

(51) Int.Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マコード [*] (参考)
C 1 2 N 15/09	ZNA	A 6 1 K 35/76	2 G 0 4 5
A 6 1 K 35/76		39/395	D 4 B 0 2 4
38/46			P 4 B 0 5 0
39/395		48/00	4 B 0 6 3
		A 6 1 P 1/04	4 B 0 6 4
審査請求 未請求 請求項の数 38 O L (全 69数) 最終頁に続く			

(21)出願番号 特願2003 - 628(P2003 - 628)	(71)出願人 000001029 協和醗酵工業株式会社 東京都千代田区大手町1丁目6番1号
(22)出願日 平成15年1月6日(2003.1.6)	(72)発明者 森山 達哉 京都府宇治市五ヶ庄芝ノ東25 - 6
(31)優先権主張番号 特願2002 - 281(P2002 - 281)	
(32)優先日 平成14年1月7日(2002.1.7)	
(33)優先権主張国 日本(JP)	
特許法第30条第 1 項適用申請有り 平成13年 8 月25日 社団法人日本生化学会発行の「生化学 VOL.73 NO.8 2001」に発表	
	最終頁に続く

(54)【発明の名称】 新規ポリペプチド

(57)【要約】

【課題】 D G リパーゼが関与する疾患の治療薬の探索および開発に有用なポリペプチド、該ポリペプチドをコードするDNA、該ポリペプチドを認識する抗体、およびこれらの利用方法を提供する。

【解決手段】 ヒト脳よりD G リパーゼ活性を有するポリペプチドをコードするDNAを取得し、該ポリペプチドおよび該ポリペプチドを認識する抗体を製造する。さらに、該ポリペプチドまたは該抗体等を用いて、D G リパーゼが関与する疾患の治療薬のスクリーニング系を構築する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 配列番号 1 または 14 で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド。

【請求項 2】 配列番号 1 または 14 で表されるアミノ酸配列において 1 以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加され、かつ配列番号 1 または 14 で表されるアミノ酸配列と 80% 以上の相同性を有するアミノ酸配列を有し、かつジアシルグリセロールリパーゼ活性を有するポリペプチド。

【請求項 3】 請求項 1 または 2 記載のポリペプチドをコードする DNA。

【請求項 4】 配列番号 2、3 または 15 で表される塩基配列からなる DNA。

【請求項 5】 配列番号 3 または 15 で表される塩基配列と相補的な塩基配列を有する DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ配列番号 3 または 15 で表される塩基配列と 80% 以上の相同性を有する塩基配列を有し、かつジアシルグリセロールリパーゼ活性を有するポリペプチドをコードする DNA。

【請求項 6】 請求項 3 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の DNA の塩基配列と相補的な塩基配列を有する DNA。

【請求項 7】 請求項 3 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の DNA をベクターに組み込んで得られる組換え体ベクター。

【請求項 8】 請求項 3 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の DNA と相同な配列からなる RNA をベクターに組み込んで得られる組換え体ベクター。

【請求項 9】 請求項 3 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の DNA、または請求項 7 記載の組換え体ベクターを保有する形質転換体。

【請求項 10】 形質転換体が微生物、動物細胞、植物細胞および昆虫細胞からなる群より選ばれる形質転換体である、請求項 9 記載の形質転換体。

【請求項 11】 形質転換体が、非ヒトトランスジェニック動物またはトランスジェニック植物である、請求項 9 記載の形質転換体。

【請求項 12】 請求項 3 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の DNA を欠損または変異させた非ヒトノックアウト動物。

【請求項 13】 請求項 9 または 10 記載の形質転換体を培地に培養し、培養物中に請求項 1 または 2 記載のポリペプチドを生成蓄積させ、該培養物から該ポリペプチドを採取することを特徴とする、該ポリペプチドの製造方法。

【請求項 14】 請求項 11 記載の非ヒトトランスジェニック動物を飼育し、請求項 1 または 2 記載のポリペプチドを該動物中に生成蓄積させ、該動物中より該ポリペプチドを採取することを特徴とする、該ポリペプチドの製造方法。

【請求項 15】 請求項 11 記載のトランスジェニック

植物を栽培し、請求項 1 または 2 記載のポリペプチドを該植物中に生成蓄積させ、該植物中より該ポリペプチドを採取することを特徴とする、該ポリペプチドの製造方法。

【請求項 16】 請求項 3 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の DNA を用い、イン・ビトロ (in vitro) での転写・翻訳系により請求項 1 または 2 記載のポリペプチドを合成することを特徴とする、該ポリペプチドの製造方法。

【請求項 17】 請求項 3 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の DNA、または請求項 3 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の DNA の連続する少なくとも 15 塩基以上の塩基配列を有する DNA またはオリゴヌクレオチドを用いて、請求項 1 または 2 記載のポリペプチドをコードする DNA の発現を検出または定量する方法。

【請求項 18】 請求項 3 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の DNA、または請求項 3 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の DNA の連続する少なくとも 15 塩基以上の塩基配列を有する DNA またはオリゴヌクレオチドを用いて、請求項 1 または 2 記載のポリペプチドをコードする DNA の変異を検出または同定する方法。

【請求項 19】 請求項 3 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の DNA、または請求項 3 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の DNA の連続する少なくとも 15 塩基以上の塩基配列を有する DNA またはオリゴヌクレオチドを用いて、請求項 1 または 2 記載のポリペプチドをコードする DNA のプロモーター領域および/または転写制御領域を含む DNA を取得する方法。

【請求項 20】 請求項 3 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の DNA、または請求項 3 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の DNA の連続する少なくとも 15 塩基以上の塩基配列を有する DNA またはオリゴヌクレオチドを用いて、請求項 1 または 2 記載のポリペプチドをコードする DNA の転写または mRNA の翻訳を抑制する方法。

【請求項 21】 請求項 1 または 2 記載のポリペプチドを認識する抗体。

【請求項 22】 請求項 21 記載の抗体を用いる、請求項 1 または 2 記載のポリペプチドの免疫学的検出法。

【請求項 23】 請求項 1 または 2 記載のポリペプチドを含有する医薬。

【請求項 24】 医薬が精神分裂病、痛み、脳挫傷、脊髄損傷、多発性硬化症、慢性関節リウマチ、乾癬、炎症性大腸炎、自己免疫疾患、心筋梗塞、脳梗塞、高血圧、嘔吐、食欲不振、悪性腫瘍の予防および/または治療のための医薬である請求項 23 記載の医薬。

【請求項 25】 請求項 3 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の DNA、または請求項 3 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の DNA の連続する少なくとも 15 塩基以上の塩基配列を有する DNA またはオリゴヌクレオチドを含有する医薬。

【請求項 26】 医薬が、うつ病、不安、パーキンソン病、精神分裂病、幻覚、痴呆、記憶障害、マリファナ依

存症、痛み、脳挫傷、脊髄損傷、多発性硬化症、慢性関節リウマチ、乾癬、炎症性大腸炎、自己免疫疾患、喘息、心筋梗塞、脳梗塞、高血圧、嘔吐、食欲不振、過食、肥満、アルコール依存症、悪性腫瘍の診断のための医薬である請求項 25 記載の医薬。

【請求項 27】 医薬がうつ病、不安、パーキンソン病、幻覚、痴呆、記憶障害、マリファナ依存症、喘息、過食、肥満、アルコール依存症の予防および/または治療のための医薬である請求項 25 記載の医薬。

【請求項 28】 請求項 7 または 8 記載の組換え体ベクターを含有する医薬。

【請求項 29】 医薬が精神分裂病、痛み、脳挫傷、脊髄損傷、多発性硬化症、慢性関節リウマチ、乾癬、炎症性大腸炎、自己免疫疾患、心筋梗塞、脳梗塞、高血圧、嘔吐、食欲不振、悪性腫瘍の予防および/または治療のための医薬である請求項 28 記載の医薬。

【請求項 30】 請求項 21 記載の抗体を含有する医薬。

【請求項 31】 医薬が、うつ病、不安、パーキンソン病、精神分裂病、幻覚、痴呆、記憶障害、マリファナ依存症、痛み、脳挫傷、脊髄損傷、多発性硬化症、慢性関節リウマチ、乾癬、炎症性大腸炎、自己免疫疾患、喘息、心筋梗塞、脳梗塞、高血圧、嘔吐、食欲不振、過食、肥満、アルコール依存症、悪性腫瘍の診断のための医薬である請求項 30 記載の医薬。

【請求項 32】 医薬がうつ病、不安、パーキンソン病、幻覚、痴呆、記憶障害、マリファナ依存症、喘息、過食、肥満、アルコール依存症の予防および/または治療のための医薬である請求項 30 記載の医薬。

【請求項 33】 請求項 1 または 2 記載のポリペプチドと被験試料とを接触させ、被験試料による該ポリペプチドが有するジアシルグリセロールリパーゼ活性の変動を測定することを特徴とする、該ポリペプチドが有するジアシルグリセロールリパーゼ活性を変動させる化合物のスクリーニング方法。

【請求項 34】 請求項 1 または 2 記載のポリペプチドを発現する細胞と被験試料とを接触させ、請求項 21 記載の抗体を用い、被験試料による該ポリペプチドの発現量の変動を定量することを特徴とする、該ポリペプチドをコードする DNA の発現を変動させる化合物のスクリー

【請求項 35】 請求項 1 または 2 記載のポリペプチドを発現する細胞と被験試料とを接触させ、請求項 3～6 のいずれか 1 項に記載の DNA、または請求項 3～6 のいずれか 1 項に記載の DNA の連続する少なくとも 15 塩基以上の塩基配列を有する DNA またはオリゴヌクレオチドを用い、該ポリペプチドをコードする DNA の発現を定量することを特徴とする、該ポリペプチドをコードする DNA の発現を変動させる化合物のスクリーニング方法。

*【請求項 36】 請求項 19 記載の方法により取得されるプロモーター領域および/または転写制御領域を含む DNA と、該プロモーター領域および/または転写制御領域を含む DNA の下流に連結させたレポーター遺伝子とを含有するベクターを用いて動物細胞を形質転換し、該形質転換体と被験試料とを接触させ、該レポーター遺伝子の翻訳産物を定量することを特徴とする、該プロモーター領域および/または転写制御領域による請求項 1 または 2 記載のポリペプチドをコードする DNA の転写効率を変動させる化合物のスクリーニング方法。

【請求項 37】 請求項 11 記載の非ヒトトランスジェニック動物に被験試料を投与し、請求項 3～6 のいずれか 1 項に記載の DNA、または請求項 3～6 のいずれか 1 項に記載の DNA の連続する少なくとも 15 塩基以上の塩基配列を有する DNA またはオリゴヌクレオチドを用い、請求項 1 または 2 記載のポリペプチドをコードする DNA の発現を定量することを特徴とする、該ポリペプチドをコードする DNA の発現を変動させる化合物のスクリーニング方法。

【請求項 38】 請求項 33～37 のいずれか 1 項に記載のスクリーニング方法により得られる化合物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、ジアシルグリセロールリパーゼ活性を有するポリペプチド、該ポリペプチドをコードする DNA、該ポリペプチドを認識する抗体および該ポリペプチドの製造方法、ならびに、それらを用いた診断薬、治療薬のスクリーニング方法に関する。

【0002】

【従来の技術】グリセロール骨格の 2 位にアラキドン酸を結合したモノアシルグリセロールである 2 - アラキドノイルグリセロール（以下、2 - AG と略す。）は機能的脂質分子の一つである（例えば、非特許文献 1 参照）。2 - AG には、海馬における長期増強（LTP）抑制作用（例えば、非特許文献 2 参照）、脳損傷後における神経防護作用（例えば、非特許文献 3 参照）、培養神経細胞の保護作用（例えば、非特許文献 4 参照）、ならびに興奮性シナプス後電位（EPSP）の抑制作用（例えば、非特許文献 5 参照）が知られている。また、パーキンソン病の動物モデルにおいては、淡蒼球における 2 - AG の上昇が報告されている（例えば、非特許文献 6 参照）。また、2 - AG の免疫や炎症に関連する作用として、リンパ球からのインターロイキン - 2（IL - 2）の産生抑制作用（例えば、非特許文献 7 参照）、混合リンパ球反応の抑制作用、CD3 抗体刺激による T 細胞増殖の抑制作用、リボ多糖刺激の B 細胞増殖の抑制作用（例えば、非特許文献 8 参照）、およびマクロファージからの腫瘍壊死因子（TNF - α）の産生抑制作用（例えば、非特許文献 9 参照）が知られている。さらに、2 - AG の循環器系に対する作用として、血管から

の一酸化窒素産生の促進（例えば、非特許文献10参照）および血圧の低下作用が知られている（例えば、非特許文献11参照）。2-AGは、脳以外にも肝臓、脾臓、肺、腎臓等多くの組織で高濃度に産生されていることが知られている（例えば、非特許文献12参照）。これらのことから、2-AGは生体内で重要な役割をしていることが示唆されている。

【0003】2-AGは、マリファナの成分であるカンナビノイドが結合するカンナビノイド受容体に対する内因性のリガンドである（例えば、非特許文献13参照）。カンナビノイド受容体には中枢で主に発現しているカンナビノイド1受容体（CB1）と、末梢で主に発現しているカンナビノイド2受容体（CB2）が知られている（例えば、非特許文献14参照）。内因性のカンナビノイド受容体のリガンドとして報告されているN-パルミトイルエタノールアミン（N-palmitoylethanolamine）やアナンダミド（anandamide）はCB2には結合しないが、2-AGはCB2のリガンドとなることが明らかとなり、2-AGはCB2に対して最も重要な内因性のリガンドであることがわかった（例えば、非特許文献15参照）。

【0004】マリファナの成分でありカンナビノイド受容体の作動薬のデルタ-9-テトラヒドロカンナビノールは、ヒトにおいて鎮痛薬（例えば、非特許文献16参照）として報告されているとともに、カンナビノイドの1つであるナビロン（nabilone）は米国で化学療法時の嘔吐剤ならびにエイズ患者の食欲増進剤として使われている。多発性硬化症のモデルにおいてはカンナビノイド受容体作動薬を投与すると、振戦や痙攣が緩和された（例えば、非特許文献17参照）。CB1拮抗薬の作用としては、記憶障害を改善すること（例えば、非特許文献18参照）やアルコールの摂取量を減弱させること（例えば、非特許文献19参照）が報告されている。また、カンナビノイド受容体拮抗薬は、組織障害によって誘発される痛みを増強することが報告されている（例えば、非特許文献20参照）。肺における作用として、CB1の刺激により気道の収縮が見られることが報告されている（例えば、非特許文献21参照）。末梢で主に発現しているCB2は、免疫や炎症に広く関与していることが報告されている（例えば、非特許文献14参照）。また、カンナビノイド受容体の内因性リガンドは、種々の腫瘍細胞の増殖や細胞増殖因子の産生に関係することが報告されている（例えば、非特許文献22参照）。

【0005】2-AGの生成経路に関しては、イノシトールリン脂質から生成することが示唆されている。細胞が刺激を受けたとき、イノシトールリン脂質が分解されて生成したジアシルグリセロール（DG）は、プロテインキナーゼCの活性化を引き起こすが、その後、ジアシルグリセロールキナーゼやジアシルグリセロールリパーゼ（以下、DGリパーゼと略す。）によって代謝される

（例えば、非特許文献23参照）。このうち、DGリパーゼは、DGの1位の脂肪酸を加水分解する酵素である。イノシトールリン脂質は2位の位置に主にアラキドン酸を含有しているため、イノシトールリン脂質由来のDGにDGリパーゼが作用すると2-AGが生成する。従って、DGリパーゼは生体内における2-AG産生酵素の有力な候補であり、脂質性情報伝達系におけるキーンゼイムの一つである（例えば、非特許文献24参照）。DGリパーゼはヒト血小板活性化時に作動することが見いだされ（例えば、非特許文献25参照）、本酵素はヒト血小板膜画分から初めて精製された（例えば、非特許文献26参照）。これらの知見は、DGリパーゼがカンナビノイド受容体の内因性のリガンドである2-AGの生合成に重要な酵素であることを示唆している。

【0006】以上のことから、DGリパーゼ、活性促進剤およびDGリパーゼ遺伝子の発現促進剤は2-AGの生合成を促進することで、精神分裂病、痛み、脳挫傷、脊髄損傷、多発性硬化症、慢性関節リウマチ、乾癬、炎症性大腸炎、自己免疫疾患、心筋梗塞、脳梗塞、高血圧、嘔吐、食欲不振、悪性腫瘍等の予防ならびに治療に、DGリパーゼ阻害剤、DGリパーゼの活性を阻害する抗体、DGリパーゼの遺伝子発現の抑制剤は、2-AGの生合成を阻害することで、うつ病、不安、パーキンソン病、幻覚、痴呆、記憶障害、マリファナ依存症、喘息、過食、肥満、アルコール依存症等の予防ならびに治療に用いることができる。

【0007】DGリパーゼをコードする遺伝子については、カビ由来のDGリパーゼ遺伝子（例えば、非特許文献27および非特許文献28参照）およびヒト由来のDGリパーゼcDNA（例えば、非特許文献29参照）が報告されている。

【0008】

【非特許文献1】「ケミストリー・アンド・フィジックス・オブ・リピッズ（Chemistry and Physics of Lipids）」、（アイルランド）、2000年、第108巻、第1-2号、p. 89-106

【0009】

【非特許文献2】「ネイチャー（Nature）」、（イギリス）、1997年、第388巻、第6644号、p. 773-778

【0010】

【非特許文献3】「ネイチャー（Nature）」、（イギリス）、2001年、第413巻、第6855号、p. 527-531

【0011】

【非特許文献4】「ニューロサイエンス・レターズ（Neuroscience Letters）」、（アイルランド）、2000年、第278巻、第3号、p. 157-160

【0012】

【非特許文献5】「ナウニン・シュミーデベルグズ・ア

ーカイプス・オブ・ファーマコロジー (Naunyn-Schmied
eberg's Archives of Pharmacology) 」, (ドイツ) 2
000年, 第361巻, 第3号, p. 261 - 272

【0013】

【非特許文献6】「ザ・FASEB・ジャーナル (The
FASEB Journal) 」, (米国), 2000年, 第14
巻, 第10号, p. 1423 - 1431

【0014】

【非特許文献7】「モレキュラー・ファーマコロジー
(Molecular Pharmacology) 」, (米国), 1998
年, 第53巻, 第4号, p. 676 - 683

【0015】

【非特許文献8】「ザ・ジャーナル・オブ・ファーマコ
ロジー・アンド・エクスペリメンタル・セラピューティ
クス (The Journal of Pharmacology and Experimental
Therapeutics) 」, (米国), 1995年, 第275
巻, 第2号, p. 529 - 536

【0016】

【非特許文献9】「ヨーロピアン・ジャーナル・オブ・
ファーマコロジー (European Journal of Pharmacolog
y) 」, (オランダ), 2000年, 第406巻, 第1
号, p. R5 - 7

【0017】

【非特許文献10】「ファーマコロジカル・リサーチ
(Pharmacological Research) 」, (イギリス), 20
00年, 第42巻, 第4号, p. 317 - 322

【0018】

【非特許文献11】「ハイパーテンション (Hypertensi
on) 」, (米国), 2000年, 第35巻, 第2号,
p. 679 - 684

【0019】

【非特許文献12】「FEBS・レターズ (FEBS Lette
rs) 」, (オランダ), 1998年, 第429巻, 第2
号, p. 152 - 156

【0020】

【非特許文献13】「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 (Bioche
mical and Biophysical Research Communication
s) 」, (米国), 1995年, 第215巻, 第1号,
p. 89 - 97

【0021】

【非特許文献14】「イムノロジー・トゥデイ (Immuno
logy Today) 」, (イギリス), 1998年, 第19
巻, 第8号, p. 373 - 381

【0022】

【非特許文献15】「ザ・ジャーナル・オブ・バイオリ
ジカル・ケミストリー (The Journal of Biological Ch
emistry) 」, (米国), 2000年, 第275巻, 第
1号, p. 605 - 612

【0023】

【非特許文献16】「ヨーロピアン・アーカイブズ・オブ・
サイキアトリー・アンド・クリニカル・ニューロサイ
エンス (European Archives of Psychiatry and Clin
ical Neuroscience) 」, (ドイツ), 1990年, 第
249巻, 第1号, p. 1 - 6

【0024】

【非特許文献17】「ネイチャー (Nature) 」, (イギ
リス), 2000年, 第404巻, 第6773号, p.
84 - 87

【0025】

【非特許文献18】「サイコファーマコロジー (Psycho
pharmacology) 」, (ドイツ), 1996年, 第126
巻, 第2号, p. 165 - 172

【0026】

【非特許文献19】「サイコファーマコロジー (Psycho
pharmacology) 」, (ドイツ), 1997年, 第132
巻, 第1号, p. 104 - 106

【0027】

【非特許文献20】「ネイチャー (Nature) 」, (イギ
リス), 1998年, 第394巻, 第6690号, p.
277 - 281

【0028】

【非特許文献21】「ネイチャー (Nature) 」, (イギ
リス), 2000年, 第408巻, 第6808号, p.
96 - 101

【0029】

【非特許文献22】「プロスタグランジンズ・アンド・
アザー・リピッド・メディエーターズ (Prostaglandins
& Other Lipid Mediators) 」, (米国), 2000
年, 第61巻, 第1 - 2号, p. 43 - 61

【0030】

【非特許文献23】「化学と生物」, 1992年, 第3
0巻, 第11号, p. 714 - 722

【0031】

【非特許文献24】「化学と生物」, 1999年, 第3
7巻, 第9号, p. 564 - 566

【0032】

【非特許文献25】「バイオサイエンス、バイオテクノ
ロジー、アンド・バイオケミストリー (Bioscience, Bi
otechnology, and Biochemistry) 」, 日本農芸化学
会, 1994年, 58巻, 第1号, p. 93 - 98

【0033】

【非特許文献26】「ジャーナル・オブ・バイオケミ
ストリー (Journal of Biochemistry) 」, 日本生化学
会, 1999年, 125巻, 第6号, p. 1077 - 1
085

【0034】

【非特許文献27】「バイオサイエンス、バイオテクノ
ロジー、アンド・バイオケミストリー (Bioscience, Bi
otechnology, and Biochemistry) 」, 日本農芸化学

会, 1992年, 56巻, 第2号, p. 315 - 319
【0035】

【非特許文献28】「ジーン (Gene)」, (オランダ), 1991年, 第103巻, 第1号, p. 61 - 67

【0036】

【非特許文献29】森山達哉、他2名, 「ヒト膜結合型ジアシルグリセロールリパーゼのクローニングと発現解析」, 日本農芸化学会誌, 2001年, 第75巻, 臨時増刊号 (2001年度大会講演要旨集), p. 93

【0037】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、うつ病、不安、パーキンソン病、精神分裂病、幻覚、痴呆、記憶障害、マリファナ依存症、痛み、脳挫傷、脊髄損傷、多発性硬化症、慢性関節リウマチ、乾癬、炎症性大腸炎、自己免疫疾患、喘息、心筋梗塞、脳梗塞、高血圧、嘔吐、食欲不振、過食、肥満、アルコール依存症、悪性腫瘍等の診断、予防および治療に有用な、新規なヒト由来DGLリパーゼ、該蛋白質をコードするDNA、該蛋白質を認識する抗体、該蛋白質の製造方法およびこれらを用いた上記疾患の診断薬、予防薬および治療薬のスクリーニング方法等を提供することにある。

【0038】

【課題を解決するための手段】本発明は以下の(1)～(38)を提供するものである。

(1) 配列番号1または14で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド。

(2) 配列番号1または14で表されるアミノ酸配列において1以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加され、かつ配列番号1または14で表されるアミノ酸配列と80%以上の相同性を有するアミノ酸配列を有し、かつジアシルグリセロールリパーゼ活性を有するポリペプチド。

【0039】(3) (1)または(2)記載のポリペプチドをコードするDNA。

(4) 配列番号2、3または15で表される塩基配列からなるDNA。

(5) 配列番号3または15で表される塩基配列と相補的な塩基配列を有するDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ配列番号3または15で表される塩基配列と80%以上の相同性を有する塩基配列を有し、かつジアシルグリセロールリパーゼ活性を有するポリペプチドをコードするDNA。

【0040】(6) (3)～(5)のいずれか1項に記載のDNAの塩基配列と相補的な塩基配列を有するDNA。

(7) (3)～(6)のいずれか1項に記載のDNAをベクターに組み込んで得られる組換え体ベクター。

(8) (3)～(6)のいずれか1項に記載のDNAと相同な配列からなるRNAをベクターに組み込んで得

られる組換え体ベクター。

【0041】(9) (3)～(6)のいずれか1項に記載のDNA、または(7)記載の組換え体ベクターを保有する形質転換体。

(10) 形質転換体が微生物、動物細胞、植物細胞および昆虫細胞からなる群より選ばれる形質転換体である、(9)記載の形質転換体。

(11) 形質転換体が、非ヒトトランスジェニック動物またはトランスジェニック植物である、(9)記載の形質転換体。

【0042】(12) (3)～(6)のいずれか1項に記載のDNAを欠損または変異させた非ヒトノックアウト動物。

(13) (9)または(10)記載の形質転換体を培地に培養し、培養物中に(1)または(2)記載のポリペプチドを生成蓄積させ、該培養物から該ポリペプチドを採取することを特徴とする、該ポリペプチドの製造方法。

【0043】(14) (11)記載の非ヒトトランスジェニック動物を飼育し、(1)または(2)記載のポリペプチドを該動物中に生成蓄積させ、該動物中より該ポリペプチドを採取することを特徴とする、該ポリペプチドの製造方法。

(15) (11)記載のトランスジェニック植物を栽培し、(1)または(2)記載のポリペプチドを該植物中に生成蓄積させ、該植物中より該ポリペプチドを採取することを特徴とする、該ポリペプチドの製造方法。

【0044】(16) (3)～(6)のいずれか1項に記載のDNAを用い、イン・ビトロ (in vitro) での転写・翻訳系により(1)または(2)記載のポリペプチドを合成することを特徴とする、該ポリペプチドの製造方法。

(17) (3)～(6)のいずれか1項に記載のDNA、または(3)～(6)のいずれか1項に記載のDNAの連続する少なくとも15塩基以上の塩基配列を有するDNAまたはオリゴヌクレオチドを用いて、(1)または(2)記載のポリペプチドをコードするDNAの発現を検出および定量する方法。

【0045】(18) (3)～(6)のいずれか1項に記載のDNA、または(3)～(6)のいずれか1項に記載のDNAの連続する少なくとも15塩基以上の塩基配列を有するDNAまたはオリゴヌクレオチドを用いて、(1)または(2)記載のポリペプチドをコードするDNAの変異を検出および同定する方法。

(19) (3)～(6)のいずれか1項に記載のDNA、または(3)～(6)のいずれか1項に記載のDNAの連続する少なくとも15塩基以上の塩基配列を有するDNAまたはオリゴヌクレオチドを用いて、(1)または(2)記載のポリペプチドをコードするDNAのプロモーター領域および/または転写制御領域を含むDN

Aを取得する方法。

【0046】(20) (3)～(6)のいずれか1項に記載のDNA、または(3)～(6)のいずれか1項に記載のDNAの連続する少なくとも15塩基以上の塩基配列を有するDNAまたはオリゴヌクレオチドを用いて、(1)または(2)記載のポリペプチドをコードするDNAの転写またはmRNAの翻訳を抑制する方法。

【0047】(21) (1)または(2)記載のポリペプチドを認識する抗体。

(22) (21)記載の抗体を用いる、(1)または(2)記載のポリペプチドの免疫学的検出法。

(23) (1)または(2)記載のポリペプチドを含む医薬。

(24) 医薬が、精神分裂病、痛み、脳挫傷、脊髄損傷、多発性硬化症、慢性関節リウマチ、乾癬、炎症性大腸炎、自己免疫疾患、心筋梗塞、脳梗塞、高血圧、嘔吐、食欲不振、悪性腫瘍の予防および/または治療のための医薬である(23)記載の医薬。

【0048】(25) (3)～(6)のいずれか1項に記載のDNA、または(3)～(6)のいずれか1項に記載のDNAの連続する少なくとも15塩基以上の塩基配列を有するDNAまたはオリゴヌクレオチドを含む医薬。

(26) 医薬が、うつ病、不安、パーキンソン病、精神分裂病、幻覚、痴呆、記憶障害、マリファナ依存症、痛み、脳挫傷、脊髄損傷、多発性硬化症、慢性関節リウマチ、乾癬、炎症性大腸炎、自己免疫疾患、喘息、心筋梗塞、脳梗塞、高血圧、嘔吐、食欲不振、過食、肥満、アルコール依存症、悪性腫瘍の診断のための医薬である(25)記載の医薬。

【0049】(27) 医薬が、うつ病、不安、パーキンソン病、幻覚、痴呆、記憶障害、マリファナ依存症、喘息、過食、肥満、アルコール依存症の予防および/または治療のための医薬である(25)記載の医薬。

(28) (7)または(8)記載の組換え体ベクターを含む医薬。

(29) 医薬が、精神分裂病、痛み、脳挫傷、脊髄損傷、多発性硬化症、慢性関節リウマチ、乾癬、炎症性大腸炎、自己免疫疾患、心筋梗塞、脳梗塞、高血圧、嘔吐、食欲不振、悪性腫瘍の予防および/または治療のための医薬である(28)記載の医薬。

【0050】(30) (21)記載の抗体を含む医薬。

(31) 医薬が、うつ病、不安、パーキンソン病、精神分裂病、幻覚、痴呆、記憶障害、マリファナ依存症、痛み、脳挫傷、脊髄損傷、多発性硬化症、慢性関節リウマチ、乾癬、炎症性大腸炎、自己免疫疾患、喘息、心筋梗塞、脳梗塞、高血圧、嘔吐、食欲不振、過食、肥満、アルコール依存症、悪性腫瘍の診断のための医薬である(30)記載の医薬。

【0051】(32) 医薬がうつ病、不安、パーキンソン病、幻覚、痴呆、記憶障害、マリファナ依存症、喘息、過食、肥満、アルコール依存症の予防および/または治療のための医薬である(30)記載の医薬。

