACC CTC CTG ATG TAC ACG GTG CCT GCC GTC CAG GGC | 5664 |      |
| Asp Leu Ser Lys Thr Leu Leu MET Tyr Thr Val Pro Ala Val Gln Gly |      |      |
| 1875  | 1880 | 1885 |
|   |      | 20   |
| TTC TTC CGT TCC ATC TCC TTG TCA CGA GGC AAC AAC CTC CAG GAT ACA | 5712 |      |
| Phe Phe Arg Ser Ile Ser Leu Ser Arg Gly Asn Asn Leu Gln Asp Thr |      |      |
| 1890  | 1895 | 1900 |
| CTC AGA GTT CTC ACC TTA TGG TTT GAT TAT GGT CAC TGG CCA GAT GTC | 5760 |      |
| Leu Arg Val Leu Thr Leu Trp Phe Asp Tyr Gly His Trp Pro Asp Val |      |      |
| 1905  | 1910 | 1915 |
|   |      | 30   |
| AAT GAG GCC TTA GTG GAG GGG GTG AAA GCC ATC CAG ATT GAT ACC TGG | 5808 |      |
| Asn Glu Ala Leu Val Glu Gly Val Lys Ala Ile Gln Ile Asp Thr Trp |      |      |
| 1920  | 1925 | 1930 |
|   |      | 1935 |
| CTA CAG GTT ATA CCT CAG CTC ATT GCA AGA ATT GAT ACG CCC AGA CCC | 5856 |      |
| Leu Gln Val Ile Pro Gln Leu Ile Ala Arg Ile Asp Thr Pro Arg Pro |      |      |
| 1940  | 1945 | 1950 |
| TTG GTG GGA CGT CTC ATT CAC CAG CTT CTC ACA GAC ATT GGT CGG TAC | 5904 |      |
| Leu Val Gly Arg Leu Ile His Gln Leu Leu Thr Asp Ile Gly Arg Tyr |      |      |
| 1955  | 1960 | 1965 |
|   |      | 40   |
| CAC CCC CAG GCC CTC ATC TAC CCA CTG ACA GTG GCT TCT AAG TCT ACC | 5952 |      |
| His Pro Gln Ala Leu Ile Tyr Pro Leu Thr Val Ala Ser Lys Ser Thr |      |      |
| 1970  | 1975 | 1980 |
| ACG ACA GCC CGG CAC AAT GCA GCC AAC AAG ATT CTG AAG AAC ATG TGT | 6000 |      |
| Thr Thr Ala Arg His Asn Ala Ala Asn Lys Ile Leu Lys Asn MET Cys |      |      |
| 1985  | 1990 | 1995 |
|   |      | 50   |

|   |      |      |
|---|------|------|
| GAG CAC AGC AAC ACC CTG GTC CAG CAG GCC ATG ATG GTG AGC GAG GAG | 6048 |      |
| Glu His Ser Asn Thr Leu Val Gln Gln Ala MET MET Val Ser Glu Glu |      |      |
| 2000  | 2005 | 2010 |
| 2015  |      |      |
| CTG ATC CGA GTG GCC ATC CTC TGG CAT GAG ATG TGG CAT GAA GGC CTG | 6096 |      |
| Leu Ile Arg Val Ala Ile Leu Trp His Glu MET Trp His Glu Gly Leu |      |      |
| 2020  | 2025 | 2030 |
| GAA GAG GCA TCT CGT TTG TAC TTT GGG GAA AGG AAC GTG AAA GGC ATG | 6144 | 10   |
| Glu Glu Ala Ser Arg Leu Tyr Phe Gly Glu Arg Asn Val Lys Gly MET |      |      |
| 2035  | 2040 | 2045 |
| TTT GAG GTG CTG GAG CCC TTG CAT GCT ATG ATG GAA CGG GGC CCC CAG | 6192 |      |
| Phe Glu Val Leu Glu Pro Leu His Ala MET MET Glu Arg Gly Pro Gln |      |      |
| 2050  | 2055 | 2060 |
| ACT CTG AAG GAA ACA TCC TTT AAT CAG GCC TAT GGT CGA GAT TTA ATG | 6240 |      |
| Thr Leu Lys Glu Thr Ser Phe Asn Gln Ala Tyr Gly Arg Asp Leu MET |      | 20   |
| 2065  | 2070 | 2075 |
| GAG GCC CAA GAG TGG TGC AGG AAG TAC ATG AAA TCA GGG AAT GTC AAG | 6288 |      |
| Glu Ala Gln Glu Trp Cys Arg Lys Tyr MET Lys Ser Gly Asn Val Lys |      |      |
| 2080  | 2085 | 2090 |
| 2095  |      |      |
| GAC CTC ACC CAA GCC TGG GAC CTC TAT TAT CAT GTG TTC CGA CGA ATC | 6336 |      |
| Asp Leu Thr Gln Ala Trp Asp Leu Tyr Tyr His Val Phe Arg Arg Ile |      |      |
| 2100  | 2105 | 2110 |
| TCA AAG CAG CTG CCT CAG CTC ACA TCC TTA GAG CTG CAA TAT GTT TCC | 6384 | 30   |
| Ser Lys Gln Leu Pro Gln Leu Thr Ser Leu Glu Leu Gln Tyr Val Ser |      |      |
| 2115  | 2120 | 2125 |
| CCA AAA CTT CTG ATG TGC CGG GAC CTT GAA TTG GCT GTG CCA GGA ACA | 6432 |      |
| Pro Lys Leu Leu MET Cys Arg Asp Leu Glu Leu Ala Val Pro Gly Thr |      |      |
| 2130  | 2135 | 2140 |
| TAT GAC CCC AAC CAG CCA ATC ATT CGC ATT CAG TCC ATA GCA CCG TCT | 6480 |      |
| Tyr Asp Pro Asn Gln Pro Ile Ile Arg Ile Gln Ser Ile Ala Pro Ser |      | 40   |
| 2145  | 2150 | 2155 |
| TTG CAA GTC ATC ACA TCC AAG CAG AGG CCC CGG AAA TTG ACA CTT ATG | 6528 |      |
| Leu Gln Val Ile Thr Ser Lys Gln Arg Pro Arg Lys Leu Thr Leu MET |      |      |
| 2160  | 2165 | 2170 |
| 2175  |      |      |
| GGC AGC AAC GGA CAT GAG TTT GTT TTC CTT CTA AAA GGC CAT GAA GAT | 6576 |      |
| Gly Ser Asn Gly His Glu Phe Val Phe Leu Leu Lys Gly His Glu Asp |      |      |
| 2180  | 2185 | 2190 |
| CTG CGC CAG GAT GAG CGT GTG ATG CAG CTC TTC GGC CTG GTT AAC ACC | 6624 | 50   |

