

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-526484

(P2005-526484A)

(43) 公表日 平成17年9月8日(2005.9.8)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	Z N A A 4 B O 2 4
A 6 1 K 38/00	A 6 1 K 39/395	D 4 B O 2 9
A 6 1 K 39/395	A 6 1 K 39/395	N 4 B O 6 3
A 6 1 K 45/00	A 6 1 K 45/00	4 B O 6 4
A 6 1 K 49/00	A 6 1 K 49/00	Z 4 B O 6 5
	審査請求 未請求 予備審査請求 未請求	(全 190 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2003-529905 (P2003-529905)	(71) 出願人	301005050 インサイト・ゲノミックス・インコーポレイテッド アメリカ合衆国カリフォルニア州94304・パロアルト・ポータードライブ 3160
(86) (22) 出願日	平成14年9月13日 (2002.9.13)	(74) 代理人	100089266 弁理士 大島 陽一
(85) 翻訳文提出日	平成16年5月11日 (2004.5.11)	(72) 発明者	スプレイグ、ウィリアム・ダブリュ アメリカ合衆国カリフォルニア州95814・サクラメント・#シー・サーティーン ストリート 611
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/029221		
(87) 国際公開番号	W02003/025131		
(87) 国際公開日	平成15年3月27日 (2003.3.27)		
(31) 優先権主張番号	60/322,196		
(32) 優先日	平成13年9月14日 (2001.9.14)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	60/324,134		
(32) 優先日	平成13年9月21日 (2001.9.21)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	60/327,233		
(32) 優先日	平成13年10月5日 (2001.10.5)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 タンパク質修飾および維持分子

(57) 【要約】

本発明の種々の実施態様は、ヒトのタンパク質修飾および維持分子(PMMM)と、PMMMを同定およびコードするポリヌクレオチドとを提供する。本発明の実施例はまた、発現ベクター、宿主細胞、抗体、アゴニストおよびアンタゴニストをも提供する。他の実施態様はPMMMの異常発現に関連する疾患を診断、治療または予防する方法をも提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下の (a) 乃至 (i) からなる群から選択した単離されたポリペプチド。

(a) SEQ ID NO:1-31 (配列番号 1 乃至 31) からなる群から選択したアミノ酸配列を含むポリペプチド

(b) SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:4-6、SEQ ID NO:9-13、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:20-21、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:27-28、SEQ ID NO:30-31からなる群から選択した或るアミノ酸配列に対して少なくとも90%が同一であるような天然アミノ酸配列を含むポリペプチド

(c) SEQ ID NO:3のアミノ酸配列に対して少なくとも97%が同一であるような天然アミノ酸配列を含むポリペプチド 10

(d) SEQ ID NO:18のアミノ酸配列と少なくとも95%が同一であるような天然のアミノ酸配列を有するポリペプチド

(e) SEQ ID NO:19のアミノ酸配列と少なくとも91%が同一であるような天然のアミノ酸配列を有するポリペプチド

(f) SEQ ID NO:29のアミノ酸配列に対して少なくとも91%が同一であるような天然アミノ酸配列を含むポリペプチド

(g) SEQ ID NO:14-15、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:24-26からなる群から選択したアミノ酸配列と少なくとも90%が同一であるような天然のアミノ酸配列を本質的に含むポリペプチド。 20

(h) SEQ ID NO:1-31からなる群から選択したアミノ酸配列を有するポリペプチドの生物学的活性断片、および

(i) SEQ ID NO:1-31からなる群から選択したアミノ酸配列を有するポリペプチドの免疫原性断片

【請求項 2】

SEQ ID NO:1-31からなる群から選択したアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の単離されたポリペプチド。

【請求項 3】

請求項1に記載のポリペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 4】

請求項2に記載のポリペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチド。 30

【請求項 5】

SEQ ID NO:3262からなる群から選択したポリヌクレオチド配列を含む、請求項 4 に記載の単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 6】

請求項 3 に記載のポリヌクレオチドに機能的に連結したプロモーター配列を含む組換えポリヌクレオチド。

【請求項 7】

請求項 6 に記載の組換えポリヌクレオチドを用いて形質転換した細胞。

【請求項 8】

請求項 6 に記載の組換えポリヌクレオチドを含む遺伝形質転換体。 40

【請求項 9】

請求項 1 に記載のポリペプチドを生産する方法であって、

(a) 前記ポリペプチドの発現に好適な条件下で、請求項 1 のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに機能的に連結したプロモーター配列を含む組換えポリヌクレオチドで形質転換される細胞を培養する過程と、

(b) そのように発現した前記ポリペプチドを回収する過程とからなる方法。

【請求項 10】

前記ポリペプチドが、SEQ ID NO:1-31からなる群から選択した或るアミノ酸配列を含むことを特徴とする、請求項 9 に記載の方法。 50

【請求項 1 1】

請求項 1 に記載のポリペプチドと特異的に結合する単離された抗体。

【請求項 1 2】

以下の (a) 乃至 (k) からなる群から選択した単離されたポリヌクレオチド。

(a) SEQ ID NO:32-62 からなる群から選択したポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド

(b) SEQ ID NO:32-41、SEQ ID NO:43-56、SEQ ID NO:61-62 からなる群から選択した或るポリヌクレオチド配列に対して少なくとも 90% が同一であるような天然ポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド

(c) SEQ ID NO:42 のポリヌクレオチド配列に対して少なくとも 92% が同一であるような天然ポリヌクレオチド配列を持つポリヌクレオチド 10

(d) SEQ ID NO:59 のポリヌクレオチド配列に対して少なくとも 97% が同一であるような天然ポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド

(e) SEQ ID NO:58、SEQ ID NO:60 からなる群から選択した或るポリヌクレオチド配列に対して少なくとも 98% が同一であるような天然ポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド

(f) (a) のポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチド

(g) (b) のポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチド

(h) (c) のポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチド

(i) (d) のポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチド 20

(j) (e) のポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチド

(k) (a) ~ (j) の RNA 等価物

【請求項 1 3】

請求項 12 に記載のポリヌクレオチドの少なくとも 60 の連続したヌクレオチドを含む単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 1 4】

請求項 12 に記載のポリヌクレオチドの配列を有する標的ポリヌクレオチドをサンプル中から検出する方法であって、

(a) 前記サンプル中の前記標的ポリヌクレオチドに相補的な配列を持つ少なくとも 20 の連続したヌクレオチドを持つプローブを用いて前記サンプルをハイブリダイズする過程と、 30

(b) 前記ハイブリダイゼーション複合体の有無を検出し、該複合体が存在する場合にはオプションでその量を検出する過程とを含む方法。

【請求項 1 5】

前記プローブが少なくとも 60 の連続したヌクレオチドを含むことを特徴とする請求項 14 に記載の方法。

【請求項 1 6】

請求項 12 に記載のポリヌクレオチドの配列を有する標的ポリヌクレオチドをサンプル中から検出する方法であって、

(a) ポリメラーゼ連鎖反応増幅を用いて前記標的ポリヌクレオチドまたはその断片を増幅する過程と、 40

(b) 前記の増幅した標的ポリヌクレオチドまたはその断片の有無を検出し、該標的ポリヌクレオチドまたはその断片が存在する場合にはオプションでその量を検出する過程を含むことを特徴とする方法。

【請求項 1 7】

請求項 1 に記載のポリペプチドと、薬剤として許容できる賦形剤とを含む組成物。

【請求項 1 8】

前記ポリペプチドが、SEQ ID NO:1-31 からなる群から選択されたアミノ酸配列を持つことを特徴とする、請求項 1 7 に記載の組成物。

【請求項 1 9】

機能的なPMMMの発現の低下に関連する疾患や病態の治療方法であって、そのような治療が必要な患者に請求項17に記載の組成物を投与することを含むことを特徴とする治療方法。

【請求項20】

請求項1に記載のポリペプチドのアゴニストとしての有効性を確認するために化合物をスクリーニングする方法であって、

(a) 請求項1に記載のポリペプチドを含むサンプルを化合物に曝すステップと、

(b) 前記サンプルにおいてアゴニスト活性を検出する過程を含むことを特徴とする方法。

【請求項21】

請求項20に記載の方法によって同定したアゴニスト化合物と、薬剤として許容できる賦形剤とを含むことを特徴とする組成物。 10

【請求項22】

機能的なPMMMの発現の低下に関連する疾患や病態の治療方法であって、そのような治療が必要な患者に請求項21の組成物を投与することを含むことを特徴とする治療方法。

【請求項23】

請求項1に記載のポリペプチドのアンタゴニストとして有効性を確認するために化合物をスクリーニングする方法であって、

(a) 請求項1のポリペプチドを含むサンプルを化合物に曝すステップと、

(b) 前記サンプルにおいてアンタゴニスト活性を検出する過程とを含むことを特徴とする方法。 20

【請求項24】

請求項23に記載の方法によって同定したアンタゴニスト化合物と、薬剤として許容できる賦形剤とを含む組成物。

【請求項25】

機能的なPMMMの過剰な発現に関連する疾患や病態の治療方法であって、そのような治療が必要な患者に請求項24の組成物を投与することを含むことを特徴とする治療方法。

【請求項26】

請求項1に記載のポリペプチドに特異結合する化合物をスクリーニングする方法であって、

(a) 請求項1に記載のポリペプチドを適切な条件下で少なくとも1つの試験化合物と混合する過程と、 30

(b) 請求項1に記載のポリペプチドの試験化合物との結合を検出し、それによって請求項1のポリペプチドに特異結合する化合物を同定する過程を含む方法。

【請求項27】

請求項1に記載のポリペプチドの活性を調節する化合物をスクリーニングする方法であって、

(a) 請求項1に記載のポリペプチドの活性が許容される条件下で、請求項1のポリペプチドを少なくとも1つの試験化合物と混合する過程と、

(b) 請求項1に記載のポリペプチドの活性を試験化合物の存在下で算定する過程と、

(c) 試験化合物の存在下での請求項1に記載のポリペプチドの活性を、試験化合物の不存在下での請求項1に記載のポリペプチドの活性と比較する過程を含み、試験化合物の存在下での請求項1に記載のポリペプチドの活性の変化が、請求項1に記載のポリペプチドの活性を調節する化合物を標示することを特徴とする方法。 40

【請求項28】

請求項5に記載の配列を持つ標的ポリヌクレオチドの発現を改変するのに効果的な化合物をスクリーニングする方法であって、

(a) 前記標的ポリヌクレオチドの発現に好適な条件下で、該標的ポリヌクレオチドを含むサンプルを化合物に曝露する過程と、

(b) 前記標的ポリヌクレオチドの発現改変を検出する過程と、

(c) 可変量の前記化合物の存在下と前記化合物の不存在下で、前記標的ポリヌクレオ 50

チドの発現を比較する過程とを含むことを特徴とする方法。

【請求項 29】

試験化合物の毒性を算定する方法であって、

- (a) 核酸を含む生物学的サンプルを前記試験化合物で処理する過程と、
- (b) 処理した前記生物学的サンプルの核酸と、請求項12に記載のポリヌクレオチドの少なくとも20の連続するヌクレオチドを持つプローブをハイブリダイズさせる過程であって、このハイブリダイゼーションゼーションが、前記プローブと前記生物学的サンプル中の標的ポリヌクレオチドとの間で特異的なハイブリダイゼーション複合体が形成される条件下で行われ、前記標的ポリヌクレオチドが、請求項12のポリヌクレオチドまたはその断片のポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドである、前記過程と、
- (c) ハイブリダイゼーション複合体の収量を定量する過程と、
- (d) 前記処理された生物学的サンプル中のハイブリタイゼーション複合体の量を、処理されていない生物学的サンプル中のハイブリタイゼーション複合体の量と比較する過程とを含み、前記処理された生物学的サンプル中のハイブリタイゼーション複合体の量の差が、前記試験化合物の毒性を標示するような方法。

10

【請求項 30】

生物学的サンプル中のPMMMの発現に関連する症状または疾患に対する診断試験する方法であって、

- (a) 前記生物学的サンプルと請求項11の抗体との混合を、前記抗体が前記ポリペプチドに結合し、抗体とポリペプチドとの複合体を形成するのに適した条件下で行う過程と、
- (b) 前記複合体を検出する過程とを含み、前記複合体の存在が、前記生物学的サンプル中の前記ポリペプチドの存在と相関することを特徴とする方法。

20

【請求項 31】

請求項11に記載の抗体であって、

- (a) キメラ抗体
- (b) 単鎖抗体
- (c) Fab断片
- (d) F(ab')₂断片
- (e) ヒト化抗体のいずれかである抗体。

【請求項 32】

請求項11に記載の抗体と、許容できる賦形剤とを含む組成物。

30

【請求項 33】

被検者のPMMMの発現に関連する病状又は疾患の診断方法であって、請求項32に記載の組成物の有効量を前記被検者に投与する過程を含むことを特徴とする方法。

【請求項 34】

前記抗体が標識されることを特徴とする請求項32に記載の組成物。

【請求項 35】

被検者のPMMMの発現に関連する病状又は疾患の診断方法であって、請求項34に記載の組成物の有効量を前記被検者に投与する過程を含むことを特徴とする方法。

【請求項 36】

請求項11に記載の抗体の特異性を有するポリクローナル抗体を調製する方法であって、

- (a) 抗体反応を誘発する条件下で、SEQ ID NO:1-31からなる群から選択したアミノ酸配列またはその免疫原性断片を含むポリペプチドを用いて動物を免疫化する過程と、
- (b) 前記動物から抗体を単離する過程と、
- (c) 前記単離された抗体を前記ポリペプチドでスクリーニングし、それによって、SEQ ID NO:1-31からなる群から選択したアミノ酸配列を含むポリペプチドに特異結合するポリクローナル抗体を同定する過程とを含むような方法。

40

【請求項 37】

請求項36に記載の方法で産生したポリクローナル抗体。

【請求項 38】

50

請求項 37 に記載のポリクローナル抗体と好適なキャリアとを有する組成物。

【請求項 39】

請求項 11 に記載の抗体の特異性を有するモノクローナル抗体を作製する方法であって、

(a) 抗体反応を誘発する条件下で、SEQ ID NO:1-31 からなる群から選択したアミノ酸配列またはその免疫原性断片を含むポリペプチドを用いて動物を免疫化する過程と、

(b) 前記動物から抗体産出細胞を単離する過程と、

(c) 前記抗体産出細胞と不死化した細胞とを融合して、モノクローナル抗体を産出するハイブリドーマ細胞を形成する過程と、

(d) 前記ハイブリドーマ細胞を培養する過程と、

(e) SEQ ID NO:1-31 からなる群から選択したアミノ酸配列を含むポリペプチドに特異結合するようなモノクローナル抗体を前記培養物から単離する過程とを含むことを特徴とする方法。

10

【請求項 40】

請求項 39 に記載の方法で産出したモノクローナル抗体。

【請求項 41】

請求項 40 に記載のモノクローナル抗体と適切なキャリアとを含む組成物。

【請求項 42】

Fab 発現ライブラリをスクリーニングすることにより産出されることを特徴とする請求項 11 に記載の抗体。

【請求項 43】

組換え免疫グロブリンライブラリのスクリーニングにより前記抗体を産出することを特徴とする請求項 11 に記載の抗体。

20

【請求項 44】

SEQ ID NO:131 を有する群から選択したアミノ酸配列を有するポリペプチドをサンプル中で検出する方法であって、

(a) 請求項 11 に記載の抗体と前記ポリペプチドとの特異結合を許容する条件下で、前記抗体と 1 サンプルとをインキュベートする過程と、

(b) 特異結合を検出する過程とを含み、該特異結合が、SEQ ID NO:131 からなる群から選択したアミノ酸配列を有するポリペプチドがサンプル中に存在することを標示することを特徴とする方法。

30

【請求項 45】

SEQ ID NO:1-31 からなる群から選択したアミノ酸配列を有するポリペプチドを精製する方法であって、

(a) 請求項 11 に記載の抗体と前記ポリペプチドとの特異結合を許容する条件下で、前記抗体と 1 サンプルとをインキュベートする過程と、

(b) 前記サンプルから前記抗体を分離し、SEQ ID NO:1-31 からなる群から選択したアミノ酸配列を含む精製ポリペプチドを得る過程とを含むことを特徴とする方法。

【請求項 46】

マイクロアレイの少なくとも 1 つのエレメントが請求項 13 に記載のポリヌクレオチドであることを特徴とするマイクロアレイ。

40

【請求項 47】

ポリヌクレオチドを含むサンプルの発現プロファイルを作製する方法であって、

(a) サンプル中のポリヌクレオチドを標識化する過程、

(b) ハイブリダイゼーション複合体が形成されるのに適した条件下で請求項 46 のマイクロアレイのエレメントとサンプル中の標識化ポリヌクレオチドとを接触させる過程と、

(c) サンプル中のポリヌクレオチドの発現を定量する過程を含む方法

【請求項 48】

或る固体基板上の固有の物理的位置に付着された種々のヌクレオチド分子を有するアレイであって、少なくとも 1 つの前記ヌクレオチド分子が、或る標的ポリヌクレオチドの少なくとも 30 の連続したヌクレオチド群と特異的にハイブリダイズ可能な最初のオリゴヌクレ

50

オチドまたはポリヌクレオチド配列を有し、前記の標的ポリヌクレオチドが請求項 1 2 に記載のポリヌクレオチドであることを特徴とするアレイ。

【請求項 4 9】

請求項 4 8 に記載のアレイで、前記の最初のオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドの配列が前記の標的ポリヌクレオチドの少なくとも 30 の連続したヌクレオチドに完全に相補的であることを特徴とするアレイ。

【請求項 5 0】

請求項 4 8 に記載のアレイで、前記の最初のオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドの配列が前記の標的ポリヌクレオチドの少なくとも 60 の連続したヌクレオチドに完全に相補的であることを特徴とするアレイ。

10

【請求項 5 1】

請求項 4 8 に記載のアレイで、前記のオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドの最初の配列が前記の標的ポリヌクレオチドに完全に相補的であることを特徴とするアレイ。

【請求項 5 2】

請求項 48 に記載のアレイで、マイクロアレイであることを特徴とするアレイ。

【請求項 5 3】

請求項 4 8 に記載のアレイで、前記のオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドの最初の配列を有する或るヌクレオチド分子にハイブリダイズした前記の標的ポリヌクレオチドを更に有することを特徴とするアレイ。

【請求項 5 4】

請求項 4 8 に記載のアレイで、或るリンカーが前記のヌクレオチド分子の少なくとも 1 つと前記の固体基板とを連結していることを特徴とするアレイ。

20

【請求項 5 5】

請求項 4 8 に記載のアレイで、該基板上的固有の物理的位置の各々が複数のヌクレオチド分子を含み、任意の単一の固有の物理的位置でのその複数のヌクレオチド分子は同一の配列を有し、該基板上的固有の物理的位置の各々は、該基板上的別の固有の物理的位置でのヌクレオチド分子群の配列とは異なる或る配列を有するヌクレオチド分子群を含むことを特徴とするアレイ。

【請求項 5 6】

SEQ ID NO:1 のアミノ酸配列を含む請求項 1 に記載のポリペプチド。

30

【請求項 5 7】

SEQ ID NO:2 のアミノ酸配列を含む請求項 1 に記載のポリペプチド。

【請求項 5 8】

SEQ ID NO:3 のアミノ酸配列を含む請求項 1 に記載のポリペプチド。

【請求項 5 9】

SEQ ID NO:4 のアミノ酸配列を含む請求項 1 に記載のポリペプチド。

【請求項 6 0】

SEQ ID NO:5 のアミノ酸配列を含む請求項 1 に記載のポリペプチド。

【請求項 6 1】

SEQ ID NO:6 のアミノ酸配列を含む請求項 1 に記載のポリペプチド。

40

【請求項 6 2】

SEQ ID NO:7 のアミノ酸配列を含む請求項 1 に記載のポリペプチド。

【請求項 6 3】

SEQ ID NO:8 のアミノ酸配列を含む請求項 1 に記載のポリペプチド。

【請求項 6 4】

SEQ ID NO:9 のアミノ酸配列を含む請求項 1 に記載のポリペプチド。

【請求項 6 5】

SEQ ID NO:10 のアミノ酸配列を含む請求項 1 に記載のポリペプチド。

【請求項 6 6】

SEQ ID NO:11 のアミノ酸配列を含む請求項 1 に記載のポリペプチド。

50

- 【請求項 67】
SEQ ID NO:12のアミノ酸配列を含む請求項1に記載のポリペプチド。
- 【請求項 68】
SEQ ID NO:13のアミノ酸配列を含む請求項1に記載のポリペプチド。
- 【請求項 69】
SEQ ID NO:14のアミノ酸配列を含む請求項1に記載のポリペプチド。
- 【請求項 70】
SEQ ID NO:15のアミノ酸配列を含む請求項1に記載のポリペプチド。
- 【請求項 71】
SEQ ID NO:16のアミノ酸配列を含む請求項1に記載のポリペプチド。 10
- 【請求項 72】
SEQ ID NO:17のアミノ酸配列を含む請求項1に記載のポリペプチド。
- 【請求項 73】
SEQ ID NO:18のアミノ酸配列を含む請求項1に記載のポリペプチド。
- 【請求項 74】
SEQ ID NO:19のアミノ酸配列を含む請求項1に記載のポリペプチド。
- 【請求項 75】
SEQ ID NO:20のアミノ酸配列を含む請求項1に記載のポリペプチド。
- 【請求項 76】
SEQ ID NO:21のアミノ酸配列を含む請求項1に記載のポリペプチド。 20
- 【請求項 77】
SEQ ID NO:22のアミノ酸配列を含む請求項1に記載のポリペプチド。
- 【請求項 78】
SEQ ID NO:23のアミノ酸配列を含む請求項1に記載のポリペプチド。
- 【請求項 79】
SEQ ID NO:24のアミノ酸配列を含む請求項1に記載のポリペプチド。
- 【請求項 80】
SEQ ID NO:25のアミノ酸配列を含む請求項1に記載のポリペプチド。
- 【請求項 81】
SEQ ID NO:26のアミノ酸配列を含む請求項1に記載のポリペプチド。 30
- 【請求項 82】
SEQ ID NO:27のアミノ酸配列を含む請求項1に記載のポリペプチド。
- 【請求項 83】
SEQ ID NO:28のアミノ酸配列を含む請求項1に記載のポリペプチド。
- 【請求項 84】
SEQ ID NO:29のアミノ酸配列を含む請求項1に記載のポリペプチド。
- 【請求項 85】
SEQ ID NO:30のアミノ酸配列を含む請求項1に記載のポリペプチド。
- 【請求項 86】
SEQ ID NO:31のアミノ酸配列を含む請求項1に記載のポリペプチド。 40
- 【請求項 87】
SEQ ID NO:32のポリヌクレオチド配列を含む請求項12に記載のポリヌクレオチド。
- 【請求項 88】
SEQ ID NO:33のポリヌクレオチド配列を含む請求項12に記載のポリヌクレオチド。
- 【請求項 89】
SEQ ID NO:34のポリヌクレオチド配列を含む請求項12に記載のポリヌクレオチド。
- 【請求項 90】
SEQ ID NO:35のポリヌクレオチド配列を含む請求項12に記載のポリヌクレオチド。
- 【請求項 91】
SEQ ID NO:36のポリヌクレオチド配列を含む請求項12に記載のポリヌクレオチド。 50