(33) (1)または(2)記載のポリペプチドと被験試料とを接触させ、被験試料による該ポリペプチドが有するジアシルグリセロールリパーゼ活性の変動を測定することを特徴とする、該ポリペプチドが有するジアシルグリセロールリパーゼ活性を変動させる化合物のスクリーニング方法。

【0052】(34) (1)または(2)記載のポリペプチドを発現する細胞と被験試料とを接触させ、(21)記載の抗体を用い、被験試料による該ポリペプチドの発現量の変動を定量することを特徴とする、該ポリペプチドをコードするDNAの発現を変動させる化合物のスクリーニング方法。

(35) (1)または(2)記載のポリペプチドを発現する細胞と被験試料とを接触させ、(3)～(6)のいずれか1項に記載のDNA、または(3)～(6)のいずれか1項に記載のDNAの連続する少なくとも15塩基以上の塩基配列を有するDNAまたはオリゴヌクレオチドを用い、該ポリペプチドをコードするDNAの発現を定量することを特徴とする、該ポリペプチドをコードするDNAの発現を変動させる化合物のスクリーニング方法。

【0053】(36) (19)記載の方法により取得されるプロモーター領域および/または転写制御領域を含むDNAと、該プロモーター領域および/または転写制御領域を含むDNAの下流に連結させたレポーター遺伝子とを含むベクターを用いて動物細胞を形質転換し、該形質転換体と被験試料とを接触させ、該レポーター遺伝子の翻訳産物を定量することを特徴とする、該プロモーター領域および/または転写制御領域による

(1)または(2)記載のポリペプチドをコードするDNAの転写効率を変動させる化合物のスクリーニング方法。

【0054】(37) (11)記載の非ヒトトランスジェニック動物に被験試料を投与し、(3)～(6)のいずれか1項に記載のDNAの連続する少なくとも15塩基以上の塩基配列を有するDNAまたはオリゴヌクレオチドを用い、(1)または(2)記載のポリペプチドをコードするDNAの発現を定量することを特徴とする、該ポリペプチドをコードするDNAの発現を変動させる化合物のスクリーニング方法。

【0055】(38) (33)～(37)のいずれか1項に記載のスクリーニング方法により得られる化合物。

【0056】

【発明の実施の形態】本発明のポリペプチドは、DGR

パーゼ活性を有するポリペプチドであり、D G の 1 位の脂肪酸を加水分解する酵素活性を有する。生体内においては、カンナビノイド受容体の内因性のリガンドである 2 - A G の生合成に関わる重要な酵素である。従って、本発明のポリペプチドは、2 - A G 産生の促進ならびに、2 - A G 産生酵素系の阻害剤および促進剤等の探索、評価に利用することができる。

【0057】本発明のポリペプチドとしては、配列番号 1 または 14 で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、配列番号 1 または 14 で表されるアミノ酸配列において 1 以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加され、かつ配列番号 1 または 14 で表されるアミノ酸配列と B L A S T [J. Mol. Biol., 215, 403 (1990)] や F A S T A [Methods Enzymol., 183, 63 (1990)] 等を用いて計算したときに、80%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ D G リパーゼ活性を有するポリペプチドをあげることができる。なお、配列番号 14 で表されるアミノ酸配列は配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の 1 ~ 171 番目の配列を欠失した配列と一致する。

【0058】本明細書に記載される相同性の数値は、特に明示した場合を除き、当業者に公知の相同性検索プログラムを用いて算出される数値であってよいが、塩基配列、アミノ酸配列については、好ましくは B L A S T [J. Mol. Biol., 215, 403 (1990)] または F A S T A [Methods Enzymol., 183, 63 (1990)] においてデフォルト（初期設定）のパラメータを用いて算出される数値である。

【0059】配列番号 1 または 14 で表されるアミノ酸配列において 1 以上のアミノ酸が欠失、置換または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ D G リパーゼ活性を有するポリペプチドは、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory (1989)（以下、モレキュラー・クローニング第 2 版と略す）、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987-1997)（以下、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジーと略す）、Nucleic Acids Res., 10, 6487 (1982)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 6409 (1982)、Gene, 34, 315 (1985)、Nucleic Acids Res., 13, 4431 (1985)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 488 (1985) 等に記載の部位特異的変異導入法を用いて、例えば配列番号 1 または 14 で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする DNA に部位特異的変異を導入することにより、取得することができる。欠失、置換もしくは付加されるアミノ酸の数は特に限定されないが、上記の部位特異的変異法等の周知の方法により欠失、置換もしくは付加できる程度の数であり、1 個から数十個、好ましくは 1 ~ 20 個、より好ましくは 1 ~ 10 個、さらに好ましくは 1 ~ 5 個である。

【0060】また、本発明のポリペプチドが D G リパーゼ活性を有するためには、配列番号 1 または 14 で表されるアミノ酸配列と、B L A S T [J. Mol. Biol., 215, 403 (1990)] や F A S T A [Methods Enzymol., 183, 63 (1990)] 等を用いて計算したときに、少なくとも 80%以上、特に 95%以上の相同性を有していることが好ましい。

【0061】配列番号 1 または 14 で表されるアミノ酸配列において 1 以上のアミノ酸が欠失、置換または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ D G リパーゼ活性を有するポリペプチドの例として、配列番号 14 で表されるアミノ酸配列の N 末端にメチオニンを 1 つ付加した配列である配列番号 20 で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、配列番号 1 の 1 ~ 171 番目の配列中の任意の数および位置のアミノ酸を欠失させたアミノ酸配列からなるポリペプチドをあげることができる。

【0062】本発明の DNA は、本発明のポリペプチドをコードする DNA、例えば、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードする配列番号 2 または 3 で表される塩基配列からなる DNA、配列番号 14 で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードする配列番号 15 で表される塩基配列からなる DNA があげられる。一般に 1 つのアミノ酸に対して複数種の遺伝暗号が存在するため、配列番号 2、3 または 15 とは異なる塩基配列を有する DNA であっても本発明のポリペプチドをコードしていれば本発明の DNA に含まれる。さらに本発明の DNA は、配列番号 3 または 15 で表される塩基配列と相補的な塩基配列を有する DNA とストリンジントな条件下でハイブリダイズし、かつ配列番号 3 または 15 で表される塩基配列と 80%以上の相同性を有する塩基配列を有し、かつ D G リパーゼ活性を有するポリペプチドをコードする DNA も含まれる。

【0063】ストリンジントな条件下でハイブリダイズ可能な DNA とは、配列番号 3 または 15 で表される塩基配列と相補的な塩基配列を有する DNA をプローブとして、コロニー・ハイブリダイゼーション法、ブラーク・ハイブリダイゼーション法あるいはサザンブロット・ハイブリダイゼーション法等を用いることにより得られる DNA を意味し、具体的には、コロニーあるいはブラーク由来の DNA を固定化したフィルターを用いて、0.7 ~ 1.0 mol/l の塩化ナトリウム存在下、65 °C でハイブリダイゼーションを行った後、0.1 ~ 2 倍濃度の SSC 溶液（1 倍濃度の SSC 溶液の組成は、150 mmol/l 塩化ナトリウム、15 mmol/l クエン酸ナトリウムよりなる）を用い、65 °C 条件下でフィルターを洗浄することにより同定できる DNA をあげることができる。ハイブリダイゼーションは、モレキュラー・クローニング第 2 版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、DNA Cloning

1: Core Techniques, A Practical Approach, Second Edition, Oxford University (1995)等に記載されている方法に準じて行うことができる。ハイブリダイズ可能なDNAとして具体的には、BLAST [J. Mol. Biol., 215, 403 (1990)] やFASTA [Methods Enzymol., 183, 63 (1990)] 等を用いて計算したときに、配列番号3または15で表される塩基配列と少なくとも80%以上の相同性を有するDNA、好ましくは95%以上の相同性を有するDNAをあげることができる。

【0064】本発明のDNAには、上記に記載した本発明のポリペプチドをコードするDNAの塩基配列と相補的な塩基配列を有するDNAも含まれる。具体的には配列番号2、3または15で表わされる塩基配列と相補的な塩基配列を有するDNAをあげることができる。本発明のポリペプチドをコードするDNAは、後述する方法で調製したときに、通常2本鎖DNAとして得られるので、本発明のポリペプチドをコードするDNAと同時に本発明のポリペプチドをコードするDNAの塩基配列と相補的な塩基配列を有するDNAも得ることができる。2本鎖DNAを100℃で5分間熱した後、氷上で急速に冷却することにより、本発明のポリペプチドをコードするDNAと該DNAの塩基配列と相補的な塩基配列を有するDNAを分離することができる。

【0065】以下、本発明を詳細に説明する。

1. DNAの調製

(a) DGリパーゼホモログのcDNAのクローニング
ヒトDGリパーゼのアミノ酸配列(配列番号4)に相同性を有するヒト由来のアミノ酸配列を、SwissProt、PIR、PRF/SEQDB、GenPept等のアミノ酸配列データベースに対して、BLASTあるいはFASTAを用いて検索する。このようにして得られるアミノ酸配列として、ヒトの脳由来のKIAA0659 cDNA [DNA Res. 5, 169 (1998)、GenBank登録番号: AB014559、配列番号6] がコードするKIAA0659蛋白質のアミノ酸配列(PR/SEQDB番号: 2417284BE、配列番号5)をあげることができる。したがって、KIAA0659 cDNAは配列番号4のアミノ酸配列とは別のアミノ酸配列を有するDGリパーゼ(以下、DGリパーゼホモログと呼ぶ)をコードするcDNAと考えられるが、蛋白質のコード領域の途中から下流の領域しか含まない不完全長のcDNAである。完全長のcDNAの塩基配列は、KIAA0659 cDNAの塩基配列の情報をもとに、KIAA0659 cDNAよりも5'側の領域を含むcDNA断片を単離し、その塩基配列とKIAA0659 cDNAの塩基配列から明らかにすることができる。

【0066】KIAA0659 cDNAよりも5'側の領域を含むcDNA断片は、ヒト脳由来のcDNAあるいはcDNAライブラリーをテンプレートにして、c

DNAの5'端に付加したアダプターあるいはcDNAライブラリーのベクターの塩基配列に特異的なプライマーとKIAA0659 cDNAの塩基配列の一部分と相補的な配列を有するKIAA0659特異的なプライマーを用いてPCRを行う、5'-RACE (rapid amplification of cDNA ends) 法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 8998 (1988)] により単離することができる。ヒト脳cDNAとしては、オリゴキャップ法 [Gene, 138, 171 (1994)] により合成したヒト脳cDNA、例えばキャップサイトcDNA dT (Cap Site cDNA dT、ニッポンジーン社) が好ましい。

【0067】得られたcDNA断片の塩基配列を、PRISM3700 (アプライドバイオシステムズ社製) 等のDNAシーケンサーを用いて、その塩基配列を解析し、KIAA0659 cDNAの塩基配列と合わせることで、KIAA0659の完全長cDNAの塩基配列(配列番号2)および該cDNAがコードするDGリパーゼホモログのアミノ酸配列(配列番号1)を明らかにすることができる。得られたKIAA0659の完全長cDNAの塩基配列をもとに設計したプライマーを用いて、ヒト脳由来のcDNAをテンプレートにして、DGリパーゼホモログをコードするDNAを、PCRにより増幅し、単離することができる。プライマーとしては、例えば配列番号3で表わされる塩基配列の1~30番目に相当する塩基配列からなるDNAおよび配列番号3で表わされる塩基配列の3100~3129番目に相当する塩基配列と相補的な塩基配列からなるDNA、あるいは配列番号2で表わされる塩基配列の1~30番目に相当する塩基配列からなるDNAおよび配列番号2で表わされる塩基配列の5731~5760番目に相当する塩基配列と相補的な塩基配列からなるDNAをあげることができる。

【0068】以上のようにして得られるヒトのDGリパーゼホモログをコードするDNAとして、配列番号2で表わされる塩基配列を有するDNA、配列番号3で表わされる塩基配列(配列番号2で表わされる塩基配列の122~3250番目の配列に相当する)を有するDNAをあげることができる。これらのDNAがコードするヒトのDGリパーゼホモログとして配列番号1で表わされるアミノ酸配列を有するポリペプチドをあげることができる。また、(b)に後述するように配列番号15で表わされる塩基配列(配列番号3で表わされる塩基配列の514~3100番目の配列に相当する)を有するDNAも本発明のポリペプチドをコードするDNAに含まれる。配列番号15で表わされる塩基配列がコードする、配列番号14で表わされるアミノ酸配列を有するポリペプチドはDGリパーゼ活性を有し、本発明のポリペプチドに含まれる。

【0069】ヒト以外の由来のDGリパーゼホモログをコードするDNAは、ヒト以外の生物のcDNAライブ

ラリーを作製し、以上のようにして得られたヒト D G リパーゼホモログをコードする DNA をプローブにして、ストリンジェントな条件下でブランクハイブリダイゼーションやコロニーハイブリダイゼーションを行い、ハイブリダイズするポジティブな c DNA クローンとして得ることができる。c DNA ライブラリーの作製およびブランクハイブリダイゼーションやコロニーハイブリダイゼーションはモレキュラー・クロニング第 2 版に記載の方法により行うことができる。また、Gen Bank 等の塩基配列データベース上から、配列番号 2 の塩基配列あるいは配列番号 2 の塩基配列と相補的な塩基配列と連続する 150 bp 以上の領域で 80% 以上の相同性を有するヒト以外の生物の DNA の配列を相同性検索によって検索し、得られた塩基配列を有する DNA 断片を、その生物の c DNA をテンプレートにした PCR によって増幅し単離する。この断片をプローブにしてその生物の c DNA ライブラリーに対して、ストリンジェントな条件下でブランクハイブリダイゼーションやコロニーハイブリダイゼーションを行うことによって、ハイブリダイズするポジティブな c DNA クローンとして得ることができる。得られた c DNA クローンが不完全長で D G リパーゼホモログ全体をコードしていないと考えられる場合は、5' - RACE あるいは 3' - RACE により、さらに 5' 側、3' 側の領域を含む c DNA 断片を得ることができる。配列番号 2 の塩基配列あるいは配列番号 2 の塩基配列と相補的な塩基配列と連続する 150 bp 以上の領域で 80% 以上の相同性を有するヒト以外の生物の DNA の配列としては、マウス新生児肝臓 c DNA クローンの配列 (Gen Bank アクセッション番号: BG061268)、マウス c DNA クローンの配列 (Gen Bank アクセッション番号: AW457280)、マウス c DNA クローンの配列 (Gen Bank アクセッション番号: BF539611)、ニワトリ脳下垂体/視床下部/松果体 c DNA クローンの配列 (Gen Bank アクセッション番号: BI394335)、ブタ c DNA クローンの配列 (Gen Bank アクセッション番号: BG833997)、ラット c DNA クローンの配列 (Gen Bank アクセッション番号: AI030989) 等をあげることができる。

【0070】(b)部分断片およびオリゴヌクレオチドの調製

上述の方法で取得した本発明の DNA の塩基配列情報に基づいて、アプライド・バイオシステムズ (Applied Biosystems) 社等の DNA 合成機により、本発明の DNA の連続した少なくとも 15 塩基以上の塩基配列を有する、センス・ヌクレオチド、アンチセンス・ヌクレオチド等のオリゴヌクレオチドを調製することができる。

【0071】また、本発明の DNA の塩基配列の任意の部分配列を選び、この部分配列の 5' 末端の 20 塩基の配列を有する DNA および部分配列の 3' 端の 20 塩基

の配列と相補的な配列を有する DNA を DNA 合成機を用いて作製し、これらの DNA をプライマーとして、配列番号 2 で表わされる塩基配列を有する DNA をテンプレートとした PCR (polymerase chain reaction) により、選択した任意の部分配列を有する DNA を増幅し、単離することができる。PCR はモレキュラー・クロニング第 2 版に記載の方法で行うことができる。また、2 kb 以上の長い断片は、TaKaRa EX Taq、TaKaRa LA Taq (いずれも宝酒造社製) 等の耐熱性 DNA ポリメラーゼを用いた LA PCR により、通常の、Taq DNA ポリメラーゼを用いる PCR よりも効率的に増幅することができる。また、本発明の DNA を適当な制限酵素で切断後、切断された断片を単離することにより、部分断片を得ることもできる。

【0072】また、これらの部分断片がコードする D G リパーゼの部分長ポリペプチドを、下記 2. に記載した方法に準じて、宿主細胞で発現させ、該部分長ポリペプチドが D G リパーゼ活性を有しているかを調べ、D G リパーゼ活性を有していた場合は、この部分断片は本発明のポリペプチドをコードする DNA に含まれる。このような本発明のポリペプチドをコードする DNA である、配列番号 2 で表される塩基配列を有する DNA の部分断片として、配列番号 15 で表される塩基配列を有する DNA をあげることができる。配列番号 15 で表される塩基配列を有する DNA は、配列番号 15 で表わされる塩基配列の 1 ~ 30 番目に相当する塩基配列からなる DNA および配列番号 15 で表わされる塩基配列の 2587 ~ 2616 番目に相当する塩基配列と相補的な塩基配列からなる DNA をプライマーとした PCR により、調製することができる。

【0073】該オリゴヌクレオチドとしては、本発明の DNA の有する塩基配列中の連続した 15 ~ 60 塩基、好ましくは 20 ~ 60 塩基と同じ配列を有する DNA をあげることができる。PCR のプライマーとして用いる場合には、融解温度 (Tm) および塩基数が極端に変わることはない 1 組のオリゴヌクレオチドが好ましい。例えば、PCR のセンスプライマーとして用いることのできるセンス・ヌクレオチドとして、配列番号 11 に示す塩基配列 (配列番号 2 の塩基配列の 1496 ~ 1521 番目に相当する)、配列番号 16 に示す塩基配列 (配列番号 2 の塩基配列の 619 ~ 648 番目に相当する) を有する DNA、PCR のアンチセンスプライマーとして用いることのできるアンチセンス・ヌクレオチドとして、配列番号 12 に示す塩基配列 (配列番号 2 の塩基配列の 2284 ~ 2308 番目と相補的な塩基配列に相当する) を有する DNA、配列番号 17 に示す塩基配列 (配列番号 2 の塩基配列の 3244 ~ 3268 番目と相補的な塩基配列に相当する) を有する DNA をあげることができる。

【0074】さらに、これらオリゴヌクレオチドの誘導

体（以下、オリゴヌクレオチド誘導体という）もオリゴヌクレオチドとして利用することができる。該オリゴヌクレオチド誘導体としては、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がホスフォロチオエート結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がN3'-P5'ホスフォアミデート結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のリボースとリン酸ジエステル結合がペプチド核酸結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のウラシルがC-5プロピニルウラシルで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のウラシルがC-5チアゾールウラシルで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のシトシンがC-5プロピニルシトシンで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のシトシンがフェノキサジン修飾シトシン（phenoxazine-modified cytosine）で置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のリボースが2'-O-プロピルリボースで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、あるいはオリゴヌクレオチド中のリボースが2'-メトキシエトキシリボースで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体等をあげることができる〔細胞工学, 16, 1463 (1997)〕。

【0075】2. 本発明のポリペプチドの製造

以下に本発明のポリペプチドの製造法について述べる。

【0076】本発明のポリペプチドは、モレキュラー・クローニング第2版やカレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー等に記載された方法等を用い、例えば以下の方法により、本発明のDNAを宿主細胞中で発現させて、製造することができる。上記1.の記載の方法で、本発明のポリペプチドをコードするDNAから、該ポリペプチドをコードする部分を含む適当な長さのDNA断片を調製する。なお、配列番号14で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチドのようにN末端がメチオニンでないポリペプチドを発現させる場合は、DNA断片をPCRを用いて調製する際に、該ポリペプチドをコードする領域の5'末端に開始コドン(ATG)が付加するように、センスプライマーの設計を工夫することが好ましい。

【0077】また、必要に応じて、本発明のポリペプチドをコードする部分の塩基配列を、宿主細胞の発現に最適なコドンとなるように塩基を置換したDNAを調製する。該DNAは本発明のポリペプチドの効率的製造に有用である。該DNA断片、または全長cDNAを適当な発現ベクターのプロモーターの下流に挿入することにより、組換え体ベクターを作製する。

【0078】該組換え体ベクターを、該発現ベクターに適合した宿主細胞に導入する。宿主細胞としては、細菌、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞等、目的とする遺伝子を発現できるものであればいずれも用いること

ができる。発現ベクターとしては、上記宿主細胞において自立複製可能ないしは染色体中への組込が可能で、本発明のポリペプチドをコードするDNAを転写できる位置にプロモーターを含有しているものが用いられる。

【0079】細菌等の原核生物を宿主細胞として用いる場合は、本発明のポリペプチドをコードするDNAを含有してなる組換えベクターは原核生物中で自立複製可能であると同時に、プロモーター、リボソーム結合配列、本発明のDNA、転写終結配列より構成されたベクターであることが好ましい。プロモーターを制御する遺伝子が含まれていてもよい。

【0080】発現ベクターとしては、例えば、pKK223-3〔アマシャム・バイオサイエンス (Amersham Biosciences) 社製〕、pSE280〔インビトロジェン (Invitrogen) 製〕、pKYP10〔特開昭58-110600〕、pKYP200〔Agric. Biol. Chem., 48, 669 (1984)〕、pLSA1〔Agric. Biol. Chem., 53, 277 (1989)〕、pGEL1〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 4306 (1985)〕、pBluescript II SK(-)〔ストラタジーン (STRATAGENE) 社製〕、pTrs30〔*Escherichia coli* JM109/pTrs30 (FERM BP-5407) より調製〕、pTrs32〔*Escherichia coli* JM109/pTrs32 (FERM BP-5408) より調製〕、pGHA2〔*Escherichia coli* IGHA2 (FERM BP-400) より調製、特開昭60-221091〕、pGKA2〔*Escherichia coli* IGKA2 (FERM BP-6798) より調製、特開昭60-221091〕、pTerm2〔US4686191、US4939094、US5160735〕、pSupex、pUB110、pTP5、pC194、pEG400〔J. Bacteriol., 172, 2392 (1990)〕、pGEX-5X-3〔アマシャム・バイオサイエンス社製〕、pET14〔ノバジェン (Novagen) 社製〕等をあげることができる。

【0081】プロモーターとしては、宿主細胞中で機能するものであればいかなるものでもよい。例えば、 P_{trp} プロモーター、 P_{lac} プロモーター、 P_L プロモーター、 P_R プロモーター、T7プロモーター等の、大腸菌やファージ等に由来するプロモーターをあげることができる。また P_{trp} を2つ直列させたプロモーター($P_{trp} \times 2$)、 P_{tac} プロモーター、 P_{lacT7} プロモーター、 P_{let} プロモーターのように人為的に設計改変されたプロモーター等も用いることができる。

【0082】リボソーム結合配列であるシャイン・ダルガノ (Shine-Dalgarno) 配列と開始コドンとの間を適当な距離 (例えば6~18塩基) に調節したプラスミドを用いることが好ましい。本発明の組換えベクターにおいては、本発明のDNAの発現には転写終結配列は必ずしも必要ではないが、構造遺伝子の直下に転写終結配列を配置することが好ましい。

【0083】宿主細胞としては、エシェリヒア属、セラチア属、バチルス属、ブレヴィバクテリウム属、コリネバクテリウム属、ミクロバクテリウム属、シュードモナス属等に属する微生物、例えば、*Escherichia coli* XL1-Blue、*Escherichia coli* XL2-Blue、*Escherichia coli* D

H1、*Escherichia coli* MC1000、*Escherichia coli* KY32 76、*Escherichia coli* W1485、*Escherichia coli* JM10 9、*Escherichia coli* HB101、*Escherichia coli* No.4 9、*Escherichia coli* W3110、*Escherichia coli* GI69 8、*Escherichia coli* TB1、*Serratia ficaria*、*Serratia a fonticola*、*Serratia liquefaciens*、*Serratia marcescens*、*Bacillus subtilis*、*Bacillus amyloliquefaciens*、*Brevibacterium ammoniagenes*、*Brevibacterium immariophilum* ATCC14068、*Brevibacterium saccharolyticum* ATCC14066、*Brevibacterium flavum* ATCC14067、*Brevibacterium lactofermentum* ATCC13869、*Corynebacterium glutamicum* ATCC13032、*Corynebacterium glutamicum* ATCC13869、*Corynebacterium acetoacidophilum* ATCC13870、*Microbacterium ammoniaphilum* ATCC15354、*Pseudomonas putida*、*Pseudomonas sp.* D-0110等をあげることができる。

【0084】組換え体ベクターの導入方法としては、上記宿主細胞へDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、カルシウムイオンを用いる方法〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 2110 (1972)〕、プロトプラスト法（特開昭63-2483942）、またはGene, 17, 107 (1982)やMol. Gen. Genet., 168, 111 (1979)に記載の方法等をあげることができる。

【0085】酵母を宿主細胞として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、YEP13 (ATCC37115)、YEp24 (ATCC37051)、Ycp50 (ATCC37419)、pHS19、pHS15等をあげることができる。プロモーターとしては、酵母菌株中で発現できるものであればいずれのものを用いてもよく、例えば、ヘキソースキナーゼ等の解糖系の遺伝子のプロモーター、PHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーター、gal 1プロモーター、gal 10プロモーター、ヒートショックポリペプチドプロモーター、MF α 1プロモーター、CUP 1プロモーター等をあげることができる。

【0086】宿主細胞としては、*Saccharomyces*属、*Schizosaccharomyces*属、*Kluyveromyces*属、*Trichosporon*属、*Schwanniomyces*属、*Pichia*属、*Candida*属等に属する微生物、例えば、*Saccharomyces cerevisiae*、*Schizosaccharomyces pombe*、*Kluyveromyces lactis*、*Trichosporon pullulans*、*Schwanniomyces alluvius*、*Candida* 40 *tillis*等をあげることができる。

【0087】組換えベクターの導入方法としては、酵母にDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法〔Methods Enzymol., 194, 182 (1990)〕、スフェロプラスト法〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 1929 (1978)〕、酢酸リチウム法〔J. Bacteriol., 153, 163 (1983)〕、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 1929 (1978)記載の方法等をあげることができる。

【0088】動物細胞を宿主として用いる場合には、発

現ベクターとして、例えば、pcDNA3.1(+) (インビトロジェン社製)、pcDNA3.1/Hygro(-) (インビトロジェン社製)、pAGE107〔特開平3-22、Cytotechnology, 3, 133 (1990)〕、pAS3-3 (特開平2-227075)、pCDM8〔Nature, 329, 840 (1987)〕、pREP4 (インビトロジェン社製)、pAGE103〔J. Biochem., 101, 1307 (1987)〕、pAGE210等をあげることができる。

【0089】プロモーターとしては、動物細胞中で機能するものであればいずれも用いることができ、例えば、サイトメガロウイルス (CMV) のIE (immediate early) 遺伝子のプロモーター、SV40の初期プロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒートショックプロモーター、SR α プロモーター等をあげることができる。また、ヒトCMVのIE遺伝子のエンハンサーをプロモーターと共に用いてもよい。

【0090】宿主細胞としては、ヒトの細胞であるナマルバ (Namalwa) 細胞、サルの細胞であるCOS-1細胞 (ATCC番号 CRL-1650)、チャイニーズ・ハムスターの細胞であるCHO細胞、HBT5637 (特開昭63-299)等をあげることができる。動物細胞への組換えベクターの導入方法としては、動物細胞にDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法〔Cytotechnology, 3, 133 (1990)〕、リン酸カルシウム法 (特開平2-227075)、リポフェクション法〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413 (1987)〕、Virology, 52, 456 (1973)に記載の方法等をあげることができる。

【0091】昆虫細胞を宿主として用いる場合には、例えばカレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual, W. H. Freeman and Company, New York (1992)、Bio/Technology(N. Y.), 6, 47 (1988)等に記載された方法によって、ポリペプチドを発現することができる。

【0092】即ち、組換え遺伝子導入ベクターおよびバキュロウイルスを昆虫細胞に共導入して昆虫細胞培養上清中に組換えウイルスを得た後、さらに組換えウイルスを昆虫細胞に感染させ、ポリペプチドを発現させることができる。該方法において用いられる遺伝子導入ベクターとしては、例えば、pVL1392、pVL1393、pBlueBac111 (共にインビトロジェン社製)等をあげることができる。

【0093】バキュロウイルスとしては、例えば、夜盗蛾科昆虫に感染するウイルスであるアウトグラフィ・カリフォルニカ・ヌクレアー・ポリヘドロシス・ウイルス (Autographa californica nuclear polyhedrosis virus)等を用いることができる。昆虫細胞としては、*Spodoptera frugiperda*の卵巣細胞であるSf9、Sf21〔共にBaculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual,

W. H. Freeman and Company, New York (1992)]、*Trichoplusia ni*の卵巣細胞であるHigh 5 (インビトロジェン社製)等を用いることができる。

【0094】組換えウイルスを調製するための、昆虫細胞への上記組換え遺伝子導入ベクターと上記バキュロウイルスの共導入方法としては、例えば、リン酸カルシウム法(特開平2-227075)、リポフェクション法[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413 (1987)]等をあげることができる。植物細胞を宿主細胞として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、Tiプラスミド、タバコモザイクウイルスベクター等をあげることができる。

【0095】プロモーターとしては、植物細胞中で発現できるものであればいずれのものを用いてもよく、例えば、カリフラワーモザイクウイルスの35Sプロモーター、イネアクチン1プロモーター等をあげることができる。宿主細胞としては、タバコ、ジャガイモ、トマト、ニンジン、ダイズ、アブラナ、アルファルファ、イネ、コムギ、オオムギ等の植物細胞等をあげることができる。

【0096】組換えベクターの導入方法としては、植物細胞にDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、アグロバクテリウム(*Agrobacterium*) (特開昭59-140885、特開昭60-70080、WO94/00977)、エレクトロポレーション法(特開昭60-251887)、パーティクルガン(遺伝子銃)を用いる方法(特許第2606856、特許第2517813)等をあげることができる。