|   |      |      |
|---|------|------|
| Leu Arg Gln Asp Glu Arg Val MET Gln Leu Phe Gly Leu Val Asn Thr |      |      |
| 2195  | 2200 | 2205 |
| CTT CTG GCC AAT GAC CCA ACA TCT CTT CGG AAA AAC CTC AGC ATC CAG | 6672 |      |
| Leu Leu Ala Asn Asp Pro Thr Ser Leu Arg Lys Asn Leu Ser Ile Gln |      |      |
| 2210  | 2215 | 2220 |
| AGA TAC GCT GTC ATC CCT TTA TCG ACC AAC TCG GGC CTC ATT GGC TGG | 6720 |      |
| Arg Tyr Ala Val Ile Pro Leu Ser Thr Asn Ser Gly Leu Ile Gly Trp |      |      |
| 2225  | 2230 | 2235 |
|   |      | 10   |
| GTT CCC CAC TGT GAC ACA CTG CAC GCC CTC ATC CGG GAC TAC AGG GAG | 6768 |      |
| Val Pro His Cys Asp Thr Leu His Ala Leu Ile Arg Asp Tyr Arg Glu |      |      |
| 2240  | 2245 | 2250 |
|   |      | 2255 |
| AAG AAG AAG ATC CTT CTC AAC ATC GAG CAT CGC ATC ATG TTG CGG ATG | 6816 |      |
| Lys Lys Lys Ile Leu Leu Asn Ile Glu His Arg Ile MET Leu Arg MET |      |      |
| 2260  | 2265 | 2270 |
| GCT CCG GAC TAT GAC CAC TTG ACT CTG ATG CAG AAG GTG GAG GTG TTT | 6864 |      |
| Ala Pro Asp Tyr Asp His Leu Thr Leu MET Gln Lys Val Glu Val Phe |      |      |
| 2275  | 2280 | 2285 |
|   |      | 20   |
| GAG CAT GCC GTC AAT AAT ACA GCT GGG GAC GAC CTG GCC AAG CTG CTG | 6912 |      |
| Glu His Ala Val Asn Asn Thr Ala Gly Asp Asp Leu Ala Lys Leu Leu |      |      |
| 2290  | 2295 | 2300 |
| TGG CTG AAA AGC CCC AGC TCC GAG GTG TGG TTT GAC CGA AGA ACC AAT | 6960 |      |
| Trp Leu Lys Ser Pro Ser Ser Glu Val Trp Phe Asp Arg Arg Thr Asn |      |      |
| 2305  | 2310 | 2315 |
|   |      | 30   |
| TAT ACC CGT TCT TTA GCG GTC ATG TCA ATG GTT GGG TAT ATT TTA GGC | 7008 |      |
| Tyr Thr Arg Ser Leu Ala Val MET Ser MET Val Gly Tyr Ile Leu Gly |      |      |
| 2320  | 2325 | 2330 |
|   |      | 2335 |
| CTG GGA GAT AGA CAC CCA TCC AAC CTG ATG CTG GAC CGT CTG AGT GGG | 7056 |      |
| Leu Gly Asp Arg His Pro Ser Asn Leu MET Leu Asp Arg Leu Ser Gly |      |      |
| 2340  | 2345 | 2350 |
| AAG ATC CTG CAC ATT GAC TTT GGG GAC TGC TTT GAG GTT GCT ATG ACC | 7104 |      |
| Lys Ile Leu His Ile Asp Phe Gly Asp Cys Phe Glu Val Ala MET Thr |      |      |
| 2355  | 2360 | 2365 |
|   |      | 40   |
| CGA GAG AAG TTT CCA GAG AAG ATT CCA TTT AGA CTA ACA AGA ATG TTG | 7152 |      |
| Arg Glu Lys Phe Pro Glu Lys Ile Pro Phe Arg Leu Thr Arg MET Leu |      |      |
| 2370  | 2375 | 2380 |
| ACC AAT GCT ATG GAG GTT ACA GGC CTG GAT GGC AAC TAC AGA ATC ACA | 7200 |      |
| Thr Asn Ala MET Glu Val Thr Gly Leu Asp Gly Asn Tyr Arg Ile Thr |      |      |
| 2385  | 2390 | 2395 |
|   |      | 50   |

|   |      |      |
|---|------|------|
| TGC CAC ACA GTG ATG GAG GTG CTG CGA GAG CAC AAG GAC AGT GTC ATG | 7248 |      |
| Cys His Thr Val MET Glu Val Leu Arg Glu His Lys Asp Ser Val MET |      |      |
| 2400  | 2405 | 2410 |
| GCC GTG CTG GAA GCC TTT GTC TAT GAC CCC TTG CTG AAC TGG AGG CTG | 7296 |      |
| Ala Val Leu Glu Ala Phe Val Tyr Asp Pro Leu Leu Asn Trp Arg Leu |      |      |
|   | 2420 | 2425 |
| ATG GAC ACA AAT ACC AAA GGC AAC AAG CGA TCC CGA ACG AGG ACG GAT | 7344 | 10   |
| MET Asp Thr Asn Thr Lys Gly Asn Lys Arg Ser Arg Thr Arg Thr Asp |      |      |
|   | 2435 | 2440 |
| TCC TAC TCT GCT GGC CAG TCA GTC GAA ATT TTG GAC GGT GTG GAA CTT | 7392 |      |
| Ser Tyr Ser Ala Gly Gln Ser Val Glu Ile Leu Asp Gly Val Glu Leu |      |      |
|   | 2450 | 2455 |
| GGA GAG CCA GCC CAT AAG AAA ACG GGG ACC ACA GTG CCA GAA TCT ATT | 7440 |      |
| Gly Glu Pro Ala His Lys Lys Thr Gly Thr Thr Val Pro Glu Ser Ile |      |      |
|   | 2465 | 2470 |
| CAT TCT TTC ATT GGA GAC GGT TTG GTG AAA CCA GAG GCC CTA AAT AAG | 7488 |      |
| His Ser Phe Ile Gly Asp Gly Leu Val Lys Pro Glu Ala Leu Asn Lys |      |      |
|   | 2480 | 2490 |
| AAA GCT ATC CAG ATT ATT AAC AGG GTT CGA GAT AAG CTC ACT GGT CGG | 7536 |      |
| Lys Ala Ile Gln Ile Ile Asn Arg Val Arg Asp Lys Leu Thr Gly Arg |      |      |
|   | 2500 | 2505 |
| GAC TTC TCT CAT GAT GAC ACT TTG GAT GTT CCA ACG CAA GTT GAG CTG | 7584 | 30   |
| Asp Phe Ser His Asp Asp Thr Leu Asp Val Pro Thr Gln Val Glu Leu |      |      |
|   | 2515 | 2520 |
| CTC ATC AAA CAA GCG ACA TCC CAT GAA AAC CTC TGC CAG TGC TAT ATT | 7632 |      |
| Leu Ile Lys Gln Ala Thr Ser His Glu Asn Leu Cys Gln Cys Tyr Ile |      |      |
|   | 2530 | 2535 |