【請求項 1 1 7】

SEQ ID NO:62のポリヌクレオチド配列を含む請求項12に記載のポリヌクレオチド。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、新規の核酸群、これら核酸がコードするタンパク質修飾および維持分子に関する。また、これらの核酸とタンパク質とを利用した胃腸障害、心血管障害、自己免疫/炎症疾患、細胞増殖異常、発生・発達障害、上皮障害、神経疾患、生殖障害、内分泌障害、代謝異常、膵臓病、副腎と関連する疾患、性腺ステロイドホルモンと関連する疾患、癌、および感染症の診断、治療、及び予防に関する。本発明はまた、該核酸と、タンパク質修飾および維持分子との発現への、外因性化合物の効果のアセスメントに関する。

10

【背景技術】

【0002】

タンパク質分子の修飾や維持の調節を行う細胞性過程によって、その機能、高次構造、安定化および分解が調整される。これらの各々の過程はキナーゼ、ホスファターゼ、プロテアーゼ、プロテアーゼインヒビター、異性化酵素、転移酵素および分子シャペロンなどの主要な酵素またはタンパク質によって媒介される。

【0003】

キナーゼ

キナーゼは、高エネルギーのリン酸基の、アデノシン三リン酸(ATP)から標的タンパク質のヒドロキシアミノ酸残基であるセリン、トレオニン、またはチロシンへの転移を触媒する。リン酸基が付加されると、受容体分子における局所電荷が変化し、それによって内部構造が変化し、分子間接触に影響し得る。可逆的なタンパク質リン酸化は、真核細胞の細胞内での様々な現象を調節するために広く利用されている。一般的な哺乳動物細胞における活性なタンパク質の10%以上がリン酸化していると推定される。ホルモン、神経伝達物質、成長因子、および分化因子を含む細胞外シグナルは、キナーゼを活性化することがあり、そのようなキナーゼは細胞表面受容体、または最終的なエフェクタータンパク質の活性体として存在する場合があります、さらにシグナル伝達経路上のどこかに存在する場合もある。キナーゼは、解糖などの基本的な代謝プロセスから細胞周期の調節、分化、およびシグナル伝達カスケードによる細胞外環境との情報交換に至る細胞機能の全てに参与する。細胞内におけるタンパク質の不適切なリン酸化は、細胞周期の進行および細胞分化における変化に関連する。細胞周期における変化は、アポトーシスの誘発や癌の誘発に関連することが示されている。細胞分化における変化は、生殖系、免疫系、および骨格筋の、疾患や障害に関連することが示されている。

20

30

【0004】

プロテインキナーゼには2つのクラスがある。一方のクラスのプロテインチロシンキナーゼ(PTK)はチロシン残基をリン酸化し、他方のクラスであるプロテインセリン/トレオニンキナーゼ(STK)はセリン残基およびトレオニン残基をリン酸化する。数種のPTKおよびSTKは、両方のファミリーの構造的な特徴を有し、チロシン残基およびセリン/トレオニン残基の両方に対して特異性(二重特異性)を有する。ほとんど全てのキナーゼは、キナーゼファミリー特有の特定の残基群および配列モチーフ群を含む保存された250~300のアミノ酸からなる触媒ドメインを含む(概説はHardie, G及びS. Hanks (1995) The Protein Kinase Facts Book, Vol 1, Academic Press, San Diego CA. 17-20ページを参照)。

40

【0005】

ホスファターゼ

ホスファターゼ(脱リン酸酵素)は、加水分解によってタンパク質からリン酸基を除く。ホスファターゼは細胞におけるリン酸化の度合いの決定に必須であり、キナーゼと共に代謝酵素活性、細胞増殖、細胞の成長および分化、細胞接着、および細胞周期の進行などの重要な細胞プロセスを調節する。プロテインホスファターゼは、ホスホアミノ酸基質選択性に基づいて、セリン/トレオニン特異性またはチロシン特異性のいずれかによって特徴

50

づけられる。数種のホスファターゼ（DSP：二重特異性ホスファターゼ）は、リン酸化したチロシン、セリン、またはトレオニン残基に作用し得る。プロテインセリン/トレオニンホスファターゼ（PSP）は、細胞内での多くのcAMP仲介性ホルモン応答の重要な制御因子である。プロテインチロシンホスファターゼ（PTP）は、細胞周期および細胞シグナル伝達プロセスにおいて重要な役割を果たす。

【0006】

プロテアーゼ

プロテアーゼは、タンパク質鎖やペプチド鎖のバックボーンを形成するペプチド結合のところでタンパク質とペプチドを切断する。タンパク質分解は、細胞内外で生じる、最も重要で頻発する酵素反応の1つである。タンパク質分解は、新生ポリペプチドの活性化と成熟、誤ってフォールディングされたタンパク質や損傷したタンパク質の分解、および細胞内のペプチド代謝回転の制御に関する。プロテアーゼは、胚の発達、傷の治癒、および通常発育において、消化、内分泌機能、組織の再構築に関係している。プロテアーゼは、調節タンパク質の半減期に影響することで、調節過程における役割を果たしうる。プロテアーゼは、炎症、血管新生、腫瘍の撒布と転移、循環器疾患、神経系疾患、細菌性感染・寄生性感染・ウイルス性感染などの病態の病因や進行に関わる。

10

【0007】

プロテアーゼは基質のどこを切断するかによって分類できる。エキソペプチダーゼにはアミノペプチダーゼ、ジペプチルペプチダーゼ、トリペプチダーゼ、カルボキシペプチダーゼ、ペプチジル-ジペプチダーゼ、ジペプチダーゼ、およびオメガペプチダーゼが含まれ、基質の末端の残基を切断する。エンドペプチダーゼにはセリンプロテアーゼ、システインプロテアーゼ、およびメタロプロテアーゼが含まれ、ペプチド内部の残基で切断する。活性部位の構造、作用機序、および全体的三次元構造に基づき、哺乳動物プロテアーゼは四つの主なカテゴリーに分類されている(Beynon, R.J.およびJ.S. Bond (1994) *Proteolytic Enzymes: A Practical Approach*, Oxford University Press, New York NY, 1-5ページを参照)。

20

【0008】

セリンプロテアーゼ

セリンプロテアーゼ（SP）は、タンパク質分解酵素の広範で大きなファミリーで、消化酵素のトリプシンやキモトリプシン、補体カスケードや血液凝固カスケードの成分、並びに、細胞内部および細胞外基質において高分子の分解や代謝回転を制御する酵素を含む。20以上のサブファミリーのうち、ほとんどは6つの一族に分けることができ、そのそれぞれに共通の祖先をもつ。これら6つの一族は、進化の点で少なくとも4つの異なる祖先の系統を引いていると仮定されている。SPという名前は、ほとんどのファミリーの活性触媒部位に見られるセリン残基の存在に由来する。活性部位は、触媒トライアッド、すなわち、触媒にとって重要な保存アスパラギン、ヒスチジン、セリン残基のセットによって定義される。これらの残基は、基質結合を促進する電荷リレーネットワークを形成する。活性部位外のその他の残基は、触媒中に形成される四面体遷移中間状態（tetrahedral transition intermediate）を安定化するオキシアニオンホール（oxyanion hole）を形成する。SPは広範囲にわたる基質をもち、基質特異性によってサブファミリーへ細分できる。主要なサブファミリーの名前は、それらが切断する残基に由来する。すなわち、トリパーゼはアルギニンまたはリジンに、アパーゼはアスパラギン酸に、キマーゼはフェニルアラニンまたはロイシンに、メターゼ（metase）はメチオニンに、セラーゼ（serase）はセリンにそれぞれ由来する（Rawlings, N.D. および A.J. Barrett (1994) *Methods Enzymol.* 244:19-61）。

30

40

【0009】

哺乳類セリンプロテアーゼのほとんどは、酵素前駆体すなわち、タンパク質分解によって活性化される不活性な前駆体として合成される。例えば、トリプシノーゲンはエンテロペプチダーゼによって、その活性型であるトリプシンに変換される。エンテロペプチダーゼは、トリプシノーゲンからN末端断片を取り除く腸管プロテアーゼである。残った活性

50

断片がトリプシンで、そのトリプシンが他の膵臓酵素の前駆体を活性化する。同様に、トロンビンの前駆体であるプロトロンビンのタンパク質分解は、3つの別々のポリペプチド断片を生成する。N末端断片は放出されるが、活性なトロンビンを構成するほかの2つの断片は、ジスルフィド結合を介して結合したままである。

【0010】

最大のSPサブファミリーは、キモトリプシン(S1)サブファミリーとサブチリシン(S8)サブファミリーの2つである。キモトリプシンファミリーのメンバーの中には、このファミリーに特有の2つの構造的ドメインを含んでいるものがある。クリングルドメインは、さまざまなコピー数で見られる、3重ループでジスルフィドクロスリンクしたドメインである。クリングルドメインは、膜、他のタンパク質、または、リン脂質などのメディアエーターの結合、およびタンパク質分解活性の制御の役割を果たしていると考えられている(PROSITE PDOC00020)。アップル(Apple)ドメインは90アミノ酸反復ドメインで、それぞれが6つの保存されたシステインを含んでいる。3つのジスルフィド結合が、第1と第6、第2と第5、第3と第4のシステインを連結する(PROSITE PDOC00376)。アップルドメインは、タンパク質間相互作用に関する。S1ファミリーのメンバーには、トリプシン、キモトリプシン、凝固第IX因子から凝固第XII因子、補体のB因子、C因子、D因子、グランザイム、カリクレイン、組織プラスミノゲンアクチベーター、および、ウロキナーゼプラスミノゲンアクチベーターが含まれる。サブチリシンファミリーは、真正細菌、古細菌、真核生物、ウイルスに見られるメンバーをもつ。サブチリシン類には、タンパク質プロセシングエンドペプチダーゼのケキシンとフリン、および下垂体プロホルモン転換酵素のPC1、PC2、PC3、PC6とPACE4が含まれる(RawlingsおよびBarrett、前出)。

10

20

【0011】

SP類は、正常な多くのプロセスにおける機能をもち、その内のいくつかは疾病の原因あるいは治療に関係していると推定されている。エンテロキナーゼは腸内消化のイニシエーターで腸の刷子縁に見られ、そこでエンテロキナーゼは酸性プロペプチドをトリプシノーゲンから切断して活性トリプシンを産生する(Kitamoto, Y. 他(1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:7588-7592)。アンジオテンシンIIおよびアンジオテンシンIIIや[des-Arg9]ブラジキニンといったペプチドを切断するリソソームセリンペプチダーゼであるプロリルカルボキシペプチダーゼは、セリンカルボキシペプチダーゼファミリーおよびプロリルエンドペプチダーゼファミリーのメンバーと配列相同性を共有している(Tan, F. 他(1993) J. Biol. Chem. 268:16631-16638)。プロテアーゼであるニューロプシンは、神経シグナル伝達に反応して海馬状隆起でのシナプス形成とニューロン結合性に影響する可能性がある(Chen, Z.-L. 他(1995) J. Neurosci. 15:5088-5097)。組織プラスミノゲンアクチベーターは、発作(Zivin, J.A. (1999) Neurology 53:14-19)および心筋梗塞(Ross, A.M. (1999) Clin. Cardiol. 22:165-171)の緊急の処置に有効である。いくつかの受容体(PAR:プロテイナーゼ活性化受容体)は消化管全体にわたって高度に発現し、タンパク質分解による細胞外ドメイン切断によって活性化される。PARに対する主要なアゴニストであるトロンビン、トリプシンやマスト細胞トリプターゼは、アレルギーや炎症性の状態の際に放出される。プロテアーゼによるPAR活性化の制御は有望な治療標的であると示唆されている(Vergnolle, N. (2000) Aliment. Pharmacol. Ther. 14:257-266; Rice, K. D. 他(1998) Curr. Pharm. Des. 4:381-396)。前立腺特異抗原(PSA)は、前立腺の上皮細胞によってのみ合成され分泌されるカリクレイン様セリンプロテアーゼである。血清PSAは前立腺癌において増加し、癌進行のモニタリングと治療に対する反応との最も敏感な生理学的マーカーである。PSAはまた、ある転移性腫瘍の起源が前立腺であると同定できる(Brawer, M.K. および P.H. Lange (1989) Urology 33:11-16)。

30

40

【0012】

シグナルペプチダーゼは、数種のタンパク質からシグナルペプチドをプロセシングする役割を果たす、すべての原核細胞および真核細胞のタイプに見られるSPの特殊クラスである。シグナルペプチドは、タンパク質のアミノ末端ドメインであり、リボソーム集合部位から特定の細胞内の位置あるいは細胞外の位置にタンパク質を導く。いったんタンパク質

50

が搬出されると、シグナルペプチダーゼによるシグナル配列の除去および翻訳後プロセシング（例えば、グリコシル化あるいはリン酸化）によってタンパク質が活性化する。シグナルペプチダーゼは、酵母と哺乳類の両方でマルチサブユニット複合体として存在する。イヌのシグナルペプチダーゼ複合体は5つのサブユニットから構成され、そのすべてがミクロソーム膜に結合しており、その膜を1回以上貫通する疎水性領域を含んでいる（Shelness, G.S. および G. Blobel (1990) *J. Biol. Chem.* 265:9512-9519）。これらのサブユニットの中には、複合体を膜の上の適切な位置に固定するのに役立つものもある一方、実際の触媒活性を含むものもある。

【0013】

ERへの転座過程のメカニズムには、伸長するタンパク質のN末端シグナルペプチドの認識が関係する。シグナルペプチドは、タンパク質および結合したリボソームをER膜上の受容体に向かわせる。N末端のシグナルペプチドは膜の表面に接着された状態を維持するが、ポリペプチド鎖はER膜の孔を通して内腔へと貫通する。ER内部に位置するシグナルペプチダーゼがタンパク質からシグナルペプチドを切断し、タンパク質を内腔へと放出する時、過程は完了する。

【0014】

トロンピンは、血液凝固過程で不可欠の役割をもつセリンプロテアーゼである。肝臓で合成されるプロトロンピンは、因子Xaによって活性化されたトロンピンに変換される。活性化されたトロンピンが溶解性のフィブリノーゲンを切断して、ポリマー形成するフィブリン（主要な血液凝固成分）に変える。さらに、トロンピンはフィブリンの架橋形成で役割を果たす因子第XIIIaを活性化する。

【0015】

トロンピンはまた、以前にトロンピン受容体として知られるプロテアーゼ活性化受容体1（PAR-1）から41残基のアミノ末端ペプチドのタンパク質分解性プロセシングを介して、血小板凝固を刺激する。アミノ末端ペプチドの切断は、新しいアミノ末端を露出させる他に、PAR-1の細胞内取り込みにも関連している可能性がある（Stubbs, M.T. および Bode, W. (1994) *Current Opinion in Structural Biology* 4:823-832、Ofoso, F.A. 他 (1998) *Biochem. J.* 336:283-285）。トロンピンは、PAR-1の切断を介して血小板活性化を刺激させるに加えて、血小板の表面上で糖タンパクVを切断して血小板の凝集を誘導する。糖タンパクVは、無傷の血小板上で主要なトロンピン基質であるらしい。糖タンパクVを欠く血小板は、PAR-1を切断するのに必要なトロンピンに過敏である。哺乳動物の正常な止血に血小板の凝固が必要であるが、過剰な血小板凝固は、動脈血栓症、アテローム性動脈、急性心筋梗塞、および発作を起こし得る（Ramakrishnan, V. 他 (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96:13336-41 およびその内で引用された文献を参照）。

【0016】

プロテアーゼの別のファミリーは活性部位にセリンをもち、その活性をATP加水分解に依存している。これらのプロテアーゼは、ATP/GTP結合モチーフであるP-loopの存在によって同定される調節ATPaseドメインとタンパク質分解コアドメインを含む（PROSITE PD0C00803）。このファミリーのメンバーは、真核ミトコンドリアマトリックスプロテアーゼ、Clpプロテアーゼ、およびプロテアソームを含む。Clpプロテアーゼは元来、植物の葉緑体で発見されたが、原核細胞および真核細胞の両方に広がっていると考えられている。早発性捻転ジストニーの遺伝子は、Clpプロテアーゼに関連する或るタンパク質をコードする（Ozelius, L.J. 他 (1998) *Adv. Neurol.* 78:93-105）。

【0017】

プロテアソームは幾つかの細菌や全ての真核細胞に見られる細胞内プロテアーゼ複合体で、細胞生理における重要な役割を果たす。プロテアソームは大きい（2000 kDa）多サブユニット複合体で、中央触媒コアに、活性部位が中央の空洞に向いた4つの七員環状に配列された多様なプロテアーゼを含む。末端のATPアーゼサブユニット群は空洞の外部ポートを覆っており、基質が入るのを調節する（概説はSchmidt, M. 他 (1999) *Curr. Op. Chem. Biol.* 3:584-591参照）。プロテアソームはユビキチン抱合システム（UCS）に関連し、

このシステムは、転写や細胞周期進行といった細胞プロセスを活性化または抑圧する機能をもつタンパク質など、全タイプの細胞タンパク質の分解の主要経路となる (Ciechanover, A. (1994) *Cell* 79:13-21)。UCS経路において、分解の標的となるタンパク質は、小さな熱安定タンパク質であるユビキチンに抱合される。そして、ユビキチン化されたタンパク質は、プロテアソームによって認識され分解される。結果として得られるユビキチンペプチド複合体はユビキチンカルボキシル末端加水分解酵素によって加水分解され、遊離ユビキチンはUCSによる再利用のために放出される。ユビキチンプロテアソームシステムは、有糸分裂周期キナーゼ、腫瘍性タンパク質、腫瘍抑制遺伝子 (p53)、シグナル伝達に関連する細胞表面受容体、転写制御因子、および、変異または損傷したタンパク質の分解に関与すると示唆されている (Ciechanover, 前出)。この経路は、嚢胞性線維症、アンジェルマン症候群、リドル症候群を含む数多くの疾病に結びつけられている (Schwartz, A.L.およびA. Ciechanover (1999) *Annu. Rev. Med.* 50:57-74の概説を参照)。マウスの癌原遺伝子であるUnpは或る核ユビキチンプロテアーゼをコードし、その過剰発現はNIH 3T3細胞の発癌性形質転換を起こさせる。この遺伝子のヒト相同体は、肺の小さな細胞腫瘍や肺腺癌において常に増加している (Gray, D.A. (1995) *Oncogene* 10:2179-2183)。ユビキチンカルボキシル末端加水分解酵素は、リンパ芽球性白血病細胞株が、分裂しない成熟状態に分化することに関与する (Maki, A. 他 (1996) *Differentiation* 60:59-66)。ニューロンでは、ユビキチンカルボキシル末端加水分解酵素 (PGP 9.5) 発現は、ヒト神経変性疾患に起こる異常な構造において強度である (Lowe, J. 他 (1990) *J. Pathol.* 161:153-160)。プロテアソームは大きい (2000 kDa)多サブユニット複合体で、中央触媒コアに、活性部位が中央の空洞に向けた4つの七員環状に配列された多様なプロテアーゼを含む。末端のATPアーゼサブユニット群は空洞の外部ポートを覆っており、基質が入るのを調節する (概説はSchmidt, M. 他 (1999) *Curr. Op. Chem. Biol.* 3:584-591参照)。