【0097】遺伝子を導入した植物の細胞や器官は、ジャーファーマンターを用いて大量培養することができる。また、遺伝子導入した植物細胞を再分化させることにより、遺伝子が導入された植物個体(トランスジェニック植物)を造成することもできる。動物個体を用いて本発明のポリペプチドを生産することもできる。例えば、公知の方法[Am. J. Clin. Nutr., 63, 639S (1996)、Am. J. Clin. Nutr., 63, 627S (1996)、Bio/Technology (N. Y.), 9, 830 (1991)]に準じて、遺伝子を導入した動物中に本発明のポリペプチドを生産することができる。

【0098】プロモーターとしては、動物で発現できるものであればいずれも用いることができるが、例えば、乳腺細胞特異的なプロモーターである α カゼインプロモーター、 β カゼインプロモーター、 β ラクトグロブリンプロモーター、ホエー酸性プロテインプロモーター等が好適に用いられる。遺伝子の発現方法としては、直接発現以外に、モレキュラー・クローニング第2版に記載されている方法等に準じて、分泌生産、融合タンパク質発現等を行うことができる。

【0099】酵母、動物細胞、昆虫細胞または植物細胞により発現させた場合には、糖あるいは糖鎖が付加され

たポリペプチドを得ることができる。以上のようにして得られる本発明の形質転換体を培地に培養し、培養物中に本発明のポリペプチドを生成蓄積させ、該培養物から採取することにより、本発明のポリペプチドを製造することができる。

【0100】本発明の形質転換体を培地に培養する方法は、宿主の培養に用いられる通常の方法に従って行うことができる。本発明の形質転換体が大腸菌等の原核生物あるいは酵母等の真核生物を宿主として得られた形質転換体である場合、該形質転換体を培養する培地として、該形質転換体が資化し得る炭素源、窒素源、無機塩類等を含有し、該形質転換体の培養を効率的に行える培地であれば天然培地、合成培地のいずれを用いてもよい。

【0101】炭素源としては、該形質転換体が資化し得るものであればよく、グルコース、フラクトース、スクロース、これらを含有する糖蜜、デンプンあるいはデンプン加水分解物等の炭水化物、酢酸、プロピオン酸等の有機酸、エタノール、プロパノール等のアルコール類等を用いることができる。窒素源としては、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等の無機酸もしくは有機酸のアンモニウム塩、その他の含窒素化合物、ならびに、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーンステープリカー、カゼイン加水分解物、大豆粕および大豆粕加水分解物、各種発酵菌体およびその消化物等を用いることができる。

【0102】無機塩としては、リン酸二水素カリウム、リン酸水素二カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸銅、炭酸カルシウム等を用いることができる。培養は、振盪培養または深部通気攪拌培養等の好気的条件下で行う。培養温度は15~40℃がよく、培養時間は、通常16時間~7日間である。培養中のpHは3.0~9.0に保持することが好ましい。pHの調整は、無機または有機の酸、アルカリ溶液、尿素、炭酸カルシウム、アンモニア等を用いて行う。

【0103】また、培養中に必要に応じて、アンピシリンやテトラサイクリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。プロモーターとして誘導性のプロモーターを用いた組換えベクターで形質転換した微生物を培養するときには、必要に応じてインデューサーを培地に添加してもよい。例えば、*lac*プロモーターを用いた組換えベクターで形質転換した微生物を培養するときにはイソプロピル- β -D-チオガラクトピラノシド等を、*trp*プロモーターを用いた組換えベクターで形質転換した微生物を培養するときにはインドールアクリル酸等を培地に添加してもよい。

【0104】動物細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているRPMI 1640培地[J. A. M. A., 199, 519 (1967)]、イ

ーグル (Eagle) の MEM 培地 [Science, 122, 501 (1952)]、ダルベッコ改変 MEM 培地 [Virology, 8, 396 (1959)]、199 培地 [Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 73, 1 (1950)] またはこれら培地に牛胎児血清等を添加した培地等を用いることができる。

【0105】培養は、通常 pH 6 ~ 8、30 ~ 40、5% CO₂ 存在下等の条件下で 1 ~ 7 日間行う。また、培養中必要に応じて、カナマイシン、ペニシリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。昆虫細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されている TNM-FH 培地 [Cell Culture, Academic Press, 457-460 (1979)]、Sf-900 II SFM 培地 (インビトロジェン社製)、ExCell400、ExCell405 (いずれも JRH バイオサイエンス (JRH Biosciences) 社製)、グレース (Grace) のインセクト培地 [Nature, 195, 788 (1962)] 等を用いることができる。

【0106】培養は、通常 pH 6 ~ 7、25 ~ 30 等の条件下で、1 ~ 5 日間行う。また、培養中必要に応じて、ゲンタマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。植物細胞を宿主として得られた形質転換体は、細胞として、または植物の細胞や器官に分化させて培養することができる。該形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されている ムラシゲ・アンド・スクーグ培地、ホワイト (White) 培地、またはこれら培地にオーキシン、サイトカニン等、植物ホルモンを添加した培地等を用いることができる。

【0107】培養は、通常 pH 5 ~ 9、20 ~ 40 の条件下で 3 ~ 60 日間行う。

また、培養中必要に応じて、カナマイシン、ハイグロマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。上記のとおり、本発明のポリペプチドをコードする DNA を組み込んだ組換え体ベクターを保有する微生物、動物細胞、あるいは植物細胞由来の形質転換体を、通常の培養方法に従って培養し、該ポリペプチドを生成蓄積させ、該培養物より該ポリペプチドを採取することにより、該ポリペプチドを製造することができる。

【0108】遺伝子の発現方法としては、直接発現以外に、モレキュラー・クローニング第 2 版に記載されている方法等に準じて、分泌生産、融合ポリペプチド発現等を行うことができる。本発明のポリペプチドの生産方法としては、宿主細胞内に生産させる方法、宿主細胞外に分泌させる方法、あるいは宿主細胞外膜上に生産させる方法があり、使用する宿主細胞や、生産させるポリペプチドの構造を変えることにより、該方法を選択することができる。

【0109】本発明のポリペプチドが宿主細胞内あるいは宿主細胞外膜上に生産される場合、ポールソンらの方法 [J. Biol. Chem., 264, 17619 (1989)]、ロウらの方法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 8227 (1989)]、Genes Develop., 4, 1288 (1990)]、または特開平

5-336963、WO94/23021 等に記載の方法を準用することにより、該ポリペプチドを宿主細胞外に積極的に分泌させることができる。

【0110】即ち、遺伝子組換えの手法を用いて、本発明のポリペプチドの活性部位を含むポリペプチドの手前にシグナルペプチドを付加した形で発現させることにより、本発明のポリペプチドを宿主細胞外に積極的に分泌させることができる。また、特開平 2-227075 に記載されている方法に準じて、ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子等を用いた遺伝子増幅系を利用して生産量を上昇させることもできる。

【0111】上記のとおり、本発明のポリペプチドをコードする DNA を組み込んだ組換え体ベクターを保有する微生物、動物細胞、あるいは植物細胞由来の形質転換体を、通常の培養方法に従って培養し、該ポリペプチドを生成蓄積させ、該培養物より該ポリペプチドを採取することにより、該ポリペプチドを製造することができる。

【0112】さらに、遺伝子導入した動物または植物の細胞を再分化させることにより、遺伝子が導入された動物個体 (トランスジェニック非ヒト動物) または植物個体 (トランスジェニック植物) を造成し、これらの個体を用いて本発明のポリペプチドを製造することもできる。形質転換体が動物個体または植物個体の場合は、通常の方法に従って、飼育または栽培し、該ポリペプチドを生成蓄積させ、該動物個体または植物個体より該ポリペプチドを採取することにより、該ポリペプチドを製造することができる。

【0113】動物個体を用いて本発明のポリペプチドを製造する方法としては、例えば公知の方法 [Am. J. Clin. Nutr., 63, 639S (1996)、Am. J. Clin. Nutr., 63, 627S (1996)、Bio/Technology (N. Y.), 9, 830 (1991)] に準じて遺伝子を導入して造成した動物中に本発明のポリペプチドを生産する方法があげられる。動物個体の場合は、例えば、本発明のポリペプチドをコードする DNA を導入したトランスジェニック非ヒト動物を飼育し、該ポリペプチドを該動物中に生成・蓄積させ、該動物中より該ポリペプチドを採取することにより、該ポリペプチドを製造することができる。該動物中の生成・蓄積場所としては、例えば、該動物のミルク (特開昭 63-309192)、卵等をあげることができる。この際に用いられるプロモーターとしては、動物で発現できるものであればいずれも用いることができるが、例えば、乳腺細胞特異的なプロモーターである α カゼインプロモーター、 β カゼインプロモーター、 β ラクトグロブリンプロモーター、ホエー酸性プロテインプロモーター等が好適に用いられる。

【0114】植物個体を用いて本発明のポリペプチドを製造する方法としては、例えば本発明のポリペプチドをコードする DNA を導入したトランスジェニック植物を

公知の方法〔組織培養, 20 (1994)、組織培養, 21 (1995)、Trends Biotechnol., 15, 45 (1997)〕に準じて栽培し、該ポリペプチドを該植物中に生成・蓄積させ、該植物中より該ポリペプチドを採取することにより、該ポリペプチドを生産する方法があげられる。

【0115】本発明のポリペプチドの製造法として他に、本発明のDNAを用いたイン・ビトロ (*in vitro*) での転写・翻訳系による製造法がある。イン・ビトロ転写・翻訳系とは、無細胞システムを用いてDNAからmRNAへの転写、およびmRNAから蛋白質への翻訳を行うことによりポリペプチドを生産する系のことであり、目的のDNAまたは目的のmRNAから目的のポリペプチドを生産できる無細胞システムであればどのようなものでも用いることができる。代表的な無細胞翻訳系として、例えば、ウサギの網状赤血球溶解液 (rabbit reticulocyte lysate) や小麦胚芽抽出液 (wheat germ lysate) を用いた系などがあげられる。イン・ビトロ転写・翻訳系は各社からキットが販売されており、市販のキットを用いてポリペプチドを比較的容易に製造できるようになっている。市販キットとして例えば、In Vitro Express™ Translation Kit (スタラタジーン社製) があげられる。また、本発明のポリペプチドは、公知の方法〔J. Biomol. NMR, 6, 129 (1995)、Science, 242, 1162 (1988)、J. Biochem., 110, 166 (1991)〕に準じたイン・ビトロ転写・翻訳系を用いて生産することもできる。

【0116】本発明の形質転換体により製造されたポリペプチドを単離精製するためには、通常の酵素の単離精製法を用いることができる。例えば本発明のポリペプチドが、細胞内に溶解状態で発現した場合には、培養終了後、細胞を遠心分離により回収し、水系緩衝液にけん濁後、超音波破砕機、フレンチプレス、マントンガウリンホモゲナイザー、ダイノミル等により細胞を破砕し、無細胞抽出液を得る。該無細胞抽出液を遠心分離することにより得られる上清から、通常の酵素の単離精製法、即ち、溶媒抽出法、硫酸等による塩析法、脱塩法、有機溶媒による沈殿法、ジエチルアミノエチル (DEAE) - セファロース、DIAION HPA-75 (三菱化学社製) 等のレジンを用いた陰イオン交換クロマトグラフィー法、S - セファロース (Sephacrose) FF (アマシャム・バイオサイエンス社製) 等のレジンを用いた陽イオン交換クロマトグラフィー法、ブチルセファロース、フェニルセファロース等のレジンを用いた疎水性クロマトグラフィー法、分子篩を用いたゲルろ過法、アフィニティークロマトグラフィー法、クロマトフォーカシング法、等電電気泳動等の電気泳動法等の手法を単独あるいは組み合わせて用い、精製標品を得ることができる。

【0117】また、該ポリペプチドが細胞内に不溶体を形成して発現した場合は、同様に細胞を回収後、破砕し、遠心分離を行うことにより、沈殿画分としてポリペ

プチドの不溶体を回収する。回収したポリペプチドの不溶体を蛋白質変性剤で可溶化する。該可溶化液を希釈または透析し、該可溶化液中の蛋白質変性剤の濃度を下げることにより、該ポリペプチドを正常な立体構造に戻す。該操作の後、上記と同様の単離精製法により該ポリペプチドの精製標品を得ることができる。

【0118】本発明のポリペプチド、あるいは該ポリペプチドに糖鎖の付加されたポリペプチド等の誘導体が細胞外に分泌された場合には、培養上清に該ポリペプチドあるいは該ポリペプチドの誘導体を回収することができる。即ち、該培養物を上記と同様の遠心分離等の手法により処理することにより培養上清を取得し、該培養上清から、上記と同様の単離精製法を用いることにより、精製標品を得ることができる。

【0119】このようにして取得されるポリペプチドとして、例えば、配列番号1で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチドをあげることができる。また、本発明のポリペプチドは、Fmoc法 (フルオレニルメチルオキシカルボニル法)、tBoc法 (t-ブチルオキシカルボニル法) 等の化学合成法によっても製造することができる。また、アドバンスド・ケムテック (Advanced ChemTech) 社、アプライド・バイオシステムズ (Applied Biosystems) 社、島津製作所等のペプチド合成機を利用して化学合成することもできる。

【0120】以上のようにして得られたポリペプチドがDグリパーゼ活性を有していることは、¹⁴C標識したステアロイル側鎖もつ [¹⁴C] ステアロイルDGを基質にした既報〔J. Biochem. 125, 1077 (1999)〕の方法により調べることができる。

【0121】3. 本発明のポリペプチドを認識する抗体の調製

本発明のポリペプチドまたは該ポリペプチドの部分断片ポリペプチドの精製標品、あるいは本発明のポリペプチドの一部のアミノ酸配列を有するペプチドを抗原として用いることにより、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体等、本発明のポリペプチドを認識する抗体を作製することができる。

【0122】(1) ポリクローナル抗体の作製

本発明のポリペプチドまたは該ポリペプチドの部分断片ポリペプチドの精製標品、あるいは本発明のポリペプチドの一部のアミノ酸配列を有するペプチドを抗原として用い、動物に投与することにより本発明のポリペプチドを認識するポリクローナル抗体を作製することができる。

【0123】投与する動物として、ウサギ、ヤギ、ラット、マウス、ハムスター等を用いることができる。該抗原の投与量は動物1匹当たり50 ~ 100 μg 好ましい。ペプチドを用いる場合は、ペプチドをキーホール・リンペット・ヘモシアニン (keyhole limpet haemocyanin; 以下、KLHと略す。) や牛チログロブリン等のキ

ヤリア蛋白に共有結合させたものを抗原とするのが望ましい。抗原とするペプチドは、ペプチド合成機で合成することができる。

【0124】該抗原の投与は、1回目の投与の後1～2週間おきに3～10回行う。各投与後、3～7日目に眼底静脈叢より採血し、該血清が免疫に用いた抗原と反応することを酵素免疫測定法〔酵素免疫測定法(ELISA法)：医学書院刊(1976年)、Antibodies-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)〕等で確認する。

【0125】免疫に用いた抗原に対し、その血清が十分な抗体価を示した非ヒト哺乳動物より血清を取得し、該血清を分離、精製することによりポリクローナル抗体を取得することができる。分離、精製する方法としては、遠心分離、40～50%飽和硫酸アンモニウムによる塩析、カプリル酸沈殿〔Antibodies, A Laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)〕、またはDEAE-セファロースカラム、陰イオン交換カラム、プロテインAまたはG-カラムあるいはゲル濾過カラム等を用いるクロマトグラフィー等を、単独または組み合わせて処理する方法があげられる。

【0126】(2)モノクローナル抗体の作製

(a)抗体産生細胞の調製

免疫に用いた本発明のポリペプチドの部分断片ポリペプチドに対し、その血清が十分な抗体価を示したラットを抗体産生細胞の供給源として供する。

【0127】該抗体価を示したラットに抗原物質を最終投与した後3～7日目に、脾臓を摘出する。該脾臓をMEM培地中で細断し、ピンセットでほぐし、1,200rpmで5分間遠心分離した後、上清を捨てる。得られた沈殿画分の脾細胞をトリス-塩化アンモニウム緩衝液(pH7.65)で1～2分間処理し赤血球を除去した後、MEM培地で3回洗浄し、得られた脾細胞を抗体産生細胞として用いる。

【0128】(b)骨髄腫細胞の調製

骨髄腫細胞としては、マウスまたはラットから取得した株化細胞を使用する。例えば、8-アザグアニン耐性マウス(BALB/c由来)骨髄腫細胞株P3-X63Ag8-U1〔Curr. Topics. Microbiol. Immunol., 81, 1 (1978)、Eur. J. Immunol., 6, 511 (1976)〕、SP2/0-Ag14〔Nature, 276, 269 (1978)〕、P3-X63-Ag8653〔J. Immunol., 123, 1548 (1979)〕、P3-X63-Ag8〔Nature, 256, 495 (1975)〕等を用いることができる。これらの細胞株は、8-アザグアニン培地〔RPMI 1640培地にグルタミン(1.5mmol/l)、2-メルカプトエタノール(5×10⁻⁵mol/l)、ゲンタマイシン(10μg/ml)および牛胎児血清(CSL社製、10%)を加えた培地(以下、正常培地という)に、さらに8-アザグアニン(15μg/ml)を加えた培地〕で継代するが、細胞融合の3～4日前に正常培地で培養し、融合に

は該細胞を2×10⁷個以上用いる。]

【0129】(c)ハイブリドーマの作製

(a)で取得した抗体産生細胞と(b)で取得した骨髄腫細胞をMEM培地またはPBS(リン酸二ナトリウム1.83g、リン酸一カリウム0.21g、食塩7.65g、蒸留水1リットル、pH7.2)でよく洗浄し、細胞数が、抗体産生細胞：骨髄腫細胞=5～10：1になるよう混合し、1200rpmで5分間遠心分離した後、上清を捨てる。

10 【0130】得られた沈殿画分の細胞群をよくほぐし、該細胞群に、攪拌しながら、37℃で、10⁸抗体産生細胞あたり、ポリエチレングライコール-1000(PEG-1000)2g、MEM培地2mlおよびジメチルスルホキシド0.7mlを混合した溶液を0.2～1ml添加し、さらに1～2分間毎にMEM培地1～2mlを数回添加する。

【0131】添加後、MEM培地を加えて全量が50mlになるように調製する。該調製液を900rpmで5分間遠心分離後、上清を捨てる。得られた沈殿画分の細胞を、ゆるやかにほぐした後、メスピペットによる吸込み、吹出しでゆるやかにHAT培地〔正常培地にヒポキサンチン(10⁻⁴mol/l)、チミジン(1.5×10⁻⁵mol/l)およびアミノプテリン(4×10⁻⁷mol/l)を加えた培地〕100ml中に懸濁する。

【0132】該懸濁液を96ウェル培養用プレートに100μl/ウェルずつ分注し、5%CO₂インキュベーター中、37℃で7～14日間培養する。培養後、培養上清の一部をとりアンチボディーズ〔Antibodies, A Laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Chapter 14 (1988)〕等に述べられている酵素免疫測定法により、本発明のポリペプチドの部分断片ポリペプチドに特異的に反応するハイブリドーマを選択する。

【0133】酵素免疫測定法の具体例として、以下の方法をあげることができる。免疫の際、抗原に用いた本発明のポリペプチドの部分断片ポリペプチドを適当なプレートにコートし、ハイブリドーマ培養上清もしくは後述の(d)で得られる精製抗体を第一抗体として反応させ、さらに第二抗体としてビオチン、酵素、化学発光物質あるいは放射線化合物等で標識した抗ラットまたは抗マウスイムノグロブリン抗体を反応させた後に標識物質に応じた反応を行い、本発明のポリペプチドに特異的に反応するものを本発明のモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマとして選択する。

【0134】該ハイブリドーマを用いて、限界希釈法によりクローニングを2回繰り返し〔1回目は、HAT培地(HAT培地からアミノプテリンを除いた培地)、2回目は、正常培地を使用する〕、安定して強い抗体価の認められたものを本発明のモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマ株として選択する。

(d)モノクローナル抗体の調製

プリスタン処理〔2, 6, 10, 14-テトラメチルペンタデカン (Pristane) 0.5mlを腹腔内投与し、2週間飼育する〕した8~10週令のマウスまたはヌードマウスに、(c)で取得した本発明のポリペプチドモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ細胞5~20×10⁶細胞/匹を腹腔内に注射する。10~21日間でハイブリドーマは腹水癌化する。

【0135】該腹水癌化したマウスから腹水を採取し、3000rpmで5分間遠心分離して固形分を除去する。得られた上清より、ポリクローナル抗体で用いた方法と同様の方法でモノクローナル抗体を精製、取得することができる。抗体のサブクラスの決定は、マウスモノクローナル抗体タイピングキットまたはラットモノクローナル抗体タイピングキットを用いて行う。ポリペプチド量は、ローリー法あるいは280nmでの吸光度より算出する。

【0136】4. 本発明の抗体の利用

(1) 本発明のポリペプチドの検出および定量

本発明のポリペプチドを特異的に認識する抗体を用い、抗原抗体反応を行わせることにより、本発明のポリペプチドまたは該ポリペプチドを含む細胞または組織を免疫学的に検出することができる。該検出法は、うつ病、不安、パーキンソン病、幻覚、痴呆、記憶障害、マリファナ依存症、喘息、過食、肥満、アルコール依存症等の本発明のポリペプチドの発現量が増加している疾患あるいは、精神分裂病、痛み、脳挫傷、脊髄損傷、多発性硬化症、慢性関節リウマチ、乾癬、炎症性大腸炎、自己免疫疾患、心筋梗塞、脳梗塞、高血圧、嘔吐、食欲不振、悪性腫瘍等の本発明のポリペプチドの発現量が減少している疾患の診断に利用することができる。また、該検出方法は、本発明のポリペプチドの定量にも用いられる。

【0137】免疫学的に検出および定量する方法としては、蛍光抗体法、酵素免疫測定法(ELISA法)、放射性物質標識免疫抗体法(RIA)、免疫組織染色法や免疫細胞染色法、ウェスタンブロッティング法、ドットブロッティング法、免疫沈降法、サンドイッチELISA法〔単クローン抗体実験マニュアル(講談社サイエンティフィック)(1987)、続生化学実験講座5, 免疫生化学研究法(東京化学同人)(1986)〕等があげられる。

【0138】蛍光抗体法とは、本発明のポリペプチドを細胞内あるいは細胞外に発現した微生物、動物細胞あるいは昆虫細胞または組織に、本発明の抗体を反応させ、さらにフルオレシニン・イソチオシアネート(FITC)などの蛍光物質でラベルした抗マウスIgG抗体あるいはその断片を反応させた後、蛍光色素をフローサイトメーターで測定する方法である。

【0139】酵素免疫測定法(ELISA法)とは、該ポリペプチドを細胞内あるいは細胞外に発現した微生物、動物細胞あるいは昆虫細胞または組織に、本発明の抗体を反応させ、さらにペルオキシダーゼ、ビオチンな

どの酵素標識などを施した抗マウスIgG抗体あるいは結合断片を反応させた後、発色色素を吸光度計で測定する方法である。

【0140】放射性物質標識免疫抗体法(RIA)とは、該ポリペプチドを細胞内あるいは細胞外に発現した微生物、動物細胞あるいは昆虫細胞または組織に、本発明の抗体を反応させ、さらに放射線標識を施した抗マウスIgG抗体あるいはその断片を反応させた後、シンチレーションカウンターなどで測定する方法である。免疫細胞染色法、免疫組織染色法とは、該ポリペプチドを細胞内あるいは細胞外に発現した微生物、動物細胞あるいは昆虫細胞または組織に、該ポリペプチドを特異的に認識する抗体を反応させ、さらにFITCなどの蛍光物質、ペルオキシダーゼ、ビオチンなどの酵素標識を施した抗マウスIgG抗体あるいはその断片を反応させた後、顕微鏡を用いて観察する方法である。

【0141】ウェスタンブロッティング法とは、該ポリペプチドを細胞内あるいは細胞外に発現した微生物、動物細胞あるいは昆虫細胞または組織の抽出液をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動〔Antibodies- A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, (1988)〕で分画した後、該ゲルをPVDf膜あるいはニトロセルロース膜にブロッティングし、該膜に本発明の該ポリペプチドを特異的に認識する抗体を反応させ、さらにFITCなどの蛍光物質、ペルオキシダーゼ、ビオチンなどの酵素標識を施した抗マウスIgG抗体あるいはその断片を反応させた後、標識物質に応じた反応を行う方法である。

【0142】ドットブロッティング法とは、該ポリペプチドを細胞内あるいは細胞外に発現した微生物、動物細胞あるいは昆虫細胞または組織の抽出液をニトロセルロース膜にブロッティングし、該膜に本発明の抗体を反応させ、さらにFITCなどの蛍光物質、ペルオキシダーゼ、ビオチンなどの酵素標識を施した抗マウスIgG抗体あるいは結合断片を反応させた後、標識物質に応じた反応を行う方法である。

【0143】免疫沈降法とは、本発明のポリペプチドを細胞内あるいは細胞外に発現した微生物、動物細胞あるいは昆虫細胞または組織の抽出液を該ポリペプチドを特異的に認識する抗体と反応させた後、プロテインG-セファロース等イムノグロブリンに特異的な結合能を有する担体を加えて抗原抗体複合体を沈降させる方法である。

【0144】サンドイッチELISA法とは、本発明のポリペプチドを特異的に認識する抗体を吸着させたプレートに、該ポリペプチドを細胞内あるいは細胞外に発現した微生物、動物細胞あるいは昆虫細胞または組織の抽出液を反応させた後、FITCなどの蛍光物質、またはペルオキシダーゼやビオチンなどの酵素で標識した本発明のポリペプチドを特異的に認識する抗体(上記抗体と

は抗原認識部位が異なる)を反応させ、標識物質に応じた反応を行う方法である。

【0145】(2) 診断および治療への利用

ヒト生体試料ならびヒト初代培養細胞での、本発明のポリペプチドの発現量の変化ならびに発現している該ポリペプチドの構造変化を同定することは、将来、疾患を発症する危険性や既に発症した疾患の原因を知る上で有用である。本発明の抗体を用いて、本発明のポリペプチドの発現量の変化ならびに発現している該ポリペプチドの構造変化を検出し、うつ病、不安、パーキンソン病、幻覚、痴呆、記憶障害、マリファナ依存症、喘息、過食、肥満、アルコール依存症等の本発明のポリペプチドの発現量が増加している疾患あるいは、精神分裂病、痛み、脳挫傷、脊髄損傷、多発性硬化症、慢性関節リウマチ、乾癬、炎症性大腸炎、自己免疫疾患、心筋梗塞、脳梗塞、高血圧、嘔吐、食欲不振、悪性腫瘍等の本発明のポリペプチドの発現量が減少している疾患の診断を行うことができる。

【0146】該ポリペプチドの発現量や構造変化を検出して診断する方法としては、上記の蛍光抗体法、酵素免疫測定法(ELISA法)、放射性物質標識免疫抗体法(RIA)、免疫組織染色法や免疫細胞染色法、ウェスタンブロットティング法、ドットブロットティング法、免疫沈降法、サンドイッチELISA法等があげられる。上記方法による診断に供する検体としては、うつ病、不安、パーキンソン病、精神分裂病、幻覚、痴呆、記憶障害、マリファナ依存症、痛み、脳挫傷、脊髄損傷、多発性硬化症、慢性関節リウマチ、乾癬、炎症性大腸炎、自己免疫疾患、喘息、心筋梗塞、脳梗塞、高血圧、嘔吐、食欲不振、過食、肥満、アルコール依存症、悪性腫瘍等、本発明のポリペプチドの発現変動が伴う疾患の患者より取得した組織、血液、血清、尿、便、唾液等の生体試料そのものあるいは、該生体試料から取得した細胞ならびに細胞抽出液が用いられる。また、生体試料から取得した組織を、パラフィンあるいはクリオスタット切片として単離したものをを用いることもできる。

【0147】免疫学的に検出する方法としては、マイクロタイタープレートを用いるELISA法・蛍光抗体法、ウェスタンブロットティング法、免疫組織染色法等があげられる。免疫学的に定量する方法としては、液相中で本発明のポリペプチドと反応する抗体のうちエピトープが異なる2種類のモノクローナル抗体を用いたサンドイッチELISA法、¹²⁵I等の放射性同位体で標識した本発明のポリペプチドと本発明のポリペプチドを認識する抗体とを用いるラジオイムノアッセイ法等があげられる。

【0148】本発明のポリペプチドの発現量の変化を伴う疾患は以下のようにして診断できる。まず、複数の患者および健常者の検体について本発明のポリペプチドの発現量を上記にあげた検出方法で測定して比較し、患者

および健常者の該ポリペプチドの発現レベルの範囲を決定する。被験者の検体の該ポリペプチドの発現レベルを、健常者の発現レベルおよび患者の発現レベルとそれぞれ比較し、どちらの発現レベルの範囲に入るかを調べるにより診断を行う。うつ病、不安、パーキンソン病、幻覚、痴呆、記憶障害、マリファナ依存症、喘息、過食、肥満、アルコール依存症等の本発明のポリペプチドの発現量が増加している疾患の場合は、健常者よりも高いレベルの発現であれば、該疾患であると診断することができ、精神分裂病、痛み、脳挫傷、脊髄損傷、多発性硬化症、慢性関節リウマチ、乾癬、炎症性大腸炎、自己免疫疾患、心筋梗塞、脳梗塞、高血圧、嘔吐、食欲不振、悪性腫瘍等の本発明のポリペプチドの発現量が減少している疾患の場合は、健常者よりも低いレベルの発現であれば、該疾患であると診断することができる。

【0149】本発明のポリペプチドは、生体内で多彩な生理作用を有すると考えられているカンナビノイド受容体アゴニストである2-AGの産生に関与していると考えられており、本発明のポリペプチドの活性を阻害することにより、うつ病、不安、パーキンソン病、幻覚、痴呆、記憶障害、マリファナ依存症、喘息、過食、肥満、アルコール依存症等の予防または治療が可能となる。