GGC TGG TAC CCT TTC TGG TAA  
 Gly Trp Tyr Pro Phe Trp  
 2545

40

【 0 0 7 6 】

配列番号：2

配列の長さ：3 4 2 3

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

ハイボセチカル配列：No

アンチセンス：No

起源

50

生物名：モルト4ヒトT細胞白血病細胞

株名：ATCC CRL 1582株

配列：

|   |     |    |
|---|-----|----|
| ATG TCC CCT ATA CTA GGT TAT TGG AAA ATT AAG GGC CTT GTG CAA CCC | 48  |    |
| MET Ser Pro Ile Leu Gly Tyr Trp Lys Ile Lys Gly Leu Val Gln Pro |     |    |
| 1 5 10 15   |     |    |
| ACT CGA CTT CTT TTG GAA TAT CTT GAA GAA AAA TAT GAA GAG CAT TTG | 96  |    |
| Thr Arg Leu Leu Leu Glu Tyr Leu Glu Glu Lys Tyr Glu Glu His Leu |     | 10 |
| 20 25 30  |     |    |
| TAT GAG CGC GAT GAA GGT GAT AAA TGG CGA AAC AAA AAG TTT GAA TTG | 144 |    |
| Tyr Glu Arg Asp Glu Gly Asp Lys Trp Arg Asn Lys Lys Phe Glu Leu |     |    |
| 35 40 45  |     |    |
| GGT TTG GAG TTT CCC AAT CTT CCT TAT TAT ATT GAT GGT GAT GTT AAA | 192 |    |
| Gly Leu Glu Phe Pro Asn Leu Pro Tyr Tyr Ile Asp Gly Asp Val Lys |     |    |
| 50 55 60  |     | 20 |
| TTA ACA CAG TCT ATG GCC ATC ATA CGT TAT ATA GCT GAC AAG CAC AAC | 240 |    |
| Leu Thr Gln Ser MET Ala Ile Ile Arg Tyr Ile Ala Asp Lys His Asn |     |    |
| 65 70 75 80   |     |    |
| ATG TTG GGT GGT TGT CCA AAA GAG CGT GCA GAG ATT TCA ATG CTT GAA | 288 |    |
| MET Leu Gly Gly Cys Pro Lys Glu Arg Ala Glu Ile Ser MET Leu Glu |     |    |
| 85 90 95  |     |    |
| GGA GCG GTT TTG GAT ATT AGA TAC GGT GTT TCG AGA ATT GCA TAT AGT | 336 |    |
| Gly Ala Val Leu Asp Ile Arg Tyr Gly Val Ser Arg Ile Ala Tyr Ser |     | 30 |
| 100 105 110   |     |    |
| AAA GAC TTT GAA ACT CTC AAA GTT GAT TTT CTT AGC AAG CTA CCT GAA | 384 |    |
| Lys Asp Phe Glu Thr Leu Lys Val Asp Phe Leu Ser Lys Leu Pro Glu |     |    |
| 115 120 125   |     |    |
| ATG CTG AAA ATG TTC GAA GAT CGT TTA TGT CAT AAA ACA TAT TTA AAT | 432 |    |
| MET Leu Lys MET Phe Glu Asp Arg Leu Cys His Lys Thr Tyr Leu Asn |     |    |
| 130 135 140   |     | 40 |
| GGT GAT CAT GTA ACC CAT CCT GAC TTC ATG TTG TAT GAC GCT CTT GAT | 480 |    |
| Gly Asp His Val Thr His Pro Asp Phe MET Leu Tyr Asp Ala Leu Asp |     |    |
| 145 150 155 160   |     |    |
| GTT GTT TTA TAC ATG GAC CCA ATG TGC CTG GAT GCG TTC CCA AAA TTA | 528 |    |
| Val Val Leu Tyr MET Asp Pro MET Cys Leu Asp Ala Phe Pro Lys Leu |     |    |
| 165 170 175   |     |    |
| GTT TGT TTT AAA AAA CGT ATT GAA GCT ATC CCA CAA ATT GAT AAG TAC | 576 |    |
| Val Cys Phe Lys Lys Arg Ile Glu Ala Ile Pro Gln Ile Asp Lys Tyr |     | 50 |