10

20

【0018】

システインプロテアーゼ

システインプロテアーゼ (CP) は、前駆体タンパク質のプロセッシングから細胞内分解にわたる多様な細胞プロセスに関与している。知られているCPの約半数は、ウイルス内のみ存在する。CPは、触媒がチオエステル中間体を介して進行し近くのヒスチジン残基とアスパラギン残基によって促進される活性部位での主な触媒残基としてシステインをもつ。或るグルタミン残基も重要であるが、それはオキサニオン穴の形成を助けるからである。2つの重要なCPファミリーに、パパイン様酵素 (C1) およびカルパイン (C2) がある。パパイン様ファミリーのメンバーは、一般的にリソソーム型あるいは分泌されるものがあり、したがって、プロペプチドと同様にシグナルペプチドを付けて合成される。ほとんどのメンバーは、構造的な重要性をもつ可能性のあるプロペプチドに1つの保存モチーフをもつ (Karrer, K.M. 他 (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:3063-3067)。パパインファミリーのメンバーの3次元構造は、2つの葉の間に位置する触媒部位をもつ2葉分子を示す。パパインは、カテプシンB、C、H、L、およびS、ある種の植物アレルゲン、およびジペプチジルペプチダーゼを含む (Rawlings, N.D.およびA.J. Barrett (1994) *Methods Enzymol.* 244:461-486の概説を参照)。

30

40

【0019】

広範に発現するCPがある一方で、免疫系細胞によってのみ産生されるCPもある。特記すべきは、炎症部位に移動して組織修復に関与する分子を分泌する単球、マクロファージ、および他の細胞によってCPが産生されることである。これら修復分子の過剰は数種の疾患で役割を果たす。慢性関節リウマチなどの自己免疫疾患において、システインペプチダーゼカテプシンCの分泌は、コラーゲン、ラミニン、エラスチン、およびその他の骨の細胞外マトリックスに見られる構造タンパク質を分解する。そのような分解によって弱められた骨はまた、腫瘍浸潤と転移を受けやすくなる。カテプシンL発現はまた、リウマチ滑膜の破壊を悪化させる単核細胞の流入に寄与する可能性がある (Keyszer, G.M. (1995) *Arthritis Rheum.* 38:976-984)。

【0020】

50

カルパインは、N末端触媒ドメインとC末端カルシウム結合ドメインの両方を含むカルシウム依存性細胞質エンドペプチダーゼである。カルパインは、それぞれのアイソフォームに特有の触媒サブユニットと異なるアイソフォームに共通の調節サブユニットからなるプロテオソームヘテロダイマーとして発現される。各サブユニットは、カルシウム結合EFハンドドメインを有する。調節サブユニットはまた、酵素が細胞膜と結合できるようにする疎水性グリシンリッチドメインを含む。カルパインは増加した細胞内カルシウム濃度によって活性化され、高次構造に変化を起こさせ、限られた自己分解を誘導する。結果として得られる活性分子は、その活性のためにより低いカルシウム濃度を必要とする (Chan, S.L. および M.P. Mattson (1999) *J. Neurosci. Res.* 58:167-190)。カルパインの発現は他の組織でも見られるが、主にニューロンに見られる。筋萎縮性側索硬化症 (ALS)、パーキンソン病、アルツハイマー病を含むいくつかの慢性神経変性疾患は、増加したカルパイン発現に関連している (Chan および Mattson、前出)。細胞骨格のカルパイン媒介分解が、頭部外傷による脳損傷に寄与しているという示唆がある (McCracken, E. 他 (1999) *J. Neurotrauma* 16:749-761)。カルパイン3は主に骨格筋に発現し、肢帯型筋ジストロフィータイプ2Aの原因である (Minami, N. 他 (1999) *J. Neurol. Sci.* 171:31-37)。

10

20

30

40

50

【 0 0 2 1 】

チオールプロテアーゼの別のファミリーのカスパーゼは、アポトーシスの開始段階と実行段階に参与している。プロアポトーシス性シグナルは、タンパク質分解カスパーゼカスケードを引き起こすイニシエーターカスパーゼを活性化でき、標的タンパク質の加水分解と典型的なアポトーシス細胞死に導く。2つの活性部位残基、システインとヒスチジンは、触媒機序に参与すると考えられている。カスパーゼは最も特異的なエンドペプチダーゼの1つで、アスパラギン酸残基の後で切断する。カスパーゼは不活性酵素前駆体として合成され、この前駆体は、小さなスペース領域によって分離される1つの大きな (p20) サブユニットと1つの小さな (p10) サブユニット、および、可変N末端プロドメインからなる。このプロドメインは、アポトーシスに正または負に影響しうる補助因子と相互作用する。活性化シグナルが、特異的アスパラギン酸残基 (カスパーゼ1の番号付け規則ではD297) の自己タンパク質分解切断およびスペースとプロドメインの除去を引き起こし、p10/p20ヘテロダイマーを残す。これらのヘテロダイマーの2つが、その小サブユニットを介して相互作用し、触媒的に活性な四量体を形成する。カスパーゼファミリーのいくつかのメンバーの長いプロドメインが、プロカスパーゼの二量体化と自己プロセッシングを促進していることが示されている。幾つかのカスパーゼはそのプロドメインに「デスエフェクタードメイン」を含み、それによって、他のカスパーゼおよび、FADDタンパク質会合細胞死受容体 (death receptor) との自己活性化複合体に、あるいはTNF受容体複合体に、カスパーゼが補充されうる。さらに、カスパーゼファミリーの異なるメンバーからの2つの二量体が会合して、結果として得る四量体の基質特異性を変えることができる。内在性カスパーゼ阻害剤 (アポトーシスタンパク質阻害剤 (IAP)) もまた存在する。これらすべての相互作用は、アポトーシスの調整に明らかに影響する (Chan および Mattson、前出、Salveson, G.S. および V.M. Dixit (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:10964-10967の概説を参照)。

【 0 0 2 2 】

カスパーゼは数多くの疾病に結びつけられる。いくつかのカスパーゼを欠いているマウスは、神経上皮のアポトーシス不全により神経系に重度の欠陥をもっており、致死が早くなる。他のカスパーゼを欠くマウスも炎症性反応に重度の欠陥をもっているが、これはカスパーゼが IL-1bのプロセッシングとおそらく他の炎症性サイトカインの原因となっているからである (Chan および Mattson、前出)。牛痘ウイルスとバキュロウイルスはカスパーゼを標的とし、宿主細胞の死を回避して感染の成功を促進する。更に、不適切アポトーシスの増加がAIDS、神経変性疾患、虚血損傷で報告されている一方、細胞死の減少は癌に関連する (Salveson および Dixit、前出; Thompson, C.B. (1995) *Science* 267:1456-1462)。

【 0 0 2 3 】

アスパルチルプロテアーゼ

アスパルチルプロテアーゼ (AP) は、キモシン、レニン、胃ペプシン、リソソームプロテアーゼのカテプシンDとEを含む。レトロウイルスは、通常、polポリタンパク質の一部としてAPをコードするものがほとんどである。酸プロテアーゼとも呼ばれるAPは2つのドメインからなる単量体酵素で、各々のドメインは半分の活性部位とそれ自身の触媒アスパラギン酸残基を含む。APはpH2から3の範囲で最も活性が高く、アスパラギン酸残基の1つはイオン化されもう1つは中性になる。APのペプシンファミリーは分泌酵素を多く含み、すべてシグナルペプチドおよびプロペプチドが付いて合成されるようである。ほとんどのファミリーのメンバーは3つのジスルフィドループをもち、最初の約5残基のループが最初のアスパラギン酸に続き、第2の5~6残基ループが第2アスパラギン酸の前にあり、第3で最大

10

【0024】

APは多様な組織における役割をもち、そのいくつかは疾病に関連する。レニンは、電解質バランスと血圧の制御を担っているホルモン、アンジオテンシンのプロセッシングにおいて第1段階を媒介している (Crews, D.E. および S.R. Williams (1999) Hum. Biol. 71:475-503の概説を参照)。カテプシンの異常な調整と発現は、多様な炎症性の病状において明らかである。カテプシンDの発現は、慢性関節リウマチおよび骨関節炎の患者から取った滑膜組織において増加している。カテプシンの増加した発現および差次的制御は、さまざまな癌の潜在的な転移性との関係がある (Chambers, A.F. 他(1993) Crit. Rev. Oncol. 4:95-114)。

20

【0025】

メタロプロテアーゼ

メタロプロテアーゼは活性のために金属イオンを必要とし、通常はマンガンか亜鉛である。マンガン金属酵素の例としては、アミノペプチダーゼPおよびヒトのプロリンジペプチダーゼ (PEPD) が含まれる。アミノペプチダーゼPは、さまざまな炎症性反応において活性化されるノナペプチドであるブラジキニンを分解できる。アミノペプチダーゼPは、冠状動脈の虚血および再灌流傷害に関係すると考えられている。アミノペプチダーゼP阻害剤の投与は、ラットにおいて心臓を保護する効果をもつことが示されている (Ersahin, C. 他 (1999) J. Cardiovasc. Pharmacol. 34:604-611)。

30

【0026】

亜鉛依存メタロプロテアーゼのほとんどは、亜鉛結合ドメインにおける共通の配列をもち、活性部位は、亜鉛リガンドとして作用する2つのヒスチジンと、第1ヒスチジンまでの触媒グルタミン酸C末端とからなる。このシグネチャ配列を含んでいるタンパク質はメトジンシンとして知られており、アミノペプチダーゼN、アンジオテンシン変換酵素、ニューロリシン、マトリックスメタロプロテアーゼ、および、アダマリシン (ADAMS) が含まれる。代替の配列が亜鉛カルボキシペプチダーゼに見られ、3つすべての保存残基 (2つのヒスチジンと1つのグルタミン酸) が亜鉛結合に関与している。

40

【0027】

アンジオテンシン変換酵素およびアミノペプチダーゼを含む数多くの中性メタロエンドペプチダーゼは、ペプチドホルモンの代謝に関与している。アミノペプチダーゼBの活性亢進は例えば、高血圧ラットの副腎や神経下垂体に見られる (Prieto, I. 他(1998) Horm. Metab. Res. 30:246-248)。オリゴペプチダーゼM/ニューロリシンは、ニューロテンシンと同様にブラジキニンを加水分解できる (Serizawa, A. 他(1995) J. Biol. Chem 270:2092-2098)。ニューロテンシンは脳の神経伝達物質として作用しうる血管作動性ペプチドで、脳では食物摂取の制限に関与すると考えられる (Tritos, N.A. 他(1999) Neuropeptides 33:339-349)。

【0028】

マトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) は、細胞外マトリックス (ECM) の成分を分解

50

できる少なくとも23の酵素のファミリーである。MMPはN末端触媒ドメインをもつZn²⁺エンドペプチダーゼである。このファミリーのほとんどのすべてのメンバーは、ECMの基質分子または組織によって産生される阻害剤に結合できるヒンジペプチドとC末端ドメインをもつ (TIMP:メタロプロテアーゼ組織インヒビター、Campbell, I.L.およびA. Pagenstecher (1999) Trends Neurosci. 22:285-287)。フィブロネクチン様リピート、膜貫通ドメイン、またはC末端ヘモペキシナーゼ様ドメインの存在は、コラゲナーゼ、ゼラチナーゼ、ストロメライシン、および膜タイプMMPサブファミリーにMMPを分類するのに使用できる。不活性型においては、活性部位のZn²⁺イオンはプロ配列のシステインと相互作用する。活性化因子は、Zn²⁺システイン相互作用、すなわち、「システインスイッチ」を妨害して、活性部位を曝露させる。これは酵素を部分的に活性化し、その酵素はプロペプチドを切断して完全に活性になる。MMPは、セリンプロテアーゼであるプラスミンとフリン (furin) とによってしばしば活性化される。MMPは、しばしば阻害剤との化学量論的で非共有結合の相互作用によって調整されるので、プロテアーゼの、阻害剤に対するバランスが、組織恒常性において非常に重要である (概説はYong, V.W. 他 (1998) Trends Neurosci. 21:75-80)。

10

【0029】

MMPは、骨関節炎 (Mitchell, P. 他 (1996) J. Clin. Invest. 97:761-768)、アテローム硬化性プラーク破裂 (Sukhova, G.K. 他 (1999) Circulation 99:2503-2509)、大動脈瘤 (Schneiderman, J. 他 (1998) Am. J. Path. 152:703-710)、不治の傷 (Saarialho-Kere, U.K. 他 (1994) J. Clin. Invest. 94:79-88)、骨吸収 (Blavier, L.およびJ.M. Delaisse (1995) J. Cell Sci. 108:3649-3659)、年齢に関連する黄斑変性症 (Steen, B. 他 (1998) Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 39:2194-2200)、気腫 (Finlay, G.A. 他 (1997) Thorax 52:502-506)、心筋梗塞 (Rohde, L.E. 他 (1999) Circulation 99:3063-3070)、および拡張型心筋症 (Thomas, C.V. 他 (1998) Circulation 97:1708-1715) を含む数多くの疾病に結びつけられる。MMP阻害剤は、ラットにおいて乳癌と実験的腫瘍の転移を阻止し、マウスにおいては、ルイス肺癌、血管腫、およびヒト卵巣癌の異種移植を阻止する (Eccles, S.A. 他 (1996) Cancer Res. 56:2815-2822、Anderson 他 (1996) Cancer Res. 56:715-718、Volpert, O.V. 他 (1996) J. Clin. Invest. 98:671-679、Taraboletti, G. 他 (1995) J. Natl. Cancer Inst. 87:293-298、Davies, B. 他 (1993) Cancer Res. 53:2087-2091)。MMPはアルツハイマー病において活性である場合がある。数多くのMMPは多発性硬化症に結びつけられ、MMP阻害剤の投与により症状のいくつかを軽減できる (前出のYong 他 の概説を参照)。

20

30

【0030】

メタロエンドペプチダーゼのアスタシンファミリーが、成熟系と発生系での、ヒドラからヒトにいたる種において検出され、成長因子の活性化、ポリペプチドの分解、細胞外タンパク質のプロセッシングに關与する機能を実行する。アスタシンファミリープロテアーゼはNH₂末端シグナルおよびプロ酵素配列を付いて合成される。そして多数 (meprin、BMP1、tolloid等) はプロテアーゼドメインのカルボキシ末端に複数のドメインを含む。それらは細胞から分泌される可能性があり、或いは原形質膜に随伴する酵素である。アスタシンファミリープロテアーゼは、プロテアーゼドメインにおいてシグネチャ配列およびpentacoordinationとの固有のタイプの垂鉛結合を含み、さらにセラリシン、マトリックスメタロエンドペプチダーゼ、ヘビ毒プロテアーゼとに共通の特性を含有するプロテアーゼドメイン三次構造を持つ。アスタシン類は、インシュリンB鎖、ブラジキニン等のポリペプチド、またカゼイン、ゼラチン等のタンパク質においてペプチド結合を切断する。そしてアリアルアミダーゼ活性を有する。meprinは、そのオリゴマー構造のためにアスタシンファミリーの固有のプロテアーゼである。meprinはジスルフィドで連結した二量体の二量体であり、また接着ドメイン、上皮成長因子様ドメイン、膜貫通ドメインを有する受容体またはインテグリンの多くの特性を有する、非常にグリコシル化されたタイプI膜内在性タンパク質である。とサブユニットは差次的発現され、膜結合型と分泌型と同様に、潜在型および活性型のプロテアーゼを生成するようにプロセッシングされた。meprinは、転写

40

50

および翻訳後レベルで調節される (Bond, J.S および Beynon, R.J. (1995) *Protein Sci.* 4 :12471261)。

【 0 0 3 1 】

メタロプロテアーゼの別のファミリーはADAM (「或るディスインテグリンおよびメタロプロテアーゼドメイン: A Disintegrin And Metalloprotease Domain」から命名)で、非常に近縁のアダマリシン(ヘビ毒メタロプロテアーゼ(SVMP))とそのドメインを共有している。ADAMは、細胞表面接着分子とプロテアーゼの両方の特徴を組み合わせ、プロドメイン、プロテアーゼドメイン、ディスインテグリンドメイン、システインリッチドメイン、上皮成長因子リピート、膜貫通ドメイン、および、細胞質内尾部を含んでいる。上記した最初の3つのドメインはSVMPにも見られる。ADAMは、4つの潜在的機能をもつ。すなわち、タンパク質分解、接着、シグナル伝達、融合である。ADAM類はメトジンシン亜鉛結合配列を共有し、TIMP-1など幾つかのMMPアンタゴニストによって抑制される。

10

【 0 0 3 2 】

ADAM類は、精子と卵子の結合と融合、筋芽細胞融合、および、サイトカイン、サイトカイン受容体、接着タンパク質、その他細胞外タンパク質ドメインの、タンパク質-外部ドメインのプロセッシングや分断といったプロセスに関与すると考えられる (Schlondorff, J. および C.P. Blobel (1999) *J. Cell. Sci.* 112:3603-3617)。クズバニアン (Kuzbanian) タンパク質はNOTCH経路の基質(おそらくNOTCH自身)を切断し、ショウジョウバエの神経発達における側抑制のプログラムを活性化する。2つのADAMであるTACE (ADAM 17) とADAM 10は、脳内のアミロイド前駆体タンパク質のプロセッシングにおいて類似した役割をもつと提案されている (Schlondorff および Blobel、前出)。TACEはTNF活性化酵素としても同定されている (Black, R.A. 他(1997) *Nature* 385:729-733)。TNFは感染あるいは外傷に反応して宿主防御を起動させるのに重要な多面的サイトカインであるが、過剰になると重度の損傷を引き起こすことがあり、しばしば自己免疫疾患において過剰産生される。TACEは、膜結合型プロTNFを切断して可溶型を放出する。他のADAMは、他の膜結合型分子の同様のタイプのプロセッシングに関与している可能性がある。

20

【 0 0 3 3 】

ADAMTSサブファミリーのタンパク質は、ADAMファミリーのメタロプロテアーゼの全特徴をもち、さらに1つのトロンボスポンジンドメイン(TS)を含む。プロトタイプADAMTSがマウスで同定されており、心臓および腎臓で発現され、炎症誘発性刺激によって上方制御される (Kuno, K.他(1997) *J. Biol. Chem.* 272:556-562)。現在まで、11のメンバーがヒトゲノム解析機構 (HUGO; <http://www.gene.ucl.ac.uk/users/hester/adamts.html#Approved>) によって認識されている。このファミリーのメンバーは、軟骨に圧縮性などの重要な機械的特性をもたらし関節炎の発生時に失われる高分子量プロテオグリカンのアグリカンを分解する。したがって、アグリカンを分解する酵素は、関節軟骨の分解を阻止し遅くする魅力的な標的と考えられている (Tortorella, M.D. (1999) *Science* 284:1664-1666、Abbaszade, I. (1999) *J. Biol. Chem.* 274:23443-23450などを参照)。他のメンバーは抗血管新生の可能性 (Kuno他、前出) および/またはプロコラーゲンプロセッシング (Collige, A. 他(1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:2374) を有することが報告されている。

30

【 0 0 3 4 】

プロテアーゼインヒビター

プロテアーゼインヒビターおよびその他のプロテアーゼ活性の調節因子は、プロテアーゼの活性および効果を調節する。プロテアーゼインヒビターは、蛋白分解疾患の動物モデルにおける病因を調節すると報告された (Murphy, G. (1991) *Agents Actions Suppl.* 35 :69-76)。HIV患者において、プロテアーゼインヒビターは疾患の進行を防ぎ、死亡率を下げるのに有効であることが示されている (Barry, M. 他(1997) *Clin. Pharmacokinet.* 32:194-209)。システインプロテアーゼの低分子量インヒビターであるシスタチン濃度の低下は腫瘍の悪性進行と相関する (Calkins, C. 他(1995) *Biol. Biochem. Hoppe Seyler* 376:71-80)。プロテアーゼインヒビターのシスタチンスーパーファミリーは、直線的に配列され、直列にリピートされるジスルフィドループのパターンを特徴とする (Kellermann, J.