【0150】本発明の抗体のなかでDGリパーゼの活性を阻害する抗体は、うつ病、不安、パーキンソン病、幻覚、痴呆、記憶障害、マリファナ依存症、喘息、過食、肥満、アルコール依存症等の予防薬または治療薬として利用することができる。

【0151】5. 本発明のポリペプチドを生産する組換えウイルスベクターの調製法

以下に、本発明のポリペプチドを特定のヒト組織内で生産するための組換えウイルスベクターの調製法について述べる。

【0152】本発明のポリペプチドをコードするDNAとして、例えばヒトDGリパーゼホモログ遺伝子の完全長cDNAをもとに、必要に応じて、該ポリペプチドをコードする部分を含む適当な長さのDNA断片を調製する。完全長cDNA、あるいは該DNA断片をウイルスベクター内のプロモーターの下流に挿入することにより、組換えウイルスベクターを造成する。

【0153】RNAウイルスベクターの場合には、ヒトDGリパーゼホモログ遺伝子の完全長cDNAに相同なcRNA、若しくは該ポリペプチドをコードする部分を含む適当な長さのDNA断片に相同なRNA断片を調整し、それらを、ウイルスベクター内のプロモーターの下流に挿入することにより、組換えウイルスを造成する。RNA断片は、二本鎖の他、ウイルスベクターの種類に応じて、センス鎖若しくはアンチセンス鎖のどちらか一方の一本鎖を選択する。例えば、レトロウイルスベクターの場合は、センス鎖に相同するRNAを、センダイウイルスベクターの場合は、逆にアンチセンス鎖に相同な

RNAを選択する。

【0154】該組換えウイルスベクターを、該ベクターに適合したパッケージング細胞に導入する。パッケージング細胞はウイルスのパッケージングに必要な蛋白質をコードする遺伝子の少なくとも1つを欠損している組換えウイルスベクターの該欠損する蛋白質を補給できる細胞は全て用いることができ、例えばヒト腎臓由来のHEK293細胞、マウス繊維芽細胞NIH3T3などを用いることができる。パッケージング細胞で補給する蛋白質としては、レトロウイルスベクターの場合はマウスレトロウイルス由来のgag、pol、envなどの蛋白質が、レンチウイルスベクターの場合はヒト免疫不全ウイルス由来のgag、pol、env、vpr、vpu、vif、tat、rev、nefなどの蛋白質、アデノウイルスベクターの場合はアデノウイルス由来のE1A・E1Bなどの蛋白質が、アデノ随伴ウイルスの場合はRep (p5、p19、p40)、Vp (Cap)などの蛋白質が、センダイウイルスの場合はNP、P/C、L、M、F、HNなどの蛋白質があげられる。

【0155】ウイルスベクターとしては上記パッケージング細胞において組換えウイルスが生産でき、標的細胞で本発明のDNAを転写できる位置にプロモーターを含有しているものが用いられる。プラスミドベクターとしてはMFG [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92, 6733 (1995)]、pBabePuro [Nucleic Acids Res., 18, 3587 (1990)]、LL-CG、CL-CG、CS-CG、CLG [Journal of Virology, 72, 8150 (1998)]、pAdex1 [Nucleic Acids Res., 23, 3816 (1995)]等が用いられる。プロモーターとしては、ヒト組織中で発現できるものであればいずれも用いることができ、例えば、ヒトCMVのIE遺伝子のプロモーター、SV40の初期プロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒートショック蛋白質プロモーター、SRαプロモーター等をあげることができる。また、ヒトCMVのIE遺伝子のエンハンサーをプロモーターと共に用いてもよい。

【0156】パッケージング細胞への組換えウイルスベクターの導入法としては、例えば、リン酸カルシウム法(特開平2-227075)、リポフェクション法[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413 (1987)]等をあげることができる。

【0157】6. 本発明のポリペプチドをコードするDNAの発現を検出および定量する方法

本発明のDNA、該DNAの部分断片、または該DNA由来のオリゴヌクレオチドを用いて、本発明のポリペプチドをコードするDNAを検出、定量することができる。また、該DNAに由来するmRNAの構造変化を検出することもできる。以下に本発明のDNA、該DNAの部分断片、または該DNA由来のオリゴヌクレオチドを用いて、本発明のポリペプチドをコードするDNAを検出、定量する方法について述べる。

【0158】当該方法に用いられるDNAとしては、例えば配列番号2で表される塩基配列を有するDNA、該塩基配列と相補的な配列を有するDNAもしくはそれらから得られる部分断片、該DNA由来のオリゴヌクレオチド等があげられる。本発明のポリペプチドをコードするDNAの発現量や該DNAに由来するmRNAの構造変化を検出する方法としては、例えば(1)ノーザンブロット法(2)イン・サイチュ(in situ)ハイブリダイゼーション法、(3)定量的PCR法、(4)デファレンシャル・ハイブリダイゼーション法、(5)DNAチップ法、(6)リボヌクレアーゼ保護アッセイ法などの方法等があげられる。

【0159】上記方法による分析に供する検体としては、培養細胞あるいは各種組織、血清、唾液等の生体試料、(3)に記載した形質転換体から取得したDNA、mRNAあるいは全RNAが用いられる。以後、該mRNAおよび全RNAを検体由来RNAと称する。また、生体試料から取得した組織を、パラフィンあるいはクリオスタット切片として単離したものをを用いることもできる。

【0160】ノーザンブロット法では、検体由来RNAをゲル電気泳動で分離後、ナイロンフィルター等の支持体に転写し、本発明のDNAより調製した標識プローブを用いて、ハイブリダイゼーションならびに洗浄を行うことで、本発明のポリペプチドをコードするDNAのmRNAに特異的に結合したバンドを検出することにより、本発明のポリペプチドをコードするDNAのmRNAの発現量ならびに構造の変化を検出することができる。ハイブリダイゼーションを行う際には、プローブと検体由来RNA中の本発明のポリペプチドをコードするDNAのmRNAが安定なハイブリッドを形成する条件でインキュベーションする。偽陽性を防ぐためには、ハイブリダイゼーションならびに洗浄工程は高ストリンジェントな条件で行うことが望ましい。高ストリンジェントな条件は、温度、イオン強度、塩基組成、プローブの長さ、およびホルムアミド濃度等の多数の因子により決定されるが、例えば、0.7~1.0mol/lの塩化ナトリウム存在下、65℃でハイブリダイゼーションを行った後、0.1~2倍濃度のSSC溶液を用い、65℃条件下でフィルターを洗浄する条件をあげることができる。

【0161】ノーザンブロット法に用いる標識プローブは、例えば、公知の方法(ニック・トランスレーション、ランダム・プライミングまたはキナーゼ)により放射性同位体、ビオチン、蛍光基、化学発光基等を、本発明のDNAあるいは該DNAの配列から設計したオリゴヌクレオチドに取り込ませることで調製できる。標識プローブの結合量は本発明のポリペプチドをコードするDNAのmRNAの発現量を反映することから、結合した標識プローブの量を定量することで本発明のポリペ

プチドをコードするDNAのmRNAの発現量を定量することができる。また、標識プローブ結合部位を分析することで、本発明のポリペプチドをコードするDNAのmRNAの構造変化を知ることができる。

【0162】上記標識プローブおよび、生体から取得した組織をパラフィンあるいはクリオスタット切片として単離したものをを用いてハイブリダイゼーションならびに洗浄の工程を行うイン・サイチュ・ハイブリダイゼーション法によって、本発明のポリペプチドをコードするDNAのmRNAの発現量を検出することができる。イン・サイチュ・ハイブリダイゼーション法で、偽陽性を防ぐためには、ハイブリダイゼーションならびに洗浄工程は高ストリンジェントな条件で行うことが望ましい。この条件は、温度、イオン強度、塩基組成、プローブの長さ、およびホルムアミド濃度等の多数の因子により決定される。これらの因子は、例えばカレント・プロトコルズ・イン・モレキュラー・パイオロジーに記載されている。

【0163】定量的PCR法やデファレンシャル・ハイブリダイゼーション法あるいはDNAチップ法等による本発明のポリペプチドをコードするDNAのmRNAの検出法は、検体由来RNA、オリゴdTプライマーまたはランダムプライマーおよび逆転写酵素を用いてcDNAを合成することに基づいた方法で行うことができる（以後、該cDNAを検体由来cDNAと称する）。検体由来RNAがmRNAの場合は、上記いずれのプライマーも用いることができるが、該検体由来RNAが全RNAである場合は、オリゴdTプライマーを用いることが必要である。

【0164】定量的PCR法では、検体由来cDNAをテンプレートとし本発明のポリペプチドをコードするDNAが有する塩基配列に基づき設計したプライマーを用いてreverse transcription（逆転写）-PCR（以下、RT-PCRと略す）を行うことで、本発明のポリペプチドをコードするDNAのmRNA由来のDNA断片が増幅される。該増幅DNA断片の量は本発明のポリペプチドをコードするDNAのmRNAの発現量を反映することから、アクチンやグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ（glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase、以下G3PDHと略す）等をコードするDNAを内部コントロールとして置くことで本発明のポリペプチドをコードするDNAのmRNAの量を定量することが可能である。また、該増幅DNA断片をゲル電気泳動により分離することで、本発明のポリペプチドをコードするDNAのmRNAの構造の変化を知ることができる。本検出法では、標的配列を特異的にかつ効率的に増幅する適当なプライマーを用いることが望ましい。適当なプライマーは、プライマー間の結合やプライマー内の結合を起こさず、アニーリング温度で標的cDNAと特異的に結合して、変性条件で標的cDNAから

はずれる等の条件に基づき設計することができる。増幅DNA断片の定量は増幅産物が指数関数的に増加しているPCR反応の内に行うことが必要である。このようなPCR反応は、各反応ごとに生産される該増幅DNA断片を回収してゲル電気泳動で定量分析することで知ることができる。

【0165】検体由来cDNAをプローブとして、本発明のDNAを固定化させたフィルターあるいはスライドガラスやシリコンなどの基盤に対してハイブリダイゼーションならびに洗浄を行うことで、本発明のポリペプチドをコードするDNAのmRNAの発現量の変動を検出することができる。このような原理に基づく方法には、ディファレンシャルハイブリダイゼーション法〔Trends Genet., 7, 314 (1991)〕やDNAチップ法〔Genome Res., 6, 639 (1996)〕と呼ばれる方法がある。いずれの方法もフィルターあるいは基盤上にアクチンやG3PDHなどの内部コントロールを固定化することで、対照検体と標的検体の間での本発明のポリペプチドをコードするDNAのmRNAの発現の違いを正確に検出することができる。また対照検体と標的検体由来のRNAをもとにそれぞれ異なる標識のdNTP（dATP、dGTP、dCTP、dTTPの混合物）を用いて標識cDNA合成を行い、1枚のフィルターあるいは1枚の基盤に2つの標識cDNAプローブを同時にハイブリダイズさせることで正確な本発明のポリペプチドをコードする遺伝子のmRNAの発現量の定量を行うことができる。

【0166】リボヌクレアーゼ保護アッセイ法では、まず本発明のDNAの3'端にT7プロモーター、SP6プロモーターなどのプロモーター配列を結合し、標識したNTP（ATP、GTP、CTP、UTPの混合物）およびRNAポリメラーゼを用いたイン・ビトロの転写系により、標識したアンチセンスRNAを合成する。該標識アンチセンスRNAは、検体由来RNAと結合させて、RNA-RNAハイブリッドを形成させた後、リボヌクレアーゼで消化し、消化から保護されたRNA断片をゲル電気泳動によりバンドを形成させ検出する。得られたバンドを定量することで、本発明のポリペプチドをコードするDNAのmRNAの発現量を定量することができる。

【0167】上記の方法を用いて、本発明のDNAの発現量の変化あるいは該DNAに由来するmRNAの構造変化を検出し、うつ病、不安、パーキンソン病、幻覚、痴呆、記憶障害、マリファナ依存症、喘息、過食、肥満、アルコール依存症等の本発明のDNAの発現量が増加している疾患または、精神分裂病、痛み、脳挫傷、脊髄損傷、多発性硬化症、慢性関節リウマチ、乾癬、炎症性大腸炎、自己免疫疾患、心筋梗塞、脳梗塞、高血圧、嘔吐、食欲不振、悪性腫瘍等の本発明のDNAの発現量が減少している疾患、あるいは該DNAに由来するmRNAの構造変化を伴う疾患の診断を行うことができる。

【0168】疾患の診断に供する検体としては患者より取得した組織、血液等の生体試料あるいは該生体試料から細胞を取得して試験管内の適当な培地中で培養した初代培養細胞試料から取得したmRNAあるいは全RNAが用いられる。また、生体試料から取得した組織を、パラフィンあるいはクリオスタット切片として単離したものをを用いることもできる。

【0169】本発明のDNAの発現量の変化を伴う疾患は以下のようにして診断できる。まず、複数の患者および健常者の検体について本発明のポリペプチドをコードするDNAの発現量を上記にあげた検出方法で測定して比較し、患者および健常者の該DNAの発現レベルの範囲を決定する。被験者の検体の該DNAの発現レベルを、健常者の発現レベルおよび患者の発現レベルとそれぞれ比較し、どちらの発現レベルの範囲に入るかを調べることににより診断を行う。うつ病、不安、パーキンソン病、幻覚、痴呆、記憶障害、マリファナ依存症、喘息、過食、肥満、アルコール依存症等の本発明のDNAの発現量が増加している疾患の場合は、健常者よりも高いレベルの発現であれば、該疾患であると診断することができる。精神分裂病、痛み、脳挫傷、脊髄損傷、多発性硬化症、慢性関節リウマチ、乾癬、炎症性大腸炎、自己免疫疾患、心筋梗塞、脳梗塞、高血圧、嘔吐、食欲不振、悪性腫瘍等の本発明のDNAの発現量が減少している疾患の場合は、健常者よりも低いレベルの発現であれば、該疾患であると診断することができる。

【0170】本発明のDNAに由来するmRNAの構造変化を伴う疾患は、被験者の検体のmRNAを上述の方法により検出して、健常者のmRNAの構造と比較し、構造変化の有無を調べることににより、診断を行うことができる。

【0171】7. 本発明のポリペプチドをコードするDNAの変異を検出および同定する方法

以下に本発明のポリペプチドをコードするDNAを用いて該DNAの変異および多型を検出する方法について述べる。

【0172】当該方法に用いられるDNAとしては、例えば配列番号2で表される塩基配列を有するDNAもしくはそれらから得られるDNA断片等があげられる。本発明のポリペプチドをコードする遺伝子座中に存在する疾患の原因となる変異の存在の有無を評価するための最も明確な試験は、対照集団からの遺伝子と疾患患者からの遺伝子とを直接比較することである。

【0173】具体的には疾患患者ならび健常者から、生体試料あるいは該生体試料から樹立した初代培養細胞由来の試料を集め、該生体試料ならびに該初代培養細胞由来試料中からDNAを抽出する(以後、該DNAを検体由来DNAと称する)。該検体由来DNAあるいは、本発明のDNAが有する塩基配列に基づき設計したプライマーを用いて増幅した本発明のポリペプチドをコードす

るDNAを試料DNAとして用いることができる。別法として、該検体由来cDNAをテンプレートとして、本発明のDNAが有する塩基配列に基づき設計したプライマーによりPCRを行うことで本発明のポリペプチドをコードするDNA配列を含むDNA断片を増幅して試料DNAとして用いることができる。

【0174】本発明のポリペプチドをコードするDNAに疾患の原因となる変異があるかどうかを検出する方法として、野生型対立遺伝子を有するDNA鎖と変異対立遺伝子を有するDNA鎖とのハイブリダイズにより形成されるヘテロ二本鎖を検出する方法を用いることができる。ヘテロ二本鎖を検出する方法には、(1)ポリアクリルアミドゲル電気泳動によるヘテロ二本鎖検出法〔Trends Genet., 7, 5 (1991)〕、(2)一本鎖コンフォメーション多型解析法(SSCP解析; single strand conformation polymorphism analysis)〔Genomics, 16, 325 (1993)〕、(3)ミスマッチの化学的切断法(CCM法, chemical cleavage of mismatches)〔Human Molecular Genetics, BIOS Scientific Publishers Limited (1996)〕、(4)ミスマッチの酵素的切断法〔Nat. Genet., 9, 103 (1995)〕、(5)変性ゲル電気泳動法(denaturing gradient gel electrophoresis: DGGE法)〔Mutat. Res., 288, 103 (1993)〕等の方法があげられる。

【0175】検体由来DNAあるいは検体由来cDNAをテンプレートに、本発明のポリペプチドをコードするDNAを配列番号2で表される塩基配列に基づき設計したプライマーにより、200bpよりも小さい断片として増幅し、ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行う。本発明のポリペプチドをコードするDNAの変異によりヘテロ二本鎖が形成された場合は、変異を持たないホモ二本鎖よりも移動度が遅く、それらは余分なバンドとして検出することができる。特製のゲル〔ハイドロ-リンク(Hydro-link)、MDEなど〕を用いた方が分離度はよい。200bpよりも小さい断片の検索ならば、挿入、欠失、ほとんどの1塩基置換を検出可能である。ヘテロ二本鎖解析は、次に述べる一本鎖コンフォメーション多型解析と組み合わせた一枚のゲルで行うことが望ましい。

【0176】SSCP解析では、検体由来DNAあるいは検体由来cDNAをテンプレートに、配列番号2で表される塩基配列に基づき設計したプライマーにより、200bpよりも小さい断片として増幅した本発明のポリペプチドをコードするDNAを変性後、未変性ポリアクリルアミドゲル中で泳動する。DNA増幅を行う際にプライマーを放射性同位体あるいは蛍光色素で標識するか、または未標識の増幅産物を銀染色することにより、増幅した本発明のポリペプチドをコードするDNAをバンドとして検出することができる。野生型のパターンとの相違を明らかにするために、コントロールの検体も同

時に泳動すると、変異を持った断片を移動度の違いから検出できる。

【0177】CCM法では、検体由来DNAあるいは検体由来cDNAをテンプレートに、本発明のポリペプチドをコードするDNAを配列番号2で表される塩基配列に基づき設計したプライマーで増幅したDNA断片を、本発明のDNAに放射性同位体あるいは蛍光色素をとり込ませた標識DNAとハイブリダイズさせ、四酸化オスミウムで処理することでミスマッチしている場所のDNAの一方の鎖を切断させ変異を検出することができる。CCM法は最も感度の高い検出法の1つであり、キロベースの長さの検体にも適応できる。

【0178】上記四酸化オスミウムの代わりにT4エンドヌクレアーゼVIIのような細胞内でミスマッチの修復に関与する酵リゾル素とリボヌクレアーゼAと組み合わせることで、酵素的にミスマッチを切断することもできる。DGE法では、検体由来DNAあるいは検体由来cDNAをテンプレートに、本発明のポリペプチドをコードするDNAを配列番号2で表される塩基配列に基づき設計したプライマーで増幅したDNA断片を化学的変性剤の濃度勾配や温度勾配を有するゲルを用いて電気泳動する。増幅したDNA断片はゲル内を一本鎖に変性する位置まで移動し、変性後は移動しなくなる。本発明のポリペプチドをコードするDNAに変異がある場合とない場合では増幅したDNAのゲル内での移動度が異なることから、変異の存在を検出することが可能である。検出感度を上げるにはそれぞれのプライマーにポリ(G:C)末端を付けるとよい。

【0179】疾患の原因遺伝子を検出する別の方法として、蛋白質短縮試験(protein truncation test: PTT法) [Genomics, 20, 1 (1994)] がある。該試験により蛋白質の欠損を生み出すフレームシフト突然変異、スプライス部位突然変異、ナンセンス突然変異を特異的に検出することができる。PTT法では、配列番号2で表された塩基配列を有するDNAの5'末端にT7プロモーター配列と真核生物翻訳開始配列をつないだ特殊なプライマーを設計し、該プライマーを用いて検体由来RNAよりRT-PCR法でcDNAを作成する。該cDNAを用い、イン・ビトロ転写、翻訳を行うと、蛋白質が生産される。該蛋白質をゲルに泳動して、該蛋白質の泳動位置が完全長蛋白質に相当する位置にあれば欠損を生み出す変異は存在せず、該蛋白質に欠損がある場合は、完全長蛋白質より短い位置に該蛋白質は泳動され、該位置より欠損の程度を知ることができる。

【0180】検体由来DNAならびに検体由来cDNAの塩基配列を決定するために本発明のDNAが有する塩基配列に基づいて設計したプライマーを用いることが可能である。決定された塩基配列を解析することにより、検体由来DNAあるいは検体由来cDNAに腎疾患の原因となる変異があるか否かを判別できる。本発明のポリ

ペプチドをコードする遺伝子のコード領域以外の変異は、該遺伝子の付近またはその中のイントロンおよび調節配列のような、非コード領域を検査することによって検出し得る。非コード領域中の変異に起因する疾患は、上記に記載した方法に従い対照検体と比較した場合の、疾患患者における異常なサイズの、または異常な生産量のmRNAを検出することで確認することができる。

【0181】このようにして非コード領域における変異の存在が示唆された該遺伝子については、配列番号2で表される塩基配列を有するDNAをハイブリダイゼーションのプロープとして用いることにより、クローン化することができる。非コード領域における変異は上述のいずれかの方法に準じて探索することができる。見い出された変異は、Handbook of Human Genetics Linkage. The John Hopkins University Press, Baltimore (1994) に記載された方法に従い統計処理を行うことで、疾患との連鎖があるSNPs(シングル・ヌクレオチド・ポリモルフィズム)として同定することができる。また、疾患の病歴を持つ家族から、先に示した方法に従いDNAを取得し、変異および多型を検出することで、疾患の原因遺伝子を同定することができる。

【0182】8. 本発明のDNAを用いて疾患の発生の可能性および予後を診断する方法

当該方法に用いられるDNAとしては、例えば配列番号2で表される塩基配列を有するDNAもしくはそれらから得られるDNA断片等があげられる。

【0183】うつ病、不安、パーキンソン病、精神分裂病、幻覚、痴呆、記憶障害、マリファナ依存症、痛み、脳挫傷、脊髄損傷、多発性硬化症、慢性関節リウマチ、乾癬、炎症性大腸炎、自己免疫疾患、喘息、心筋梗塞、脳梗塞、高血圧、嘔吐、食欲不振、過食、肥満、アルコール依存症、悪性腫瘍等のDGLパーゼが関与する疾患の原因は、ヒトのいずれかの組織における遺伝子の変異を検出することによって確認し得る。例えば、生殖細胞系に変異がある場合、当該変異を遺伝した個人は、疾患を発症し易い傾向である可能性がある。当該変異は、該個人の体のいずれかの組織からのDNAを試験することによって検出し得る。例えば、採血しその血液の細胞からDNAを抽出し、このDNAを用い、遺伝子の変異を試験することにより、疾患を診断することができる。また、胎児細胞、胎盤細胞または羊膜細胞を用い、遺伝子の変異を試験することにより、出生前診断を行うことができる。

【0184】また疾患を発症した患者から、病巣部位の生体組織を取得してDNAを試験することにより、疾患の種類を診断し、投与する薬物の選択などに利用することができる。組織中の遺伝子の変異を検出するためには、周囲の正常組織から遊離した病巣部位の組織を単離することが有用である。取得した組織をトリプシンなどで処理し、得られた細胞を適当な培地で培養する。培養

した細胞からは染色体DNAならびにmRNAを抽出することができる。

【0185】以後、診断を目的としてヒト検体から上記いずれかの方法で取得したDNAを診断検体由来DNAと称する。また、診断を目的としてヒト検体から上記いずれかの方法で取得したRNAより合成したcDNAを診断検体由来cDNAと称する。本発明のDNAおよび診断検体由来DNAあるいは診断検体由来cDNAを用い、疾患の原因遺伝子を検出する方法に準じた方法により、疾患の診断を行うことができる。

【0186】また、本発明のDNAおよび診断検体由来DNAあるいは診断検体由来cDNAを利用した疾患の診断には(1)制限酵素部位の検出、(2)対立遺伝子特異的なオリゴヌクレオチドプローブを利用する方法(ASO: allele specific oligonucleotide hybridization)、(3)対立遺伝子特異的なオリゴヌクレオチドを用いたPCR(ARMS: amplification refractory mutation system)、(4)オリゴヌクレオチドライゲーションアッセイ(OLA: oligonucleotide ligation assay)、(5)PCR-PHFA法(PCR-preferential homoduplex formation assay)、(6)オリゴDNAアレイを用いる方法〔蛋白質核酸酵素、43、2004(1998)〕等の方法も用いることができる。

【0187】単一塩基変化により制限酵素部位が消失あるいは発生する場合は、診断検体由来DNAあるいは診断検体由来cDNAを、本発明のDNAが有する配列に基づき設計したプライマーで増幅し、該制限酵素で消化し、得られた制限酵素切断DNA断片を正常人の場合と比較することで簡便に変異を検出することができる。しかし単一塩基変化が起こることはまれであるので、診断目的には、本発明のDNAが有する配列情報ならびに別途同定された変異の情報を組合せることでオリゴヌクレオチドプローブを設計し、該オリゴヌクレオチドプローブをフィルターに結合させハイブリダイズを行うリバースドットプロット法で変異を検出する。

【0188】短い合成DNAプローブは、完全に対合する配列とだけハイブリダイズする。この特徴を利用して、対立遺伝子特異的なオリゴヌクレオチドプローブを用いて、1塩基の変異を容易に検出することができる。診断目的には、本発明のDNAが有する配列と同定された変異に基づき設計したオリゴヌクレオチドをフィルターに結合させ、診断検体由来DNAあるいは診断検体由来cDNAから本発明のDNAが有する配列を用いて設計したプライマーと標識したdNTPを用いたPCRで作成したプローブを用いてハイブリダイズを行うリバースドットプロットが用いられることが好ましい。スライドガラスやシリコンなどの基盤に直接、本発明のDNAが有する配列と該変異に基づき設計したオリゴヌクレオチドを合成して、高密度のアレイを作ることからなるDNAチップ法は、少量の診断検体由来DNAあるいは診

断検体由来cDNAについて多様な変異をより簡便に検出できるため大規模な診断目的に適した変異検出法である。

【0189】塩基変異は、以下のオリゴヌクレオチドライゲーションアッセイ(OLA)法によっても検出できる。変異部位を挟んで両側にハイブリダイズする本発明のDNAが有する配列より設計した20塩基程度のオリゴヌクレオチドを2本作成する。診断検体由来DNAあるいは診断検体由来cDNAをテンプレートとして用い、本発明のDNAが有する配列から設計したプライマーを用い、PCRにより本発明のDNA断片を増幅する。該増幅断片と上記オリゴヌクレオチドとをハイブリダイズさせる。ハイブリダイズ後に、DNAリガーゼで2本のオリゴヌクレオチドを連結させる。例えば、一方のオリゴヌクレオチドにはビオチンを、他方のオリゴヌクレオチドにジギキゲンinのような異なる標識をつけると、連結反応が起こったかどうかを速やかに検出することが可能である。OLAは電気泳動や遠心分離操作が不要なために、多くのサンプルを効率的に短期間で診断するのに適した変異検出法である。

【0190】また、以下のPCR-PHFA法により微量な変異遺伝子を定量的かつ容易に検出することができる。PCR-PHFA法は、PCR、非常に高い特異性を示す液相でのハイブリダイゼーション、ELISAと同様の操作でPCR産物を検出するED-PCR(enzymatic detection of PCR product)の3つを組み合わせたものである。ジニトロフェニル(dinitrophenyl; DNP)標識およびビオチン標識したプライマーセットを用いて、本発明のDNAをテンプレートにPCR増幅を行い、両末端標識増幅物を調製する。これに対して、標識を持たない同じ配列を有するプライマーセットと診断検体由来DNAあるいは診断検体由来cDNAをテンプレートに増幅して得た非標識増幅物を20~100倍の大過剰量混合する。そして熱変性後、1/5分~10分程度の緩やかな温度勾配で冷却し、完全な相補鎖を優先的に形成させる。こうして再形成された標識DNAはビオチンを介してストレプトアビジン固定化ウエルに捕獲吸着し、DNPを介して酵素標識抗DNP抗体を結合させて酵素による発色反応により検出する。検体中に標識DNAと同じ配列の遺伝子が存在しない場合は、元の二本鎖の標識DNAが優先的に再形成されて発色を示す。これに対し、同じ配列の遺伝子が存在する場合は、相補鎖の置換がランダムに生じるため再形成される標識DNAは減少するので、発色は著しく低下する。これにより、既知の変異・多型遺伝子の検出および定量が可能となる。

【0191】9. 本発明のポリペプチドをコードするDNAのプロモーター領域および/または転写制御領域の取得
モレキュラー・クローニング第2版に記載の方法によ

り、ヒトの細胞や組織から単離した染色体DNAを用いて作製したゲノムDNAライブラリーに対して、本発明のDNA、該DNA由来の部分DNA断片、またはオリゴヌクレオチドをプローブにして、ブランクハイブリダイゼーション等の方法でスクリーニングすることにより、本発明のDNAのヒトのゲノムDNAを得ることができる。ゲノムDNAの塩基配列とcDNAの塩基配列を比較することにより該遺伝子のエキソン/イントロン構造を明らかにすることができる。また、特にcDNAの5'側の部分をプローブにすることにより、本発明のDNAのプロモーター領域および/または転写制御領域などの遺伝子の転写を制御するゲノム遺伝子領域の塩基配列を明らかにすることができ、本発明のDNAのプロモーター領域および/または転写制御領域を単離、取得することができる。この取得したプロモーター領域および/または転写制御領域の配列は本発明のDNAの転写の制御機構を解析するのに役立つ他、該DNAの転写効率を変動させる化合物のスクリーニングなどに利用することができる。