| 180 |     |     | 185 |     |     | 190 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |    |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|----|
| TTG | AAA | TCC | AGC | AAG | TAT | ATA | GCA | TGG | CCT | TTG | CAG | GGC | TGG | CAA | GCC | 624  |    |
| Leu | Lys | Ser | Ser | Lys | Tyr | Ile | Ala | Trp | Pro | Leu | Gln | Gly | Trp | Gln | Ala |      |    |
|     |     | 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |     |     |      |    |
| ACG | TTT | GGT | GGT | GGC | GAC | CAT | CCT | CCA | AAA | TCG | GAT | CTG | GTT | CCG | CGT | 672  |    |
| Thr | Phe | Gly | Gly | Gly | Asp | His | Pro | Pro | Lys | Ser | Asp | Leu | Val | Pro | Arg |      |    |
|     |     | 210 |     |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |     |     |      |    |
| GGT | GGA | TCC | CCG | GGA | ATT | TCC | GGT | GGT | GGT | GGT | GGT | GGA | ATT | CTA | GAC | 720  | 10 |
| Gly | Gly | Ser | Pro | Gly | Ile | Ser | Gly | Gly | Gly | Gly | Gly | Gly | Ile | Leu | Asp |      |    |
| 225 |     |     |     |     |     | 230 |     |     |     | 235 |     |     |     |     | 240 |      |    |
| GAC | TCC | ATG | AGC | TTC | AAG | TAT | GCA | AGC | CTG | TGC | GGC | AAG | AGT | GGC | AGG | 768  |    |
| Asp | Ser | MET | Ser | Phe | Lys | Tyr | Ala | Ser | Leu | Cys | Gly | Lys | Ser | Gly | Arg |      |    |
|     |     |     |     | 245 |     |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     | 255 |      |    |
| CTG | GCT | CTT | GCT | CAT | AAA | ACT | TTA | GTG | TTG | CTC | CTG | GGA | GTT | GAT | CCG | 816  |    |
| Leu | Ala | Leu | Ala | His | Lys | Thr | Leu | Val | Leu | Leu | Leu | Gly | Val | Asp | Pro |      |    |
|     |     |     |     | 260 |     |     |     |     |     | 265 |     |     |     |     | 270 | 20   |    |
| TCT | CGG | CAA | CTT | GAC | CAT | CCT | CTG | CCA | ACA | GTT | CAC | CCT | CAG | GTG | ACC | 864  |    |
| Ser | Arg | Gln | Leu | Asp | His | Pro | Leu | Pro | Thr | Val | His | Pro | Gln | Val | Thr |      |    |
|     |     | 275 |     |     |     |     | 280 |     |     |     |     |     |     |     | 285 |      |    |
| TAT | GCC | TAC | ATG | AAA | AAC | ATG | TGG | AAG | AGT | GCC | CGC | AAG | ATC | GAT | GCC | 912  |    |
| Tyr | Ala | Tyr | MET | Lys | Asn | MET | Trp | Lys | Ser | Ala | Arg | Lys | Ile | Asp | Ala |      |    |
|     |     | 290 |     |     |     |     | 295 |     |     |     | 300 |     |     |     |     |      |    |
| TTC | CAG | CAC | ATG | CAG | CAT | TTT | GTC | CAG | ACC | ATG | CAG | CAA | CAG | GCC | CAG | 960  |    |
| Phe | Gln | His | MET | Gln | His | Phe | Val | Gln | Thr | MET | Gln | Gln | Gln | Ala | Gln |      |    |
| 305 |     |     |     |     |     | 310 |     |     |     | 315 |     |     |     |     | 320 |      |    |
| CAT | GCC | ATC | GCT | ACT | GAG | GAC | CAG | CAG | CAT | AAG | CAG | GAA | CTG | CAC | AAG | 1008 |    |
| His | Ala | Ile | Ala | Thr | Glu | Asp | Gln | Gln | His | Lys | Gln | Glu | Leu | His | Lys |      |    |
|     |     |     |     | 325 |     |     |     |     |     | 330 |     |     |     |     | 335 |      |    |
| CTC | ATG | GCC | CGA | TGC | TTC | CTG | AAA | CTT | GGA | GAG | TGG | CAG | CTG | AAT | CTA | 1056 |    |
| Leu | MET | Ala | Arg | Cys | Phe | Leu | Lys | Leu | Gly | Glu | Trp | Gln | Leu | Asn | Leu |      |    |
|     |     |     |     | 340 |     |     |     |     |     | 345 |     |     |     |     | 350 | 40   |    |
| CAG | GGC | ATC | AAT | GAG | AGC | ACA | ATC | CCC | AAA | GTG | CTG | CAG | TAC | TAC | AGC | 1104 |    |
| Gln | Gly | Ile | Asn | Glu | Ser | Thr | Ile | Pro | Lys | Val | Leu | Gln | Tyr | Tyr | Ser |      |    |
|     |     |     | 355 |     |     |     |     |     | 360 |     |     |     |     |     | 365 |      |    |
| GCC | GCC | ACA | GAG | CAC | GAC | CGC | AGC | TGG | TAC | AAG | GCC | TGG | CAT | GCG | TGG | 1152 |    |
| Ala | Ala | Thr | Glu | His | Asp | Arg | Ser | Trp | Tyr | Lys | Ala | Trp | His | Ala | Trp |      |    |
|     |     | 370 |     |     |     |     |     |     |     | 375 |     |     |     |     | 380 |      |    |

|   |      |     |
|---|------|-----|
| GCA GTG ATG AAC TTC GAA GCT GTG CTA CAC TAC AAA CAT CAG AAC CAA | 1200 |     |
| Ala Val MET Asn Phe Glu Ala Val Leu His Tyr Lys His Gln Asn Gln |      |     |
| 385   | 390  | 400 |
| GCC CGC GAT GAG AAG AAG AAA CTG CGT CAT GCC AGC GGG GCC AAC ATC | 1248 |     |
| Ala Arg Asp Glu Lys Lys Lys Leu Arg His Ala Ser Gly Ala Asn Ile |      |     |
|   | 405  | 415 |
| ACC AAC GCC ACC ACT GCC GCC ACC ACG GCC GCC ACT GCC ACC ACC ACT | 1296 |     |
| Thr Asn Ala Thr Thr Ala Ala Thr Thr Ala Ala Thr Ala Thr Thr Thr |      | 10  |
|   | 420  | 430 |
| GCC AGC ACC GAG GGC AGC AAC AGT GAG AGC GAG GCC GAG AGC ACC GAG | 1344 |     |
| Ala Ser Thr Glu Gly Ser Asn Ser Glu Ser Glu Ala Glu Ser Thr Glu |      |     |
|   | 435  | 445 |
| AAC AGC CCC ACC CCA TCG CCG CTG CAG AAG AAG GTC ACT GAG GAT CTG | 1392 |     |
| Asn Ser Pro Thr Pro Ser Pro Leu Gln Lys Lys Val Thr Glu Asp Leu |      |     |
|   | 450  | 460 |
|   |      | 20  |
| TCC AAA ACC CTC CTG ATG TAC ACG GTG CCT GCC GTC CAG GGC TTC TTC | 1440 |     |
| Ser Lys Thr Leu Leu MET Tyr Thr Val Pro Ala Val Gln Gly Phe Phe |      |     |
| 465   | 470  | 480 |
| CGT TCC ATC TCC TTG TCA CGA GGC AAC AAC CTC CAG GAT ACA CTC AGA | 1488 |     |
| Arg Ser Ile Ser Leu Ser Arg Gly Asn Asn Leu Gln Asp Thr Leu Arg |      |     |
|   | 485  | 495 |
| GTT CTC ACC TTA TGG TTT GAT TAT GGT CAC TGG CCA GAT GTC AAT GAG | 1536 |     |
| Val Leu Thr Leu Trp Phe Asp Tyr Gly His Trp Pro Asp Val Asn Glu |      | 30  |
|   | 500  | 510 |
| GCC TTA GTG GAG GGG GTG AAA GCC ATC CAG ATT GAT ACC TGG CTA CAG | 1584 |     |
| Ala Leu Val Glu Gly Val Lys Ala Ile Gln Ile Asp Thr Trp Leu Gln |      |     |
|   | 515  | 525 |
| GTT ATA CCT CAG CTC ATT GCA AGA ATT GAT ACG CCC AGA CCC TTG GTG | 1632 |     |
| Val Ile Pro Gln Leu Ile Ala Arg Ile Asp Thr Pro Arg Pro Leu Val |      |     |
|   | 530  | 540 |
|   |      | 40  |
| GGA CGT CTC ATT CAC CAG CTT CTC ACA GAC ATT GGT CGG TAC CAC CCC | 1680 |     |
| Gly Arg Leu Ile His Gln Leu Leu Thr Asp Ile Gly Arg Tyr His Pro |      |     |
| 545   | 550  | 560 |
| CAG GCC CTC ATC TAC CCA CTG ACA GTG GCT TCT AAG TCT ACC ACG ACA | 1728 |     |
| Gln Ala Leu Ile Tyr Pro Leu Thr Val Ala Ser Lys Ser Thr Thr Thr |      |     |
|   | 565  | 575 |
| GCC CGG CAC AAT GCA GCC AAC AAG ATT CTG AAG AAC ATG TGT GAG CAC | 1776 |     |
| Ala Arg His Asn Ala Ala Asn Lys Ile Leu Lys Asn MET Cys Glu His |      | 50  |