40

50

他(1989) J. Biol. Chem. 264:14121-14128)。シスタチンスーパーファミリーの中の新規ファミリーの代表的な構造的プロトタイプ为例が、肝臓で合成され、骨の基質、象牙質および他のミネラル化組織に選択的に集中している血漿タンパク質であるヒト 2-HS糖タンパク質(AHSG)であり(Triffitt, J.T. (1976) Calcif. Tissue Res. 22:27-33)、これはまた、fetuin(フェツイン)ファミリーに属するとしても分類されている。fetuinは、2つのN末端に位置するシステイン様リピートと、シスタチンスーパーファミリーの他のタンパク質に存在しない或る独特のC末端ドメインが存在することが特徴である(PROSITE PDOC00966)。AHSGは骨の形成と再吸収、および免疫応答に關与するとの報告がある(Yang, F. 他(1992) 1130:149-156; Lee, C.C. 他(1987) PNAS USA 84:4403-4407; Nakamura, O. 他(1999) Biosci. Biotechnol. Biochem. 63:1383-1391)。さらに、AHSGは子宮内膜症に關連する

10

【0035】

serpin(セルピン)は哺乳動物血漿セリンプロテアーゼのインヒビターである。多くのserpinが、哺乳動物における血液凝固カスケードおよび/または補体カスケードの調節に作用する。SP32は哺乳動物アクトソームプロテアーゼであるアクトシンの正の調節因子である。SP32はプロ酵素であるプロアクトシンと結合し、この酵素をアクトソームマトリックスに詰める助けをする(T. Baba他(1994) J. Biol. Chem. 269:10133-10140)。セリンプロテアーゼインヒビターのKunitzファミリーは1つ以上の「Kunitzドメイン」によって特徴づけられる。Kunitzドメインは一連のシステイン残基を含み、それらは約50個のアミノ酸残基の間隔で規則的に離れた位置にあり、3つの鎖内ジスルフィド結合を形成する。このファミリーのメンバーには、アプロチニン、組織因子経路インヒビター(TFPI-1およびTFPI-2)、インタートリプシンインヒビター(ITI)、およびビクニン(bikunin)が含まれる(Marlor, C.W. 他(1997) J. Biol. Chem. 272:12202-12208)。このファミリーのメンバーが、カリクレインおよびプラスミンなどのセリンプロテアーゼに対する強力なインヒビター(ナノモル範囲における)である。アプロチニンは、手術中の血液損失の抑制に有用である。ITIは、ヒトのトリプシン、キモトリプシン、好中球エラスターゼ、カテプシンGを不活性にすることが知られている(Morii, M. 他(1985) Biol. Chem. Hoppe Seyler 366:19-21); また、細胞外基質の生物学および慢性気管支肺疾患または肺癌の進行の病態生理において重要な役割を果たすと推測される(Cuvelier, A.他(2000) Rev. Mal. Respir. 17:437-446)。

20

30

【0036】

真核細胞内で合成される全てのタンパク質の過半数は、小胞体(ER)の細胞質ゾル表面上で合成される。これらの未熟タンパク質は、細胞の他の細胞小器官に送られるか、または分泌される前に、翻訳後修飾が行われる小胞体の内部ルーメンに輸送される必要がある。これらの修飾にはタンパク質折り畳みやジスルフィド結合形成およびN結合グリコシル化がある。

40

【0037】

タンパク質異性化酵素

ER内でのタンパク質の折り畳みは、タンパク質ジスルフィドイソメラーゼ(PDI)とペプチジル-プロリルイソメラーゼ(PPI)の2種類の主なタンパク質イソメラーゼによって補助される。PDIはシステイン残基における遊離スルフヒドリル基の酸化を触媒してタンパク質内に分子内ジスルフィド結合を形成する。オリゴペプチドおよびタンパク質における幾つかのプロリンイミド結合の異性化を触媒する酵素であるPPIは多くのタンパク質を最終的機能的な高次構造に折り畳む際の律速段階の一つを支配するとみなされる。シクロフィリ

50

ンは、元来、免疫抑制薬シクロスポリンAの主要な受容体として同定された主なクラスのPIを指す(Handschumacher, R.E. 他(1984) Science 226:544-547)。

【0038】

タンパク質のグリコシル化

タンパク質における、大部分の可溶性分泌および膜結合タンパク質の、アスパラギン残基結合寡糖類によるグリコシル化もまた、ER(小胞体)において行われる。この反応は、膜結合酵素である寡糖類転移酵素によって触媒される。この「N結合」グリコシル化の正確な目的は知られていないが、寡糖類の存在は糖タンパク質をプロテアーゼ消化に対して耐性にする傾向がある。さらに、セレクチンと呼ばれる細胞表面タンパク質に付着した寡糖類は、細胞間接着過程において作用することがわかっている (Alberts, B. 他(1994) *Molecular Biology of the Cell* Garland Publishing Co., New York, NY. 608ページ)。タンパク質の「O-結合」グリコシル化もまた、小胞内においてセリンまたはトレオニン残基のヒドロキシル基へのN-アセチルガラクトサミンの付加、次いで、他の糖残基の最初の残基への連続的付加によって生じる。この過程は、各々が特定の供与体糖ヌクレオチドおよび受容体分子に特異的である一連の糖転移酵素によって触媒される(Lodish, H. 他(1995) *Molecular Cell Biology*, W. H. Freeman and Co., New York, NY 700-708ページ)。例えばドリコール経路での糖転移酵素の1種であるドリコール燐酸マンノースシンターゼは、タンパクのNグリコシル化、Oマンノシル化、グリコシルホスファチジルイノシトール膜固着に必要である(Tomita, S. 他(1998) *J. Biol. Chem.* 9249-9254)。このように多くの場合、NおよびO-結合寡糖類は、タンパク質の分泌、または形質膜糖タンパク質の細胞表面への移動に必要であると思われる。

10

20

【0039】

更なるグリコシル化機序はERにおいて特異的にリソソーム酵素をリソソームへ向かわせ、それらの分泌を妨げる。ER(小胞体)内のリソソーム酵素は形質膜タンパクおよび分泌タンパクのようにN結合性オリゴサッカライドを受け入れるが、更に一つまたは二つのマンノース残基がリン酸化される。マンノース残基のリン酸化は二段階で生じ、最初の段階はN-アセチルグルコサミンリン酸転移酵素によるN-アセチルグルコサミンリン酸残基の付加であり、二番目はホスホジエステラーゼによるN-アセチルグルコサミン基の除去である。リン酸化されたマンノース残基は次に該リソソーム酵素をマンノース6リン酸受容体に向かわせ、該受容体が該酵素をリソソーム小胞に輸送する(前出Lodish 他、708-711ページ)。

30

【0040】

シャペロン

分子シャペロンは、未成熟タンパク質の適切な折り畳みや、不適切に折り畳まれたものの畳み直し、タンパク質サブユニット群のアセンブリ、および折り畳まれていないタンパク質の膜貫通輸送を補助するタンパク質である。シャペロンはまた、細胞が短時間高温に晒された後劇的に発現が増加される傾向があるため熱ショックタンパク質(hsp)と呼ばれている。この後者の特性は、おそらく、高温によって変性されたタンパク質は再折り畳みされる必要があるためと思われる。シャペロンはそれらの配置、機能および分子量にしたがって幾つかのクラスに分けることができ、hsp60、TCP1、hsp70、hsp40 (DnaJとも呼ばれる)およびhsp90が含まれる。例えばhsp90はステロイドホルモン受容体に結合し、リガンドの無い場合の転写を阻止し、ホルモンの存在下で受容体のリガンド結合ドメインの折り畳みを正常化する(Burston, S.G.およびA.R. Clarke (1995) *Essays Biochem.* 29:125-136)。Hsp60とhsp70シャペロンは新しく合成されたタンパク質の輸送と折り畳みを助ける。Hsp70はタンパク質の折り畳みの早期に作用し、新しく合成されたタンパク質がリボソームを離れる前に結合し、ミトコンドリアまたはERにタンパク質を輸送した後、折り畳まれたタンパク質を遊離する。hsp10とともにHsp60は誤って折り畳まれたタンパク質と結合し、タンパク質が正しく折り畳み直される機会を与える。すべてのシャペロンは不完全に折り畳まれたタンパク質上の疎水性パッチへの親和性と、ATPを加水分解する能力を共有する。ATP加水分解のエネルギーが使われ、適切に折り畳まれた状態のhsp結合タンパク質

40

50

が遊離する(前出Alberts, B.他、214、571-572ページ)。Hsp40/DnaJ相同体にはmDj3、mDj4、mDj5、mDj6、mDj7、mDj8、mDj9、mDj10、mDj11が含まれる(Ohtsuka, K.およびHata, M. (2000) Cell Stress Chaperones 5:98-112)。

【0041】

リジルヒドロキシラーゼ

リジルヒドロキシラーゼ酵素は、コラーゲン生合成に関わる。コラーゲンファミリーの線維構造タンパクは、本質的に全ての組織に見られる。コラーゲンは哺乳類では最も豊富なタンパク質で、皮膚、骨、腱、軟骨、血管、歯など結合組織の形成に必須である。コラーゲンファミリーのメンバーは互いに、コラーゲン線維間の架橋の程度と、コラーゲン線維に付着した糖質ユニット(例えばガラクトースやグルコシルガラクトース)の数で区別できる。ヒドロキシル化したリジン残基(ヒドロキシリジン)が、架橋の安定に、また糖質ユニットの付着点として必須である。

【0042】

酵素リジルヒドロキシラーゼがリジン残基のヒドロキシル化を触媒し、ヒドロキシリジンが形成される。リジルヒドロキシラーゼは、配列X-lys-gly(lysはリジン、glyはグリシン、Xは何れかのアミノ酸残基)のリジン残基を標的とする。リジルヒドロキシラーゼの3種のアイソフォームが特徴付けられており、命名はLH1(またはPLOD: プロコラーゲンリジン2-オキシグルタル酸5-ジオキシゲナーゼ)、LH2(またはPLOD2)、LH3である。3種の酵素は60%の配列同一性を全体として共有し、更に高い類似性をC末端領域に持つ。また分子の中央部の領域は、80%以上の同一性を持つ(Valtavaara, M. 他(1998) J. Biol. Chem. 273:12881-12886)。

【0043】

リジルヒドロキシラーゼ活性の減少は、数種の結合組織障害に関わる。特定の突然変異、例えばPLODの遺伝子のコード領域内の切り詰めや重複が、タイプVIエーラース・ダンロス(Ehlers-Danos)症候群患者で記述されている(Hyland, J. 他(1992) Nature Genet.2: 228-31; Hautala, T. 他(1993) Genomics 15:399-404)。

【0044】

発現プロファイル作成

マイクロアレイは、生体分析で用いられる分析ツールである。マイクロアレイは複数の分子を有し、それらは或る固体支持体の表面で空間的に分布し、その表面と安定して結合している。ポリペプチド、ポリヌクレオチド、そして/あるいは抗体のマイクロアレイが開発されており、その種々の用途には遺伝子シーケンシング、遺伝子発現のモニタリング、遺伝子マッピング、細菌同定、薬剤発見、コンビナトリアルケミストリがある。

【0045】

特にマイクロアレイの使用として見出された1つの分野は、遺伝子発現分析である。アレイ技術は、単一の多型遺伝子の発現や、多数の関連遺伝子または無関係の遺伝子の発現プロファイルを探求する、簡単な方法を提供し得る。単一遺伝子の発現を試験するときは、アレイを用いて、或る特定遺伝子又はその変異体の発現を検出する。発現プロファイルを試験するときは、アレイは次のような遺伝子を同定するプラットフォームを提供する。即ちどの遺伝子が組織特異的か、毒性アッセイにおいてテストされる物質に影響されるか、シグナル伝達カスケードの一部であるか、ハウスキーピング機能を実行するか、又は、特定の遺伝的素因や、条件、疾患、又は障害に、特異的に関連する遺伝子であるかの同定である。

【0046】

アルツハイマー病

遺伝子発現プロファイル作成の潜在的応用は特に、アルツハイマー病のような病気の診断、予後診断、および治療の向上に関わる。例えば、アルツハイマー病患者に由来の組織に発現されるレベルと配列との双方を、正常な脳組織に発現されるレベルおよび配列と比較しうる。アルツハイマー病は進行性神経変性障害であり、特徴は、アミロイドペプチドを含有する、老人斑と神経原線維変化との形成である。これらの斑は脳の辺縁皮質と連

合皮質とに見られる。海馬は大脳辺縁系の一部であり、学習と記憶において重要な役割を果たす。アルツハイマー病の患者では、蓄積する斑が、辺縁領域の神経構造を損傷し、最終的に、記憶プロセスを不自由にする。

【0047】

ステロイドホルモン

遺伝子発現プロファイル作成の潜在的応用は、治療の可能性のある化合物に対する毒性反応と治療薬剤の代謝反応の測定に関連する。例えば、ステロイドで治療する疾患とステロイド治療への代謝反応によって引き起こされる病気には、腺腫症、胆汁鬱滞、肝硬変、血管腫、アレルギー性紫斑病、肝炎、肝細胞癌、転移性癌、特発性血小板減少性紫斑病、ポルフィリン症、サルコイドーシス、ウィルソン病が含まれる。治療の可能性のある化合物に対する毒性反応と治療薬剤の代謝反応の測定が望ましい。

10

【0048】

ステロイドは、コレステロール、胆汁酸、ビタミンD、ホルモン等の脂質可溶性分子の1クラスであり、シクロペンタヒドロフェナントレン(cyclopentanoperhydrophenanthrene)に基づく共通な4リング構造を共有し、広範囲な機能を実施する。副腎皮質、卵巣、精巣によって生成されるステロイドホルモンには、グルココルチコイド、電解質コルチコイド、アンドロゲン、エストロゲンが含まれる。ステロイドホルモンは、避妊法、また怪我や関節炎、喘息、自己免疫障害等の疾患での抗炎症治療において広範囲に利用されている。天然のプロゲステンであるプロゲステロンは、無月経、異常子宮出血を治療するために、または避妊薬として主に使用される。6 α -メチル-17-ヒドロキシプロゲステロンとしても知られるメドロキシプロゲステロン(MAH)は、プロゲステロンよりも約15倍も大きな薬理学的作用を有する合成プロゲステンである。MAHは腎臓癌と子宮内膜癌、無月経、異常子宮出血および、ホルモン失調と関連する子宮内膜症の治療のために使用される。MAHは呼吸中枢刺激作用を有し、睡眠時無呼吸、慢性閉塞性肺疾患あるいは炭酸過剰症によって引き起こされる、血液の低酸素化の症例に使用されている。ベクロメタゾンは、ステロイド依存性喘息を治療、アレルギーまたは非アレルギー(血管運動性)鼻炎に付随する症状を緩和、あるいは外科的切除に続く再発性鼻ポリープを予防するために使用される合成グルココルチコイドである。ブデソニドは、アレルギー性鼻炎または喘息に付随する症状を制御するために使用されるコルチコステロイドである。デキサメタゾンは、抗炎症組成物または免疫抑制組成物において使用される合成グルココルチコイドである。プレドニゾンは肝臓で代謝されて、活性型であるプレドニゾン(抗炎症特性を有するグルココルチコイド)になる。ベタメタゾンは抗炎症作用と免疫抑制作用を有する合成グルココルチコイドであり、乾癬と、水虫や白癬等の真菌感染症を治療するために使用される。ステロイドに対する組織反応については、ステロイド化合物に曝露したあるいは治療した患者の組織で発現したレベルおよび配列の両者を、正常な治療されていない組織のレベルおよび配列と比較することによって測定され得る。

20

30

【0049】

乳癌

アレイ技術は、単一の多型遺伝子の発現や、多数の関連遺伝子または無関係の遺伝子の発現プロファイルを探求する、簡単な方法を提供し得る。単一遺伝子の発現を試験するときは、アレイを用いて、或る特定遺伝子又はその変異体の発現を検出する。発現プロファイルを試験するときは、アレイは次のような遺伝子を同定するプラットフォームを提供する。即ちどの遺伝子が組織特異的か、毒性アッセイにおいてテストされる物質に影響されるか、シグナル伝達カスケードの一部であるか、ハウスキーピング機能を実行するか、又は、特定の遺伝的素因や、条件、疾患、又は障害に、特異的に関連する遺伝子であるかの同定である。

40

【0050】

遺伝子発現プロファイル作成の潜在的応用は特に、乳癌、結腸癌、肺癌、卵巣癌、前立腺癌のような癌の診断、予後診断、および治療の向上に関わる。乳癌は米国人女性で最も頻繁に診断されるタイプの癌であり、癌死の2番目に多い要因である。乳癌を発生してい

50

る米国人女性の生涯リスクは8分の1であり、乳癌と診断されている女性の3分の1は乳癌で死亡する。ホルモン因子、遺伝因子を含む、多数の危険因子が同定されてきた。乳癌と関連する1つの遺伝子欠損が、p53、Rb、BRCA1、BRCA2等の複数の座における異型接合性の喪失(L0H)という結果となる。別の遺伝子欠損は、c-mycとc-erbB2(Her2-neu遺伝子)等の遺伝子が関与する遺伝子増幅である。ステロイドおよび成長因子経路も、乳癌において変化する。特に著しいのは、エストロゲン、プロゲステロン、上皮成長因子(EGF)経路である。乳癌の発達には複数の段階があり、これらの段階の中で前癌乳腺上皮細胞が比較的順序の決まったイベントを経て腫瘍を形成する。早期の腫瘍発達イベントとして導管過形成がある。急速な新生物成長中の細胞は次第に浸潤性の癌に進行し、肺、骨、そして潜在的には他の臓器へ転移するようになる。腫瘍進行と悪性転換との過程に影響しうる変数としては、遺伝因子、環境因子、成長因子、及びホルモンがある。

10

【0051】

結腸癌

結腸癌の発達には複数の段階があり、これらの段階の中で前癌結腸細胞が比較的順序の決まったイベントを経て腫瘍を形成する。軟組織肉腫は比較的まれであるが、同疾患と診断される新たな患者の50%以上がそれにより死亡する。肉腫の発達に導く分子経路は、疾患が稀であること病理のばらつきのため比較的未知である。腫瘍進行と悪性転換との過程に影響しうる幾つかの因子としては、遺伝因子、突然変異、及び選択がある。

【0052】

結腸直腸癌における遺伝子の改変の本質を理解するために、多くの研究は遺伝性症候群に焦点を合わせてきた。家族性大腸腺腫症(FAP)は、タンパク質の不完全または不活性化形態につながる大腸腺腫様ポリポーシス遺伝子(APC)の変異により引き起こされる。この癌抑制遺伝子は染色体5qにマップされている。遺伝性非ポリポーシス結腸直腸癌(HNPCC)は、不一致な修復遺伝子における突然変異により引き起こされる。遺伝性大腸癌の発症率は低く、大部分の結腸直腸癌は散発的であるが、遺伝性症候群の研究から理解されることが一般に適用され得る。例えば、APCの体細胞変異は散発性の結腸腫瘍の少なくとも80%で発生する。APC突然変異は疾患における開始現象であると考えられている。続いて他の変異が発生する。約50%の結腸直腸癌はras癌遺伝子における活性化突然変異を有するが、85%はp53における不活性化突然変異を有する。これらすべての遺伝子における変更は、結腸癌における遺伝子発現の変化につながる。

20

30

【0053】

肺癌

肺癌は米国における癌死亡の主要原因であり、毎年10万人以上の男性および5万人以上の女性がこの影響を受けている。肺癌と診断された患者の殆ど90%が喫煙者である。タバコの煙には暴露された気管支上皮において発癌物質代謝酵素および共有結合性DNA付加体形成を誘発する有害物質がたくさん含まれている。肺癌と診断された患者のほとんど80%においてすでに転移が生じている。大部分の肺癌は胸膜、脳、骨、心膜、および肝臓に移転する。手術、放射線療法、あるいは化学療法を行うかの決定は、腫瘍組織学、成長因子またはホルモン応答および阻害剤または薬物への感受性に基づいてなされる。現在の治療では大部分の患者が診断の一年以内に死亡する。肺癌の早期診断、および同定、病期および治療に対する系統的アプローチは患者への結果をポジティブなものにし得る。

40

【0054】

肺癌は、過形成から侵襲性癌への一連の形態学的に固有の段階を通して進行する。悪性の肺癌は四つの組織病理学的なクラスからなる2つのグループに分かれる。Non Small Cell Lung Carcinoma (NSCLC) (非小細胞肺癌)群は扁平上皮細胞癌、腺癌および大細胞癌を含み、すべての肺癌症例の約70%を占める。腺癌は通常、末梢気道に生じ、ムチン分泌腺を形成する。扁平上皮細胞癌は一般に、近位気道に発症する。扁平上皮細胞癌の組織形成は慢性炎症と、気管支上皮の損傷に関連し、扁平〔上皮〕化生につながる。肺小細胞癌(Small Cell Lung Carcinoma : SCLC)群は肺癌症例の約20%を占める。SCLCは一般的に近位の気道に発症し、副腎皮質刺激ホルモンおよび抗利尿ホルモンの不適切な産生などの多

50

くの腫瘍随伴症候群を示す。

【0055】

肺癌細胞は多くの遺伝的病変を蓄積し、その多くは、細胞学的に明らかな染色体異常を伴う。肺癌に随伴する染色体欠失の頻度が高いことはこの疾患の病因において複数の癌抑制遺伝子座の関与を示し得る。3番染色体の短腕の欠失は症例の90%以上に見られ、肺癌につながる最も早期の遺伝子病変の一つを示す。染色体の9pおよび17pの短腕における欠失もまた一般的である。その他のしばしば見られる遺伝的病変にはテロメラーゼの過剰発現、Kras やcmycなどの発癌遺伝子の活性化、またRB、 p53 および CDKN2のような癌抑制遺伝子の不活性化がある。

【0056】

肺癌において差次的に制御される遺伝子が種々の方法によって同定されている。mRNAディファレンシャルディスプレイ技術を用いて、Manda, .他 (1999; Genomics 51:5-14)は正常気管支上皮細胞に比べて肺癌細胞系に差次的に発現される5つの遺伝子を同定した。既知の遺伝子の内で、肺界面活性物質のアポプロテインAおよびアルファ2マクログロブリンは下方制御され、他方、nm23H1は上方制御される。Petersen, 他(2000; Int J. Cancer, 86:512-517)はサプレッションサブトラクティブハイブリダイゼーションを用いて、肺腫瘍由来細胞系に差次的に発現された552のクローンを同定した。その中の205は既知の遺伝子を示した。既知の遺伝子の間で、トロンボスポンジン1、フィブロネクチン、細胞間接着分子1およびサイトケラチン6と18は肺癌において差次的に発現されることが以前に観察されていた。Wang, . 他(2000; Oncogene 19:1519-1528)はマイクロアレイ解析とサブトラクティブハイブリダイゼーションを併用して正常肺上皮と比べて扁平細胞癌に差次的に過剰発現された17の遺伝子を同定した。彼らが同定した既知の遺伝子の中には、ケラチンアイソフォーム6、KOC、SPRC、IGFb2、コネキシン 26、 plakofillin 1 およびサイトケラチン 13があった。