【0192】尚、同様の方法を用いて、他の非ヒト哺乳動物においてもゲノム遺伝子を取得することができる。

【0193】10. 本発明のポリペプチドをコードするDNAの転写および翻訳を抑制する方法

本発明のDNAは、アンチセンスRNA/DNA技術〔バイオサイエンスとインダストリー, 50, 322 (1992)、化学, 46, 681 (1991)、Biotechnology, 9, 358 (1992)、Trends Biotechnol., 10, 87 (1992)、Trends Biotechnol., 10, 152 (1992)、細胞工学, 16, 1463 (1997)〕、トリプル・ヘリックス技術〔Trends Biotechnol., 10, 132 (1992)〕等を用い、本発明のポリペプチドをコードするDNAの転写または翻訳を抑制することができる。例えば、本発明のDNA、該DNAの一部の配列を有するDNA、またはオリゴヌクレオチドを投与することにより、本発明のポリペプチドの生産を抑制することができる。即ち、本発明のDNA、該DNAの一部の配列を有するDNA、ならびにオリゴヌクレオチドまたはその誘導体を用いることにより、本発明のポリペプチドをコードするDNAの転写、または本発明のポリペプチドをコードするmRNAの翻訳を、それぞれ抑制できる。

【0194】該抑制方法は、うつ病、不安、パーキンソン病、幻覚、痴呆、記憶障害、マリファナ依存症、喘息、過食、肥満、アルコール依存症等の治療または予防に利用することができる。本発明のポリペプチドは、生体内で多彩な生理作用を有すると考えられているカンナビノイド受容体アゴニストである2-AGの産生を促進するので、本発明のDNA、該DNAの連続した15塩基以上の配列を有するDNAならびにオリゴヌクレオチドまたはその誘導体は、本発明のDNAの転写および本発明のポリペプチドをコードするmRNAの翻訳を抑制

することで、うつ病、不安、パーキンソン病、幻覚、痴呆、記憶障害、マリファナ依存症、喘息、過食、肥満、アルコール依存症等の予防薬または治療薬として利用できる。

【0195】11. 本発明のポリペプチドを含有する医薬

本発明のポリペプチドは、精神分裂病、痛み、脳挫傷、脊髄損傷、多発性硬化症、慢性関節リウマチ、乾癬、炎症性大腸炎、自己免疫疾患、心筋梗塞、脳梗塞、高血圧、嘔吐、食欲不振、悪性腫瘍等、本発明のポリペプチドの発現減少を伴う疾患の治療または予防のための医薬として利用することができる。

【0196】本発明のポリペプチドは、生体内で多彩な生理作用を有すると考えられているカンナビノイド受容体アゴニストである2-AGの産生に関連しているため、本発明のポリペプチドにより、2-AGの産生が促進される。従って、本発明のポリペプチドは、精神分裂病、痛み、脳挫傷、脊髄損傷、多発性硬化症、慢性関節リウマチ、乾癬、炎症性大腸炎、自己免疫疾患、心筋梗塞、脳梗塞、高血圧、嘔吐、食欲不振、悪性腫瘍等の予防薬または治療薬として利用できる。

【0197】本発明のポリペプチドを含有する医薬製剤は、活性成分として該ポリペプチド単独で、あるいは任意の他の治療のための有効成分との混合物として含有することができる。また、それら医薬製剤は、活性成分を薬理的に許容される一種もしくはそれ以上の担体と一緒に混合し、製剤学の技術分野においてよく知られている任意の方法により製造される。

【0198】投与経路は、治療に際し最も効果的なものを使用するのが望ましく、経口または、例えば静脈内等の非経口をあげることができる。投与形態としては、錠剤、散剤、顆粒剤、シロップ剤、注射剤等がある。経口投与に適当な、例えばシロップ剤のような液体調製物は、水、蔗糖、ソルビット、果糖等の糖類、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール等のグリコール類、ごま油、オリーブ油、大豆油等の油類、p-ヒドロキシ安息香酸エステル類等の防腐剤、ストロベリーフレーバー、ペパーミント等のフレーバー類等を使用して製造できる。また、錠剤、散剤および顆粒剤等は、乳糖、ブドウ糖、蔗糖、マンニット等の賦形剤、澱粉、アルギン酸ソーダ等の崩壊剤、ステアリン酸マグネシウム、タルク等の滑沢剤、ポリビニールアルコール、ヒドロキシプロピルセルロース、ゼラチン等の結合剤、脂肪酸エステル等の界面活性剤、グリセリン等の可塑剤等を用いて製造できる。

【0199】非経口投与に適当な製剤は、好ましくは受容者の血液と等張である活性化合物を含む滅菌水性剤からなる。例えば、注射剤の場合は、塩溶液、ブドウ糖溶液または塩水とブドウ糖溶液の混合物からなる担体等を用いて注射用の溶液を調製する。また、これら非経口剤

においても、経口剤で例示した希釈剤、防腐剤、フレーバー類、賦形剤、崩壊剤、滑沢剤、結合剤、界面活性剤、可塑剤等から選択される１種もしくはそれ以上の補助成分を添加することもできる。

【0200】また、噴霧剤は該ポリペプチドそのもの、ないしは受容者の口腔および気道粘膜を刺激せず、かつ該蛋白質を微細な粒子として分散させ吸収を容易にさせる担体等を用いて調製する。担体として具体的には乳糖、グリセリン等が例示される。該蛋白質および用いる担体の性質により、エアロゾル、ドライパウダー等の製

剤が可能である。また、これらの非経口剤においても経口剤で添加剤として例示した成分を添加することもできる。

【0201】本発明のポリペプチドの投与量および投与回数は、投与形態、患者の年齢、体重、治療すべき症状の性質もしくは重篤度により異なるが、通常経口の場合、成人一人当たり 0.01mg ~ 1g、好ましくは 0.05 ~ 50mg を一日一回ないし数回投与する。静脈内投与等の非経口投与の場合、成人一人当たり 0.001 ~ 100mg、好ましくは 0.01 ~ 10mg を一日一回

ないし数回投与する。しかしながら、これら投与量および投与回数に関しては、前述の種々の条件により変動する。

【0202】本発明の DNA、該 DNA の連続した 15 塩基以上の配列を有する DNA ならびにオリゴヌクレオチドまたはその誘導体を含有する医薬、本発明の抗体を含有する医薬も、上記の本発明のポリペプチドを含有する医薬に準じて製造および投与することができる。本発明の DNA、該 DNA の連続した 15 塩基以上の配列を

有する DNA ならびにオリゴヌクレオチドまたはその誘導体を含有する医薬、本発明の抗体を含有する医薬が診断のための医薬の場合は、目的の診断法に応じて、本発明の DNA あるいはポリペプチドの定量あるいは変異の検出を行うのに必要な試薬、例えば緩衝剤、塩、反应用酵素、本発明の抗体を認識する標識された抗体、検出用発色剤等を含んでもよい。

【0203】12. 本発明の DNA を含有する遺伝子治療剤

本発明の DNA を含有する遺伝子治療剤は、本発明のポリペプチドの産生を促すことにより、DGR パーゼ活性に対するアゴニストとして作用する。即ち、本発明の DNA を含有してなる遺伝子治療剤は、精神分裂病、痛み、脳挫傷、脊髄損傷、多発性硬化症、慢性関節リウマチ、乾癬、炎症性大腸炎、自己免疫疾患、心筋梗塞、脳梗塞、高血圧、嘔吐、食欲不振、悪性腫瘍等の予防薬または治療薬として利用できる。

【0204】本発明の DNA を含有するウイルスベクターを用いた遺伝子治療剤は、5 項で作製した組換えウイルスベクターおよび遺伝子治療剤に用いる基剤を調合することにより製造することができる〔Nat. Genet., 8,

42(1994)〕。遺伝子治療剤に用いる基剤としては、通常注射剤に用いる基剤であればどのようなものでもよく、蒸留水、塩化ナトリウムまたは塩化ナトリウムと無機塩との混合物等の塩溶液、マンニトール、ラクトース、デキストラン、グルコース等の糖溶液、グリシン、アルギニン等のアミノ酸溶液、有機酸溶液又は塩溶液とグルコース溶液との混合溶液等があげられる。また常法に従い、これらの基剤に浸透圧調整剤、pH 調整剤、ゴマ油、ダイズ油等の植物油又はレシチンもしくは非イオン界面活性剤等の界面活性剤等の助剤を用いて、溶液、懸濁液、分散液として注射剤を調製してもよい。これらの注射剤を、粉末化、凍結乾燥等の操作により用時溶解用製剤として調製することもできる。本発明の遺伝子治療剤は、液体の場合はそのまま、個体の場合は必要により滅菌処理をした上記の基剤に遺伝子治療の直前に溶解して治療に使用することができる。

【0205】上記遺伝子治療剤に用いるウイルスベクターは、レトロウイルスベクターに限定されず、レンチウイルスベクター等も用いることができる。適当なサイズの本発明の DNA を、アデノウイルス・ヘキソン蛋白質に特異的なポリリジン-コンジュゲート抗体と組み合わせることでコンプレックスを作製し、得られたコンプレックスをアデノウイルスベクターに結合させることにより、ウイルスベクターを調製することができる。該ウイルスベクターは安定に標的細胞に到達し、エンドソームにより細胞内に取り込まれ、細胞内で分解され効率的に遺伝子を発現させることができる。

【0206】(-)鎖 RNA ウイルスであるセンダイウイルスをベースにしたウイルスベクターも開発されており(WO 97/16538、WO 97/16539)、遺伝子治療を目的として本発明の DNA と相同な RNA を組み込んだセンダイウイルスベクターを作製することができる。本発明の DNA は、非ウイルス遺伝子移入法によっても移入することができる。

【0207】当該分野で公知の非ウイルス遺伝子移入法には、リン酸カルシウム共沈法〔Virology, 52, 456 (1973); Science, 209, 1414 (1980)〕、マイクロインジェクション法〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 5399 (1980); Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 7380 (1980); Cell, 27, 223 (1981); Nature, 294, 92 (1981)〕、リボソームを介した膜融合-介在移入法〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413 (1987); Biochemistry, 28, 9508 (1989); J. Biol. Chem., 264, 12126 (1989); Hum. Gene Ther., 3, 267 (1992); Science, 249, 1285 (1990); Circulation, 83, 2007 (1992)〕あるいは直接 DNA 取り込みおよび受容体-媒介 DNA 移入法〔Science, 247, 1465 (1990); J. Biol. Chem., 266, 14338 (1991); Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 3655 (1991); J. Biol. Chem., 264, 16985 (1989); BioTechniques, 11, 474 (1991); Proc. Natl. Acad. Sc

i. USA, 87, 3410 (1990); Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 4255 (1991); Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 4033 (1990); Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 8850 (1991); Hum. Gene Ther., 3, 147 (1991)] 等をあげることができる。

【0208】リボソームを介した膜融合 - 介在移入法ではリボソーム調製物を標的とする組織に直接投与することにより、当該組織の局所的な遺伝子の取り込みおよび発現が可能であることが腫瘍に関する研究において報告されている [Hum. Gene Ther. 3, 399 (1992)]。従って同様の効果が D G リパーゼが関与する疾患病巣でも期待される。DNA を病巣に直接ターゲティングするには、直接 DNA 取り込み技術が好ましい。受容体 - 媒介 DNA 移入は、例えば、ポリリジンを通して、蛋白質リガンドに DNA (通常、共有的に閉環したスーパーコイル化プラスミドの形態をとる) をコンジュゲートすることによって行う。リガンドは、標的細胞または組織の細胞表面上の対応するリガンド受容体の存在に基づいて選択する。当該リガンド - DNA コンジュゲートは、所望により、血管に直接注射することができ、受容体結合および DNA - 蛋白質コンプレックスの内在化が起こる標的組織に指向し得る。DNA の細胞内破壊を防止するために、アデノウイルスを同時感染させて、エンドソーム機能を崩壊させることもできる。

【0209】1.3. 本発明のポリペプチドをコードする DNA を用いたスクリーニング方法

本発明のポリペプチドを発現している細胞株に種々の被験化合物を添加し、本発明の DNA を用いて、mRNA の発現の増減を検定することで該 DNA の転写もしくは翻訳を抑制または促進する化合物をスクリーニングすることができる。該 DNA の mRNA の発現の増減は、上記した PCR 法、ノーザンブロット法、リボヌクレアーゼ保護アッセイ法等により検出できる。

【0210】本発明のポリペプチドを発現している細胞株に種々の被験化合物を添加し、本発明のポリペプチドを特異的に認識する抗体を用いて、該ポリペプチドの発現の増減を検定することで該 DNA の転写もしくは翻訳を促進する化合物をスクリーニングすることができる。該ポリペプチドの発現の増減は、上記した蛍光抗体法、酵素免疫測定法 (ELISA 法)、放射性物質標識免疫抗体法 (RIA)、免疫組織染色法、免疫細胞染色法、ウェスタンブロットティング法、ドットブロットティング法、免疫沈降法、サンドイッチ ELISA 法等により検出できる。

【0211】また、本発明のポリペプチドをコードする DNA のプロモータ領域および転写制御領域の下流に、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (CAT) 遺伝子、ルシフェラーゼ遺伝子または緑色蛍光蛋白質 (GFP) などをレポーター遺伝子として連結したレポータープラスミドを構築し、適当な細胞宿主に導入

して形質転換体を得た後、その形質転換体に種々の被験物質を添加し、レポーター遺伝子の発現の増減を解析することにより、本発明のポリペプチドをコードする DNA の発現を転写レベルで制御する化合物をスクリーニングすることができる。

【0212】また、本発明の DNA を導入して作製された非ヒトトランスジェニック動物に種々の被験物質を投与して、本発明の DNA を用いて、脳、脾臓、大腸等の発現局所における mRNA の発現の増減を検定することで該 DNA の転写もしくは翻訳を抑制または促進する化合物をスクリーニングすることができる。該 DNA の mRNA の発現の増減は、上記した PCR 法、ノーザンブロット法、リボヌクレアーゼ保護アッセイ法、イン・サイチュ・ハイブリダイゼーション法等により検出できる。

【0213】尚、上記スクリーニング方法により得られた本発明のポリペプチドをコードする DNA の発現を転写レベルで制御する化合物は、うつ病、不安、パーキンソン病、精神分裂病、幻覚、痴呆、記憶障害、マリファナ依存症、痛み、脳挫傷、脊髄損傷、多発性硬化症、慢性関節リウマチ、乾癬、炎症性大腸炎、自己免疫疾患、喘息、心筋梗塞、脳梗塞、高血圧、嘔吐、食欲不振、過食、肥満、アルコール依存症、悪性腫瘍等、本発明のポリペプチドをコードする DNA の発現変動を伴う疾患の治療または予防のための医薬として利用することができる。

【0214】1.4. 本発明のポリペプチドを用いたスクリーニング方法

本発明のポリペプチドあるいは該ポリペプチドの部分ペプチドを発現した形質転換体と種々の被験物質とを共存させ、該形質転換体における D G リパーゼの活性化の変動を解析することにより、本発明のポリペプチドに作用する医薬をスクリーニングすることができる。また、精製した該ポリペプチドあるいは該ポリペプチドの部分ペプチドも該ポリペプチドに特異的に作用する医薬のスクリーニングに利用することができる。該スクリーニングによって得られた化合物は、うつ病、不安、パーキンソン病、精神分裂病、幻覚、痴呆、記憶障害、マリファナ依存症、痛み、脳挫傷、脊髄損傷、多発性硬化症、慢性関節リウマチ、乾癬、炎症性大腸炎、自己免疫疾患、喘息、心筋梗塞、脳梗塞、高血圧、嘔吐、食欲不振、過食、肥満、アルコール依存症、悪性腫瘍等の治療または予防のための医薬として利用することができる。

【0215】以下、2 種のスクリーニング法について説明する。

スクリーニング法 (1)

本発明のポリペプチドあるいは該ポリペプチドの部分ペプチドを生産するように形質転換した微生物、動物細胞、または昆虫細胞 (以後探索用形質転換体と称する) と被験物質とを水性媒体中で共存させ、D G リパーゼの

活性を測定する。形質転換していない宿主の微生物、動物細胞、または昆虫細胞を対照群として比較し、該形質転換体におけるD Gリパーゼの活性化の程度を変動させる被験物質を選択することで目的の物質を取得することができる。また、該探索用形質転換体に特異的に結合する化合物あるいはポリペプチドの、該探索用形質転換体に対する結合を阻害することを指標にして、上記と同様の方法により、目的の物質を競合スクリーニングすることができる。

【0216】精製した本発明のポリペプチドまたは該ポリペプチドの一部を構成するポリペプチドは、該ポリペプチドに特異的に結合する物質を選択するのに用いることができる。該物質を定量するには、本発明のポリペプチドを特異的に認識する抗体を用いて上記の免疫学的方法により行うことができる。また、該ポリペプチドあるいは該ポリペプチドのポリペプチドに結合する該物質の結合を阻害することを指標に、該物質を競合スクリーニングすることができる。

【0217】スクリーニング法(2)

該ポリペプチドの一部を構成するペプチドを多数、プラスチックピンまたはある種の固体支持体上で高密度に合成し、該ペプチドに選択的に結合する化合物あるいはポリペプチドを効率的にスクリーニングすることができる(WO84/03564)。

【0218】その他、本発明のポリペプチドを発現する形質転換体を用いて、遺伝子の発現を解析することにより、本発明のポリペプチドにより転写制御を受ける遺伝子をスクリーニングすることができる。本発明のスクリーニング方法により得られた化合物のうち、D Gリパーゼ活性を促進する物質は、精神分裂病、痛み、脳挫傷、脊髄損傷、多発性硬化症、慢性関節リウマチ、乾癬、炎症性大腸炎、自己免疫疾患、心筋梗塞、脳梗塞、高血圧、嘔吐、食欲不振、悪性腫瘍等の予防薬または治療薬として用いることができ、D Gリパーゼ活性を抑制する物質は、うつ病、不安、パーキンソン病、幻覚、痴呆、記憶障害、マリファナ依存症、喘息、過食、肥満、アルコール依存症等の予防薬または治療薬として用いることができる。

【0219】15. 本発明のDNAを用いたノックアウト非ヒト動物の作製

本発明のDNAを含有してなる組換えベクターを用い、目的とする非ヒト動物、例えばウシ、ヒツジ、ヤギ、ブタ、ウマ、マウス、ニワトリ等の胚性幹細胞(embryonic stem cell)において、染色体上の本発明のポリペプチドをコードするDNAを公知の相同組換えの手法〔例えば、Nature, 326, 295 (1987)、Cell, 51, 503 (1987)等〕により欠損、不活化または任意の配列と置換した変異クローンを作製することができる〔例えば、Nature, 350, 243 (1991)〕。胚性幹細胞の変異クローンを用い、動物の受精卵の胚盤胞(blastocyst)への注入キメラ

法または集合キメラ法等の手法により、胚性幹細胞クローンと正常細胞からなるキメラ個体を調製することができる。このキメラ個体と正常個体の掛け合わせにより、全身の細胞の染色体上の本発明のポリペプチドをコードするDNAに任意の変異を有する個体を得ることができる。さらにその個体の掛け合わせにより相同染色体の双方に変異が入ったホモ個体の中から、本発明のポリペプチドをコードするDNAの発現が一部または完全に抑制された個体としてノックアウト非ヒト動物を得ることができる。

【0220】また、染色体上の本発明のポリペプチドをコードするDNAの任意の位置へ変異を導入することにより、ノックアウト非ヒト動物を作製することも可能である。例えば染色体上の本発明のポリペプチドをコードするDNAの翻訳領域中へ塩基を置換、欠失、挿入等させて変異を導入することにより、その産物の活性を改変させることも可能である。また、その発現制御領域への同様な変異を導入することにより、発現の程度、時期、組織特異性等を改変させることも可能である。さらにCre-loxP系との組合せにより、より積極的に発現時期、発現部位、発現量を制御することも可能である。このような例として、脳のある特定の領域で発現されるプロモータを利用して、その領域でのみ目的遺伝子を欠失させた例〔Cell, 87, 1317 (1996)〕やCreを発現するアデノウイルスを用いて、目的の時期に、臓器特異的に目的遺伝子を欠失させた例〔Science, 278, 5335 (1997)〕が知られている。

【0221】従って、染色体上の本発明のポリペプチドをコードするDNAについても、このように任意の時期や組織で発現を制御できる、または任意の挿入、欠失、置換をその翻訳領域や発現制御領域に有する、ノックアウト非ヒト動物を作製することができる。ノックアウト非ヒト動物は、脳、脾臓、大腸等、本発明のポリペプチドが発現している任意の部位に、任意の時期、任意の程度に、本発明のポリペプチドに起因する種々の疾患を誘導することができる。

【0222】このように、本発明のノックアウト非ヒト動物は、本発明のポリペプチドに起因する種々の疾患の治療や予防において極めて有用な動物モデルとなる。特にその治療薬、予防薬、また機能性食品、健康食品等の評価用モデルとして非常に有用である。

【0223】

【実施例】実施例1 D Gリパーゼホモログc DNAの探索と同定、塩基配列決定

アミノ酸配列データベースに対して、ヒトD Gリパーゼのアミノ酸配列(配列番号4)と相同性を有するアミノ酸配列をBLASTにてホモロジー検索したところ、KIAA0659蛋白質のアミノ酸配列(PRF/SEQDB登録番号:2417284BE、配列番号5)のN端側の領域がホモロジーを示し、KIAA0659蛋白

質はヒトのDGRリパーゼホモログであることが予想された。しかし、KIAA0659蛋白質をコードするヒトの脳由来のKIAA0659 cDNA (GenBank アクセス番号: AB014559、配列番号6) は完全長ではなく、データベース中のKIAA0659蛋白質のアミノ酸配列もN端側の領域が欠失した部分配列であることが推定されていた。

【0224】まず、ヒト脳由来のマラソン・レディー・cDNAライブラリー(クロンテック社製)をテンプレートにして3'-RACE法にてKIAA0659遺伝子10の転写産物の3'側領域に相当するcDNA断片を取得した。3'-RACE法に用いた遺伝子特異的プライマー(配列番号7)はKIAA0659 cDNA(配列番号6)の2520番目から2544番目までの塩基配列に相当する。増幅した約2000bpのDNA断片をゲルから切り出し、キアquick・ゲル抽出キット〔QIAquick Gel Extraction Kit; キアゲン(QIAGEN)社製〕により精製し、pGEM-T Easyベクターシステムズ〔pGEM-T Easy Vector Systems; プロメガ(Promega)社製〕を用いてpGEM-T Easyベクターにクローン化し20た。得られたDNA断片の塩基配列(配列番号8)を、東洋紡ジーンアナリシス株式会社に依頼して決定したところ3'-RACE法に用いた遺伝子特異的プライマーに相当する配列(配列番号7)を有し、KIAA0659 cDNAの塩基配列の3'末端の3残基が欠損し、欠損部分の下流にポリA配列が存在することを除いて、KIAA0659 cDNAの配列と一致した。従って、得られた3'-RACE産物はKIAA0659 cDNAの3'側領域に相当することが明らかであっ

【0225】次に、このクローンの5'側領域を取得す30るためにヒト脳由来のマラソン・レディー・cDNAライブラリー(クロンテック社製)をテンプレートにして5'-RACE法を行ったが、5'側領域を取得できなかった。そこで、完全長のcDNAクローンを多く含むとされるヒト脳由来のcDNAライブラリーであるキャップサイトcDNA dT(ニッポンジーン社製)をテンプレートにしてPCRを行い、5'側領域のcDNA断片を増幅し、上記の3'側領域の断片と同様にしてクローン化した。用いた遺伝子特異的プライマー(配列番号9)はKIAA0659 cDNA(配列番号6)の189番目から208番目までの塩基配列のアンチセンス鎖配列に相当する。得られたDNA断片の塩基配列(配列番号10)を、東洋紡ジーンアナリシス株式会社に依頼して決定したところ、3'端にKIAA0659 cDNAの1~208番目を含む新規な塩基配列であっ40た。この配列の5'端側の塩基配列を解析したところ、翻訳開始点と考えられるATGが同定された。

【0226】得られた5'側領域の配列と、既知のKIAA0659 cDNAの配列、及び3'-RACE法にて得た転写産物の3'側領域の配列の重複部位を除い50

て結合させた配列(配列番号2)は1042アミノ酸からなる単一のポリペプチド鎖(配列番号1)をコードしていた。このアミノ酸配列の1~687番目の領域はヒトDGRリパーゼのアミノ酸配列と相同性を示した(図1)。アミノ酸配列の親水性プロットおよび膜貫通ドメインの予測プログラムSOSUI〔Bioinformatics, 14, 378 (1998)〕を用いた解析結果から、このアミノ酸配列のN末端の領域には、ヒトDGRリパーゼと同様に4つの膜貫通ドメインと推定される配列(配列番号1の16~38番目、57~69番目、97~119番目、135~157番目)を有することがわかった。また、MOTIFプログラム(京都大学化学研究所バイオインフォマテクスセンターのゲノムネット(GenomeNet)サービス、<http://motif.genome.ad.jp>)による機能的モチーフ検索によってリパーゼの活性中心のコンセンサス配列〔(Leu/Ile/Val)-Xaa-(Leu/Ile/Val/Phe/Tyr)-(Leu/Ile/Val/Met/Ser/Thr)-Gly-(His/Tyr/Trp/Val)-Ser-Xaa-Gly-(Gly/Ser/Thr/Ala/Cys)〕と一致する配列(Leu-Ile-Val-Val-Gly-His-Ser-Leu-Gly-Ala)がこのアミノ酸配列の466~475番目に存在することがわかった。この配列はヒトDGRリパーゼおよびカビのDGRリパーゼでのコンセンサス配列に相当する配列(ヒト: Leu-Val-Ile-Val-Gly-His-Ser-Leu-Gly-Ala、カビ: Leu-Val-Val-Val-Gly-His-Ser-Leu-Gly-Ala)ともよく一致していた。これらの知見から配列番号1のアミノ酸配列を有する蛋白質は4回膜貫通型のDGRリパーゼと考えられた。アミノ酸配列から推定されるDGRリパーゼホモログの分子量は115kDaとなり、等電点は5.92となった。なお、得られたDGRリパーゼホモログのアミノ酸配列は配列番号4のヒトDGRリパーゼのアミノ酸配列よりも長く、C端側にヒトDGRリパーゼとは相同性がない領域が存在するが、MOTIFプログラムによる機能的モチーフ検索の結果、C端側領域にシャペロニンサブユニットc p n 60のコンセンサス配列〔Ala-(Ala/Ser)-Xaa-(Asp/Glu/Gln)-Glu-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Gly-Gly-(Gly/Ala)〕と一致する配列(Ala-Ala-Ala-Asn-Asp-Glu-Glu-Glu-Glu-Val-Gly-Gly-Gly、配列番号1の874~885番目に相当する)が存在することがわかった。配列番号3に、配列番号2の塩基配列のうちの、配列番号1のアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードしている領域(ストップコドンを含む)の塩基配列を示した。

【0227】実施例2 ヒトDGRリパーゼホモログ遺伝子の発現組織解析(1)

ヒトDGRリパーゼホモログ遺伝子がヒトのどのような組織で発現しているのかを確認するために、ヒトの各種組織(心臓、脳、胎盤、肺、骨格筋、腎臓、肝臓、脾臓、脾臓、胸腺、前立腺、精巣、卵巣、小腸、大腸、白血球)由来のmRNAから得たファースト・ストランドのcDNAのパネルであるMTCパネル(クロンテック社製)をテンプレートにし、ヒトDGRリパーゼホモログc

DNAの塩基配列をもとにしたプライマー（配列番号11と配列番号12）を用いてPCRを行った。コントロールとしてG3PDH遺伝子についても同様にPCRを行った。PCRの後、アガロースゲル電気泳動を行い、特異的に増幅した約800bpの長さのバンド（配列番号2の1496～2308番目、配列番号6の192～1004番目に相当する）量を確認する事によって各種ヒト組織での本遺伝子のmRNAレベルでの発現量を見積もった。その結果、脳や脾臓、大腸において強い発現が見られたのに対し、脾臓、胸腺、卵巣、小腸、白血球10では発現が見られなかった（図2）。

【0228】実施例3 ヒトDGリパーゼホモログ遺伝子の発現組織解析(2)

ヒトDGRリパーゼホモログ遺伝子の発現を、ヒトの各種組織由来のmRNAを用いてノーザンブロット法を用いて調べた。ヒトDGRリパーゼホモログcDNAの部分断片(配列番号2の1から1720番目に相当する塩基配列からなる)25ngを用いて、ランダムプライマーDNAラベリングキット(タカラバイオ社製)により[α - 32 P]dCTP(パーキンエルマーライフサイエンス社製)により放射線ラベルシブローブDNAを得た。これをNICカラム(アマシャムバイオサイエンス社製)で精製した。エクスプレスハイブ(ExpressHyb)ハイブリダイゼーション溶液(クロンテック社製)をあらかじめ68℃に保温しておき、ヒト脳MTNプロットIIおよびV、ヒト12レーンMTNプロット(クロンテック社製)を入れた。ハイブリダイゼーション溶液1mlあたり1mgの加熱急冷したサケ精子DNAを加え、30分間保温した。これに放射線ラベルしたブローブDNAを加え、さらに1時間、68℃で保温した。その後、ハイブリダイゼーション溶液を除去し、0.05% SDSを含む2×SSPE(0.3mol/L NaCl、20mmol/L NaH₂PO₄、2mmol/L EDTA、pH7.4)で室温にて30分間、2回メンブレンを洗浄した。さらに、0.1% SDSを含む0.1×SSPE(2×SSPEを1/20の濃度に希釈した溶液)で50、40分間、2回メンブレンを洗浄した。その後、ストレージフォスファスクリーン(STORAGE PHOSPHOR SCREEN、コダック社製)に一晩露光し、タイフーン(TYPHOON)8600パリアブルモードイメージャー(アマシャムファルマシアバイオテク社製)で検出した。

【0229】その結果、脳、心臓、骨格筋、肝臓、などで発現が確認されたが、大腸、胸腺、脾臓、腎臓、小腸、胎盤、肺、末梢血リンパ球などでは発現が検出されなかった（図3）。脳内での部位では小脳、大脳皮質、延髄、後頭葉、前頭葉、側頭葉、扁桃、尾状核、被殻、海馬、視床などで発現が見られたが、脊髄、脳梁にはほとんど発現していないことが明らかとなった（図4および図5）。