| 580 |     |     | 585 |     |     | 590 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |  |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|--|
| AGC | AAC | ACC | CTG | GTC | CAG | CAG | GCC | ATG | ATG | GTG | AGC | GAG | GAG | CTG | ATC | 1824 |  |
| Ser | Asn | Thr | Leu | Val | Gln | Gln | Ala | MET | MET | Val | Ser | Glu | Glu | Leu | Ile |      |  |
|     |     | 595 |     |     |     |     | 600 |     |     |     |     | 605 |     |     |     |      |  |
| CGA | GTG | GCC | ATC | CTC | TGG | CAT | GAG | ATG | TGG | CAT | GAA | GGC | CTG | GAA | GAG | 1872 |  |
| Arg | Val | Ala | Ile | Leu | Trp | His | Glu | MET | Trp | His | Glu | Gly | Leu | Glu | Glu |      |  |
|     | 610 |     |     |     |     |     | 615 |     |     |     |     | 620 |     |     |     |      |  |
| GCA | TCT | CGT | TTG | TAC | TTT | GGG | GAA | AGG | AAC | GTG | AAA | GGC | ATG | TTT | GAG | 1920 |  |
| Ala | Ser | Arg | Leu | Tyr | Phe | Gly | Glu | Arg | Asn | Val | Lys | Gly | MET | Phe | Glu |      |  |
|     | 625 |     |     |     |     | 630 |     |     |     |     | 635 |     |     |     | 640 |      |  |
| GTG | CTG | GAG | CCC | TTG | CAT | GCT | ATG | ATG | GAA | CGG | GGC | CCC | CAG | ACT | CTG | 1968 |  |
| Val | Leu | Glu | Pro | Leu | His | Ala | MET | MET | Glu | Arg | Gly | Pro | Gln | Thr | Leu |      |  |
|     |     |     |     | 645 |     |     |     |     |     |     | 650 |     |     |     | 655 |      |  |
| AAG | GAA | ACA | TCC | TTT | AAT | CAG | GCC | TAT | GGT | CGA | GAT | TTA | ATG | GAG | GCC | 2016 |  |
| Lys | Glu | Thr | Ser | Phe | Asn | Gln | Ala | Tyr | Gly | Arg | Asp | Leu | MET | Glu | Ala |      |  |
|     |     |     | 660 |     |     |     |     |     |     |     | 665 |     |     |     | 670 |      |  |
| CAA | GAG | TGG | TGC | AGG | AAG | TAC | ATG | AAA | TCA | GGG | AAT | GTC | AAG | GAC | CTC | 2064 |  |
| Gln | Glu | Trp | Cys | Arg | Lys | Tyr | MET | Lys | Ser | Gly | Asn | Val | Lys | Asp | Leu |      |  |
|     |     | 675 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 685 |      |  |
| ACC | CAA | GCC | TGG | GAC | CTC | TAT | TAT | CAT | GTG | TTC | CGA | CGA | ATC | TCA | AAG | 2112 |  |
| Thr | Gln | Ala | Trp | Asp | Leu | Tyr | Tyr | His | Val | Phe | Arg | Arg | Ile | Ser | Lys |      |  |
|     |     | 690 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 700 |      |  |
| CAG | CTG | CCT | CAG | CTC | ACA | TCC | TTA | GAG | CTG | CAA | TAT | GTT | TCC | CCA | AAA | 2160 |  |
| Gln | Leu | Pro | Gln | Leu | Thr | Ser | Leu | Glu | Leu | Gln | Tyr | Val | Ser | Pro | Lys |      |  |
|     | 705 |     |     |     |     |     | 710 |     |     |     |     |     |     |     | 720 |      |  |
| CTT | CTG | ATG | TGC | CGG | GAC | CTT | GAA | TTG | GCT | GTG | CCA | GGA | ACA | TAT | GAC | 2208 |  |
| Leu | Leu | MET | Cys | Arg | Asp | Leu | Glu | Leu | Ala | Val | Pro | Gly | Thr | Tyr | Asp |      |  |
|     |     |     |     | 725 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 735 |      |  |
| CCC | AAC | CAG | CCA | ATC | ATT | CGC | ATT | CAG | TCC | ATA | GCA | CCG | TCT | TTG | CAA | 2256 |  |
| Pro | Asn | Gln | Pro | Ile | Ile | Arg | Ile | Gln | Ser | Ile | Ala | Pro | Ser | Leu | Gln |      |  |
|     |     |     | 740 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 750 |      |  |
| GTC | ATC | ACA | TCC | AAG | CAG | AGG | CCC | CGG | AAA | TTG | ACA | CTT | ATG | GGC | AGC | 2304 |  |
| Val | Ile | Thr | Ser | Lys | Gln | Arg | Pro | Arg | Lys | Leu | Thr | Leu | MET | Gly | Ser |      |  |
|     |     |     | 755 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 765 |      |  |
| AAC | GGA | CAT | GAG | TTT | GTT | TTC | CTT | CTA | AAA | GGC | CAT | GAA | GAT | CTG | CGC | 2352 |  |
| Asn | Gly | His | Glu | Phe | Val | Phe | Leu | Leu | Lys | Gly | His | Glu | Asp | Leu | Arg |      |  |
|     |     |     | 770 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 780 |      |  |