【0057】

卵巣癌

卵巣癌は、婦人科癌死の主因である。卵巣癌の主なものは上皮細胞から由来しており、上皮卵巣癌の患者の70%は疾患の後期段階にある。結果として、この疾患の長期生存率はとても低い。卵巣癌の早期マーカーを同定できれば、生存率を大きく増加できるであろう。卵巣癌発生に関与する遺伝的変異には、p53の突然変異とマイクロサテライト不安定性が含まれる。遺伝子発現パターンは、正常な卵巣を卵巣腫瘍と比較した時おそらく異なると思われる。

【0058】

前立腺癌

前立腺癌は50歳以上の男性に多い悪性疾患であり、罹患率は年齢と共に増える。米国では毎年、約13万2千の新規診断前立腺癌症例があり、3万3千人が前立腺癌で死亡する。前立腺に癌細胞が生じると、テストステロンの刺激で、より速く成長する。したがって精巣を除去すれば、癌の急速な成長と転移との双方を、間接的に低減できる。95パーセント以上の前立腺癌は、起源が前立腺腺房の腺癌である。残る5%の分類は扁平上皮細胞癌と移行上皮細胞癌とがあり、どちらも前立腺管または前立腺の他の部位に生じる。

【0059】

ほとんどの腫瘍と同様、前立腺癌は多段階の進行を通して発達して、最終的に侵略的な腫瘍の表現型をもたらす。腫瘍進行の初めの段階には、正常な内腔および/または基底上皮細胞の過剰増殖が関係する。アンドロゲン応答性細胞は過形成し、初期段階の腫瘍に発展する。初期段階の腫瘍はしばしばアンドロゲンに対して感受性がありアンドロゲン除去療法に反応するが、アンドロゲン非依存性細胞の集団が過形成集団から発展する。これらの細胞は、浸襲性となり、また骨、脳、または肺に転移する可能性がある前立腺腫瘍のより進んだ形態を表す。多様な遺伝子が、腫瘍進行中に差次的に発現され得る。例えば、異型接合性の喪失(LOH)は前立腺癌の8番染色体短腕(8p)において頻繁に観察される。蛍光 *in situ*ハイブリダイゼーション(FISH)は、29(69%)腫瘍で8p上の少なくとも1座の削除、

10

20

30

40

50

また局在化した前立腺癌よりも進行した前立腺癌で更に著しく高い頻度で8p21.2p21.1の削除を示した。そのことは8p21.2p21.1削除が前立腺癌の進行において或る役割を果たすが、8p22p21.3での削除が腫瘍分化において重要な役割を果たすことを示唆する(Oba, K. 他 (2001) Cancer Genet. Cytogenet. 124: 2026)。

【0060】

前立腺の一次診断マーカーは前立腺特異抗原(PSA)である。PSAは組織特異的セリンプロテアーゼであり、ほぼ限定的に前立腺上皮細胞が産生する。PSA量は前立腺上皮細胞の数量と相関するので、PSAレベルは異常な前立腺成長の優れた指標である。前立腺癌男性のPSAレベルは早期に線形的に上昇した後、指数関数的に上昇し、診断がつく。しかしPSAレベルはまた炎症やアンドロゲンその他の成長因子などの因子にも影響されるので、一部の科学者は依然、PSAレベルの変化は個々の前立腺癌症例の検出に有用でないとする。

【0061】

白血球

白血球は、リンパ球、顆粒球および単球から成る。リンパ球にはT細胞およびB細胞が含まれ、外来病原体を特異的に認識し、応答する。T細胞はウイルス感染と闘い、他の白血球を活性化するが、B細胞は細菌や他の微生物を中和する抗体を分泌する。顆粒球と単球は主に、組織内の感染と闘うため血流から出る遊走細胞、食細胞である。未熟な前単球に由来する単球は、微生物や損傷したまた死んだ細胞を飲み込み消化する、マクロファージにさらに分化する。単球とマクロファージは、成長因子、サイトカイン等のシグナル分子を分泌することにより免疫反応を調節する。例えば、腫瘍壊死因子- (TNF-) は抗腫瘍活性と抗ウイルス活性を伴うマクロファージ分泌タンパク質である。さらに、他の白血球によって分泌されるシグナル伝達タンパク質により、単球とマクロファージは感染および炎症部位に集められる。単球白血球系統の分化は、培養した細胞株を用いて *in vitro* で研究し得る。例えばTHP-1は、ホルボールミリスチン酸酢酸(PMA)等のホルボールエステルとリポ多糖(LPS)両者での処理によって活性化可能なヒト前単球細胞株である。PMAは、プロテインキナーゼC依存性の経路の広範な活性化因子である。

【0062】

単球は、炎症免疫応答の開始と維持に関与する。グラム陰性細菌の外膜は、内毒素と呼ばれるリポ多糖(LPS)複合物を発現する。毒性はLPSの脂質成分(脂質A)と関連し、免疫原性はLPSの多糖成分と関連する。LPSは多様な炎症反応を誘発する。また別の(プロパージン)経路によって補体を活性化するのでしばしばグラム陰性細菌感染の病状の一部である。大部分は、細菌が分解するまで内毒素は細胞壁と会合したままである。グラム陰性細菌を溶解することにより血流中に放出されるLPSは、LPS結合タンパク質として同定される数種の血漿タンパク質により最初に結合される。LPS-結合タンパク質複合体は、単球上のCD14受容体、マクロファージ、B細胞、内皮細胞上の他のタイプの受容体と相互作用する。ヒトB細胞のLPSとの活性化は、免疫グロブリン合成の他に有糸分裂生起につながる。単球とマクロファージにおいては、LPSとの相互作用中3タイプの事象がトリガされる：1) IL-1、IL-6、IL-8、TNF-、血小板活性化因子等のサイトカインの産生、これらは炎症と敗血性ショックを仲介するプロスタグランジンとロイコトリエンの産生を刺激する、2) 補体カスケードの活性化、そして3) 凝固カスケードの活性化。

【0063】

当分野には、胃腸障害、心血管障害、自己免疫/炎症疾患、細胞増殖異常、発生・発達障害、上皮障害、神経疾患、生殖障害、内分泌障害、代謝異常、膵臓病、副腎と関連する疾患、性腺ステロイドホルモンと関連する疾患、癌、および感染症の診断、予防、および治療のための、核酸とタンパク質とを含む新規組成の必要がある。

【発明の開示】

【発明の効果】

【0064】

本発明の種々の実施態様は、総称して「PMMM」、個別にはそれぞれ「PMMM-1」、「PMMM-2」、「PMMM-3」、「PMMM-4」、「PMMM-5」、「PMMM-6」、「PMMM-7」、「PMMM-8」、「

PMMM-9」、「PMMM-10」、「PMMM-11」、「PMMM-12」、「PMMM-13」、「PMMM-14」、「PMMM-15」、「PMMM-16」、「PMMM-17」、「PMMM-18」、「PMMM-19」、「PMMM-20」、「PMMM-21」、「PMMM-22」、「PMMM-23」、「PMMM-24」、「PMMM-25」、「PMMM-26」、「PMMM-27」、「PMMM-28」、「PMMM-29」、「PMMM-30」、「PMMM-31」と呼ぶ精製されたポリペプチドである、タンパク質修飾および維持分子を提供し、またこれらタンパク質とそれらをコードするポリヌクレオチドとを用いる、疾患と病状との検出、診断、および治療の方法を提供する。幾つかの実施態様はまた、精製したタンパク質修飾および維持分子、並びに/またはそれらをコードするポリヌクレオチドを用いて創薬過程を促進する方法、例えば効力、用量、毒性、および薬理の決定の方法を提供する。関連する幾つかの実施態様は、精製したタンパク質修飾および維持分子、並びに/またはそれらをコードするポリヌクレオチドを用いて疾患と病状との病原を調査する方法を提供する。

10

【0065】

或る実施態様は、(a)SEQ ID NO:1-31からなる群から選択されたアミノ酸配列を含むポリペプチドと、(b)SEQ ID NO:1-31からなる群から選択されたアミノ酸配列と90%以上同一であるあるいは少なくとも約90%同一である天然のアミノ酸配列を含むポリペプチドと、(c)SEQ ID NO:1-31からなる群から選択されたアミノ酸配列を有するポリペプチドの生物学的活性断片と、(d)SEQ ID NO:1-31とからなる群から選択されたアミノ酸配列を有するポリペプチドの免疫原性断片とで構成される群から選択された単離したポリペプチドを提供する。別の実施態様は、SEQ ID NO:1-31のアミノ酸配列を含む単離したポリペプチドを提供する。

20

【0066】

また別の実施態様は(a)SEQ ID NO:1-31からなる群から選択した或るアミノ酸配列を持つポリペプチド、(b)SEQ ID NO:1-31からなる群から選択した或るアミノ酸配列との少なくとも90%の同一性を持つ或る天然アミノ酸配列を有するポリペプチド、(c)SEQ ID NO:1-31からなる群から選択した或るアミノ酸配列を持つポリペプチドの生物学的活性断片、または(d)SEQ ID NO:1-31からなる群から選択した或るアミノ酸配列を持つポリヌクレオチドの免疫原性断片、からなる群から選択した或るポリペプチドをコードする、単離されたポリヌクレオチドを提供する。一実施態様では、該ポリヌクレオチドは、SEQ ID NO:1-31からなる群から選択した或るポリペプチドをコードする。別の実施態様では、ポリヌクレオチドはSEQ ID NO:32-62からなる群から選択される。

30

【0067】

更に別の実施態様は、(a)SEQ ID NO:1-31からなる群から選択したアミノ酸配列を含むポリペプチド、(b)SEQ ID NO:1-31からなる群から選択したアミノ酸配列と少なくとも90%同一であるあるいは少なくとも約90%同一である天然のアミノ酸配列を含むポリペプチド、(c)SEQ ID NO:1-31からなる群から選択したアミノ酸配列を有するポリペプチドの生物学的活性断片、または(d)SEQ ID NO:1-31からなる群から選択したアミノ酸配列を有するポリペプチドの免疫原性断片、からなる群から選択されたポリペプチドをコードするポリヌクレオチドと機能的に連結したプロモーター配列を含む組換えポリヌクレオチドを提供する。別の実施態様では、本発明は組換えポリヌクレオチドを用いて形質転換した細胞を提供する。しかし別の実施態様は、組換えポリヌクレオチドを含む遺伝形質転換生物体を提供する。

40

【0068】

別の実施態様は、(a)SEQ ID NO:1-31からなる群から選択したアミノ酸配列を含むポリペプチド、(b)SEQ ID NO:1-31からなる群から選択したアミノ酸配列と少なくとも90%同一であるあるいは少なくとも約90%同一である天然のアミノ酸配列を含むポリペプチド、(c)SEQ ID NO:1-31からなる群から選択したアミノ酸配列を有するポリペプチドの生物学的活性断片、または(d)SEQ ID NO:1-31からなる群から選択したアミノ酸配列を有するポリペプチドの免疫原性断片、からなる群から選択したポリペプチドを製造する方法を提供する。製造方法は、(a)組換えポリヌクレオチドを用いて形質転換した細胞をポリペプチドの発現に適した条件下で培養する過程と、(b)そのように発現したポリペプチドを受

50

容する過程とを有し、組換えポリヌクレオチドはポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに機能的に結合したプロモーター配列を有する。

【0069】

更に別の実施様態は、(a)SEQ ID NO:1-31からなる群から選択したアミノ酸配列を含むポリペプチド、(b)SEQ ID NO:1-31からなる群から選択したアミノ酸配列と少なくとも90%同一であるあるいは少なくとも約90%同一である天然のアミノ酸配列を含むポリペプチド、(c)SEQ ID NO:1-31からなる群から選択したアミノ酸配列を有するポリペプチドの生物学的活性断片、または(d)SEQ ID NO:1-31からなる群から選択したアミノ酸配列を有するポリペプチドの免疫原性断片、から構成される群から選択されたポリペプチドに特異結合するような単離された抗体を提供する。

10

【0070】

また更に別の実施様態は、(a)SEQ ID NO:32-62からなる群から選択したポリヌクレオチド配列を持つポリヌクレオチド、(b)SEQ ID NO:32-62からなる群から選択した或るポリヌクレオチド配列との少なくとも90%の同一性を有する或る天然ポリヌクレオチド配列を持つポリヌクレオチド、(c)(a)に相補的なポリヌクレオチド、(d)(b)に相補的なポリヌクレオチド、および(e)(a)~(d)のRNA等価物、からなる群から選択した、単離されたポリヌクレオチドを提供する。別の実施様態では、ポリヌクレオチドは少なくとも20、30、40、60、80、あるいは100の連続したヌクレオチドを含むことができる。

【0071】

また別の実施様態は、サンプル中の標的ポリヌクレオチドを検出する方法を提供する。ここで標的ポリヌクレオチドは、(a)SEQ ID NO:32-62からなる群から選択したポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド、(b)SEQ ID NO:32-62からなる群から選択したポリヌクレオチド配列と少なくとも90%同一であるあるいは少なくとも約90%同一である天然のポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド、(c)(a)のポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチド、(d)(b)のポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチド、および(e)(a)~(d)のRNA等価物、からなる群から選択される。検出方法は、(a)サンプル中の上記標的ポリヌクレオチドに相補的な或る配列からなる少なくとも20の連続したヌクレオチド群からなる或るプローブを用いて該サンプルをハイブリダイズする過程と、(b)該ハイブリダイゼーション複合体の有無を検出する過程を含む。該プローブと該標的ポリヌクレオチドあるいはその断片との間でハイブリダイゼーション複合体が形成されるような条件下で、プローブは、該標的ポリヌクレオチドに対し特異的にハイブリダイズする。関連する或る実施様態では、方法にはハイブリダイゼーション複合体の量を検出することが含まれ得る。別の実施様態では、プローブは少なくとも約20、30、40、60、80、あるいは100の連続したヌクレオチドを含むことができる。

20

30

【0072】

更にまた別の実施様態は、サンプル中の標的ポリヌクレオチドを検出する方法を提供する。ここで標的ポリヌクレオチドは、(a)SEQ ID NO:32-62からなる群から選択したポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド、(b)SEQ ID NO:32-62からなる群から選択したポリヌクレオチド配列と少なくとも90%同一であるあるいは少なくとも約90%同一である天然のポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド、(c)(a)のポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチド、(d)(b)のポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチド、および(e)(a)~(d)のRNA等価物、からなる群から選択される。検出方法は、(a)ポリメラーゼ連鎖反応増幅を用いて標的ポリヌクレオチドまたはその断片を増幅する過程と、(b)増幅した標的ポリヌクレオチドまたはその断片の存在・不存在を検出する過程を含む。関連する或る実施様態では、検出方法には増幅した標的ポリヌクレオチドまたはその断片の量を検出することが含まれ得る。

40

【0073】

別の実施様態は、有効量のポリペプチドと薬剤として許容できる賦形剤とを含む成分を提供する。有効量のポリペプチドは、(a)SEQ ID NO:1-31からなる群から選択したアミノ酸配列を含むポリペプチド、(b)SEQ ID NO:1-31からなる群から選択したアミノ酸配列と

50

少なくとも90%同一であるあるいは少なくとも約90%同一である天然のアミノ酸配列を含むポリペプチド、(c)SEQ ID NO:1-31からなる群から選択したアミノ酸配列を有するポリペプチドの生物学的活性断片、または(d)SEQ ID NO:1-31からなる群から選択したアミノ酸配列を有するポリペプチドの免疫原性断片、からなる群れから選択される。一実施様態では、組成物はSEQ ID NO:1-31からなる群から選択されたアミノ酸配列を含み得る。他の実施様態は、機能的PMMMの発現の低下または異常発現に関連する疾患や症状の治療方法を提供し、そのような治療の必要な患者にこの組成物を投与することを含む。

【0074】

また別の実施様態は、(a)SEQ ID NO:1-31からなる群から選択したアミノ酸配列を含むポリペプチド、(b)SEQ ID NO:1-31からなる群から選択したアミノ酸配列と少なくとも90%同一であるあるいは少なくとも約90%同一である天然のアミノ酸配列を含むポリペプチド、(c)SEQ ID NO:1-31からなる群から選択したアミノ酸配列を有するポリペプチドの生物学的活性断片、または(d)SEQ ID NO:1-31からなる群から選択したアミノ酸配列を有するポリペプチドの免疫原性断片、からなる群から選択したポリペプチドのアゴニストとしての有効性を確認するために、或る化合物をスクリーニングする方法を提供する。スクリーニング方法は、(a)該ポリペプチドを含むサンプルを或る化合物に曝す過程と、(b)サンプル中のアゴニスト活性を検出する過程からなる。別の実施様態は、この方法で同定したアゴニスト化合物と許容される医薬用賦形剤を含む、或る組成物を提供する。また別の実施様態は、機能的PMMMの発現の低下を伴う疾患や症状の治療を要する患者への、この組成物の投与方法を提供する。

10

20

【0075】

さらにまた別の実施様態は、(a)SEQ ID NO:1-31からなる群から選択したアミノ酸配列を含むポリペプチド、(b)SEQ ID NO:1-31からなる群から選択したアミノ酸配列と少なくとも90%同一であるあるいは少なくとも約90%同一である天然のアミノ酸配列を含むポリペプチド、(c)SEQ ID NO:1-31からなる群から選択したアミノ酸配列を有するポリペプチドの生物学的活性断片、または(d)SEQ ID NO:1-31からなる群から選択したアミノ酸配列を有するポリペプチドの免疫原性断片、からなる群から選択したポリペプチドのアンタゴニストとしての有効性を確認するために、或る化合物をスクリーニングする方法を提供する。スクリーニング方法は、(a)該ポリペプチドを含むサンプルを或る化合物に曝す過程と、(b)サンプル中のアンタゴニスト活性を検出する過程からなる。別の実施様態は、この方法で同定したアンタゴニスト化合物と許容される医薬用賦形剤を含む、或る組成物を提供する。更なる別の実施様態では、本発明は、機能的PMMMの過剰発現を伴う疾患や症状の治療をする方法やそのような治療を必と要する患者へのこの組成物の投与方法を提供する。

30

【0076】

別の実施様態は、(a)SEQ ID NO:1-31からなる群から選択したアミノ酸配列を含むポリペプチド、(b)SEQ ID NO:1-31からなる群から選択したアミノ酸配列と少なくとも90%の同一性あるいは少なくとも約90%の同一性を有する天然のアミノ酸配列を含むポリペプチド、(c)SEQ ID NO:1-31からなる群から選択したアミノ酸配列を有するポリペプチドの生物学的活性断片、または(d)SEQ ID NO:1-31からなる群から選択したアミノ酸配列を有するポリペプチドの免疫原性断片を含む群から選択されたポリペプチドに特異結合する化合物をスクリーニングする方法を提供する。スクリーニング方法は、(a)ポリペプチドを適切な条件下で少なくとも1つの試験化合物と混合させる過程と、(b)試験化合物とのポリペプチドの結合を検出し、それによってポリペプチドに特異結合する化合物を同定する過程とを含む。

40

【0077】

また別の実施様態は、(a)SEQ ID NO:1-31からなる群から選択した或るアミノ酸配列を含むポリペプチド、(b)SEQ ID NO:1-31からなる群から選択したアミノ酸配列との少なくとも90%または少なくとも約90%の同一性を有する或る天然アミノ酸配列を含むポリペプチド、(c)SEQ ID NO:1-31からなる群から選択した或るアミノ酸配列を有するポリペプチ

50

ドの生物学的活性断片、および(d)SEQ ID NO:1-31からなる群から選択した或るアミノ酸配列を有するポリペプチドの免疫原性断片、からなる群から選択した或るポリペプチドの活性をモジュレートする或る化合物をスクリーニングする方法を提供する。スクリーニング方法は、(a)該ポリペプチドの活性を許容し得る条件下で、該ポリペプチドを少なくとも1つの試験化合物と混合する過程と、(b)該ポリペプチドの活性をこの試験化合物の存在下で算定する過程と、(c)この試験化合物の存在下での該ポリペプチドの活性をこの試験化合物の不存在下での該ポリペプチドの活性と比較する過程からなり、この試験化合物の存在下での該ポリペプチドの活性の変化は、該ポリペプチドの活性をモジュレートする化合物を標示する。

【0078】

更に別の実施様態は、SEQ ID NO:32-62からなる群から選択した或るポリヌクレオチド配列を含む標的ポリヌクレオチドの発現を改変する効果につき、或る化合物をスクリーニングする一方法を提供する。この方法は、(a)この標的ポリヌクレオチドを含むサンプルを或る化合物に曝露する過程と、(b)この標的ポリヌクレオチドの発現の改変を検出する過程と、(c)可変量のこの化合物の存在下でのこの標的ポリヌクレオチドの発現と、この化合物の不在下での発現とを比較する過程とからなる。