【0230】実施例4 ヒトDGリパーゼホモログに対 50

するポリクローナル抗体の取得

ヒト D G リパーゼホモログのアミノ酸配列の 9 4 1 ~ 9 5 6 番目の配列の N 末端にシステインを付加した配列 (配列番号 1 3) からなるペプチドを化学合成し、これを K L H にカップリングしたものをアジュバンドと共に 2 匹のウサギに 2 週間おきに 6 回注射した。1 2 週間後まで抗原を用いた E L I S A によって抗体価を測定した (図 6)。2 匹のうちの 1 匹の抗体価が十分に上昇していることを確認した後、免疫開始 1 2 週目にこのウサギから全血採血を行った。得られた全血から遠心分離法によって血清を得た。

【0231】実施例5 ヒトDGリパーゼホモログの部分長ポリペプチドの哺乳類細胞での発現とDGリパーゼ活性の検出

実施例 1 で得られたヒト D G リパーゼホモログのアミノ酸配列のうち、N 末端近傍の膜貫通ドメインを除いた、配列番号 1 4 で表されるアミノ酸配列（配列番号 1 の 1 7 2 ~ 1 0 4 2 番目の配列に相当する）を有する部分長ポリペプチドを以下のようにして、哺乳類細胞で発現させ、該部分長ポリペプチドが、D G リパーゼ活性を有することを確認した。配列番号 1 5 に、ヒト D G リパーゼホモログ c D N A の、該部分長ポリペプチドをコードする領域の塩基配列を示した。

【0232】該部分長ポリペプチドをコードする部分長ヌクレオチド配列をまずはじめにPCRにて増幅した。配列番号16と配列番号17に示すプライマーを用いて、クロンテック社製ヒト胎児脳由来マラソン・リーダーcDNAをテンプレートとしてPCRを行った。その結果、推定される大きさ(約2600bp)のPCR産物が増幅したので、これをアガロースゲルより切り出し、精製した後、Aアディクションキット(キアゲン社製)によってPCR産物の末端にA残基を付加した。これをpGEM-T Easyベクター(プロメガ社製)にT/Aクローニングした。こうしてサブクローニングされたインサート部位の配列決定を行い塩基配列(配列番号2の619~3268番目に相当する)を確認した後、これをテンプレートとして発現用ベクターに挿入するためのDNAをセンスプライマー(配列番号18)およびアンチセンスプライマー(配列番号19)を用いてPCRにて増幅した。センスプライマー(配列番号18)には開始コドン(ATG)及び制限酵素BamHI認識サイトを、アンチセンスプライマー(配列番号19)には制限酵素NotI認識サイトをそれぞれ含むように設計した。得られたPCR産物を制限酵素BamHI及びNotIにて2重切断し、これを同じく制限酵素BamHI及びNotIにて2重切断した哺乳類細胞発現用ベクターであるpcDNA3(インビトロジェン社製)に方向性を保ったままライゲーションした。こうしてヒトDGリパーゼホモログの部分長ポリペプチドを哺乳類細胞で発現させるためのベクターpcDNA3-solubedGL2を構築した。配列番号20にベクターとライゲーション

ヨシしたDNAがコードするポリペプチドのアミノ酸配列(配列番号14で表されるアミノ酸配列のN末端に開始コドン由来のメチオニンが付加した配列)を、配列番号21に該DNAのコード領域の塩基配列を示した。

【0233】pcDNA3-solubeDGL2をリン酸カルシウム法〔Mol. Cell Biol., 7 2745 (1987)〕にてCOS-1細胞に導入した(導入後の細胞を、以下、形質転換細胞とよぶ)。48時間後、細胞をラバーポリスמןで回収し、PBSで3回洗浄後、細胞のペレットに1mLのホモジネート用バッファー〔10mmol/L Tris/HCl pH7.4、1mmol/L EDTA、0.15 mol/Lショ糖、100μmol/L ロイペプチン、50μmol/L N-アセチル-L-ロイシル-L-ロイシル-L-ノルロイシナル(ALLN、カルピオケム社製)、1mmol/L 4-(2-アミノエチル)ベンゼンスルホニル・フルオリド・ハイドロクロライド(AEBSF、カルピオケム社製)〕を加え、懸濁した。懸濁物をガラス製ダウンス(Dounce)型ホモジナイザー〔ホイートン(Wheaton)社製〕にて10ストローク操作することにより破碎した。破碎物をエッペンドルフチューブへ移し替え、バスソニック(ブランソン社)にて30秒超音波処理した。こうして得られた破碎物を50倍希釈してプロテイン・アッセイ・キットI〔バイオ・ラッド(BioRad)社製〕にて蛋白質の定量を行った。ベクターの導入をしなかったCOS-1細胞(以下、コントロール細胞とよぶ)についても、上記と同様の操作を行った。コントロール細胞破碎物と形質転換細胞破碎物との蛋白質の濃度を、ともに10 mg/mLに合わせた(以下、これらの溶液を破碎液とよぶ)。

【0234】形質転換細胞の破碎液およびコントロール細胞の破碎液5μLをSDSサンプルバッファーに加え、100℃で5分間ボイルし、7.5%ゲル濃度のSDS-PAGEを行った。実施例4で得られた抗血清を1次抗体として用いたウェスタンブロッティング法によってヒトDGLリパーゼホモログの部分長ポリペプチドの検出を行った。形質転換細胞には、コントロール細胞には見られない特異的な約100kDaのバンドが検出され(図7)、ヒトDGLリパーゼホモログの部分長ポリペプチドの発現が確認された。

【0235】上記で得られた形質転換細胞の破碎液を酵素源として、[¹⁴C]ステアロイルDGを基質にした既報〔J. Biochem. 125, 1077 (1999)〕の方法にてDGLリパーゼ活性を測定した。その結果、コントロール細胞の破碎液を酵素源とした場合と比べて形質転換細胞の破碎液を酵素源とした場合、DGLリパーゼ活性が約2倍上昇した。この活性はDGLリパーゼの特異的な阻害剤とし*

*て知られているRHC-80267〔バイオモル(BIOMOL)社製〕によって完全に阻害された(図8)。これらのことから配列番号14で表されるアミノ酸配列を有するヒトDGLリパーゼホモログの部分長ポリペプチドはDGLリパーゼ活性を有していることが明らかとなった。

【0236】

【発明の効果】本発明によれば、DGLリパーゼが関与する疾患の治療薬の探索、開発に有用なポリペプチド、該ポリペプチドをコードするDNA、該ポリペプチドを認識する抗体、およびこれらの利用方法を提供することができる。また、本発明のポリペプチドおよびDNAを用いることにより、生体内で多彩な生理作用を有すると考えられるカンナビノイド受容体アゴニストである2-AG産生酵素系の活性化剤や阻害剤等をスクリーニングすることができる。

【0237】

【配列表フリーテキスト】配列番号7-KIAA0659特異的な3'-RACE用プライマー

配列番号9-KIAA0659特異的な5'-RACE用プライマー

配列番号11-KIAA0659特異的なPCR用プライマー

配列番号12-KIAA0659特異的なPCR用プライマー

配列番号13-ヒトDGLリパーゼホモログのアミノ酸配列の941~956とN末に付加したシステインからなるペプチド

配列番号16-ヒトDGLリパーゼホモログの部分長ポリペプチドをコードするDNAの増幅用のセンスプライマー

配列番号17-ヒトDGLリパーゼホモログの部分長ポリペプチドをコードするDNAの増幅用のアンチセンスプライマー

配列番号18-発現ベクターのための挿入DNAの増幅用のセンスプライマー

配列番号19-発現ベクターのための挿入DNAの増幅用のセンスプライマー

配列番号20-N末にメチオニン残基を付加したヒトDGLリパーゼホモログの部分長ポリペプチド

配列番号21-N末にメチオニン残基を付加したヒトDGLリパーゼホモログの部分長ポリペプチドをコードするDNA

【0238】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.

<120> Novel polypeptide

<130> H14-1964S3

<150> JP 2002-000281

<151> 2002-01-07

<160> 21

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 1042

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Pro Gly Ile Val Val Phe Arg Arg Arg

Trp Ser Val Gly Ser Asp

1 5 10 15

Asp Leu Val Leu Pro Ala Ile Phe Leu Phe

Leu Leu His Thr Thr Trp

20 25 30

Phe Val Ile Leu Ser Val Val Leu Phe Gly

Leu Val Tyr Asn Pro His

35 40 45

Glu Ala Cys Ser Leu Asn Leu Val Asp His

Gly Arg Gly Tyr Leu Gly

50 55 60

Ile Leu Leu Ser Cys Met Ile Ala Glu Met

Ala Ile Ile Trp Leu Ser

65 70 75 80

Met Arg Gly Gly Ile Leu Tyr Thr Glu Pro

Arg Asp Ser Met Gln Tyr

85 90 95

Val Leu Tyr Val Arg Leu Ala Ile Leu Val

Ile Glu Phe Ile Tyr Ala

100 105 110

Ile Val Gly Ile Val Trp Leu Thr Gln Tyr

Tyr Thr Ser Cys Asn Asp

115 120 125

Leu Thr Ala Lys Asn Val Thr Leu Gly Met

Val Val Cys Asn Trp Val

130 135 140

Val Ile Leu Ser Val Cys Ile Thr Val Leu

Cys Val Phe Asp Pro Thr

145 150 155 1

60

Gly Arg Thr Phe Val Lys Leu Arg Ala Thr

Lys Arg Arg Gln Arg Asn

165 170 175

Trp Pro Met Tyr Leu Met Arg Lys Pro Ala
 Cys Gly Leu Cys Gln Leu
 305 310 315 3
 20
 Ala Arg Ser Cys Ser Cys Cys Leu Cys Pro
 Ala Arg Pro Arg Phe Ala
 325 330 335

 Pro Gly Val Thr Ile Glu Glu Asp Asn Cys
 Cys Gly Cys Asn Ala Ile
 340 345 350

 Ala Ile Arg Arg His Phe Leu Asp Glu Asn
 Met Thr Ala Val Asp Ile
 355 360 365

 Val Tyr Thr Ser Cys His Asp Ala Val Tyr
 Glu Thr Pro Phe Tyr Val
 370 375 380

 Ala Val Asp His Asp Lys Lys Lys Val Val
 Ile Ser Ile Arg Gly Thr
 385 390 395 4
 00
 Leu Ser Pro Lys Asp Ala Leu Thr Asp Leu
 Thr Gly Asp Ala Glu Arg
 405 410 415

 Leu Pro Val Glu Gly His His Gly Thr Trp
 Leu Gly His Lys Gly Met
 420 425 430

 Val Leu Ser Ala Glu Tyr Ile Lys Lys Lys
 Leu Glu Gln Glu Met Val
 435 440 445

 Leu Ser Gln Ala Phe Gly Arg Asp Leu Gly
 Arg Gly Thr Lys His Tyr
 450 455 460

 Gly Leu Ile Val Val Gly His Ser Leu Gly
 Ala Gly Thr Ala Ala Ile
 465 470 475 4
 80
 Leu Ser Phe Leu Leu Arg Pro Gln Tyr Pro
 Thr Leu Lys Cys Phe Ala
 485 490 495

 Tyr Ser Pro Pro Gly Gly Leu Leu Ser Glu
 Asp Ala Met Glu Tyr Ser
 500 505 510

Leu Leu Ser Ala Ala Lys Val Met Val Ser
Pro Thr Glu Val Asp Leu

675 680 685

Thr Pro Glu Leu Ile Phe Gln Gln Gln Pro
Leu Pro Thr Gly Pro Pro

690 695 700

Met Pro Thr Gly Leu Ala Leu Glu Leu Pro
Thr Ala Asp His Arg Asn

705 710 715 7
20

Ser Ser Val Arg Ser Lys Ser Gln Ser Glu
Met Ser Leu Glu Gly Phe

725 730 735

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

740 745 750

Asp Pro Val Glu Leu Leu Leu Leu Ser Thr
Gln Glu Arg Leu Ala Ala

755 760 765

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

770 775 780

Asp Thr Glu Ser Leu Tyr Ser Phe Asp Ser
Arg Arg Ser Ser Gly Phe

785 790 795 8
00

Arg Ser Ile Arg Gly Ser Pro Ser Leu His
Ala Val Leu Glu Arg Asp

805 810 815

Glu Gly His Leu Phe Tyr Ile Asp Pro Ala
Ile Pro Glu Glu Asn Pro

820 825 830

Ser Leu Ser Ser Arg Thr Glu Leu Leu Ala
Ala Asp Ser Leu Ser Lys

835 840 845

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

850 855 860

Val Thr Pro Glu Arg Pro Pro Ser Ala Ala
Ala Asn Asp Glu Glu Glu

865 870 875 8
80

```

<210> 2
<211> 5788
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<220>
<221> source
<222> (1)..(5788)
<223> /organism="Homo sapiens"

<220>
<221> CDS
<222> (122)..(3250)
<400> 2
agtgaatcgg ggccttgggg agcccaggat ggag
gtggcg gtcgcggcgg cgggccgagc      60
cctgcggcgg gcgggaggag gtgagcacca ggcc
cactga gcctctgcag agccaccagc     120
c atg ccc ggg atc gtg gtg ttc cgg cgg cg
c tgg tct gtg ggc agt gat      169
  Met Pro Gly Ile Val Val Phe Arg Arg Arg
  Trp Ser Val Gly Ser Asp
      1              5              10              15

gac ctc gtc cta ccg gcc atc ttc ctc ttt
ctc ctg cat acc acc tgg      217
Asp Leu Val Leu Pro Ala Ile Phe Leu Phe
Leu Leu His Thr Thr Trp
              20              25              30

ttt gtg atc ctg tcc gtg gtg ctc ttc ggc
ctg gtc tat aac ccg cac      265
Phe Val Ile Leu Ser Val Val Leu Phe Gly
Leu Val Tyr Asn Pro His
      35              40              45

gag gcc tgc tcc ctg aac ctg gtg gac cac
ggc cgc ggc tac ctg ggc      313
Glu Ala Cys Ser Leu Asn Leu Val Asp His
Gly Arg Gly Tyr Leu Gly
      50              55              60

atc ctg ctg agc tgc atg atc gct gag atg
gcc atc atc tgg ctg agc      361
Ile Leu Leu Ser Cys Met Ile Ala Glu Met
Ala Ile Ile Trp Leu Ser
      65              70              75              80

atg cgc ggg ggc atc ctc tac acg gag ccc
cgt gac tcc atg cag tac      409
Met Arg Gly Gly Ile Leu Tyr Thr Glu Pro
Arg Asp Ser Met Gln Tyr
              85              90              95

```

agc tgg tcg cgc cgg ctc aaa gtg ttc ctc
 tgc tgc acg cgg acg aag 745
 Ser Trp Ser Arg Arg Leu Lys Val Phe Leu
 Cys Cys Thr Arg Thr Lys
 195 200 205

gac tcc cag tca gat gcc tac tca gaa atc
 gcc tac ctc ttt gcg gag 793
 Asp Ser Gln Ser Asp Ala Tyr Ser Glu Ile
 Ala Tyr Leu Phe Ala Glu
 210 215 220

ttc ttc cgg gac ctt gac att gtg cca tcc
 gac atc att gct ggc ctg 841
 Phe Phe Arg Asp Leu Asp Ile Val Pro Ser
 Asp Ile Ile Ala Gly Leu
 225 230 235 2
 40

gtg ctg ctc cgg cag cgg cag cgg gcc aag
 cgc aac gcc gtg ctg gac 889
 Val Leu Leu Arg Gln Arg Gln Arg Ala Lys
 Arg Asn Ala Val Leu Asp
 245 250 255

gag gca aac aat gac atc ttg gcc ttc ctg
 tct ggg atg ccg gtg acc 937
 Glu Ala Asn Asn Asp Ile Leu Ala Phe Leu
 Ser Gly Met Pro Val Thr
 260 265 270

aga aac acc aag tac ctc gac ctc aag aat
 tca caa gag atg ctc cgc 985
 Arg Asn Thr Lys Tyr Leu Asp Leu Lys Asn
 Ser Gln Glu Met Leu Arg
 275 280 285

tac aaa gag gtc tgc tac tac atg ctc ttt
 gcc ctg gct gcc tac ggg 1033
 Tyr Lys Glu Val Cys Tyr Tyr Met Leu Phe
 Ala Leu Ala Ala Tyr Gly
 290 295 300

tgg ccc atg tac ctg atg cgg aag ccc gcc
 tgc ggc ctc tgc caa ctg 1081
 Trp Pro Met Tyr Leu Met Arg Lys Pro Ala
 Cys Gly Leu Cys Gln Leu
 305 310 315 3
 20

gct cgg tcc tgc tcg tgt tgc ctg tgt cct
 gcg agg ccg cgg ttc gcc 1129
 Ala Arg Ser Cys Ser Cys Cys Leu Cys Pro
 Ala Arg Pro Arg Phe Ala
 325 330 335

ctg tcc cag gcc ttt ggg cga gac ctg ggc
 cgc gga acc aaa cac tac 1513
 Leu Ser Gln Ala Phe Gly Arg Asp Leu Gly
 Arg Gly Thr Lys His Tyr
 450 455 460

ggc ctg att gtg gtg ggc cac tcc ctg ggc
 gcg ggc act gct gcc atc 1561
 Gly Leu Ile Val Val Gly His Ser Leu Gly
 Ala Gly Thr Ala Ala Ile
 465 470 475 4
 80

ctc tcc ttc ctt ctg cgc cca cag tat ccg
 acc ctc aag tgc ttt gcc 1609
 Leu Ser Phe Leu Leu Arg Pro Gln Tyr Pro
 Thr Leu Lys Cys Phe Ala
 485 490 495

tac tcc ccg cca ggg ggc ctg ctg agt gag
 gat gcg atg gag tat tcc 1657
 Tyr Ser Pro Pro Gly Gly Leu Leu Ser Glu
 Asp Ala Met Glu Tyr Ser
 500 505 510

aag gag ttc gtg act gct gtg gtt ctg ggc
 aaa gac ctc gtc ccc agg 1705
 Lys Glu Phe Val Thr Ala Val Val Leu Gly
 Lys Asp Leu Val Pro Arg
 515 520 525

att ggc ctc tct cag ctg gaa ggc ttc cgc
 aga cag ctc ctg gat gtc 1753
 Ile Gly Leu Ser Gln Leu Glu Gly Phe Arg
 Arg Gln Leu Leu Asp Val
 530 535 540

ctg cag cga agc acc aag ccc aaa tgg cgg
 atc atc gtg ggg gcc acc 1801
 Leu Gln Arg Ser Thr Lys Pro Lys Trp Arg
 Ile Ile Val Gly Ala Thr
 545 550 555 5
 60

aaa tgc atc ccc aag tcg gag ctg cct gag
 gag gta gag gtg acc acc 1849
 Lys Cys Ile Pro Lys Ser Glu Leu Pro Glu
 Glu Val Glu Val Thr Thr
 565 570 575

ctg gcc agc acg cgg ctc tgg acc cac ccc
 agc gac cta act ata gcc 1897
 Leu Ala Ser Thr Arg Leu Trp Thr His Pro
 Ser Asp Leu Thr Ile Ala
 580 585 590

705 710 715 7
 20
 agc agc gtc agg agc aag tcc cag tct gag
 atg agc ctg gag ggc ttc 2329
 Ser Ser Val Arg Ser Lys Ser Gln Ser Glu
 Met Ser Leu Glu Gly Phe
 725 730 735

 tcg gag ggg cgg ctg ctg tcg cca gtg gtt
 gcg gcg gcg gcc cgc cag 2377
 Ser Glu Gly Arg Leu Leu Ser Pro Val Val
 Ala Ala Ala Ala Arg Gln
 740 745 750

 gac ccg gtg gag ctg ctg ctg ctg tct acc
 cag gag cgg ctg gca gcg 2425
 Asp Pro Val Glu Leu Leu Leu Leu Ser Thr
 Gln Glu Arg Leu Ala Ala
 755 760 765

 gag ctg cag gcc cgg cgg gca cca ctg gcc
 acc atg gag agc ctc tcg 2473
 Glu Leu Gln Ala Arg Arg Ala Pro Leu Ala
 Thr Met Glu Ser Leu Ser
 770 775 780

 gac act gag tcc ctg tac agc ttc gac tcg
 cgc cgc tcc tca ggc ttc 2521
 Asp Thr Glu Ser Leu Tyr Ser Phe Asp Ser
 Arg Arg Ser Ser Gly Phe
 785 790 795 8
 00

 cgc agc atc cgg ggc tcc ccc agc ctc cac
 gct gtg ctg gag cgt gat 2569
 Arg Ser Ile Arg Gly Ser Pro Ser Leu His
 Ala Val Leu Glu Arg Asp
 805 810 815

 gaa ggc cac ctc ttc tac att gac cct gcc
 atc ccc gag gaa aac cca 2617
 Glu Gly His Leu Phe Tyr Ile Asp Pro Ala
 Ile Pro Glu Glu Asn Pro
 820 825 830

 tcc ctg agc tcg cgc act gag ctg ctg gcg
 gcc gac agc ctg tcc aag 2665
 Ser Leu Ser Ser Arg Thr Glu Leu Leu Ala
 Ala Asp Ser Leu Ser Lys
 835 840 845

 cac tca cag gac acg cag ccc ctg gag gcg
 gcc ctg ggc agt ggc ggc 2713

965

970

975

gcc ggc tca gcc gac ccc tcc tcg ggc atc
tca ctc tcg ccc tcc ttc 3097

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

980

985

990

ccg ctc agc tcc tcg ggt gag ctc atg gac
ctg acg ccc acg ggc ctc 3145

Pro Leu Ser Ser Ser Gly Glu Leu Met Asp
Leu Thr Pro Thr Gly Leu

995

1000

1005

agt agc cag gaa tgc ctg gcg gct gac aag
atc cgg act tct acc 3190

Ser Ser Gln Glu Cys Leu Ala Ala Asp Lys
Ile Arg Thr Ser Thr

1010

1015

1020

ccc act ggc cac gga gcc agc ccc gcc aag
caa gat gag ctg gtc 3235

Pro Thr Gly His Gly Ala Ser Pro Ala Lys
Gln Asp Glu Leu Val

1025

1030

1035

atc tca gca cgc tag caccacagtt gcgtggc
cag ccgggccag gcaggagcag 3290

Ile Ser Ala Arg

1040

gtggccctgt gggcacctgg tgcctgcccc ctgc
cgggca gctttaagga cagaccccca 3350

ggggcagttt agcctcaggc acaggcatcg ctgc
tgagct gggggtccgc atccctacct 3410

cagcttagga cccacagagc caaggtggct ggga
tctggc cccacagatg gggaaagatg 3470

gggaaggggtg tggagtgggg aggagcctgg gcag
cctgct ggggtgggcca cactcagcct 3530

gactgccctc catgggggca ttctggcacc ccct
gtcca ggacaggcca tgggcaagct 3590

gcctcccatc actgcctgct ggtgctctc ccag
gggcca ggtggagagc agtgcacccc 3650

gacacatgta ttctcatctg tgggtccaggc cggc
atcgtc ctggccaccc cccagatctg 3710

gtgcctgctg gccggccccc tggggtgccc ctgc
cgaggt ggcctgcagt gctgtacatg 3770

tttacagaag ctgctgggct tggctcagga tgtg
ttctgg gcttgcaagc cccccgcca 3830

atcatgtgtt cagtagccat cctctgagca gggc
ccaagg cagccagggg cctggagggg 3890

ccagaggagg gtgggggtcag ggccgcccct tctc

ctaatgtggg catgtcgtcc accccaggac aagc
 catcag ggacagaccc cccaccccca 5270
 aggctgcagc cacaccatgt ttcaggcttg gggc
 tggggc aggcttgggc tcaatcctgg 5330
 gcacccaggg gcagcccacc cctaacctgg ctcc
 taccca cctcgccctt gaaggatggg 5390
 cctgctgcac gtctccctcc tccaccccat acca
 cactgg ggggtctgag ccacccccct 5450
 cagccccgtt cggctcagac cgacccccac tcca
 tcccca gacctgcagc acaagtgcgc 5510
 gggcctgtcc tcccaggggc ctgggcgact ccat
 atgcaa tcagtagcga gcagccgggc 5570
 cccacagacc ctcatgact ctcttacgtg ccat
 tctccc cagacttttt ttgtacttaa 5630
 tgtatgaaag atccaaacta atattgctgt aaaa
 aggaga gacaaattaa tatagcttat 5690

tctataaata tatctgtata taaaggtttc tgta
 tattgt atagagctgt gtataaactg 5750
 gatgtagaag aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaa
 aaaa 5788

<210> 3

<211> 3129

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> source

<222> (1)..(3129)

<223> /organism="Homo sapiens"

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(3129)

<400> 3

atg ccc ggg atc gtg gtg ttc cgg cgg cgc
 tgg tct gtg ggc agt gat 48
 Met Pro Gly Ile Val Val Phe Arg Arg Arg
 Trp Ser Val Gly Ser Asp

1 5 10 15

gac ctc gtc cta ccg gcc atc ttc ctc ttt
 ctc ctg cat acc acc tgg 96
 Asp Leu Val Leu Pro Ala Ile Phe Leu Phe
 Leu Leu His Thr Thr Trp

20 25 30

ttt gtg atc ctg tcc gtg gtg ctc ttc ggc
 ctg gtc tat aac ccg cac 144
 Phe Val Ile Leu Ser Val Val Leu Phe Gly
 Leu Val Tyr Asn Pro His

35 40 45

gag gcc tgc tcc ctg aac ctg gtg gac cac

gtc atc ctc agt gtg tgc atc act gtc ctc
 tgc gtc ttc gac ccc acg 480
 Val Ile Leu Ser Val Cys Ile Thr Val Leu
 Cys Val Phe Asp Pro Thr
 145 150 155 1
 60
 ggc cgc acc ttt gtc aag ctg aga gcc acc
 aag agg agg cag cgt aac 528
 Gly Arg Thr Phe Val Lys Leu Arg Ala Thr
 Lys Arg Arg Gln Arg Asn
 165 170 175

 ctg cgg acc tac aac ctg cgg cac cgc tta
 gag gag ggt caa gcc acc 576
 Leu Arg Thr Tyr Asn Leu Arg His Arg Leu
 Glu Glu Gly Gln Ala Thr
 180 185 190

 agc tgg tcg cgc cgg ctc aaa gtg ttc ctc
 tgc tgc acg cgg acg aag 624
 Ser Trp Ser Arg Arg Leu Lys Val Phe Leu
 Cys Cys Thr Arg Thr Lys
 195 200 205

 gac tcc cag tca gat gcc tac tca gaa atc
 gcc tac ctc ttt gcg gag 672
 Asp Ser Gln Ser Asp Ala Tyr Ser Glu Ile
 Ala Tyr Leu Phe Ala Glu
 210 215 220

 ttc ttc cgg gac ctt gac att gtg cca tcc
 gac atc att gct ggc ctg 720
 Phe Phe Arg Asp Leu Asp Ile Val Pro Ser
 Asp Ile Ile Ala Gly Leu
 225 230 235 2
 40
 gtg ctg ctc cgg cag cgg cag cgg gcc aag
 cgc aac gcc gtg ctg gac 768
 Val Leu Leu Arg Gln Arg Gln Arg Ala Lys
 Arg Asn Ala Val Leu Asp
 245 250 255

 gag gca aac aat gac atc ttg gcc ttc ctg
 tct ggg atg ccg gtg acc 816
 Glu Ala Asn Asn Asp Ile Leu Ala Phe Leu
 Ser Gly Met Pro Val Thr
 260 265 270

 aga aac acc aag tac ctc gac ctc aag aat
 tca caa gag atg ctc cgc 864
 Arg Asn Thr Lys Tyr Leu Asp Leu Lys Asn
 Ser Gln Glu Met Leu Arg

ctg tcc ccc aag gat gcc ctg act gac ctg
 acg ggt gat gct gag cgc 1248
 Leu Ser Pro Lys Asp Ala Leu Thr Asp Leu
 Thr Gly Asp Ala Glu Arg
 405 410 415

ctc ccc gtg gag ggg cac cac ggc acc tgg
 ctg ggc cac aag ggt atg 1296
 Leu Pro Val Glu Gly His His Gly Thr Trp
 Leu Gly His Lys Gly Met
 420 425 430

gtc ctc tca gct gag tac atc aag aag aaa
 ctg gag cag gag atg gtc 1344
 Val Leu Ser Ala Glu Tyr Ile Lys Lys Lys
 Leu Glu Gln Glu Met Val
 435 440 445

ctg tcc cag gcc ttt ggg cga gac ctg ggc
 cgc gga acc aaa cac tac 1392
 Leu Ser Gln Ala Phe Gly Arg Asp Leu Gly
 Arg Gly Thr Lys His Tyr
 450 455 460

ggc ctg att gtg gtg ggc cac tcc ctg ggc
 gcg ggc act gct gcc atc 1440
 Gly Leu Ile Val Val Gly His Ser Leu Gly
 Ala Gly Thr Ala Ala Ile
 465 470 475 4
 80

ctc tcc ttc ctt ctg cgc cca cag tat ccg
 acc ctc aag tgc ttt gcc 1488
 Leu Ser Phe Leu Leu Arg Pro Gln Tyr Pro
 Thr Leu Lys Cys Phe Ala
 485 490 495

tac tcc ccg cca ggg ggc ctg ctg agt gag
 gat gcg atg gag tat tcc 1536
 Tyr Ser Pro Pro Gly Gly Leu Leu Ser Glu
 Asp Ala Met Glu Tyr Ser
 500 505 510

aag gag ttc gtg act gct gtg gtt ctg ggc
 aaa gac ctc gtc ccc agg 1584
 Lys Glu Phe Val Thr Ala Val Val Leu Gly
 Lys Asp Leu Val Pro Arg
 515 520 525

att ggc ctc tct cag ctg gaa ggc ttc cgc
 aga cag ctc ctg gat gtc 1632
 Ile Gly Leu Ser Gln Leu Glu Gly Phe Arg
 Arg Gln Leu Leu Asp Val
 530 535 540