10

20

30

40

50

|   |      |     |
|---|------|-----|
| CAG GAT GAG CGT GTG ATG CAG CTC TTC GGC CTG GTT AAC ACC CTT CTG | 2400 |     |
| Gln Asp Glu Arg Val MET Gln Leu Phe Gly Leu Val Asn Thr Leu Leu |      |     |
| 785   | 790  | 800 |
| GCC AAT GAC CCA ACA TCT CTT CGG AAA AAC CTC AGC ATC CAG AGA TAC | 2448 |     |
| Ala Asn Asp Pro Thr Ser Leu Arg Lys Asn Leu Ser Ile Gln Arg Tyr |      |     |
|   | 805  | 815 |
| GCT GTC ATC CCT TTA TCG ACC AAC TCG GGC CTC ATT GGC TGG GTT CCC | 2496 |     |
| Ala Val Ile Pro Leu Ser Thr Asn Ser Gly Leu Ile Gly Trp Val Pro |      | 10  |
|   | 820  | 830 |
| CAC TGT GAC ACA CTG CAC GCC CTC ATC CGG GAC TAC AGG GAG AAG AAG | 2544 |     |
| His Cys Asp Thr Leu His Ala Leu Ile Arg Asp Tyr Arg Glu Lys Lys |      |     |
|   | 835  | 845 |
| AAG ATC CTT CTC AAC ATC GAG CAT CGC ATC ATG TTG CGG ATG GCT CCG | 2592 |     |
| Lys Ile Leu Leu Asn Ile Glu His Arg Ile MET Leu Arg MET Ala Pro |      |     |
|   | 850  | 860 |
| GAC TAT GAC CAC TTG ACT CTG ATG CAG AAG GTG GAG GTG TTT GAG CAT | 2640 |     |
| Asp Tyr Asp His Leu Thr Leu MET Gln Lys Val Glu Val Phe Glu His |      | 20  |
|   | 865  | 880 |
| GCC GTC AAT AAT ACA GCT GGG GAC GAC CTG GCC AAG CTG CTG TGG CTG | 2688 |     |
| Ala Val Asn Asn Thr Ala Gly Asp Asp Leu Ala Lys Leu Leu Trp Leu |      |     |
|   | 885  | 895 |
| AAA AGC CCC AGC TCC GAG GTG TGG TTT GAC CGA AGA ACC AAT TAT ACC | 2736 |     |
| Lys Ser Pro Ser Ser Glu Val Trp Phe Asp Arg Arg Thr Asn Tyr Thr |      | 30  |
|   | 900  | 910 |
| CGT TCT TTA GCG GTC ATG TCA ATG GTT GGG TAT ATT TTA GGC CTG GGA | 2784 |     |
| Arg Ser Leu Ala Val MET Ser MET Val Gly Tyr Ile Leu Gly Leu Gly |      |     |
|   | 915  | 925 |
| GAT AGA CAC CCA TCC AAC CTG ATG CTG GAC CGT CTG AGT GGG AAG ATC | 2832 |     |
| Asp Arg His Pro Ser Asn Leu MET Leu Asp Arg Leu Ser Gly Lys Ile |      |     |
|   | 930  | 940 |
| CTG CAC ATT GAC TTT GGG GAC TGC TTT GAG GTT GCT ATG ACC CGA GAG | 2880 |     |
| Leu His Ile Asp Phe Gly Asp Cys Phe Glu Val Ala MET Thr Arg Glu |      | 40  |
|   | 945  | 960 |
| AAG TTT CCA GAG AAG ATT CCA TTT AGA CTA ACA AGA ATG TTG ACC AAT | 2928 |     |
| Lys Phe Pro Glu Lys Ile Pro Phe Arg Leu Thr Arg MET Leu Thr Asn |      |     |
|   | 965  | 975 |
| GCT ATG GAG GTT ACA GGC CTG GAT GGC AAC TAC AGA ATC ACA TGC CAC | 2976 |     |
| Ala MET Glu Val Thr Gly Leu Asp Gly Asn Tyr Arg Ile Thr Cys His |      | 50  |

| 980   | 985  | 990  |      |    |
|---|------|------|------|----|
| ACA GTG ATG GAG GTG CTG CGA GAG CAC AAG GAC AGT GTC ATG GCC GTG |      |      | 3024 |    |
| Thr Val MET Glu Val Leu Arg Glu His Lys Asp Ser Val MET Ala Val |      |      |      |    |
| 995   | 1000 | 1005 |      |    |
| CTG GAA GCC TTT GTC TAT GAC CCC TTG CTG AAC TGG AGG CTG ATG GAC |      |      | 3072 |    |
| Leu Glu Ala Phe Val Tyr Asp Pro Leu Leu Asn Trp Arg Leu MET Asp |      |      |      |    |
| 1010  | 1015 | 1020 |      |    |
| ACA AAT ACC AAA GGC AAC AAG CGA TCC CGA ACG AGG ACG GAT TCC TAC |      |      | 3120 | 10 |
| Thr Asn Thr Lys Gly Asn Lys Arg Ser Arg Thr Arg Thr Asp Ser Tyr |      |      |      |    |
| 1025  | 1030 | 1035 | 1040 |    |
| TCT GCT GGC CAG TCA GTC GAA ATT TTG GAC GGT GTG GAA CTT GGA GAG |      |      | 3168 |    |
| Ser Ala Gly Gln Ser Val Glu Ile Leu Asp Gly Val Glu Leu Gly Glu |      |      |      |    |
| 1045  | 1050 | 1055 |      |    |
| CCA GCC CAT AAG AAA ACG GGG ACC ACA GTG CCA GAA TCT ATT CAT TCT |      |      | 3216 | 20 |
| Pro Ala His Lys Lys Thr Gly Thr Thr Val Pro Glu Ser Ile His Ser |      |      |      |    |
| 1060  | 1065 | 1070 |      |    |
| TTC ATT GGA GAC GGT TTG GTG AAA CCA GAG GCC CTA AAT AAG AAA GCT |      |      | 3264 |    |
| Phe Ile Gly Asp Gly Leu Val Lys Pro Glu Ala Leu Asn Lys Lys Ala |      |      |      |    |
| 1075  | 1080 | 1085 |      |    |
| ATC CAG ATT ATT AAC AGG GTT CGA GAT AAG CTC ACT GGT CGG GAC TTC |      |      | 3312 |    |
| Ile Gln Ile Ile Asn Arg Val Arg Asp Lys Leu Thr Gly Arg Asp Phe |      |      |      |    |
| 1090  | 1095 | 1100 |      |    |
| TCT CAT GAT GAC ACT TTG GAT GTT CCA ACG CAA GTT GAG CTG CTC ATC |      |      | 3360 | 30 |
| Ser His Asp Asp Thr Leu Asp Val Pro Thr Gln Val Glu Leu Leu Ile |      |      |      |    |
| 1105  | 1110 | 1115 | 1120 |    |
| AAA CAA GCG ACA TCC CAT GAA AAC CTC TGC CAG TGC TAT ATT GGC TGG |      |      | 3408 |    |
| Lys Gln Ala Thr Ser His Glu Asn Leu Cys Gln Cys Tyr Ile Gly Trp |      |      |      |    |
| 1125  | 1130 | 1135 |      |    |
| TAC CCT TTC TGG TAA   |      |      |      |    |
| Tyr Pro Phe Trp   |      |      |      | 40 |
| 1140  |      |      |      |    |