【0079】

別の実施様態は、試験化合物の毒性の算定方法を提供する。この方法には、以下の過程がある。(a)核酸を有する生体サンプルを試験化合物で処理する過程、(b)処理済み生体サンプルの核酸をハイブリダイズする過程。この過程には、次のようなプローブを用いる。(i)SEQ ID NO:20-62からなる群から選択した或るポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド、(ii)SEQ ID NO:32-62からなる群から選択した或るポリヌクレオチド配列との少なくとも90%の同一であるあるいは少なくとも約90%同一である天然ポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド、(iii)(i)に相補的な配列を有するポリヌクレオチド、(iv)(i)のポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチド、(v)(i)~(iv)のRNA等価物、からなる群から選択した或るポリヌクレオチドの少なくとも32の連続したヌクレオチド群からなるプローブである。ハイブリダイゼーションは、上記プローブと生体サンプル中の標的ポリヌクレオチドとの間に特異的ハイブリダイゼーション複合体が形成されるような条件下で生じる。上記標的ポリヌクレオチドは、(i)SEQ ID NO:32-62からなる群から選択した或るポリヌクレオチド配列を持つポリヌクレオチド、(ii)SEQ ID NO:32-62からなる群から選択した或るポリヌクレオチド配列との少なくとも90%または少なくとも約90%の同一性を有する天然ポリヌクレオチド配列を持つポリヌクレオチド、(iii)(i)のポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチド、(iv)(ii)のポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチド、(v)(i)~(iv)のRNA等価物、からなる群から選択する。あるいは標的ポリヌクレオチドは、上記(i)~(v)からなる群から選択したポリヌクレオチド配列の断片を持つ場合がある。毒性の算定方法には更に、以下の過程がある。(c)ハイブリダイゼーション複合体の量を定量する過程と、(d)処理済み生体サンプル中のハイブリダイゼーション複合体の量を、非処理の生体サンプル中のハイブリダイゼーション複合体の量と比較する過程である。処理済み生体サンプル中のハイブリダイゼーション複合体の量の差異が、試験化合物の毒性を示す。

【発明を実施するための最良の形態】

【0080】

(本発明の記載について)

タンパク質、核酸および方法について説明するが、その前に、説明した特定の装置、機器、材料および方法に本発明の実施様態が限定されるものではなく、変更され得ることを理解されたい。また、ここで使用する専門用語は特定の実施様態を説明する目的で用いたものであり、本発明の範囲を限定することを意図したものではないことも併せて理解されたい。

【0081】

補足請求および明細書中で用いている単数形の「或る」および「その(この)」の表記

10

20

30

40

50

は、文脈から明らかにそうでないとされる場合を除いて複数のものを指す場合もあることに注意されたい。したがって、例えば「或る宿主細胞」と記されている場合にはそのような宿主細胞が複数あることもあり、「或る抗体」と記されている場合には1個以上の抗体、および、当業者に公知の抗体の等価物などについても言及している。

【0082】

本明細書中で用いる全ての技術用語および科学用語は、特に定義されている場合を除き、当業者に一般に理解されている意味と同じ意味を有する。本明細書で説明するものと類似あるいは同等の任意の装置、材料および方法を用いて本発明の実施または試験を行うことができるが、ここでは好適な装置、材料、方法について説明する。本発明で言及する全ての刊行物は、刊行物中で報告されていて且つ本発明の実施様態に関係して用い得る、細胞株、プロトコル、試薬およびベクターについて説明および開示する目的で引用しているものである。本明細書のいかなる開示内容も、本発明が先行技術の効力によってこのような開示に対して先行する権利を与えられていないことを認めるものではない。

10

【0083】

(定義)

用語「PMMM」は、天然、合成、半合成或いは組換え体など全ての種(特にウシ、ヒツジ、ブタ、マウス、ウマ及びヒトを含む哺乳動物)から得られる実質的に精製されたPMMMのアミノ酸配列を指す。

【0084】

用語「アゴニスト」は、PMMMの生物学的活性を強めたり、模倣する分子を指す。このアゴニストは、PMMMに直接相互作用するか、或いはPMMMが関与する生物学的経路の成分と作用して、LMEの活性を調節するタンパク質、核酸、糖質、小分子、任意の他の化合物や組成物を含み得る。

20

【0085】

用語「対立遺伝子変異配列」は、PMMMSをコードする遺伝子の別の形を指す。対立遺伝子変異体は、核酸配列における少なくとも1つの突然変異から作製し得る。また、変容したmRNAまたはポリペプチドを作製し得る。その構造または機能は、変容することもしないこともある。或る遺伝子は、その天然型の対立遺伝子変異体を全く持たない場合もあり、1個以上持つこともある。対立遺伝子変異体を生じさせる通常の突然変異性変化は一般に、ヌクレオチドの自然な欠失、付加または置換に帰するものである。これら各変化は、単独或いは他の変化と共に、所定の配列内で1回若しくは数回生じ得る。

30

【0086】

PMMMをコードする「変異」核酸配列は、様々なヌクレオチドの欠失、挿入、或いは置換が起こっても、PMMMと同じポリペプチド或いはPMMMの機能特性の少なくとも1つを備えるポリペプチドを指す。この定義には、PMMMをコードするポリヌクレオチドの正常な染色体の遺伝子座ではない位置での対立遺伝子変異配列との不適當或いは予期しないハイブリダイゼーション、並びにPMMMをコードするポリヌクレオチドの特定のオリゴヌクレオチドプローブを用いて容易に検出可能な或いは検出困難な多型性を含む。コードされたタンパク質も変異され得り、サイレント変化を生じPMMMと機能的に等価となるアミノ酸残基の欠失、挿入、或いは置換を含み得る。意図的なアミノ酸置換は、生物学的或いは免疫学的にPMMMの活性が保持される範囲で、残基の、極性、電荷、溶解度、疎水性、親水性、及び/または両親媒性、についての1つ以上の類似性に基づいて成され得る。例えば、負に帯電したアミノ酸にはアスパラギン酸およびグルタミン酸があり、正に帯電したアミノ酸にはリジンおよびアルギニンがある。親水性値が近似した非荷電極性側鎖を持つアミノ酸としては、アスパラギンとグルタミン、およびセリンとトレオニンを含みうる。親水性値が近似した非荷電側鎖を持つアミノ酸としては、ロイシンとイソロイシンとバリン、グリシンとアラニン、およびフェニルアラニンとチロシンを含みうる。

40

【0087】

用語「アミノ酸」および「アミノ酸配列」は、オリゴペプチド、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質配列、あるいはそれらのいずれかの断片を指し、天然分子または合成分子

50

を指し得る。ここで「アミノ酸配列」は天然のタンパク質分子のアミノ酸配列を指すものであり、「アミノ酸配列」及び類似の語は、アミノ酸配列を、列挙したタンパク質分子に関連する完全な本来のアミノ酸配列に限定しようとするものではない。

【0088】

「増幅」は、或る核酸配列の付加的複製物を作製する行為に関する。増幅は、ポリメラーゼ連鎖反応法（PCR）技術または当分野でよく知られている他の核酸増幅技術を用いて実行される。

【0089】

用語「アンタゴニスト」は、PMMMの生物学的活性を阻害或いは減弱する分子である。アンタゴニストは、PMMMに直接相互作用するか、或いはPMMMが関与する生物学的経路の成分と作用して、PMMMの活性を調節する抗体、anticalin、核酸、糖質、小分子、任意の他の化合物や組成物などのタンパク質を含み得る。 10

【0090】

「抗体」の語は、抗原決定基と結合することができる、無傷の免疫グロブリン分子やその断片、例えばFab₁、F(ab')₂及びFv断片を指す。PMMMポリペプチドと結合する抗体は、抗体を免疫する小ペプチドを含む無傷の分子またはその断片を用いて作製可能である。動物（マウス、ラット、ウサギ等）を免疫化するために用いるポリペプチドまたはオリゴペプチドは、RNAの翻訳、または化学合成によって得られるポリペプチドまたはオリゴペプチドに由来し得るもので、所望によりキャリアタンパク質に抱合することも可能である。通常用いられるキャリアであってペプチドと化学結合するものは、ウシ血清アルブミン、サイログロブリン及びスカシガイのヘモシアニン（KLH）等がある。結合その結合ペプチドは、動物を免疫化するために用いる。 20

【0091】

「抗原決定基」の語は、特定の抗体と接触する、分子の領域（即ちエピトープ）を指す。タンパク質またはタンパク質断片を用いて宿主動物を免疫化する場合、タンパク質の多数の領域が、抗原決定基（タンパク質の特定の領域または3次元構造）に特異結合する抗体の産生を誘発し得る。抗原決定基は、抗体への結合において無損傷抗原（即ち免疫応答を誘発するために用いられる免疫原）と競合し得る。

【0092】

用語「アプタマー」は、特定の分子標的に結合する核酸またはオリゴヌクレオチドを指す。アプタマーは*in vitro*での進化プロセスに由来する（例えば、SELEX(Systematic Evolution of Ligands by EXponential Enrichmentの略、試験管内選択法)、米国特許第5,270,163号に記述)。これは、大規模な組合せライブラリ群から標的特異的アプタマー配列を選択するプロセスである。アプタマーの構成は二本鎖または一本鎖であり、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド、ヌクレオチド誘導體または他のヌクレオチド様分子を含み得る。アプタマーのヌクレオチド構成要素は修飾された糖基（例えば、リボヌクレオチドの2'-OH基が2'-Fまたは2'-NH₂で置換されている）を有することが可能で、これらの糖基は、例えば、ヌクレアーゼに対する耐性あるいは血中でのより長い寿命など、望む性質を改善しうる。循環系からアプタマーが除去される速度を遅くするために、アプタマーを高分子量キャリア等の分子に抱合させることができる。アプタマーは、たとえば架橋剤の光活性化によって各々のリガンドと特異的に架橋させることができる（Brody, E.N. および L. Gold (2000) J. Biotechnol. 74:5-13)。 30 40

【0093】

「intramer」の用語は*in vivo*で発現されるアプタマーを意味する例えば、ワクシニアウイルスに基づく或るRNA発現系を用いて、白血球の細胞質内で特定のRNAアプタマー類が高レベルに発現されている（Blind, M.他(1999) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:3606-3610)。

【0094】

「スピーゲルマー（spiegelmer）」の語はL-DNA、L-RNAその他の左旋性ヌクレオチド誘導體またはヌクレオチド様分子を含むアプタマーを指す。左旋性ヌクレオチドを 50

含むアプタマーは、右旋性のヌクレオチドを含む基質に通常作用する天然の酵素による分解に耐性がある。

【0095】

用語「アンチセンス」は、或る特定の核酸配列を有するポリヌクレオチドの「センス」（コーディング）鎖との塩基対を形成し得る任意の組成物を指す。アンチセンス組成物としては、DNAや、RNAや、ペプチド核酸（PNA）や、修飾されたバックボーン連結たとえばホスホロチオ酸、メチルホスホン酸またはベンジルホスホン酸などを有するオリゴヌクレオチドや、修飾された糖基たとえば2'-メトキシエチル糖または2'-メトキシエトキシ糖などを有するオリゴヌクレオチドや、あるいは修飾された塩基たとえば5-メチルシトシン、2-デオキシウラシルまたは7-デアザ-2'-デオキシグアノシンなどを有するオリゴヌクレオチドがあり得る。アンチセンス分子は、化学合成または転写など、任意の方法で製造することができる。相補的アンチセンス分子は、細胞に導入されると、細胞が産生した天然核酸配列との塩基対を形成し、二重鎖を形成して転写または翻訳を妨害する。「負」または「マイナス」という表現は、ある参考DNA分子のアンチセンス鎖を意味し、「正」または「プラス」という表現は、ある参考DNA分子のセンス鎖を意味する。

10

【0096】

「生物学的に活性」の語は、天然分子の構造的機能、調節機能または生化学的機能を有するタンパク質を指す。同様に、用語「免疫学的に活性」または「免疫原性」は、天然或いは組換え体のPMHM、合成のPMHMまたはそれらの任意のオリゴペプチドが、適当な動物或いは細胞の特定の免疫応答を誘発して特定の抗体と結合する能力を指す。

20

【0097】

「相補(的)」または「相補性」の語は、塩基対形成によってアニーリングする2つの一本鎖核酸の間を指す。例えば、配列「5'A-G-T3'」は、相補配列「3'T-C-A5'」と対を形成する。

【0098】

「～のポリヌクレオチドを含む(持つ)組成物」または「～のポリペプチドを含む(持つ)組成物」は、所定のポリヌクレオチド配列若しくはポリペプチドを持つ、任意の組成物を指す。この組成物には、乾燥製剤または水溶液が含まれ得る。PMHM若しくはPMHMの断片をコードするポリヌクレオチドを含む組成物は、ハイブリダイゼーションプローブとして使用され得る。これらプローブは、凍結乾燥形態で貯蔵でき、また、糖質などの安定化剤と結合させ得る。ハイブリダイゼーションにおいては、塩(例えばNaCl)、界面活性剤(例えばドデシル硫酸ナトリウム; SDS)及びその他の構成要素(例えばデンハート液、粉乳、サケの精子のDNA等)を含む水溶液中にプローブを分散させることができる。

30

【0099】

「コンセンサス配列」は、不要な塩基を分離するためにDNA配列の解析を繰り返し行い、XL-PCRキット(Applied Biosystems, Foster City CA)を用いて5'及び/または3'の方向に伸長され、再度シーケンシングされた核酸配列、またはGELVIEW断片アセンブリシステム(Accelrys, Burlington MA)、あるいはPhrap(University of Washington, Seattle WA)等の断片アセンブリ用のコンピュータプログラムを用いて1つ或いはそれ以上の重複するcDNAやEST、またはゲノムDNA断片からアセンブリされた核酸配列を指す。伸長及びアセンブリの両方を行ってコンセンサス配列を作製する配列もある。

40

【0100】

「保存的なアミノ酸置換」は、置換がなされた時に元のタンパク質の特性を殆ど損なわないと予測されるような置換、即ちタンパク質の構造と特に機能が保存され、そのような置換による大きな変化がない置換を指す。下表は、タンパク質中で元のアミノ酸と置換可能で、保存アミノ酸置換と認められるアミノ酸を示している。

元の残基	保存的な置換	
Ala	Gly, Ser	
Arg	His, Lys	
Asn	Asp, Gln, His	
Asp	Asn, Glu	
Cys	Ala, Ser	
Gln	Asn, Glu, His	
Glu	Asp, Gln, His	
Gly	Ala	
His	Asn, Arg, Gln, Glu	10
Ile	Leu, Val	
Leu	Ile, Val	
Lys	Arg, Gln, Glu	
Met	Leu, Ile	
Phe	His, Met, Leu, Trp, Tyr	
Ser	Cys, Thr	
Thr	Ser, Val	
Trp	Phe, Tyr	
Tyr	His, Phe, Trp	20
Val	Ile, Leu, Thr	

【0101】

保存アミノ酸置換では通常、(a)置換領域におけるポリペプチドのバックボーン構造、例えば シートや 螺旋構造、(b)置換部位における分子の電荷または疎水性、及び/または(c)側鎖の大部分を保持する。

【0102】

「欠失」は、結果的に1個若しくは数個のアミノ酸残基またはヌクレオチドが失われてなくなるようなアミノ酸またはヌクレオチド配列における変化を指す。

30

【0103】

「誘導体」の語は、ポリペプチドまたはポリヌクレオチドの化学修飾を指す。例えば、アルキル基、アシル基、ヒドロキシル基またはアミノ基による水素の置換は、ポリヌクレオチドの化学修飾に含まれ得る。ポリヌクレオチド誘導体は、天然分子の生物学的または免疫学的機能を少なくとも1つは保持しているポリペプチドをコードする。ポリペプチド誘導体は、グリコシル化、ポリエチレングリコール化(pegylation)、或いは任意の同様なプロセスであって誘導起源のポリペプチドの、少なくとも1つの生物学的若しくは免疫学的機能を保持するプロセスによって修飾されたポリペプチドである。

【0104】

「検出可能な標識」は、測定可能なシグナルを生成することができ、ポリヌクレオチドまたはポリペプチドに共有結合または非共有結合するようなレポーター分子または酵素を指す。

40

【0105】

「差次的発現」は少なくとも2つの異なったサンプルを比較することによって決められる、増加(上方調節)、あるいは減少(下方調節)、または遺伝子発現またはタンパク発現の欠損を指す。このような比較は例えば、処理済サンプルと不処理サンプル、または病態サンプルと健常サンプルとの間で行われ得る。

【0106】

「エキソンシャフリング」は、異なるコード領域(エキソン)の組換えを意味する。1つのエキソンはコードされるタンパク質の1つの構造的または機能的ドメインを代表し得

50

るため、安定したサブストラクチャー群の新たな組み合わせによって、新しいタンパク質がアセンブリされることが可能であり、新しいタンパク質機能の進化を促進できる。

【0107】

用語「断片」は、PMMMの又はPMMMをコードするポリヌクレオチドの固有の部分であって、その親配列 (parent sequence) と配列は同一であり得るが親配列より長さが短いものを指す。或る断片は、定義された配列の全長から1ヌクレオチド/アミノ酸残基を差し引いた長さよりも短い長さを有し得る。例えば或る断片は、約5~約1000の連続したヌクレオチドまたはアミノ酸残基を有し得る。プローブ、プライマー、抗原、治療用分子として、或いはその他の目的のために用いられる断片は、少なくとも5、10、15、16、20、25、30、40、50、60、75、100、150、250若しくは500の連続したヌクレオチド或いはアミノ酸残基長さであり得る。断片は、或る分子の特定領域から優先的に選択し得る。例えば、或るポリペプチド断片は、定義された或る配列内に見られるような或るポリペプチドの最初の250または500アミノ酸 (または最初の25%または50%) から選択した、或る長さの連続したアミノ酸を持ち得る。これらの長さは明らかに例として挙げているものであり、本発明の実施態様では、配列表、表および図面を含む本明細書が支持する任意の長さであり得る。

10

【0108】

SEQ ID NO:32-62の断片は、例えば、この断片を得たゲノム内の他の配列とは異なる、SEQ ID NO:32-62を特異的に同定する固有のポリヌクレオチド配列の領域を持ちうる。SEQ ID NO:32-62のある断片は、本発明の例えば、ハイブリダイゼーションや増幅技術の1つ以上の実施態様、またはSEQ ID NO:32-62を関連ポリヌクレオチドから区別する類似の方法に有用である。SEQ ID NO:32-62の断片の正確な長さ及び断片に対応するSEQ ID NO:32-62の領域は、断片に対する意図した目的に基づき当業者が慣例的に決定することが可能である。

20

【0109】

SEQ ID NO:1-31の断片はSEQ ID NO:32-62の断片によってコードされている。SEQ ID NO:1-31の断片はSEQ ID NO:1-31を特異的に同定する固有のアミノ酸配列の領域を含む。例えば、SEQ ID NO:1-31の断片は、SEQ ID NO:1-31を特異認識する抗体を産出するための免疫原性ペプチドとして有用である。SEQ ID NO:1-31の断片および断片に対応するSEQ ID NO:1-31の領域の正確な長さは、断片に対する意図した目的に基づき、本明細書に記載されている、あるいは当分野で知られている1つ以上の分析方法を用いて当業者が慣例的に決定することが可能である。

30

【0110】

「完全長」ポリヌクレオチドとは、少なくとも1つの翻訳開始コドン (例えばメチオニン) と、それに続く1オープンリーディングフレームおよび翻訳終止コドンを有する配列である。或る「完全長」ポリヌクレオチド配列は、或る「完全長」ポリペプチド配列をコードする。

【0111】

「相同性」の語は、2つ以上のポリヌクレオチド配列または2つ以上のポリペプチド配列の配列類似性、二者択一性、または配列同一性を意味する。

40

【0112】

ポリヌクレオチド配列に適用される「一致率」または「~%同一」の語は、標準化されたアルゴリズムを用いてアラインメントされた少なくとも2つ以上のポリヌクレオチド配列間で一致する同一残基の割合を意味する。標準化アルゴリズムは、2配列間のアラインメントを最適化するため、標準化された再現性のある方法で比較対象の2配列内にギャップ群を挿入し得るので、2つの配列をより有意に比較できる。

【0113】

ポリヌクレオチド配列間の一致率は、当分野で知られているあるいは本明細書に記載されている1つ以上のコンピュータアルゴリズムまたはプログラムを用いて決定し得る。例えば、一致率は、MEGALIGN version 3.12e配列アラインメントプログラムに組込まれてい

50

るようなCLUSTAL Vアルゴリズムのデフォルトのパラメータを用いて決定できる。このプログラムは、LASERGENE ソフトウェアパッケージ(一組の分子生物学的分析プログラム)(D NASTAR, Madison WI)の一部である。CLUSTAL Vは、Higgins, D.G.およびP.M. Sharp (1989; CABIOS 5:151-153)、並びにHiggins, D.G. 他(1992; CABIOS 8:189-191)に記載がある。ポリヌクレオチド配列を2つ1組でアラインメントする際のデフォルトパラメータは、Ktuple=2、gap penalty=5、window=4、「diagonals saved」=4と設定する。デフォルトとして「重みづけされた」残基の重みづけ表を選択する。