660	665	670	
ctg ctc tct gca gcc aag gtc atg gtg agc			
cct acc gag gtg gac ctg	2064		
Leu Leu Ser Ala Ala Lys Val Met Val Ser			
Pro Thr Glu Val Asp Leu			
675	680	685	
act cct gag ctc atc ttc cag cag cag cca			
ctc ccc acg ggg ccg ccc	2112		
Thr Pro Glu Leu Ile Phe Gln Gln Gln Pro			
Leu Pro Thr Gly Pro Pro			
690	695	700	
atg ccc act ggc ctt gcc ctg gag ctg ccg			
act gca gac cac cgc aac	2160		
Met Pro Thr Gly Leu Ala Leu Glu Leu Pro			
Thr Ala Asp His Arg Asn			
705	710	715	7
20			
agc agc gtc agg agc aag tcc cag tct gag			
atg agc ctg gag ggc ttc	2208		
Ser Ser Val Arg Ser Lys Ser Gln Ser Glu			
Met Ser Leu Glu Gly Phe			
725	730	735	
tcg gag ggg cgg ctg ctg tcg cca gtg gtt			
gcg gcg gcg gcc cgc cag	2256		
Ser Glu Gly Arg Leu Leu Ser Pro Val Val			
Ala Ala Ala Ala Arg Gln			
740	745	750	
gac ccg gtg gag ctg ctg ctg ctg tct acc			
cag gag cgg ctg gca gcg	2304		
Asp Pro Val Glu Leu Leu Leu Leu Ser Thr			
Gln Glu Arg Leu Ala Ala			
755	760	765	
gag ctg cag gcc cgg cgg gca cca ctg gcc			
acc atg gag agc ctc tcg	2352		
Glu Leu Gln Ala Arg Arg Ala Pro Leu Ala			
Thr Met Glu Ser Leu Ser			
770	775	780	
gac act gag tcc ctg tac agc ttc gac tcg			
cgc cgc tcc tca ggc ttc	2400		
Asp Thr Glu Ser Leu Tyr Ser Phe Asp Ser			
Arg Arg Ser Ser Gly Phe			
785	790	795	8
00			
cgc agc atc cgg ggc tcc ccc agc ctc cac			
gct gtg ctg gag cgt gat	2448		

915	920	925	
tcc ttc caa gac ctc tac tgc atg gtg gtg			
ccc gag agc ccc acc agt	2832		
Ser Phe Gln Asp Leu Tyr Cys Met Val Val			
Pro Glu Ser Pro Thr Ser			
930	935	940	
gac tac gct gag ggc ccc aag tcc ccc agc			
cag caa gag atc ctg ctc	2880		
Asp Tyr Ala Glu Gly Pro Lys Ser Pro Ser			
Gln Gln Glu Ile Leu Leu			
945	950	955	9
60			
cgt gcc cag ttc gag ccc aac ctg gtg ccc			
aag ccc cca cgg ctc ttt	2928		
Arg Ala Gln Phe Glu Pro Asn Leu Val Pro			
Lys Pro Pro Arg Leu Phe			
965	970	975	
gcc ggc tca gcc gac ccc tcc tcg ggc atc			
tca ctc tcg ccc tcc ttc	2976		
Ala Gly Ser Ala Asp Pro Ser Ser Gly Ile			
Ser Leu Ser Pro Ser Phe			
980	985	990	
ccg ctc agc tcc tcg ggt gag ctc atg gac			
ctg acg ccc acg ggc ctc	3024		
Pro Leu Ser Ser Ser Gly Glu Leu Met Asp			
Leu Thr Pro Thr Gly Leu			
995	1000	1005	
agt agc cag gaa tgc ctg gcg gct gac aag			
atc cgg act tct acc ccc	3072		
Ser Ser Gln Glu Cys Leu Ala Ala Asp Lys			
Ile Arg Thr Ser Thr Pro			
1010	1015	1020	
act ggc cac gga gcc agc ccc gcc aag caa			
gat gag ctg gtc atc tca	3120		
Thr Gly His Gly Ala Ser Pro Ala Lys Gln			
Asp Glu Leu Val Ile Ser			
1025	1030	1035	
1040			
gca cgc tag			
3129			
Ala Arg			

<210> 4

<211> 672

<212> PRT

130	135	140	
Ala Ala Thr Val Val Ser Ile Ile Ile Val			
Phe Asp Pro Leu Gly Gly			
145	150	155	1
60			
Lys Met Ala Pro Tyr Ser Ser Ala Gly Pro			
Ser His Leu Asp Ser His			
165	170	175	
Asp Ser Ser Gln Leu Leu Asn Gly Leu Lys			
Thr Ala Ala Thr Ser Val			
180	185	190	
Trp Glu Thr Arg Ile Lys Leu Leu Cys Cys			
Cys Ile Gly Lys Asp Asp			
195	200	205	
His Thr Arg Val Ala Phe Ser Ser Thr Ala			
Glu Leu Phe Ser Thr Tyr			
210	215	220	
Phe Ser Asp Thr Asp Leu Val Pro Ser Asp			
Ile Ala Ala Gly Leu Ala			
225	230	235	2
40			
Leu Leu His Gln Gln Gln Asp Asn Ile Arg			
Asn Asn Gln Glu Pro Ala			
245	250	255	
Gln Val Val Cys His Ala Pro Gly Ser Ser			
Gln Glu Ala Asp Leu Gly			
260	265	270	
Ala Glu Leu Glu Asn Cys His His Tyr Met			
Gln Phe Ala Ala Ala Ala			
275	280	285	
Tyr Gly Trp Pro Leu Tyr Ile Tyr Arg Asn			
Pro Leu Thr Gly Leu Cys			
290	295	300	
Arg Ile Gly Gly Asp Cys Cys Arg Ser Arg			
Thr Thr Asp Tyr Asp Leu			
305	310	315	3
20			
Val Gly Gly Asp Gln Leu Asn Cys His Phe			
Gly Ser Ile Leu His Thr			
325	330	335	
Thr Gly Leu Gln Tyr Arg Asp Phe Ile His			
Val Ser Phe His Asp Lys			

515	520	525	
His Gly Leu Trp Tyr Glu Leu Phe Gly Gly			
Asn Pro Asn Asn Leu Pro			
530	535	540	
Thr Glu Leu Asp Gly Gly Asp Gln Glu Val			
Leu Thr Gln Pro Leu Leu			
545	550	555	5
60			
Gly Glu Gln Ser Leu Leu Thr Arg Trp Ser			
Pro Ala Tyr Ser Phe Ser			
565	570	575	
Ser Asp Ser Pro Leu Asp Ser Ser Pro Lys			
Tyr Pro Pro Leu Tyr Pro			
580	585	590	
Pro Gly Arg Ile Ile His Leu Gln Glu Glu			
Gly Ala Ser Gly Arg Phe			
595	600	605	
Gly Cys Cys Ser Ala Ala His Tyr Ser Ala			
Lys Trp Ser His Glu Ala			
610	615	620	
Glu Phe Ser Lys Ile Leu Ile Gly Pro Lys			
Met Leu Thr Asp His Met			
625	630	635	6
40			
Pro Asp Ile Leu Met Arg Ala Leu Asp Ser			
Val Val Ser Asp Arg Ala			
645	650	655	
Ala Cys Val Ser Cys Pro Ala Gln Gly Val			
Ser Ser Val Asp Val Ala			
660	665	670	
<210> 5			
<211> 647			
<212> PRT			
<213> Homo sapiens			
<400> 5			
Ser Ile Arg Gly Thr Leu Ser Pro Lys Asp			
Ala Leu Thr Asp Leu Thr			
1	5	10	15
Gly Asp Ala Glu Arg Leu Pro Val Glu Gly			
His His Gly Thr Trp Leu			
20	25	30	

Val Glu Val Thr Thr Leu Ala Ser Thr Arg
Leu Trp Thr His Pro Ser

180

185

190

Asp Leu Thr Ile Ala Leu Ser Ala Ser Thr
Pro Leu Tyr Pro Pro Gly

195

200

205

Arg Ile Ile His Val Val His Asn His Pro
Ala Glu Gln Cys Cys Cys

210

215

220

Cys Glu Gln Glu Glu Pro Thr Tyr Phe Ala
Ile Trp Gly Asp Asn Lys

225

230

235

2

40

Ala Phe Asn Glu Val Ile Ile Ser Pro Ala
Met Leu His Glu His Leu

245

250

255

Pro Tyr Val Val Met Glu Gly Leu Asn Lys
Val Leu Glu Asn Tyr Asn

260

265

270

Lys Gly Lys Thr Ala Leu Leu Ser Ala Ala
Lys Val Met Val Ser Pro

275

280

285

Thr Glu Val Asp Leu Thr Pro Glu Leu Ile
Phe Gln Gln Gln Pro Leu

290

295

300

Pro Thr Gly Pro Pro Met Pro Thr Gly Leu
Ala Leu Glu Leu Pro Thr

305

310

315

3

20

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

325

330

335

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

340

345

350

Ala Ala Ala Arg Gln Asp Pro Val Glu Leu
Leu Leu Leu Ser Thr Gln

355

360

365

Glu Arg Leu Ala Ala Glu Leu Gln Ala Arg
Arg Ala Pro Leu Ala Thr

545 550 555 5
 60
 Gln Glu Ile Leu Leu Arg Ala Gln Phe Glu
 Pro Asn Leu Val Pro Lys

565 570 575

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

580 585 590

Leu Ser Pro Ser Phe Pro Leu Ser Ser Ser
 Gly Glu Leu Met Asp Leu

595 600 605

Thr Pro Thr Gly Leu Ser Ser Gln Glu Cys
 Leu Ala Ala Asp Lys Ile

610 615 620

Arg Thr Ser Thr Pro Thr Gly His Gly Ala
 Ser Pro Ala Lys Gln Asp

625 630 635 6

40

Glu Leu Val Ile Ser Ala Arg

645

<210> 6

<211> 4459

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> source

<222> (1)..(4459)

<223> /organism="Homo sapiens"

/clone="HK01892"

/tissue_type="brain"

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1946)

<400> 6

tc agt atc cgg ggg acc ctg tcc ccc aag g

at gcc ctg act gac ctg 47

Ser Ile Arg Gly Thr Leu Ser Pro Lys As

p Ala Leu Thr Asp Leu

1 5 10 15

acg ggt gat gct gag cgc ctc ccc gtg gag

ggg cac cac ggc acc tgg 95

Thr Gly Asp Ala Glu Arg Leu Pro Val Glu

Gly His His Gly Thr Trp

20 25 30

ctg ggc cac aag ggt atg gtc ctc tca gct

gat gcg atg gag tat tcc aag gag ttc gtg
act gct gtg gtt ctg ggc 383
Asp Ala Met Glu Tyr Ser Lys Glu Phe Val
Thr Ala Val Val Leu Gly
115 120 125

aaa gac ctc gtc ccc agg att ggc ctc tct
cag ctg gaa ggc ttc cgc 431
Lys Asp Leu Val Pro Arg Ile Gly Leu Ser
Gln Leu Glu Gly Phe Arg
130 135 140

aga cag ctc ctg gat gtc ctg cag cga agc
acc aag ccc aaa tgg cgg 479
Arg Gln Leu Leu Asp Val Leu Gln Arg Ser
Thr Lys Pro Lys Trp Arg
145 150 155

atc atc gtg ggg gcc acc aaa tgc atc ccc
aag tcg gag ctg cct gag 527
Ile Ile Val Gly Ala Thr Lys Cys Ile Pro
Lys Ser Glu Leu Pro Glu
160 165 170 1
75

gag gta gag gtg acc acc ctg gcc agc acg
cgg ctc tgg acc cac ccc 575
Glu Val Glu Val Thr Thr Leu Ala Ser Thr
Arg Leu Trp Thr His Pro
180 185 190

agc gac cta act ata gcc ctc tca gcc agc
act cca ctc tac ccg ccc 623
Ser Asp Leu Thr Ile Ala Leu Ser Ala Ser
Thr Pro Leu Tyr Pro Pro
195 200 205

ggc cgc atc atc cac gtg gtc cac aac cac
cct gca gag cag tgc tgc 671
Gly Arg Ile Ile His Val Val His Asn His
Pro Ala Glu Gln Cys Cys
210 215 220

tgc tgt gag cag gag gag ccc aca tac ttt
gcc atc tgg ggc gac aac 719
Cys Cys Glu Gln Glu Glu Pro Thr Tyr Phe
Ala Ile Trp Gly Asp Asn
225 230 235

aag gcc ttc aat gag gtg atc atc tcg cca
gcc atg ctg cat gag cac 767
Lys Ala Phe Asn Glu Val Ile Ile Ser Pro
Ala Met Leu His Glu His

Gln Glu Arg Leu Ala Ala Glu Leu Gln Ala
Arg Arg Ala Pro Leu Ala

370

375

380

acc atg gag agc ctc tcg gac act gag tcc
ctg tac agc ttc gac tcg 1199
Thr Met Glu Ser Leu Ser Asp Thr Glu Ser
Leu Tyr Ser Phe Asp Ser

385

390

395

cgc cgc tcc tca ggc ttc cgc agc atc cgg
ggc tcc ccc agc ctc cac 1247
Arg Arg Ser Ser Gly Phe Arg Ser Ile Arg
Gly Ser Pro Ser Leu His

400

405

410

4

15

gct gtg ctg gag cgt gat gaa ggc cac ctc
ttc tac att gac cct gcc 1295
Ala Val Leu Glu Arg Asp Glu Gly His Leu
Phe Tyr Ile Asp Pro Ala

420

425

430

atc ccc gag gaa aac cca tcc ctg agc tcg
cgc act gag ctg ctg gcg 1343
Ile Pro Glu Glu Asn Pro Ser Leu Ser Ser
Arg Thr Glu Leu Leu Ala

435

440

445

gcc gac agc ctg tcc aag cac tca cag gac
acg cag ccc ctg gag gcg 1391
Ala Asp Ser Leu Ser Lys His Ser Gln Asp
Thr Gln Pro Leu Glu Ala

450

455

460

gcc ctg ggc agt ggc ggc gtc act cct gag
cgg ccc ccc agt gct gcg 1439
Ala Leu Gly Ser Gly Gly Val Thr Pro Glu
Arg Pro Pro Ser Ala Ala

465

470

475

gcc aat gac gag gag gaa gag gtt ggc ggt
ggg ggt ggc ggc ccg gcc 1487
Ala Asn Asp Glu Glu Glu Glu Val Gly Gly
Gly Gly Gly Gly Pro Ala

480

485

490

4

95

tcc cgc ggg gag ctg gcg ctg cac aat ggg
cgc ctg ggg gac tcg ccc 1535
Ser Arg Gly Glu Leu Ala Leu His Asn Gly
Arg Leu Gly Asp Ser Pro

500

505

510

agt cct cag gtg ctg gaa ttc gcc gag ttc

625

630

635

gat gag ctg gtc atc tca gca cgc tag cacc
 ccagtt gcgtggccag 1966
 Asp Glu Leu Val Ile Ser Ala Arg

640

645

ccgggcccag gcaggagcag gtggccctgt gggc
 acctgg tgctgcccc ctgccgggca 2026
 gctttaagga cagaccccca ggggcagttt agcc
 tcaggc acaggcatcg ctgctgagct 2086
 ggggtccgc atccctacct cagcttagga cccc
 cagagc caaggaggct gggatctggc 2146
 cccacagatg gggaaagatg ggaagggtg tgga
 gtgggg aggagcctgg gcagcctgct 2206
 gggtagggca cactcagcct gactgccctc catg
 ggggca ttctggcacc ccctgctcca 2266
 ggacaggcca tgggcaagct gcctcccatc actg
 cctgct ggctgctctc ccaggggcca 2326
 ggtggagagc agtgccccc gacacatgta ttct
 catctg tgggccaggc cggcatcgtc 2386
 ctggccaccc ccagatctg gtgcctgctg gccg
 gcccc tggggtgccc ctgccgaggt 2446
 ggctgcagct gctgtacatg ttacagaag ctgc
 tgggct tggctcagga tgtgttctgg 2506
 gcttgcaagc ccccgccca atcatgtgtt cagt
 agccat cctctgagca gggccaagg 2566
 cagccagggg cctggagggg ccagaggagg gtgg
 ggtagc ggccgcccct tctctgcctt 2626
 gtgcctctca tctgcctcc tctgcccatg ggtc
 ctgggc acccaggcct gccctgcctg 2686
 ctggctactt cctggcttac ctctacccc caag
 gatcct caccaccaa aggggtgtgg 2746
 gcaactgctgt gaccaccca gctgcagagt cagt
 gccctg ggtggaagga aggcactgag 2806
 agcccccttc ctctgagggc ccacctcac ccct
 tgggtgt caccaccacc acgcctaggc 2866

agctctgggc cctgggatct ggaaccaaca cacc
 cctgtt cccctcagct ttccctctc 2926
 gctggcctgg gcaccctcct gggagcaggc cttc
 ctccct cccaccccca atgtcctgtt 2986
 ggtaggaggt ggggccaaga gtggggtatg gtgg
 gccttg gctggagacc tctgtccact 3046
 gccagggag gggcctgggg ctgggagcag tccc
 ggttta gcctgaggtc cccatagggc 3106
 ttccctcccct gctgggtttg ggaagcagtt aggg
 agatag cgaccggag ttccccaga 3166
 agcggggtgg gaggtgtgc atgctagtgt tggc
 gcgtat gcatgtgat gagtgtgcac 3226
 cgttcctaag gaaggggcct ctggggctgc ccac

```

<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> KIAA0659-specific primer
      for 3'-RACE
<400> 7
ccgcccaatc atgtgttcag tagcc
                                     25

<210> 8
<211> 1965
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<220>
<221> source
<222> (1)..(1965)
<223> /organism="Homo sapiens"

      /tissue_type="brain"
<400> 8
ccgcccaatc atgtgttcag tagccatcct ctga
gcaggg cccaaggcag ccaggggcct      60
ggaggggcca gaggaggggt gggtcagggc cgcc
ccttct ctgcctttgt cctctcatgc      120
tgccctctct gcccatgggt cctgggcacc cagg
cctgcc ctgcctgctg gctacttcct      180
ggcttacctt ctaccccaa ggatcctcac cacc
caaagg gtggtgggca ctgctgtgac      240

caccagct gcagagtcag tgccctgggt ggaa
ggaagg cactgagagc ccccttcctc      300
tgagggcccc acctacccc ttggtgtcac cccc
accacg cctaggcagc tctgggccct      360
gggatctgga accaacacac cctgttccc ctca
gctttc cctcctcgtt ggcctgggca      420
ccctcctggg agcaggcctt cctccctccc accc
ccaatg tcctgttggg aggaggtggg      480
gccaagagtg gggatatgtg ggccttggct ggag
acctct gtccactgcc caggagggg      540
cctggggctg ggagcagtcc cggtttagcc tgag
gtcccc atagggcttc ctcccctgct      600
gggtttggga agcagttagg gagatagcga cccg
gagttt cccagaagc ggggtgggag      660
ggtgtgcatg ctagtgttg cgcgtatgca tgtg
catgag tgtgcaccgt tcctaaggaa      720
ggggcctctg gggctgcca ccctacctgc cctg
cctgcc tgctgccctt cccagcctgc      780
caagaaaacg gtaggggagc atgatggggc cttt
gaggca gggtcgcagg gacaagctca      840
gctttaggca ccatctgttc ccatcgcgcc tgct
gctgtg acccgttttg gaaaactggt      900
gtgtaccgag gcgctgactg cacggctgac cgcc
tgctcg tgccttcatt ctgcagcggc      960

```

```

agcttattct ataaatatat ctgtatataa aggt
ttctgt atattgtata gagctgtgta 1920
taaactggat gtagaagaaa aaaaaaaaaa aaaa
aaaaaa aaaaaa 1965

```

```

<210> 9
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> KIAA0659-specific primer
      for 5'-RACE
<400> 9
tagtgtttgg ttccgcggcc
                20

```

```

<210> 10
<211> 1512
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<220>
<221> source
<222> (1)..(1512)
<223> /organism="Homo sapiens"

```

```

      /tissue_type="brain"
<400> 10
agtgaatcgg ggccttgggg agcccaggat ggag
gtggcg gtcgcggcgg cgggccgagc 60
cctgcggcgg gcgggaggag gtgagcacca ggcc
cactga gcctctgcag agccaccagc 120

```

```

catgcccggg atcgtggtgt tccggcggcg ctgg
tctgtg ggcagtgatg acctcgtcct 180
accggccatc ttctctttc tctgcatac cacc
tggttt gtgatacctgt ccgtggtgct 240
cttcggcctg gtctataacc cgcacgaggc ctgc
tccttg aacctggtgg accacggccg 300
cggctacctg ggcatcctgc tgagctgcat gatc
gctgag atggccatca tctggctgag 360
catgcgcggg ggcatcctct acacggagcc ccgt
gactcc atgcagtacg tgctctacgt 420
gcgcctggcc atcctggtga tcgagttcat ctac
gccatc gtgggcatcg tctggctcac 480
tcagtactac acctcctgca acgacctcac tgcc
aagaat gtcaccctcg gaatggttgt 540
ctgcaactgg gtagtcatcc tcagtgtgtg catc
actgtc ctctgcgtct tcgacccac 600
gggccgcacc tttgtcaagc tgagagccac caag
aggagg cagcgttaacc tgcggacctc 660
caacctgcgg caccgcttag aggagggtca agcc
accagc tggtcgcgcc ggctcaaagt 720
gttcctctgc tgcacgcgga cgaaggactc ccag
tcagat gcctactcag aaatcgcccta 780

```

<211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> KIAA0659-specific primer
 for PCR

<400> 11
 cgcggaacca aacactacgg cctgat
 26

<210> 12
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> KIAA0659-specific primer
 for PCR

<400> 12
 agactgggac ttgctcctga cgctg
 25

<210> 13
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> a peptide consisting of 94
 1-956 of the amino acid sequence of the

human DG lipase homologue and a cysteine residue added to its N-terminal

<400> 13
 Cys Ser Pro Thr Ser Asp Tyr Ala Glu Gly
 Pro Lys Ser Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Gln

<210> 14
 <211> 871
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 14
 Arg Arg Gln Arg Asn Leu Arg Thr Tyr Asn
 Leu Arg His Arg Leu Glu
 1 5 10 15
 Glu Gly Gln Ala Thr Ser Trp Ser Arg Arg
 Leu Lys Val Phe Leu Cys
 20 25 30
 Cys Thr Arg Thr Lys Asp Ser Gln Ser Asp
 Ala Tyr Ser Glu Ile Ala

Gln Glu Met Leu Arg Tyr Lys Glu Val Cys
 Tyr Tyr Met Leu Phe Ala
 115 120 125

Leu Ala Ala Tyr Gly Trp Pro Met Tyr Leu
 Met Arg Lys Pro Ala Cys
 130 135 140

Gly Leu Cys Gln Leu Ala Arg Ser Cys Ser
 Cys Cys Leu Cys Pro Ala
 145 150 155 1
 60

Arg Pro Arg Phe Ala Pro Gly Val Thr Ile
 Glu Glu Asp Asn Cys Cys
 165 170 175

Gly Cys Asn Ala Ile Ala Ile Arg Arg His
 Phe Leu Asp Glu Asn Met
 180 185 190

Thr Ala Val Asp Ile Val Tyr Thr Ser Cys
 His Asp Ala Val Tyr Glu
 195 200 205

Thr Pro Phe Tyr Val Ala Val Asp His Asp
 Lys Lys Lys Val Val Ile
 210 215 220

Ser Ile Arg Gly Thr Leu Ser Pro Lys Asp
 Ala Leu Thr Asp Leu Thr
 225 230 235 2
 40

Gly Asp Ala Glu Arg Leu Pro Val Glu Gly
 His His Gly Thr Trp Leu
 245 250 255

Gly His Lys Gly Met Val Leu Ser Ala Glu
 Tyr Ile Lys Lys Lys Leu
 260 265 270

Glu Gln Glu Met Val Leu Ser Gln Ala Phe
 Gly Arg Asp Leu Gly Arg
 275 280 285

Gly Thr Lys His Tyr Gly Leu Ile Val Val
 Gly His Ser Leu Gly Ala
 290 295 300

Gly Thr Ala Ala Ile Leu Ser Phe Leu Leu
 Arg Pro Gln Tyr Pro Thr
 305 310 315 3
 20

Lys Gly Lys Thr Ala Leu Leu Ser Ala Ala
Lys Val Met Val Ser Pro

500

505

510

Thr Glu Val Asp Leu Thr Pro Glu Leu Ile
Phe Gln Gln Gln Pro Leu

515

520

525

Pro Thr Gly Pro Pro Met Pro Thr Gly Leu
Ala Leu Glu Leu Pro Thr

530

535

540

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

545

550

555

5

60

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

565

570

575

Ala Ala Ala Arg Gln Asp Pro Val Glu Leu
Leu Leu Leu Ser Thr Gln

580

585

590

Glu Arg Leu Ala Ala Glu Leu Gln Ala Arg
Arg Ala Pro Leu Ala Thr

595

600

605

Met Glu Ser Leu Ser Asp Thr Glu Ser Leu
Tyr Ser Phe Asp Ser Arg

610

615

620

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

625

630

635

6

40

Val Leu Glu Arg Asp Glu Gly His Leu Phe
Tyr Ile Asp Pro Ala Ile

645

650

655

Pro Glu Glu Asn Pro Ser Leu Ser Ser Arg
Thr Glu Leu Leu Ala Ala

660

665

670

Asp Ser Leu Ser Lys His Ser Gln Asp Thr
Gln Pro Leu Glu Ala Ala

675

680

685

Leu Gly Ser Gly Gly Val Thr Pro Glu Arg
Pro Pro Ser Ala Ala Ala

865

870

<210> 15

<211> 2616

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> source

<222> (1)..(2616)

<223> /organism="Homo sapiens"

/tissue_type="brain"

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(2616)

<400> 15

agg agg cag cgt aac ctg cgg acc tac aac

ctg cgg cac cgc tta gag 48

Arg Arg Gln Arg Asn Leu Arg Thr Tyr Asn

Leu Arg His Arg Leu Glu

1

5

10

15

gag ggt caa gcc acc agc tgg tcg cgc cgg

ctc aaa gtg ttc ctc tgc 96

Glu Gly Gln Ala Thr Ser Trp Ser Arg Arg

Leu Lys Val Phe Leu Cys

20

25

30

tgc acg cgg acg aag gac tcc cag tca gat

gcc tac tca gaa atc gcc 144

Cys Thr Arg Thr Lys Asp Ser Gln Ser Asp

Ala Tyr Ser Glu Ile Ala

35

40

45

tac ctc ttt gcg gag ttc ttc cgg gac ctt

gac att gtg cca tcc gac 192

Tyr Leu Phe Ala Glu Phe Phe Arg Asp Leu

Asp Ile Val Pro Ser Asp

50

55

60

atc att gct ggc ctg gtg ctg ctc cgg cag

cgg cag cgg gcc aag cgc 240

Ile Ile Ala Gly Leu Val Leu Leu Arg Gln

Arg Gln Arg Ala Lys Arg

65

70

75

80

aac gcc gtg ctg gac gag gca aac aat gac

atc ttg gcc ttc ctg tct 288

Asn Ala Val Leu Asp Glu Ala Asn Asn Asp

Ile Leu Ala Phe Leu Ser

85

90

95

ggc tgt aat gcc att gcc atc cgg cgc cac
 ttc ctg gac gag aac atg 576
 Gly Cys Asn Ala Ile Ala Ile Arg Arg His
 Phe Leu Asp Glu Asn Met
 180 185 190

act gcg gtg gac atc gtc tat acc tcc tgc
 cat gat gcg gtc tat gaa 624
 Thr Ala Val Asp Ile Val Tyr Thr Ser Cys
 His Asp Ala Val Tyr Glu
 195 200 205

acg ccc ttc tac gtg gcg gtg gac cat gac
 aag aag aaa gtg gtg atc 672
 Thr Pro Phe Tyr Val Ala Val Asp His Asp
 Lys Lys Lys Val Val Ile
 210 215 220

agt atc cgg ggg acc ctg tcc ccc aag gat
 gcc ctg act gac ctg acg 720
 Ser Ile Arg Gly Thr Leu Ser Pro Lys Asp
 Ala Leu Thr Asp Leu Thr
 225 230 235 2

40
 ggt gat gct gag cgc ctc ccc gtg gag ggg
 cac cac ggc acc tgg ctg 768
 Gly Asp Ala Glu Arg Leu Pro Val Glu Gly
 His His Gly Thr Trp Leu
 245 250 255

ggc cac aag ggt atg gtc ctc tca gct gag
 tac atc aag aag aaa ctg 816
 Gly His Lys Gly Met Val Leu Ser Ala Glu
 Tyr Ile Lys Lys Lys Leu
 260 265 270

gag cag gag atg gtc ctg tcc cag gcc ttt
 ggg cga gac ctg ggc cgc 864
 Glu Gln Glu Met Val Leu Ser Gln Ala Phe
 Gly Arg Asp Leu Gly Arg
 275 280 285

gga acc aaa cac tac ggc ctg att gtg gtg
 ggc cac tcc ctg ggc gcg 912
 Gly Thr Lys His Tyr Gly Leu Ile Val Val
 Gly His Ser Leu Gly Ala
 290 295 300

ggc act gct gcc atc ctc tcc ttc ctt ctg
 cgc cca cag tat ccg acc 960
 Gly Thr Ala Ala Ile Leu Ser Phe Leu Leu
 Arg Pro Gln Tyr Pro Thr
 305 310 315 3