## 【配列表】

2007014344000001.app

## フロントページの続き

| (51) Int.Cl.              | F I             | テーマコード(参考) |
|---------------------------|-----------------|------------|
| A 6 1 K 31/711 (2006.01)  | A 6 1 K 31/711  | 4 H 0 4 5  |
| A 6 1 K 31/7105 (2006.01) | A 6 1 K 31/7105 |            |
| A 6 1 P 37/02 (2006.01)   | A 6 1 P 37/02   |            |
| A 6 1 P 37/06 (2006.01)   | A 6 1 P 37/06   |            |
| A 6 1 P 17/00 (2006.01)   | A 6 1 P 17/00   |            |
| A 6 1 P 19/02 (2006.01)   | A 6 1 P 19/02   |            |
| A 6 1 P 29/00 (2006.01)   | A 6 1 P 29/00   | 1 0 1      |
| A 6 1 P 3/10 (2006.01)    | A 6 1 P 3/10    |            |
| A 6 1 P 21/04 (2006.01)   | A 6 1 P 21/04   |            |
| A 6 1 P 25/00 (2006.01)   | A 6 1 P 25/00   |            |
| A 6 1 P 37/00 (2006.01)   | A 6 1 P 37/00   |            |
| A 6 1 P 17/06 (2006.01)   | A 6 1 P 17/06   |            |
| A 6 1 P 17/02 (2006.01)   | A 6 1 P 17/02   |            |
| A 6 1 P 17/08 (2006.01)   | A 6 1 P 17/08   |            |
| A 6 1 P 1/04 (2006.01)    | A 6 1 P 1/04    |            |
| A 6 1 P 27/02 (2006.01)   | A 6 1 P 27/02   |            |
| A 6 1 P 31/04 (2006.01)   | A 6 1 P 31/04   |            |
| A 6 1 P 35/00 (2006.01)   | A 6 1 P 29/00   |            |
| A 6 1 P 31/10 (2006.01)   | A 6 1 P 35/00   |            |
| A 6 1 P 35/02 (2006.01)   | A 6 1 P 31/10   |            |
| A 6 1 P 9/10 (2006.01)    | A 6 1 P 35/02   |            |
| A 6 1 P 9/14 (2006.01)    | A 6 1 P 9/10    | 1 0 1      |
| A 6 1 P 43/00 (2006.01)   | A 6 1 P 9/14    |            |
| G 0 1 N 33/50 (2006.01)   | A 6 1 P 43/00   | 1 0 5      |
| G 0 1 N 33/53 (2006.01)   | G 0 1 N 33/50   | Z          |
| G 0 1 N 33/15 (2006.01)   | G 0 1 N 33/53   | G          |
| C 1 2 P 21/08 (2006.01)   | G 0 1 N 33/15   | Z          |
|                           | C 1 2 P 21/08   |            |

(74)代理人 100062144

弁理士 青山 稔

(74)代理人 100081422

弁理士 田中 光雄

(72)発明者 キャサリン・ルー・モルナー - キンバー

アメリカ合衆国 1 9 0 3 8 ペンシルベニア州 グレンサイド、ハリソン・アベニュー 2 2 2 番

(72)発明者 ヤンキュー・チェン

アメリカ合衆国 1 0 0 2 1 ニューヨーク州 ニューヨーク、イースト・シックスティナインズ・ストリート 4 2 7 番 ナンバー 3 イー

(72)発明者 中西 香爾

アメリカ合衆国 1 0 0 2 1 ニューヨーク州 ニューヨーク、リバーサイド・ドライブ 5 6 0 番 アパートメント 9 ジェイ

(72)発明者 アメデオ・アルトゥロ・ファイリ

アメリカ合衆国 0 8 5 5 0 ニュージャージー州 プリンストン・ジャンクション、ランディング・レイン 1 4 番

(72)発明者 トーマス・ジョゼフ・カッジャーノ

アメリカ合衆国 1 9 0 6 7 ペンシルベニア州 モリスビル、ストックハム・アベニュー 3 5 0 番

Fターム(参考) 2G045 AA40 DA36 DA80 FB03

|       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 4B024 | AA01  | AA11  | BA80  | CA01  | CA11  | HA15  | HA17  |       |       |       |
| 4B064 | AG01  | AG27  | CA10  | CA19  | CC24  | CE02  | CE12  | DA01  | DA13  |       |
| 4C084 | AA13  | NA14  | ZA011 | ZA331 | ZA361 | ZA441 | ZA451 | ZA661 | ZA681 | ZA891 |
|       | ZA901 | ZA941 | ZA961 | ZB051 | ZB071 | ZB081 | ZB111 | ZB151 | ZB211 | ZB261 |
|       | ZB271 | ZB321 | ZB351 | ZC351 |       |       |       |       |       |       |
| 4C086 | AA01  | AA02  | EA16  | MA01  | MA04  | NA14  | ZA01  | ZA33  | ZA36  | ZA44  |
|       | ZA45  | ZA66  | ZA68  | ZA89  | ZA90  | ZA94  | ZA96  | ZB05  | ZB07  | ZB08  |
|       | ZB11  | ZB15  | ZB21  | ZB26  | ZB27  | ZB32  | ZB35  | ZC35  |       |       |
| 4H045 | AA10  | AA20  | BA10  | CA40  | DA76  | DA86  | EA20  | EA28  | HA07  |       |