【0114】

あるいは、米国国立バイオテクノロジー情報センター(NCBI)のBasic Local Alignment Search Tool(BLAST)が、一般的に用いられ、且つ、無料で利用可能な用い得る配列比較アルゴリズム一式を提供している(Altschul, S.F. 他(1990) J. Mol. Biol. 215:403-410)。BLASTアルゴリズムは、幾つかの情報源から入手可能であり、メリーランド州ベセスダにあるNCBIおよびインターネット(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)からも入手可能である。BLASTソフトウェア一式には様々な配列分析プログラムが含まれており、既知のポリヌクレオチド配列を種々のデータベースから得た別のポリヌクレオチド配列とアラインメントする「blastn」もその1つである。その他にも、2つのヌクレオチド配列をペアワイズで直接比較するために用いる「BLAST 2 Sequences」と称されるツールも利用可能である。「BLAST 2 Sequences」は、<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/bl2.html>にアクセスして、対話形式で利用ができる。「BLAST 2 Sequences」ツールは、blastn 及び blastp(以下に記載)の両方に用いることができる。BLASTプログラムは、一般的には、ギャップ及び他のパラメータをデフォルト設定に設定して用いる。例えば、2つのヌクレオチド配列を比較するには、デフォルトパラメータに設定した「BLAST 2 Sequences」ツールVersion 2.0.12(2000年4月21日)を用いてblastnを実行し得る。デフォルトパラメータの設定例を以下に示す。

【0115】

```
Matrix: BLOSUM62
Reward for match: 1
Penalty for mismatch: -2
Open Gap: 5 and Extension Gap: 2 penalties
Gap x drop-off: 50
Expect: 10
Word Size: 11
Filter: on
```

【0116】

一致率は、ある定義された配列の全長(例えば特定のSEQ IDナンバーで定義された配列)について測定し得る。或いは、より短い長さ、例えば、定義された、より大きな配列から得られた断片(例えば少なくとも20、30、40、50、70、100または200の連続したヌクレオチドの断片)の長さについて一致率を測定してもよい。ここに挙げた長さは単なる例示的なものに過ぎず、表、図および配列リストを含めた本明細書に記載された配列が支持する任意の断片長を用いて、一致率を測定し得る或る長さを説明し得ることを理解されたい。

【0117】

高度の同一性を示さない核酸配列が、それにもかかわらず遺伝子コードの縮重が原因で、類似のアミノ酸配列をコードする場合がある。この縮重を利用して核酸配列内で変化を生じさせて、全ての核酸配列が実質上同一のタンパク質をコードするような多数の核酸配列を生成し得ることを理解されたい。

【0118】

ポリペプチド配列に用いられる用語「一致率」または「~%同一」とは、標準化されたアルゴリズムを用いてアラインメントされる2つ以上のポリペプチド配列間の一致する同一残基の百分率のことである。ポリペプチド配列アラインメントの方法は公知である。保

10

20

30

40

50

存的アミノ酸置換を考慮するアラインメント方法もある。既に詳述したこのような保存的置換は通常、置換部位の電荷および疎水性を保存するので、ポリペプチドの構造を(したがって機能も)保存する。ポリペプチド配列に用いられる用語「類似率」または「~%類似」とは、一致する同一残基と保存的置換を含む標準化されたアルゴリズムを用いてアラインメントされる2つ以上のポリペプチド配列間の一致する残基の百分率のことである。対照的に、保存的置換はポリペプチド配列間の一致率の計算には含まれない。

【0119】

ポリペプチド配列間の一致率は、MEGALIGN version 3.12e配列アラインメントプログラムに組み込まれているようなCLUSTAL Vアルゴリズムのデフォルトのパラメータを用いて決定できる(既に説明したのでそれを参照されたい)。CLUSTAL Vを用いて、ポリペプチド配列をペアワイズアラインメントする際のデフォルトパラメータは、Ktuple=1、gap penalty=3、window=5、「diagonals saved」=5と設定される。PAM250マトリクスが、デフォルトの残基重み付け表として選択される。

10

【0120】

或いは、NCBI BLASTソフトウェア一式を用いてもよい。例えば、2つのポリペプチド配列をペアワイズで比較する場合、「BLAST 2 Sequences」ツールVersion 2.0.12(2000年4月21日)のblastpをデフォルトパラメータに設定して用い得る。デフォルトパラメータの設定例を以下に示す。

【0121】

Matrix: BLOSUM62
Open Gap: 11 and Extension Gap: 1 penalties
Gap x drop-off: 50
Expect: 10
Word Size: 3
Filter: on

20

【0122】

一致率は、ある定義されたポリペプチド配列の全長(例えば特定のSEQ IDナンバーで定義された配列)について測定し得る。或いは、より短い長さ、例えば、定義された、より大きなポリペプチド配列から得られた断片(例えば少なくとも15、20、30、40、50、70、または150の連続した残基の断片)の長さについて一致率を測定してもよい。ここに挙げた長さは単なる例示的なものに過ぎず、表、図および配列リストを含めた本明細書に記載された配列が支持する任意の断片長を用いて、一致率を測定し得る或る長さを説明し得ることを理解されたい。

30

【0123】

「ヒト人工染色体(HAC)」は、約6 kb(キロベース)~10 MbのサイズのDNA配列を含み得る、染色体の複製、分離及び維持に必要な全ての要素を含む直鎖状の微小染色体である。

【0124】

用語「ヒト化抗体」は、もとの結合能力を保持しつつよりヒトの抗体に似せるために、非抗原結合領域のアミノ酸配列が変えられた抗体分子を指す。

40

【0125】

「ハイブリダイゼーション」とは、所定のハイブリダイゼーション条件下で、ある一本鎖ポリヌクレオチドがある相補的な一本鎖と塩基対を形成するアニーリングのプロセスである。特異的ハイブリダイゼーションは、2つの核酸配列が高い相補性を共有することの指標である。特異的ハイブリダイゼーション複合体は許容されるアニーリング条件下で形成され、1回以上の「洗浄」ステップ後もハイブリダイズされたままである。洗浄ステップは、ハイブリダイゼーションプロセスのストリンジェンシーを決定する際に特に重要であり、よりストリンジェントな条件では、非特異結合(すなわち完全には一致しない核酸鎖対間の結合)が減少する。核酸配列のアニーリングに対する許容条件は、当業者が慣例的に決定できる。許容条件は、どのハイブリダイゼーション実験でも一定でありうるが、

50

洗浄条件は所望のストリンジェンシーを得るように、従ってハイブリダイゼーション特異性も得るように実験によって変更することができる。アニーリングが許容される条件は、例えば、温度が68で、約6×SSC、約1% (w/v) のSDS、並びに約100 µg/mlのせん断して変性したサケ精子DNAが含まれる。

【0126】

一般に、ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーは或る程度、洗浄ステップを実行する温度を基準にして表すことができる。このような洗浄温度は通常、所定のイオン強度及びpHにおける特定の配列の融点(T_m)より約5~20低くなるように選択する。このT_mは、所定のイオン強度及びpHの下で、完全に一致するプローブに標的配列の50%がハイブリダイズする温度である。T_mを計算する式および核酸のハイブリダイゼーション条件はよく知られており、Sambrook, J.およびD.W. Russell (2001; Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第3版, 1-3巻, Cold Spring Harbor NYに記載されており、特に9章を参照されたい。

10

【0127】

本発明のポリヌクレオチド間の高いストリンジェンシーのハイブリダイゼーションでは、約0.2×SSC及び約0.1%のSDSの存在の下、約68で1時間の洗浄過程を含む。別法では、約65、60、55、または42の温度で行う。SSC濃度は、約0.1%のSDS存在下で、約0.1~2×SSCの範囲で変化し得る。通常は、ブロッキング剤を用いて非特異ハイブリダイゼーションを阻止する。このようなブロッキング剤には、例えば、約100~200 µg/mlのせん断して変性サケ精子DNAがある。特定条件下で、例えばRNAとDNAのハイブリダイゼーションでは、有機溶剤、例えば約35~50% v/vの濃度のホルムアミドを用いることもできる。洗浄条件の有用なバリエーションは、当業者には自明であろう。ハイブリダイゼーションは、特に高ストリンジェント条件下では、ヌクレオチド間の進化的な類似性を示唆し得る。進化的類似性は、ヌクレオチド群、およびヌクレオチドがコードするポリペプチド群について、或る同様の役割を強く示唆する。

20

【0128】

用語「ハイブリダイゼーション複合体」は、相補的な塩基間の水素結合の形成によって形成された、2つの核酸配列の複合体を指す。ハイブリダイゼーション複合体は、溶解状態で形成し得る(C₀tまたはR₀t解析など)。あるいは、一方の核酸が溶解状態で存在し、もう一方の核酸が固体支持体(例えば紙、膜、フィルタ、チップ、ピンまたはガラススライド、あるいは他の適切な基板であって細胞若しくはその核酸が固定される基板)に固定されているような2つの核酸間に形成され得る。

30

【0129】

用語「挿入」或いは「付加」は、1個以上のアミノ酸残基或いはヌクレオチドがそれぞれ追加されるアミノ酸配列或いはポリヌクレオチド配列の変化を指す。

【0130】

「免疫応答」は、炎症、外傷、免疫異常症、伝染性疾患または遺伝性疾患に関連する症状を指し得る。これらの症状は、細胞及び全身の防御系に作用し得る種々の因子、例えばサイトカイン、ケモカイン、その他のシグナル伝達分子の発現によって特徴づけることができる。

40

【0131】

「免疫抗原性断片」とは、哺乳動物等の生命体に導入されると免疫応答を誘発し得るようなPMMMのポリペプチドまたはオリゴペプチド断片である。「免疫抗原性断片」の語には、本明細書中で開示したような或いは当分野で既知であるような任意の抗体産出方法において有用なPMMMの任意のポリペプチドまたはオリゴペプチド断片も含まれる。

【0132】

用語「マイクロアレイ」は、基板上の複数のポリヌクレオチド、ポリペプチド、抗体またはその他の化合物の構成を指す。

【0133】

用語「エレメント」または「アレイエレメント」は、マイクロアレイ上に固有の指定さ

50

れた位置を有する、ポリヌクレオチド、ポリペプチド、抗体またはその他の化合物を指す。

【0134】

用語「調節」は、PMMMの活性の変化を指す。例えば、調節によって、PMMMのタンパク質活性、或いは結合特性、またはその他の生物学的特性、機能的特性或いは免疫学的特性の変化が起こる。

【0135】

「核酸」および「核酸配列」の語は、ヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチドまたはこれらの断片を指す。「核酸」および「核酸配列」の語はまた、ゲノム起源または合成起源のDNAまたはRNAであって一本鎖または二本鎖であるかあるいはセンス鎖またはアンチセンス鎖を表し得るようなDNAまたはRNAや、ペプチド核酸(PNA)や、任意のDNA様またはRNA様物質を指すこともある。

10

【0136】

「機能的に連結した」は、第1の核酸配列と第2の核酸配列が機能的な関係にある状態を指す。例えば、或るプロモーターが或るコード配列の転写または発現に影響を及ぼす場合には、そのプロモーターはそのコード配列に機能的に連結している。機能的に連結したDNA配列群は非常に近接するか連続的に隣接することがあり、また、2つのタンパク質コード領域を結合するために必要な場合は同一リーディングフレーム内にあり得る。

【0137】

「ペプチド核酸(PNA)」は、末端がリジンで終わるアミノ酸残基のペプチドのバックボーンに結合した、少なくとも約5ヌクレオチドの長さのオリゴヌクレオチドを含む、アンチセンス分子または抗遺伝子剤を指す。末端のリジンは、この組成に溶解性を与える。PNAは、相補的一本鎖DNAまたはRNAに優先的に結合して転写の伸長を停止するものであり、ポリエチレングリコール化して細胞におけるPNAの寿命を延長し得る。

20

【0138】

PMMMの「翻訳後修飾」には、脂質化、グリコシル化、リン酸化、アセチル化、ラセミ化、蛋白分解性切断及びその他の当分野で既知の修飾を含まれ得る。これらのプロセスは、合成或いは生化学的に生じ得る。生化学的修飾は、PMMMの酵素環境に依存し、細胞の種類によって異なり得る。

【0139】

「プローブ」とは、核酸の内、PMMMやそれらの相補配列、またはそれらの断片をコードし、同一や対立遺伝子核酸、または関連する核酸の検出に用いる核酸を指す。プローブは、単離されたオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドであって、検出可能な標識またはレポーター分子に接着した配列である。典型的な標識には、放射性アイソトープ、リガンド、化学発光試薬および酵素がある。「プライマー」は、短い核酸、通常はDNAオリゴヌクレオチドであり、相補的塩基対を形成することで標的ポリヌクレオチドにアニーリングされ得る。プライマーは次に、DNAポリメラーゼ酵素によって標的DNA鎖に沿って伸長し得る。プライマー対は、例えばポリメラーゼ連鎖反応(PCR)による、核酸の増幅(および同定)に用い得る。

30

【0140】

本発明に用いるようなプローブ及びプライマーは通常、既知の配列の、少なくとも15の連続したヌクレオチドを含んでいる。特異性を高めるため、長めのプローブおよびプライマー、例えば開示した核酸配列の少なくとも20、25、30、40、50、60、70、80、90、100または少なくとも150の連続したヌクレオチドからなるようなプローブおよびプライマーも用い得る。これよりもかなり長いプローブおよびプライマーもある。表、図面および配列リストを含む本明細書が支持する、任意の長さのヌクレオチドを用い得るものと理解されたい。

40

【0141】

プローブ及びプライマーの調製及び使用方法については、Sambrook, J.およびD.W. Russell (2001; Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第3版, 1-3巻, Cold Spring Ha

50

rbor Press, Cold Spring Harbor NY)、Ausubel, F.M. 他(1999; Short Protocols in Molecular Biology, 第4版, John Wiley & Sons, New York NY)、及び Innis, M. 他(1990; PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications, Academic Press, San Diego CA)などの参考文献に記載がある。PCRプライマー対は、その目的のためのコンピュータプログラム、例えばPrimer (Version 0.5, 1991, Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge MA)を用いるなどして既知の配列から得ることができる。

【0142】

プライマーとして用いるオリゴヌクレオチドの選択は、そのような目的のために本技術分野でよく知られているソフトウェアを用いて行う。例えばOLIGO 4.06ソフトウェアは、各100ヌクレオチドまでのPCRプライマー対の選択に有用であり、オリゴヌクレオチドおよび、最大5,000までの大きめのポリヌクレオチドであって32キロボースまでのインプットポリヌクレオチド配列から得た配列を分析するのにも有用である。類似のプライマー選択プログラムには、拡張能力のための追加機能が組込まれている。例えば、PrimOUプライマー選択プログラム(テキサス州ダラスにあるテキサス大学南西部医療センターのゲノムセンターから一般向けに入手可能)は、メガベース配列から特定のプライマーを選択することが可能であり、したがってゲノム全体の範囲でプライマーを設計するのに有用である。Primer3プライマー選択プログラム(Whitehead Institute/MIT Center for Genome Research(マサチューセッツ州ケンブリッジ)より入手可能)によって、ユーザーは、プライマー結合部位として避けたい配列を指定できる「非プライミングライブラリ(mispriming library)」を入力できる。Primer3は特に、マイクロアレイのためのオリゴヌクレオチドの選択に有用である(後二者のプライマー選択プログラムのソースコードは、それぞれの情報源から得てユーザー固有のニーズを満たすように修正し得る)。PrimerGenプログラム(英国ケンブリッジ市の英国ヒトゲノムマッピングプロジェクト-リソースセンターから一般向けに入手可能)は、多数の配列アラインメントに基づいてプライマーを設計し、それによって、アラインメントされた核酸配列の最大保存領域または最小保存領域のいずれかとハイブリダイズするようなプライマーの選択を可能にする。従って、このプログラムは、固有であって保存されたオリゴヌクレオチド及びポリヌクレオチドの断片の同定に有用である。上記選択方法のいずれかによって同定したオリゴヌクレオチドおよびポリヌクレオチド断片は、ハイブリダイゼーション技術において、例えばPCRまたはシーケンシングプライマーとして、マイクロアレイエレメントとして、あるいは核酸のサンプルにおいて完全または部分的相補的ポリヌクレオチドを同定する特異プローブとして有用である。オリゴヌクレオチドの選択方法は、上記の方法に限定されるものではない。

【0143】

本明細書における「組換え核酸」は天然の配列ではなく、2つ以上の配列の離れたセグメントを人工的に組み合わせた核酸である。この人為的組合せはしばしば化学合成によって達成するが、より一般的には核酸の単離セグメントの人為的操作によって、例えばSambrookおよびRussellの文献(前出)に記載されているような遺伝子工学的手法によって達成する。組換え核酸の語は、単に核酸の一部が付加、置換または欠失により改変された核酸も含む。しばしば組換え核酸には、プロモーター配列に機能的に連結した核酸配列が含まれる。このような組換え核酸は、例えばある細胞を形質転換するために使用されるベクターの一部と成し得る。

【0144】

あるいはこのような組換え核酸は、ウイルスベクターの一部と成すことができ、ベクターは例えばワクシニアウイルスに基づくものであり得る。そのようなベクターは哺乳類に接種され、その組換え核酸が発現されて、その哺乳類内で防御免疫応答を誘導するように使用することができる。

【0145】

「調節因子」は、通常は遺伝子の非翻訳領域に由来する核酸配列であり、エンハンサー、プロモーター、イントロン及び5'及び3'の非翻訳領域(UTR)を含む。調節エレメン

10

20

30

40

50

トは、転写、翻訳またはRNA安定性を制御する宿主タンパク質またはウイルスタンパク質と相互作用する。

【0146】

「レポーター分子」は、核酸、アミノ酸または抗体の標識に用いられる化学的または生化学的部分である。レポーター分子には、放射性核種、酵素、蛍光剤、化学発光剤、発色剤、基質、補助因子、阻害因子、磁気粒子およびその他の当分野で既知の成分がある。

【0147】

DNA分子に対する「RNA等価物」は、基準となるDNA分子と同じ直鎖の核酸配列から構成されるが、全ての窒素性塩基のチミンがウラシルで置換され、糖鎖のバックボーンがデオキシリボースではなくリボースからなる。

【0148】

用語「サンプル」は、その最も広い意味で用いられている。PMMM、PMMMをコードする核酸、またはその断片を含むと推定されるサンプルは、体液と、細胞からの抽出物や細胞から単離された染色体や細胞内小器官、膜と、細胞と、溶液中に存在するまたは基板に固定されたゲノムDNA、RNA、cDNAと、組織と、組織プリント等を含み得る。

【0149】

用語「特異的結合」及び「特異的に結合する」は、タンパク質若しくはペプチドと、アゴニスト、抗体、アンタゴニスト、小分子、若しくは任意の天然若しくは合成の結合組成物との間の相互作用を指す。この相互作用は、タンパク質の特定の構造（例えば抗原決定基即ちエピトープ）であって結合分子が認識するものが存在するか否かに依存している。例えば、抗体がエピトープ「A」に対して特異的である場合、遊離した標識A及びその抗体を含む反応において、エピトープA（つまり遊離した、標識されていないA）を含むポリペプチドの存在が、抗体に結合する標識されたAの量を低減させる。

【0150】

用語「実質的に精製された」は、自然の環境から取り除かれてから、単離或いは分離された核酸配列或いはアミノ酸配列であって、自然に結合している組成物が少なくとも約60%除去されたものであり、好ましくは約75%以上の除去、最も好ましくは約90%以上除去されたものを指す。

【0151】

「置換」とは、一つ以上のアミノ酸またはヌクレオチドをそれぞれ別のアミノ酸またはヌクレオチドに置き換えることである。

【0152】

用語「基板」は、任意の好適な固体或いは半固体の支持物を指し、膜及びフィルター、チップ、スライド、ウエハ、ファイバー、磁気または非磁気ビーズ、ゲル、チューブ、プレート、ポリマー、微小粒子、毛細管が含まれる。基板は、ウェル、溝、ピン、チャンネル、孔など、様々な表面形態を有することができ、基板表面にはポリヌクレオチドやポリペプチドが結合する。

【0153】

「転写イメージ(transcript image)」または「発現プロファイル(プロフィール)」は、所定条件下での所定時間における特定の細胞の種類または組織による集合的遺伝子発現のパターンを指す。

【0154】

「形質転換(transformation)」とは、外来DNAが受容細胞に導入されるプロセスのことである。形質転換は、本技術分野で知られている種々の方法に従って自然条件または人工条件下で生じ得るものであり、外来性の核酸配列を原核宿主細胞または真核宿主細胞に挿入する、任意の既知の方法を基にし得る。形質転換の方法は、形質転換する宿主細胞の種類によって選択する。限定するものではないが形質転換方法には、バクテリオファージあるいはウイルス感染、電気穿孔法(エレクトロポレーション)、熱ショック、リポフェクションおよび微粒子銃を用いる方法がある。「形質転換された細胞」には、導入されたDNAが自律的に複製するプラスミドとして或いは宿主染色体の一部として複製可能である安

10

20

30

40

50

定的に形質転換された細胞が含まれる。さらに、限られた時間に一過的に導入DNA若しくは導入RNAを発現する細胞も含まれる。

【0155】

ここで用いる「遺伝形質転換生物体(transgenic organism)」とは任意の生物体であり、限定するものではないが動植物を含み、生物体の1個以上の細胞が、ヒトの関与によって、例えば本技術分野でよく知られているトランスジェニック(transgenic)技術によって導入された異種核酸を有する。核酸の細胞への導入は、直接または間接的に、細胞の前駆物質に導入することによって、計画的な遺伝子操作によって、例えば微量注射法によって或いは組換えウイルスでの感染によって行う。別の実施態様で核酸の導入は、組換えウイルスベクター、例えばレンチウイルスベクターを感染させて成し得る(Lois, C. 他(2002) Science 295:868-872)。遺伝子操作の語は、古典的な交雑育種あるいは*in vitro*受精を指すものではなく、組換えDNA分子の導入を指す。本発明に基づいて予期される遺伝形質転換生物体には、バクテリア、シアノバクテリア、真菌および動植物がある。本発明の単離されたDNAは、本技術分野で知られている方法、例えば感染、形質移入、形質転換またはトランス接合によって宿主に導入することができる。本発明のDNAをこのような生物体に移入する技術はよく知られており、前出のSambrookおよびRussellなどの文献で提供されている。