435	440	445	
tgt gag cag gag gag ccc aca tac ttt gcc			
atc tgg ggc gac aac aag	1392		
Cys Glu Gln Glu Glu Pro Thr Tyr Phe Ala			
Ile Trp Gly Asp Asn Lys			
450	455	460	
gcc ttc aat gag gtg atc atc tcg cca gcc			
atg ctg cat gag cac ctg	1440		
Ala Phe Asn Glu Val Ile Ile Ser Pro Ala			
Met Leu His Glu His Leu			
465	470	475	4
80			
ccc tat gtg gtc atg gag ggg ctc aac aag			
gtg ctg gag aac tac aac	1488		
Pro Tyr Val Val Met Glu Gly Leu Asn Lys			
Val Leu Glu Asn Tyr Asn			
485	490	495	
aag ggg aag acc gct ctg ctc tct gca gcc			
aag gtc atg gtg agc cct	1536		
Lys Gly Lys Thr Ala Leu Leu Ser Ala Ala			
Lys Val Met Val Ser Pro			
500	505	510	
acc gag gtg gac ctg act cct gag ctc atc			
ttc cag cag cag cca ctc	1584		
Thr Glu Val Asp Leu Thr Pro Glu Leu Ile			
Phe Gln Gln Gln Pro Leu			
515	520	525	
ccc acg ggg ccg ccc atg ccc act ggc ctt			
gcc ctg gag ctg ccg act	1632		
Pro Thr Gly Pro Pro Met Pro Thr Gly Leu			
Ala Leu Glu Leu Pro Thr			
530	535	540	
gca gac cac cgc aac agc agc gtc agg agc			
aag tcc cag tct gag atg	1680		
Ala Asp His Arg Asn Ser Ser Val Arg Ser			
Lys Ser Gln Ser Glu Met			
545	550	555	5
60			
agc ctg gag ggc ttc tcg gag ggg cgg ctg			
ctg tcg cca gtg gtt gcg	1728		
Ser Leu Glu Gly Phe Ser Glu Gly Arg Leu			
Leu Ser Pro Val Val Ala			
565	570	575	
gcg gcg gcc cgc cag gac ccg gtg gag ctg			
ctg ctg ctg tct acc cag	1776		

690	695	700	
aat gac gag gag gaa gag gtt ggc ggt ggg			
ggt ggc ggg ccg gcc tcc	2160		
Asn Asp Glu Glu Glu Glu Val Gly Gly Gly			
Gly Gly Gly Pro Ala Ser			
705	710	715	7
20			
cgc ggg gag ctg gcg ctg cac aat ggg cgc			
ctg ggg gac tcg ccc agt	2208		
Arg Gly Glu Leu Ala Leu His Asn Gly Arg			
Leu Gly Asp Ser Pro Ser			
	725	730	735
cct cag gtg ctg gaa ttc gcc gag ttc atc			
gac agc ctc ttc aac ctg	2256		
Pro Gln Val Leu Glu Phe Ala Glu Phe Ile			
Asp Ser Leu Phe Asn Leu			
	740	745	750
gac agc aag agc agc tcc ttc caa gac ctc			
tac tgc atg gtg gtg ccc	2304		
Asp Ser Lys Ser Ser Ser Phe Gln Asp Leu			
Tyr Cys Met Val Val Pro			
	755	760	765
gag agc ccc acc agt gac tac gct gag ggc			
ccc aag tcc ccc agc cag	2352		
Glu Ser Pro Thr Ser Asp Tyr Ala Glu Gly			
Pro Lys Ser Pro Ser Gln			
	770	775	780
caa gag atc ctg ctc cgt gcc cag ttc gag			
ccc aac ctg gtg ccc aag	2400		
Gln Glu Ile Leu Leu Arg Ala Gln Phe Glu			
Pro Asn Leu Val Pro Lys			
785	790	795	8
00			
ccc cca cgg ctc ttt gcc ggc tca gcc gac			
ccc tcc tcg ggc atc tca	2448		
Pro Pro Arg Leu Phe Ala Gly Ser Ala Asp			
Pro Ser Ser Gly Ile Ser			
	805	810	815
ctc tcg ccc tcc ttc ccg ctc agc tcc tcg			
ggt gag ctc atg gac ctg	2496		
Leu Ser Pro Ser Phe Pro Leu Ser Ser Ser			
Gly Glu Leu Met Asp Leu			
	820	825	830
acg ccc acg ggc ctc agt agc cag gaa tgc			
ctg gcg gct gac aag atc	2544		
Thr Pro Thr Gly Leu Ser Ser Gln Glu Cys			

<400> 17

ggccacgcaa ctggggtgct agcgt

25

<210> 18

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> a sense primer for amplification of an insert DNA for an expression

on vector

<400> 18

cgggatccat gaggaggcag cgtaacctgc ggac

c

35

<210> 19

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> an antisense primer for amplification of an insert DNA for an expression

vector

<400> 19

ttcctttttt cgccggcgtg gccacgcaac tggg

gtgcta gc

42

<210> 20

<211> 872

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> a partial-length polypeptide of human DG lipase homologue wherein a methionine residue is added at its N-terminus

<400> 20

Met Arg Arg Gln Arg Asn Leu Arg Thr Tyr

Asn Leu Arg His Arg Leu

1

5

10

15

Glu Glu Gly Gln Ala Thr Ser Trp Ser Arg

Arg Leu Lys Val Phe Leu

20

25

30

Cys Cys Thr Arg Thr Lys Asp Ser Gln Ser

Asp Ala Tyr Ser Glu Ile

35

40

45

Ala Tyr Leu Phe Ala Glu Phe Phe Arg Asp

145 150 155 1
60

Ala Arg Pro Arg Phe Ala Pro Gly Val Thr
Ile Glu Glu Asp Asn Cys

165 170 175

Cys Gly Cys Asn Ala Ile Ala Ile Arg Arg
His Phe Leu Asp Glu Asn

180 185 190

Met Thr Ala Val Asp Ile Val Tyr Thr Ser
Cys His Asp Ala Val Tyr

195 200 205

Glu Thr Pro Phe Tyr Val Ala Val Asp His
Asp Lys Lys Lys Val Val

210 215 220

Ile Ser Ile Arg Gly Thr Leu Ser Pro Lys
Asp Ala Leu Thr Asp Leu

225 230 235 2
40

Thr Gly Asp Ala Glu Arg Leu Pro Val Glu
Gly His His Gly Thr Trp

245 250 255

Leu Gly His Lys Gly Met Val Leu Ser Ala
Glu Tyr Ile Lys Lys Lys

260 265 270

Leu Glu Gln Glu Met Val Leu Ser Gln Ala
Phe Gly Arg Asp Leu Gly

275 280 285

Arg Gly Thr Lys His Tyr Gly Leu Ile Val
Val Gly His Ser Leu Gly

290 295 300

Ala Gly Thr Ala Ala Ile Leu Ser Phe Leu
Leu Arg Pro Gln Tyr Pro

305 310 315 3
20

Thr Leu Lys Cys Phe Ala Tyr Ser Pro Pro
Gly Gly Leu Leu Ser Glu

325 330 335

Asp Ala Met Glu Tyr Ser Lys Glu Phe Val
Thr Ala Val Val Leu Gly

340 345 350

515	520	525	
Leu Pro Thr Gly Pro Pro Met Pro Thr Gly			
Leu Ala Leu Glu Leu Pro			
530	535	540	
Thr Ala Asp His Arg Asn Ser Ser Val Arg			
Ser Lys Ser Gln Ser Glu			
545	550	555	5
60			
Met Ser Leu Glu Gly Phe Ser Glu Gly Arg			
Leu Leu Ser Pro Val Val			
	565	570	575
Ala Ala Ala Ala Arg Gln Asp Pro Val Glu			
Leu Leu Leu Leu Ser Thr			
	580	585	590
Gln Glu Arg Leu Ala Ala Glu Leu Gln Ala			
Arg Arg Ala Pro Leu Ala			
	595	600	605
Thr Met Glu Ser Leu Ser Asp Thr Glu Ser			
Leu Tyr Ser Phe Asp Ser			
	610	615	620
Arg Arg Ser Ser Gly Phe Arg Ser Ile Arg			
Gly Ser Pro Ser Leu His			
625	630	635	6
40			
Ala Val Leu Glu Arg Asp Glu Gly His Leu			
Phe Tyr Ile Asp Pro Ala			
	645	650	655
Ile Pro Glu Glu Asn Pro Ser Leu Ser Ser			
Arg Thr Glu Leu Leu Ala			
	660	665	670
Ala Asp Ser Leu Ser Lys His Ser Gln Asp			
Thr Gln Pro Leu Glu Ala			
	675	680	685
Ala Leu Gly Ser Gly Gly Val Thr Pro Glu			
Arg Pro Pro Ser Ala Ala			
	690	695	700
Ala Asn Asp Glu Glu Glu Glu Val Gly Gly			
Gly Gly Gly Gly Pro Ala			
705	710	715	7
20			
Ser Arg Gly Glu Leu Ala Leu His Asn Gly			
Arg Leu Gly Asp Ser Pro			

<211> 2619

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> a DNA encoding a partial-length polypeptide of human DG lipase homologue wherein an methionine residue is added at its N-terminus

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(2619)

<223>

<400> 21

atg agg agg cag cgt aac ctg cgg acc tac

aac ctg cgg cac cgc tta 48

Met Arg Arg Gln Arg Asn Leu Arg Thr Tyr

Asn Leu Arg His Arg Leu

1 5 10 15

gag gag ggt caa gcc acc agc tgg tcg cgc

cgg ctc aaa gtg ttc ctc 96

Glu Glu Gly Gln Ala Thr Ser Trp Ser Arg

Arg Leu Lys Val Phe Leu

20 25 30

tgc tgc acg cgg acg aag gac tcc cag tca

gat gcc tac tca gaa atc 144

Cys Cys Thr Arg Thr Lys Asp Ser Gln Ser

Asp Ala Tyr Ser Glu Ile

35 40 45

gcc tac ctc ttt gcg gag ttc ttc cgg gac

ctt gac att gtg cca tcc 192

Ala Tyr Leu Phe Ala Glu Phe Phe Arg Asp

Leu Asp Ile Val Pro Ser

50 55 60

gac atc att gct ggc ctg gtg ctg ctc cgg

cag cgg cag cgg gcc aag 240

Asp Ile Ile Ala Gly Leu Val Leu Leu Arg

Gln Arg Gln Arg Ala Lys

65 70 75 80

cgc aac gcc gtg ctg gac gag gca aac aat

gac atc ttg gcc ttc ctg 288

Arg Asn Ala Val Leu Asp Glu Ala Asn Asn

Asp Ile Leu Ala Phe Leu

85 90 95

tct ggg atg ccg gtg acc aga aac acc aag

tac ctc gac ctc aag aat 336

Ser Gly Met Pro Val Thr Arg Asn Thr Lys

195	200	205	
gaa acg ccc ttc tac gtg gcg gtg gac cat			
gac aag aag aaa gtg gtg 672			
Glu Thr Pro Phe Tyr Val Ala Val Asp His			
Asp Lys Lys Lys Val Val			
210	215	220	
atc agt atc cgg ggg acc ctg tcc ccc aag			
gat gcc ctg act gac ctg 720			
Ile Ser Ile Arg Gly Thr Leu Ser Pro Lys			
Asp Ala Leu Thr Asp Leu			
225	230	235	2
40			
acg ggt gat gct gag cgc ctc ccc gtg gag			
ggg cac cac ggc acc tgg 768			
Thr Gly Asp Ala Glu Arg Leu Pro Val Glu			
Gly His His Gly Thr Trp			
	245	250	255
ctg ggc cac aag ggt atg gtc ctc tca gct			
gag tac atc aag aag aaa 816			
Leu Gly His Lys Gly Met Val Leu Ser Ala			
Glu Tyr Ile Lys Lys Lys			
260	265	270	
ctg gag cag gag atg gtc ctg tcc cag gcc			
ttt ggg cga gac ctg ggc 864			
Leu Glu Gln Glu Met Val Leu Ser Gln Ala			
Phe Gly Arg Asp Leu Gly			
275	280	285	
cgc gga acc aaa cac tac ggc ctg att gtg			
gtg ggc cac tcc ctg ggc 912			
Arg Gly Thr Lys His Tyr Gly Leu Ile Val			
Val Gly His Ser Leu Gly			
290	295	300	
gcg ggc act gct gcc atc ctc tcc ttc ctt			
ctg cgc cca cag tat ccg 960			
Ala Gly Thr Ala Ala Ile Leu Ser Phe Leu			
Leu Arg Pro Gln Tyr Pro			
305	310	315	3
20			
acc ctc aag tgc ttt gcc tac tcc ccg cca			
ggg ggc ctg ctg agt gag 1008			
Thr Leu Lys Cys Phe Ala Tyr Ser Pro Pro			
Gly Gly Leu Leu Ser Glu			
	325	330	335
gat gcg atg gag tat tcc aag gag ttc gtg			
act gct gtg gtt ctg ggc 1056			

aag gcc ttc aat gag gtg atc atc tcg cca
gcc atg ctg cat gag cac 1440
Lys Ala Phe Asn Glu Val Ile Ile Ser Pro
Ala Met Leu His Glu His
465 470 475 4
80
ctg ccc tat gtg gtc atg gag ggg ctc aac
aag gtg ctg gag aac tac 1488
Leu Pro Tyr Val Val Met Glu Gly Leu Asn
Lys Val Leu Glu Asn Tyr
485 490 495

aac aag ggg aag acc gct ctg ctc tct gca
gcc aag gtc atg gtg agc 1536
Asn Lys Gly Lys Thr Ala Leu Leu Ser Ala
Ala Lys Val Met Val Ser
500 505 510

cct acc gag gtg gac ctg act cct gag ctc
atc ttc cag cag cag cca 1584
Pro Thr Glu Val Asp Leu Thr Pro Glu Leu
Ile Phe Gln Gln Gln Pro
515 520 525

ctc ccc acg ggg ccg ccc atg ccc act ggc
ctt gcc ctg gag ctg ccg 1632
Leu Pro Thr Gly Pro Pro Met Pro Thr Gly
Leu Ala Leu Glu Leu Pro
530 535 540

act gca gac cac cgc aac agc agc gtc agg
agc aag tcc cag tct gag 1680
Thr Ala Asp His Arg Asn Ser Ser Val Arg
Ser Lys Ser Gln Ser Glu
545 550 555 5
60
atg agc ctg gag ggc ttc tcg gag ggg cgg
ctg ctg tcg cca gtg gtt 1728
Met Ser Leu Glu Gly Phe Ser Glu Gly Arg
Leu Leu Ser Pro Val Val
565 570 575

gcg gcg gcg gcc cgc cag gac ccg gtg gag
ctg ctg ctg ctg tct acc 1776
Ala Ala Ala Ala Arg Gln Asp Pro Val Glu
Leu Leu Leu Leu Ser Thr
580 585 590

cag gag cgg ctg gca gcg gag ctg cag gcc
cgg cgg gca cca ctg gcc 1824
Gln Glu Arg Leu Ala Ala Glu Leu Gln Ala
Arg Arg Ala Pro Leu Ala
595 600 605

Ser Arg Gly Glu Leu Ala Leu His Asn Gly
Arg Leu Gly Asp Ser Pro

725

730

735

agt cct cag gtg ctg gaa ttc gcc gag ttc
atc gac agc ctc ttc aac 2256
Ser Pro Gln Val Leu Glu Phe Ala Glu Phe
Ile Asp Ser Leu Phe Asn

740

745

750

ctg gac agc aag agc agc tcc ttc caa gac
ctc tac tgc atg gtg gtg 2304
Leu Asp Ser Lys Ser Ser Ser Phe Gln Asp
Leu Tyr Cys Met Val Val

755

760

765

ccc gag agc ccc acc agt gac tac gct gag
ggc ccc aag tcc ccc agc 2352
Pro Glu Ser Pro Thr Ser Asp Tyr Ala Glu
Gly Pro Lys Ser Pro Ser

770

775

780

cag caa gag atc ctg ctc cgt gcc cag ttc
gag ccc aac ctg gtg ccc 2400
Gln Gln Glu Ile Leu Leu Arg Ala Gln Phe
Glu Pro Asn Leu Val Pro

785

790

795

800

aag ccc cca cgg ctc ttt gcc ggc tca gcc

60

【図面の簡単な説明】
【図1】 ヒトD G リパーゼホモログの各種組織におけるmRNAレベルの発現を、ヒト脳MTNプロットIIを用いてノーザンブロット法により検出した結果を示す。

【図2】 ヒトD G リパーゼホモログの各種組織におけるmRNAレベルの発現を、ヒト脳MTNプロットIIを用いてノーザンブロット法により検出した結果を示す。

【図3】 ヒトD G リパーゼホモログの各種組織におけるmRNAレベルの発現を、ヒト脳MTNプロットIIを用いてノーザンブロット法により検出した結果を示す。

【図4】 ヒトD G リパーゼホモログの各種組織におけるmRNAレベルの発現を、ヒト脳MTNプロットIIを用いてノーザンブロット法により検出した結果を示す。

【図5】 ヒトD G リパーゼホモログの各種組織におけるmRNAレベルの発現を、ヒト脳MTNプロットIIを用いてノーザンブロット法により検出した結果を示す。

Ala Ser Pro Ala Lys Gln

850

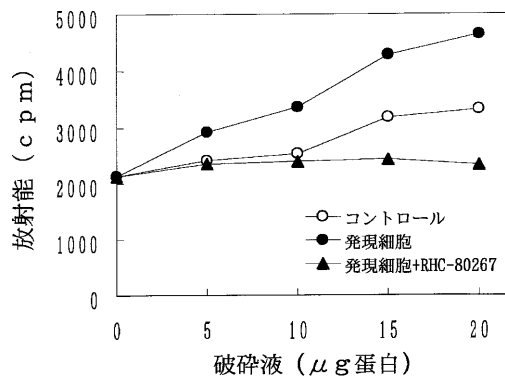
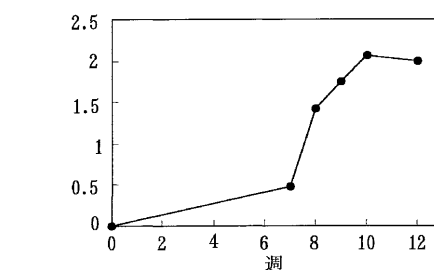
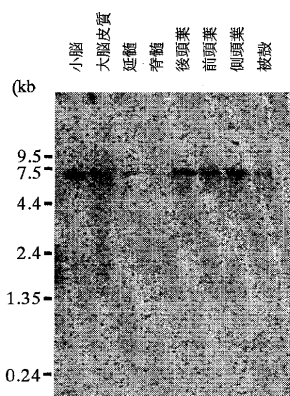
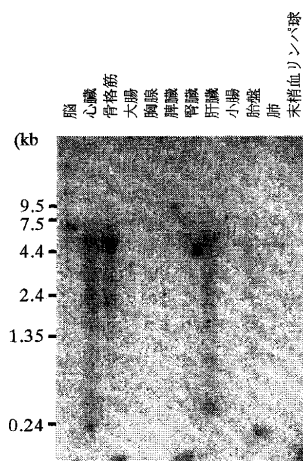
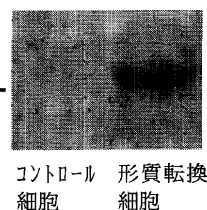
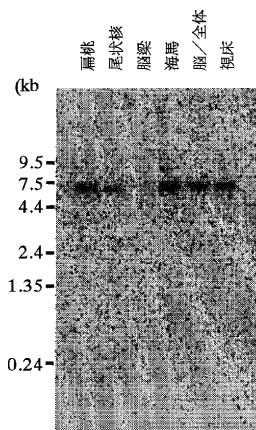
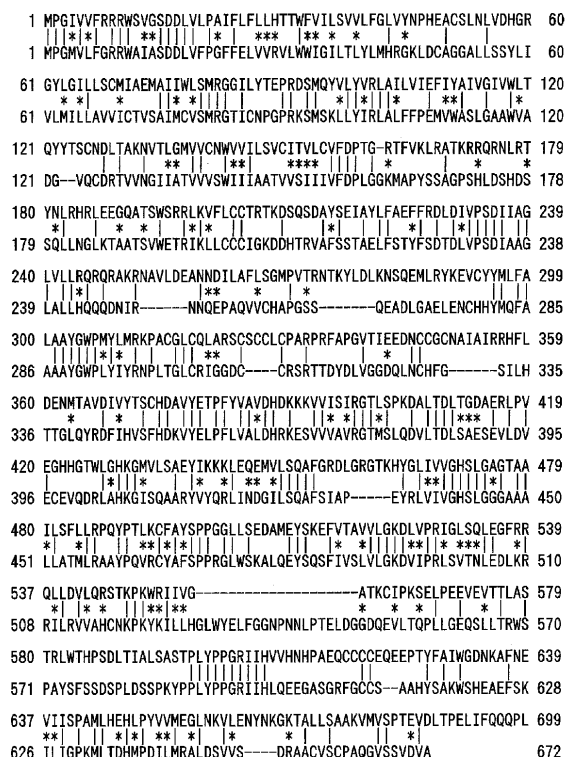
855

860

【図6】 ヒトD G リパーゼホモログの部分ペプチドを抗原として免疫したウサギの、抗体価を継時的にELISAにより測定した結果を示す。横軸が免疫開始からの時間(週)、縦軸が抗体価(ELISAでの492nmの吸光度)を示す。

【図7】 ヒトD G リパーゼホモログの部分長ポリペプチドの発現をウェスタンブロット法により検出した結果を示す。右レーンが形質転換細胞、左レーンがコントロール細胞で、左の線は、97kDaの分子量マーカーのバンドの位置を示す。

【図8】 ヒトD G リパーゼホモログの部分長ポリペプチドのD G リパーゼ活性を示す。○はコントロール細胞の破碎液、●は形質転換細胞の破碎液、▲は形質転換細胞の破碎液にRHC-80267を添加したものを、それぞれ酵素源としたときの活性を示す。横軸は、酵素源として加えた細胞の破碎液中の蛋白質の量(μg)を、縦軸は、放射能(cpm)すなわちD G リパーゼ活性を示す。



フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マコ-ド [*] (参考)
A 6 1 K 48/00		A 6 1 P 1/08	4 B 0 6 5
A 6 1 P 1/04		3/00	4 C 0 8 4
1/08		3/04	4 C 0 8 5
3/00		9/10	4 C 0 8 7
3/04		9/12	4 H 0 4 5
9/10		11/06	
9/12		17/02	
11/06		17/06	
17/02		19/02	
17/06		19/08	
19/02		25/16	
19/08		25/18	
25/16		25/22	
25/18		25/24	
25/22		25/28	
25/24		25/32	
25/28		25/36	
25/32		29/00	
25/36			1 0 1
29/00		35/00	
	1 0 1	37/06	
35/00		43/00	1 1 1
37/06		C 0 7 K 16/40	
43/00	1 1 1	C 1 2 N 1/15	
C 0 7 K 16/40		1/19	
C 1 2 N 1/15		1/21	
1/19		9/20	
1/21		C 1 2 P 21/02	C
5/10		C 1 2 Q 1/02	
9/20		1/44	
C 1 2 P 21/02		1/68	A
C 1 2 Q 1/02		G 0 1 N 33/15	Z
1/44		33/50	Z
1/68		33/53	D
G 0 1 N 33/15		C 1 2 N 15/00	Z N A A
33/50		5/00	B
33/53			C
		A 6 1 K 37/54	

F ターム(参考) 2G045 AA25 AA29 AA40 BB03 BB20
CB17 DA12 DA13 DA14 DA36
DA77 FB01 FB02 FB03
4B024 AA01 AA08 AA10 BA11 CA04
CA05 CA06 CA09 DA01 DA02
DA05 DA11 DA12 EA04 FA10
GA11 GA18 GA19 HA03 HA08
HA12 HA14
4B050 CC01 CC04 DD11 LL01
4B063 QA01 QA12 QA17 QA18 QQ20
QQ22 QQ44 QR08 QR12 QR14
QR32 QR33 QR41 QR42 QR55
QR58 QR59 QR62 QR66 QR69
QR77 QR80 QR82 QS12 QS25
QS34 QS36 QS39 QX02 QX07
4B064 AG01 CA01 CA19 CB30 CC24
DA01
4B065 AA01X AA57X AA72X AA88X
AA90X AA93Y AB01 AC14
BA01 CA31 CA44
4C084 AA02 AA06 AA07 AA13 BA01
BA08 BA22 CA18 CA53 DC22
NA14 ZA08 ZA12 ZA15 ZA18
ZA36 ZA42 ZA59 ZA66 ZA70
ZA71 ZA89 ZA96 ZB08 ZB11
ZB15 ZB26 ZC20 ZC39
4C085 AA13 AA14 BB11 CC02 CC04
CC05 CC07 CC08 CC21 CC31
DD23 DD62 DD63 EE01
4C087 AA01 AA02 AA03 BC83 CA12
NA14 ZA08 ZA12 ZA15 ZA18
ZA36 ZA42 ZA59 ZA66 ZA70
ZA71 ZA89 ZA96 ZB08 ZB11
ZB15 ZB26 ZC20 ZC39
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10
CA45 DA75 DA86 EA21 EA22
EA23 EA28 FA72 FA74

专利名称(译)	新型多肽		
公开(公告)号	JP2003259884A	公开(公告)日	2003-09-16
申请号	JP2003000628	申请日	2003-01-06
申请(专利权)人(译)	协和醱酵工业株式会社		
[标]发明人	森山達哉		
发明人	森山 達哉		
IPC分类号	G01N33/50 A61K35/76 A61K38/46 A61K39/395 A61K48/00 A61P1/04 A61P1/08 A61P3/00 A61P3/04 A61P9/10 A61P9/12 A61P11/06 A61P17/02 A61P17/06 A61P19/02 A61P19/08 A61P25/16 A61P25/18 A61P25/22 A61P25/24 A61P25/28 A61P25/32 A61P25/36 A61P29/00 A61P35/00 A61P37/06 A61P43/00 C07K16/40 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N9/20 C12N15/09 C12P21/02 C12Q1/02 C12Q1/44 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/53		
FI分类号	A61K35/76 A61K39/395.D A61K39/395.P A61K48/00 A61P1/04 A61P1/08 A61P3/00 A61P3/04 A61P9/10 A61P9/12 A61P11/06 A61P17/02 A61P17/06 A61P19/02 A61P19/08 A61P25/16 A61P25/18 A61P25/22 A61P25/24 A61P25/28 A61P25/32 A61P25/36 A61P29/00 A61P29/00.101 A61P35/00 A61P37/06 A61P43/00.111 C07K16/40 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N9/20 C12P21/02.C C12Q1/02 C12Q1/44 C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D C12N15/00.ZNA.A C12N5/00.B C12N5/00.C A61K37/54 A61K38/46 C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A C12N5/00.102 C12N5/00.103 C12N5/10		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/AA29 2G045/AA40 2G045/BB03 2G045/BB20 2G045/CB17 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/DA77 2G045/FB01 2G045/FB02 2G045/FB03 4B024/AA01 4B024/AA08 4B024/AA10 4B024/BA11 4B024/CA04 4B024/CA05 4B024/CA06 4B024/CA09 4B024/DA01 4B024/DA02 4B024/DA05 4B024/DA11 4B024/DA12 4B024/EA04 4B024/FA10 4B024/GA11 4B024/GA18 4B024/GA19 4B024/HA03 4B024/HA08 4B024/HA12 4B024/HA14 4B050/CC01 4B050/CC04 4B050/DD11 4B050/LL01 4B063/QA01 4B063/QA12 4B063/QA17 4B063/QA18 4B063/QQ20 4B063/QQ22 4B063/QQ44 4B063/QR08 4B063/QR12 4B063/QR14 4B063/QR32 4B063/QR33 4B063/QR41 4B063/QR42 4B063/QR55 4B063/QR58 4B063/QR59 4B063/QR62 4B063/QR66 4B063/QR69 4B063/QR77 4B063/QR80 4B063/QR82 4B063/QS12 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QS39 4B063/QX02 4B063/QX07 4B064/AG01 4B064/CA01 4B064/CA19 4B064/CB30 4B064/CC24 4B064/DA01 4B065/AA01X 4B065/AA57X 4B065/AA72X 4B065/AA88X 4B065/AA90X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA01 4B065/CA31 4B065/CA44 4C084/AA02 4C084/AA06 4C084/AA07 4C084/AA13 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA22 4C084/CA18 4C084/CA53 4C084/DC22 4C084/NA14 4C084/ZA08 4C084/ZA12 4C084/ZA15 4C084/ZA18 4C084/ZA36 4C084/ZA42 4C084/ZA59 4C084/ZA66 4C084/ZA70 4C084/ZA71 4C084/ZA89 4C084/ZA96 4C084/ZB08 4C084/ZB11 4C084/ZB15 4C084/ZB26 4C084/ZC20 4C084/ZC39 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BB11 4C085/CC02 4C085/CC04 4C085/CC05 4C085/CC07 4C085/CC08 4C085/CC21 4C085/CC31 4C085/DD23 4C085/DD62 4C085/DD63 4C085/EE01 4C087/AA01 4C087/AA02 4C087/AA03 4C087/BC83 4C087/CA12 4C087/NA14 4C087/ZA08 4C087/ZA12 4C087/ZA15 4C087/ZA18 4C087/ZA36 4C087/ZA42 4C087/ZA59 4C087/ZA66 4C087/ZA70 4C087/ZA71 4C087/ZA89 4C087/ZA96 4C087/ZB08 4C087/ZB11 4C087/ZB15 4C087/ZB26 4C087/ZC20 4C087/ZC39 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA45 4H045/DA75 4H045/DA86 4H045/EA21 4H045/EA22 4H045/EA23 4H045/EA28 4H045/FA72 4H045/FA74		
优先权	2002000281 2002-01-07 JP		
外部链接	Espacenet		
摘要(译)			

要解决的问题：提供一种多肽，该多肽可用于搜索和开发涉及DG脂肪酶的疾病的治疗剂，编码该多肽的DNA，识别该多肽的抗体及其使用方法。从人脑获得编码具有DG脂肪酶活性的多肽的DNA，并产生该多肽和识别该多肽的抗体。此外，使用该多肽或抗体构建了涉及DG脂肪酶的疾病的治疗剂的筛选系统。

【 图 4 】