|                |   |         |            |
|----------------|---|---------|------------|
| 专利名称(译)        | 雷帕霉素的效应蛋白   |         |            |
| 公开(公告)号        | <a href="#">JP2007014344A</a>   | 公开(公告)日 | 2007-01-25 |
| 申请号            | JP2006211171  | 申请日     | 2006-08-02 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 惠氏公司<br>纽约市哥伦比亚大学理事会  |         |            |
| 申请(专利权)人(译)    | 魏斯<br>哥伦比亚大学在纽约市的受托人  |         |            |
| [标]发明人         | キャサリンルーモルナーキンバー<br>ヤンキューチェン<br>中西香爾<br>アメデオアルトゥロファイリ<br>トーマスジョゼフカッジャーノ  |         |            |
| 发明人            | キャサリンルーモルナーキンバー<br>ヤンキューチェン<br>中西香爾<br>アメデオアルトゥロファイリ<br>トーマスジョゼフカッジャーノ  |         |            |
| IPC分类号         | C12N15/09 C07K14/47 C07K16/18 C12P21/00 A61K48/00 A61K31/711 A61K31/7105 A61P37/02<br>A61P37/06 A61P17/00 A61P19/02 A61P29/00 A61P3/10 A61P21/04 A61P25/00 A61P37/00 A61P17<br>/06 A61P17/02 A61P17/08 A61P1/04 A61P27/02 A61P31/04 A61P35/00 A61P31/10 A61P35/02 A61P9<br>/10 A61P9/14 A61P43/00 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/15 C12P21/08 A61K31/70 A61K38/00<br>C07H21/04 C07K1/22 C07K14/705 C12N9/12 C12N15/12 C12P21/02 C12R1/19 G01N33/68  |         |            |
| CPC分类号         | A61K38/00 A61P1/04 A61P3/10 A61P17/00 A61P17/02 A61P17/06 A61P17/08 A61P19/02 A61P21/04<br>A61P25/00 A61P27/02 A61P29/00 A61P31/04 A61P31/10 A61P35/00 A61P35/02 C07K14/705 C12N9<br>/1205 G01N33/68  |         |            |
| FI分类号          | C12N15/00.ZNA.A C07K14/47 C07K16/18 C12P21/00.B A61K48/00 A61K31/711 A61K31/7105<br>A61P37/02 A61P37/06 A61P17/00 A61P19/02 A61P29/00.101 A61P3/10 A61P21/04 A61P25/00<br>A61P37/00 A61P17/06 A61P17/02 A61P17/08 A61P1/04 A61P27/02 A61P31/04 A61P29/00 A61P35<br>/00 A61P31/10 A61P35/02 A61P9/10.101 A61P9/14 A61P43/00.105 G01N33/50.Z G01N33/53.G<br>G01N33/15.Z C12P21/08 C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A   |         |            |
| F-TERM分类号      | 2G045/AA40 2G045/DA36 2G045/DA80 2G045/FB03 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA80 4B024<br>/CA01 4B024/CA11 4B024/HA15 4B024/HA17 4B064/AG01 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA19<br>4B064/CC24 4B064/CE02 4B064/CE12 4B064/DA01 4B064/DA13 4C084/AA13 4C084/NA14 4C084<br>/ZA011 4C084/ZA331 4C084/ZA361 4C084/ZA441 4C084/ZA451 4C084/ZA661 4C084/ZA681 4C084<br>/ZA891 4C084/ZA901 4C084/ZA941 4C084/ZA961 4C084/ZB051 4C084/ZB071 4C084/ZB081 4C084<br>/ZB111 4C084/ZB151 4C084/ZB211 4C084/ZB261 4C084/ZB271 4C084/ZB321 4C084/ZB351 4C084<br>/ZC351 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/ZA01<br>4C086/ZA33 4C086/ZA36 4C086/ZA44 4C086/ZA45 4C086/ZA66 4C086/ZA68 4C086/ZA89 4C086<br>/ZA90 4C086/ZA94 4C086/ZA96 4C086/ZB05 4C086/ZB07 4C086/ZB08 4C086/ZB11 4C086/ZB15<br>4C086/ZB21 4C086/ZB26 4C086/ZB27 4C086/ZB32 4C086/ZB35 4C086/ZC35 4H045/AA10 4H045<br>/AA20 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA20 4H045/EA28 4H045/HA07 |         |            |
| 代理人(译)         | 田中, 三夫  |         |            |
| 优先权            | 08/207975 1994-03-08 US<br>08/312023 1994-09-26 US<br>08/384524 1995-02-13 US   |         |            |

外部链接

[Espacenet](#)

摘要(译)

要解决的问题：提供哺乳动物来源的新型雷帕霉素-FKBP12结合蛋白，用于鉴定，设计和合成免疫调节，抗再狭窄或抗肿瘤剂。解决方案：本发明包括新的哺乳动物来源的雷帕霉素-FKBP12结合蛋白，用于免疫调节，抗再狭窄或抗肿瘤剂的鉴定，设计和合成，以及蛋白质和DNA，cDNA，反义RNA和DNA片段的片段。对应于蛋白质。本发明还包括分离蛋白质的方法与与蛋白质有关的治疗用途。 Z

(43) 公開日 平成19年1月25日(2007.1.2)

| (5) Int. Cl.                       | F I        | テーマコード (参考) |
|------------------------------------|------------|-------------|
| <b>C12N 15/09 (2006.01)</b>        | C12N 15/00 | ZNAA 2G045  |
| <b>CO7K 14/47 (2006.01)</b>        | CO7K 14/47 | 4B024       |
| <b>CO7K 16/18 (2006.01)</b>        | CO7K 16/18 | 4B064       |
| <b>C12P 21/00 (2006.01)</b>        | C12P 21/00 | B 4C084     |
| <b>A61K 48/00 (2006.01)</b>        | A61K 48/00 | 4C086       |
| 審査請求 有 請求項の数 24 O L (全 44 頁) 最終頁に続 |            |             |

  

|              |                              |          |                     |
|--------------|------------------------------|----------|---------------------|
| (21) 出願番号    | 特願2006-211171 (P2006-211171) | (71) 出願人 | 591011502           |
| (22) 出願日     | 平成18年8月2日 (2006.8.2)         |          | ワイス                 |
| (62) 分割の表示   | 特願平7-47408の分割                |          | Wye t h             |
| 原出願日         | 平成7年3月7日 (1995.3.7)          |          | アメリカ合衆国07940-0874 ニ |
| (31) 優先権主張番号 | 207975                       |          | ュージャージー州マディソン、ファイブ・ |
| (32) 優先日     | 平成6年3月8日 (1994.3.8)          |          | ジラルダ・ファームズ          |
| (33) 優先権主張国  | 米国 (US)                      | (71) 出願人 | 306018457           |
| (31) 優先権主張番号 | 312023                       |          | ザ・トラスティーズ・オブ・コロンビア・ |
| (32) 優先日     | 平成6年9月26日 (1994.9.26)        |          | ユニバーシティ・イン・ザ・シティ・オブ |
| (33) 優先権主張国  | 米国 (US)                      |          | ・ニューヨーク             |
| (31) 優先権主張番号 | 384524                       |          | アメリカ合衆国・ニューヨーク・1002 |
| (32) 優先日     | 平成7年2月13日 (1995.2.13)        |          | 7・ニュー・ヨーク・ウエスト・ワンハ  |
| (33) 優先権主張国  | 米国 (US)                      |          | ドレッドシックスティーンズ・ストリー  |
|              |                              |          | ・535                |