【0156】

特定の核酸配列の「変異体」は、核酸配列1本全部の長さに対して特定の核酸配列と少なくとも40%の相同性を有する核酸配列であると定義する。その際、デフォルトパラメータに設定した「BLAST 2 Sequences」ツールVersion 2.0.9(1999年5月7日)を用いてblastnを実行する。このような核酸対は、所定の長さに対して、例えば少なくとも50%、60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれ以上の相同性を示し得る。或る変異体は、例えば「対立遺伝子」変異体(前述)、「スプライス」変異体、「種」変異体または「多型性」変異体として記載し得る。スプライス変異体は参照分子とかなりの相同性を有し得るが、mRNAプロセッシング中のエキソンの選択的スプライシングによって通常、より多くまたはより少数のヌクレオチドを有することになる。対応するポリペプチドは、追加機能ドメイン群を有するか、あるいは参照分子には存在するドメイン群が欠落していることがある。種変異体は、種によって異なるポリヌクレオチドである。結果的に生じるポリペプチドは通常、相互にかなりのアミノ酸相同性を有する。多型性変異体は、所与の種の個体間で特定の遺伝子のポリヌクレオチド配列が異なる。多型変異配列はまた、ポリヌクレオチド配列の1つのヌクレオチドが異なる「1塩基多型性」(SNP)も含み得る。SNPの存在は、例えば特定の集団、病状または病状性向を示し得る。

【0157】

特定のポリペプチド配列の「変異体」は、ポリペプチド配列の1本の長さ全体で特定のポリペプチド配列に対して少なくとも40%の配列相同性または配列類似性を有するポリペプチド配列として定義される。定義づけには、デフォルトパラメータに設定した「BLAST 2 Sequences」ツールVersion 2.0.9(1999年5月7日)を用いてblastpを実行する。このようなポリペプチド対は、そのポリペプチドの一方の所定の長さに対して、例えば少なくとも50%、60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、あるいは少なくとも99%またはそれ以上の配列同一性または配列類似性を示し得る。

【0158】

(発明)

本発明の多様な実施態様は、新規のヒトタンパク質修飾および維持分子(PMMM)、およびPMMMをコードするポリヌクレオチド群を含む。また、これらの組成物を利用した胃腸障害、心血管障害、自己免疫/炎症疾患、細胞増殖異常、発生・発達障害、上皮障害、神経疾患、生殖障害、内分泌障害、代謝異常、膵臓病、副腎と関連する疾患、性腺ステロイドホルモンと関連する疾患、癌、および感染症の診断、治療、及び予防を含む。

【 0 1 5 9 】

表 1 は、本発明の完全長ポリヌクレオチドおよびポリペプチド実施様態の命名の概略である。各ポリヌクレオチドおよびその対応するポリペプチドは、1つのIncyteプロジェクト識別番号(IncyteプロジェクトID)に相関する。各ポリペプチド配列は、ポリペプチド配列識別番号(ポリペプチドSEQ ID NO:)とIncyteポリペプチド配列番号(IncyteポリペプチドID)によって表示した。各ポリヌクレオチド配列は、ポリヌクレオチド配列識別番号(ポリヌクレオチドSEQ ID NO:)とIncyteポリヌクレオチドコンセンサス配列番号(IncyteポリヌクレオチドID)によって表示した。列 6 は本発明のポリペプチドおよびポリヌクレオチド配列に相当する物理的な完全長クローンのIncyte ID 番号を示す。完全長のクローンは列 3 に示すポリペプチド配列に少なくとも 95% の配列同一性を有するポリペプチドをコードする。 10

【 0 1 6 0 】

表 2 は、GenBankタンパク質(genpept)データベースとPROTEOMEデータベースとに対するBLAST分析で同定した、本発明のポリペプチド群に相同な配列群を示す。列 1 および列 2 はそれぞれ、本発明の各ポリペプチドに対するポリペプチド配列識別番号(ポリペプチドSEQ ID NO:)と、それに対応するIncyteポリペプチド配列番号(IncyteポリペプチドID)を示す。列 3 は、GenBankの最も近い相同体のGenBank識別番号(Genbank ID NO:)と最も近いPROTEOMEデータベース相同体のPROTEOMEデータベース識別番号(PROTEOME ID NO:)を示す。列 4 は、各ポリペプチドとその相同体 1 つ以上との間の一致に関する確率スコアを示す。列 5 は、GenBankとPROTEOMEデータベースの相同体の注釈を示し、更に該当箇所には関連する引用文献も示す。これらを引用することを以って本明細書の一部とする。 20

【 0 1 6 1 】

表 3 は、本発明のポリペプチドの多様な構造的特徴を示す。列 1 および列 2 はそれぞれ、本発明の各ポリペプチドに対するポリペプチド配列識別番号(SEQ ID NO:)と、それに対応するIncyteポリペプチド配列番号(IncyteポリペプチドID)を示す。列 3 は、各ポリペプチドのアミノ酸残基数を示す。列 4 および列 5 はそれぞれ、GCG配列分析ソフトウェアパッケージのMOTIFSプログラム(Accelrys, Burlington MA)によって決定された、リン酸化およびグリコシル化の可能性のある部位を示す。列 6 は、シグネチャ配列、ドメイン、およびモチーフを含むアミノ酸残基を示す。列 7 は、タンパク質の構造/機能の分析のための分析方法を示し、該当箇所には更に、分析方法に利用した検索可能なデータベース 30

【 0 1 6 2 】

表 2 及び表 3 は共に、本発明の各々のポリペプチドの特性を要約しており、それらの特性は、請求の範囲に記載されたポリペプチド群がタンパク質修飾および維持分子であることを確立している。例えば、SEQ ID NO:2はヒトのインタートリプシンインヒビターファミリー-重鎖関連タンパク質(GenBank ID g4096840)に対して、M1残基からE738残基まで86%、K607残基からL900残基まで96%同一であることが、Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)で判定された(表2参照)。BLAST確率スコアは0.0および7.3e-152であり、これは観測されたポリペプチド配列アラインメントが偶然に得られる確率を示している。SEQ ID NO:2はまた、1つのフォンウィルブランド因子タイプAドメインを有し、これは、隠れマルコフモデル(HMM)を基にした保存されたタンパク質ファミリードメインのPFAMデータベースにおいて、統計的に有意な一致を検索して決定された(表3参照)。BLIMPS、MOTIFS及び付加的なBLAST解析よりのデータは、SEQ ID NO:2がプロテアーゼ抑制因子である、さらに実証的な証拠を提供する。 40

【 0 1 6 3 】

別の例として、SEQ ID NO:9は、マウスのmDj10(GenBank ID g6567172)とM1残基からG378残基まで、50%の同一性を有することが、BLASTによって示された。BLAST確率スコアは9.7e-102である。SEQ ID NO:9はまた、1つのDnaJドメインを有する。これは、隠れマルコフモデル(HMM)を基にしたPFAMデータベースにおいて、統計的に有意な一致を検索して決定された。BLIMPS、MOTIFS、及びPROFILESCAN解析よりのデータは、SEQ ID NO:9が分子 50

シャペロンである、さらに実証的な証拠を提供する。

【0164】

別の例として、SEQ ID NO:12は、ヒトのホスファチジルイノシトールグリカンクラスT (GenBank ID g14456615)とM1残基からN344残基まで、100%の同一性を有することが、BLASTによって示された。BLAST確率スコアは $5.4e280$ である。BLAST-PRODOM解析よりのデータは、SEQ ID NO:12がホスファチジルイノシトールグリカンである、更なる実証的な証拠を提供する。別の例として、SEQ ID NO:13は、ヒトのホスファチジルイノシトールグリカンクラスT (GenBank ID g14456615)とD63残基からL476残基まで、100%の同一性を有することが、BLASTによって示された。BLAST確率スコアは $4.7e-261$ である。BLAST-PRODOM解析よりのデータは、SEQ ID NO:13がホスファチジルイノシトールグリカンである、更なる実証的な証拠を提供する。

10

【0165】

別の例では、SEQ ID NO:15がD50残基からD121残基にかけてヒトのユビキチン抱合酵素HR6B (GenBank ID g11037550)と97%同一であることがBLASTによって示されたBLAST確率スコアは $2.1e-58$ である。SEQ ID NO:15は細胞内領域に局在化し、ユビキチン結合機能を有し、またタンパク質抱合因子であることが、PROTEOMEデータベースを使ったBLAST解析によって示された。SEQ ID NO:15はまた、1つのユビキチン抱合酵素ドメインを有するが、これは、隠れマルコフモデル(HMM)を基にしたPFAMデータベースにおいて、統計的に有意な一致を検索して決定された。BLAST-PRODOM、BLAST-DOMO、PROFILESCAN解析から得られたデータによって、SEQ ID NO:15がユビキチン抱合酵素であることがさらに裏付けられた。

20

【0166】

別の例では、SEQ ID NO:19はヒトCANPの大サブユニット (GenBank ID g29664、それぞれM1残基からG82残基までおよびG144残基からA714残基まで) に対して、M1残基からG82残基まで100%、およびG82残基からA652残基まで100%同一であることがBLASTにより示された。BLAST確率スコアは0.0である。SEQ ID NO:19は、システインプロテアーゼ活性を有する、システインプロテアーゼの大サブユニットであるカルパイン等の他のタンパク質に対して相同的であり、原形質膜に局在化することが、PROTEOMEデータベースを使ったBLAST解析によって示された。SEQ ID NO:19はまた、カルパインおよびEFハンドドメインを有することが、隠れマルコフモデル(HMM)を基にした保存されたタンパク質ファミリードメインのPFAMデータベースにおいて、統計的に有意な一致を検索して決定された。BLIMPS、MOTIFS、及びBLAST解析よりのデータは、SEQ ID NO:19がカルパインシステインプロテアーゼであるという、さらに確証的な証拠を提供する。SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3-8、SEQ ID NO:10-11、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:16-18、SEQ ID NO:20-31は同じような方法で解析し、注釈を付けた。SEQ ID NO:1-31の解析のためのアルゴリズム及びパラメータが表7で記述されている。

30

【0167】

表4に示すように、完全長ポリヌクレオチドの具体例は、cDNA配列またはゲノムDNA由来のコード(エキソン)配列を用いて、あるいはこれら2種類の配列を任意に組み合わせアセンブリした。列1は本発明の各ポリヌクレオチドに対するポリヌクレオチド配列識別番号(ポリヌクレオチドSEQ ID NO)および対応するIncyteポリヌクレオチドコンセンサス配列番号(Incyte ID)、および塩基対の各ポリヌクレオチド配列の長さを示している。列2は、完全長ポリヌクレオチド実施態様のアセンブリに用いたcDNA配列および/またはゲノム配列の開始ヌクレオチド(5')位置および終了ヌクレオチド(3')位置、また、例えばSEQ ID NO:3262を同定するため、或いはSEQ ID NO:3262と、関連するポリヌクレオチド群とを区別するためのハイブリダイゼーション技術または増幅技術に有用なポリヌクレオチドの断片の開始ヌクレオチド(5')位置および終了ヌクレオチド(3')位置を示す。

40

【0168】

表4の列2で記述されたポリヌクレオチド断片は、具体的にはたとえば組織特異的なc

50

DNAライブラリまたはプールされたcDNAライブラリに由来するIncyte cDNAを指す場合がある。或いは列2に記載したポリヌクレオチド断片は、完全長ポリヌクレオチドのアセンブリに寄与したGenBank cDNAまたはESTを指す場合もある。さらに、列2のポリヌクレオチド断片は、ENSEMBL (The Sanger Centre、英国ケンブリッジ) データベースから由来した配列 (即ち「ENST」命名を含む配列) を同定し得る。或いは、列2で記述されたポリヌクレオチド断片は、NCBI RefSeq Nucleotide Sequence Records データベースから由来する場合もあり (即ち「NM」または「NT」の命名を含む配列)、またNCBI RefSeq Protein Sequence Recordsから由来する場合もある (即ち「NP」の命名を含む配列)。または列2のポリヌクレオチド断片は、「エキソンスティッチング (exon-stitching)」アルゴリズムにより結び合わせたcDNA及びGenscan予想エキソンの両方のアセンブリ体を意味する場合がある。例えば、FL_XXXXXX_N₁_N₂_YYYYY_N₃_N₄ と同定されるポリヌクレオチドは、アルゴリズムが適用される配列のクラスターの識別番号がXXXXXXであり、アルゴリズムにより生成される予測の番号がYYYYYであり、(もし存在すれば) N_{1,2,3...} が解析中に手動で編集された可能性のある特定のエキソンであるような「縫合された(stitched)」配列である (実施例5参照)。または、列2のポリヌクレオチド断片は「エキソンストレッチング (exon-stretching)」アルゴリズムにより結び合わせたエキソンのアセンブリ体を指す場合もある。例えば、FLXXXXXX_gAAAAA_gBBBBB_1_Nとして同定されるポリヌクレオチド配列は、「ストレッチされた」配列である。XXXXXXはIncyteプロジェクト識別番号、gAAAAAは「エキソンストレッチング」アルゴリズムを適用したヒトゲノム配列のGenBank識別番号、gBBBBBは一番近いGenBankタンパク質相同体のGenBank識別番号またはNCBI RefSeq 識別番号であり、Nは特定のエキソンを指す (実施例5を参照)。あるRefSeq配列が「エキソンストレッチング」アルゴリズムのためのタンパク質相同体として使用された場合には、RefSeq識別子 (「NM」、「NP」、または「NT」によって表される) が、GenBank識別子 (即ち、gBBBBB) の代わりに使用される場合もある。

10

20

【0169】

あるいは、接頭コードは手作業で編集されたか、ゲノムDNA配列から予測されたか、または配列解析方法の組み合わせから由来している構成配列を同定する。次の表は構成配列の接頭コードと、接頭コードに対応する同じ配列の分析方法の例を列記する (実施例4と5を参照)。

30

接頭コード	解析タイプやプログラムの例
GNN 、 GFG 、 ENST	例えば、GENSCAN (Stanford University, CA, USA) または FGENES (Computer Genomics Group, The Sanger Centre, Cambridge, UK) を用いた、ゲノム配列群からのエキソン予測
GBI	手動で編集された、ゲノム配列群の解析
FL	スティッチまたはストレッチゲノム配列 (実施例5参照)
INCY	EST配列群の、ゲノムへのマッピングからの、完全長転写物とエキソンとの予想。エキソン群と生じる転写物とを予測するために、ゲノム位置とEST構成とのデータが組み合わせられる。

40

【0170】

50

場合によっては、最終コンセンサポリヌクレオチド配列を確認するために、表4に示すような配列の適用範囲と重複するIncyte cDNA適用範囲が得られたが、該当するIncyte cDNA識別番号は示さなかった。

【0171】

表5は、Incyte cDNA配列を用いてアセンブリされた完全長ポリヌクレオチドのための代表的なcDNAライブラリを示している。代表的なcDNAライブラリとはIncyte cDNAライブラリであり、これは、最も頻繁にはIncyte cDNA配列群によって代表されるが、これら配列は、上記のポリヌクレオチドをアセンブリおよび確認するために用いられた。cDNAライブラリを作製するために用いた組織およびベクターを表5に示し、表6で説明している。

【0172】

表8は、本発明のポリヌクレオチド配列に見られる一塩基多型((SNP)を、種々のヒト集団での対立遺伝子(アレル)頻度と共に示す。列1および列2はそれぞれ、本発明の各ポリヌクレオチドのポリヌクレオチド配列識別番号(SEQ ID NO:)およびそれに対応するIncyteプロジェクト識別番号(PID)を示す。列3はSNPが検出されたESTのIncyte識別番号(EST ID)を示し、列4はSNPの識別番号(SNP ID)を示す。列5はSNPが存在するEST配列内の位置(EST SNP)を示し、列6は完全長ポリヌクレオチド配列内のSNPの位置(CB1 SNP)を示す。列7はEST配列内に存在する対立遺伝子を示す。列8および列9はSNP部位に存在する2つの対立遺伝子を示す。列10はESTに存在する対立遺伝子に基づいてSNP部位に含まれるコドンによってコードされるアミノ酸を示す。列11~14は四つの異なったヒト母集団における対立遺伝子1の発生頻度を示す。n/d(検出されない)の項目は母集団における対立遺伝子1の発生頻度が低すぎて検出されなかったことを示し、また、n/a(利用不可)はその母集団において対立遺伝子の発生頻度が決定されなかったことを示す。

【0173】

本発明はまた、PMMMの変異体も含む。PMMMの変異体の様々な実施形態は、PMMMの機能的或いは構造的特徴の少なくとも一つを有することが可能で、かつPMMMアミノ酸配列に対して少なくとも約80%のアミノ酸配列同一性、或いは少なくとも約90%のアミノ酸配列同一性、更には少なくとも約95%のアミノ酸配列同一性を有する。

【0174】

種々の実施形態もまた、PMMMをコードするポリヌクレオチドをも含む。或る例では、PMMMをコードするSEQ ID NO:32-62からなる群から選択された配列を有するポリヌクレオチド配列が本発明に含まれている。配列表に示したSEQ ID NO:32-62のポリヌクレオチド配列は等価RNA配列を含むが、窒素塩基チミンの出現はウラシルに置換され、糖のバックボーンはデオキシリボースではなくリボースから構成されている。

【0175】

本発明はまた、PMMMをコードするポリヌクレオチドの変異体を含む。詳細には、このような変異体ポリヌクレオチドは、PMMMをコードするポリヌクレオチドとの、少なくとも約70%のポリヌクレオチド配列同一性、あるいは少なくとも約85%のポリヌクレオチド配列同一性、更には少なくとも約95%ものポリヌクレオチド配列同一性を持つこととなる。本発明の或る実施形態では、SEQ ID NO:32-62からなる群から選択された核酸配列と少なくとも約70%、或いは少なくとも約85%、または少なくとも約95%ものポリヌクレオチド配列同一性を有するようなSEQ ID NO:32-62からなる群から選択された配列を有するポリヌクレオチド配列の変異配列を含む。上記の任意のポリヌクレオチドの変異体は、PMMMの機能的若しくは構造的特徴を少なくとも1つ有するポリペプチドをコードし得る。

【0176】

さらに、或いは別法では、本発明のポリヌクレオチド変異体は、PMMMをコードするポリヌクレオチドのスプライス変異体である。或るスプライス変異体はPMMMをコードするポリヌクレオチドとの顕著な配列同一性を持つ部分複数を有し得るが、mRNAプロセッシング中のエキソン群の選択的スプライシングによって生ずる、配列の数ブロックの付加または欠失により、通常、より多数またはより少数のポリヌクレオチドを有することになる。或るスプライス変異体には、約70%未満、または約60%未満、あるいは約50%未満のポリヌク

10

20

30

40

50

レオチド配列同一性が、PMMMをコードするポリヌクレオチドとの間で全長に渡って見られるが、このスプライス変異体の幾つかの部分には、PMMMをコードするポリヌクレオチドの各部との、少なくとも約70%、あるいは少なくとも約85%、または少なくとも約95%、なおまたは100%の、ポリヌクレオチド配列同一性を有することとなる。例えばSEQ ID NO:43の配列を持つポリヌクレオチドとSEQ ID NO:44の配列を持つポリヌクレオチドとは互いのスプライス変異体である。上記のスプライス変異体は何れも、PMMMの機能的或いは構造的特徴の少なくとも1つを有する或るポリペプチドをコードし得る。

【0177】

遺伝暗号の縮重により作り出され得るPMMMをコードする種々のポリヌクレオチド配列には、自然発生する任意の既知の遺伝子のポリヌクレオチド配列と最小の類似性しか有しないものも含まれることを、当業者は理解するであろう。したがって本発明には、可能コドン選択に基づく組合せの選択によって産出し得るあらゆる可能なポリヌクレオチド配列のバリエーションを網羅し得る。これらの組み合わせは、天然のPMMMのポリヌクレオチド配列に適用される標準的なトリプレット遺伝暗号を基に作られ、全てのそのような変異が明確に開示されているとみなす。

10

【0178】

PMMMとその変異体とをコードするポリヌクレオチドは一般に、好適に選択されたストリンジェンシー条件下で天然PMMMのポリヌクレオチドとハイブリダイズ可能であるが、非天然コドン群を含めるなどの実質的に異なるコドン使用を有するPMMM或いはその誘導体をコードするポリヌクレオチドを作り出すことは、有益であり得る。宿主が特定コドンを利用する頻度に基づいて、特定の真核宿主または原核宿主に発生するペプチドの発現率を高めるようにコドンを選択し得る。コードされたアミノ酸配列を変えずに、PMMM及びその誘導体をコードするヌクレオチド配列を実質的に変更する別の理由は、天然の配列から作られる転写物より例えば長い半減期など好ましい特性を備えるRNA転写物を作ることにある。

20

【0179】

本発明はまた、PMMM及びその誘導体をコードするポリヌクレオチドまたはそれらの断片を完全に合成化学によって作り出すことも含む。作製後、当分野で周知の試薬を用いて、この合成ポリヌクレオチドを任意の様々な入手可能な発現ベクター及び細胞系中に挿入し得る。更に、合成化学を用いてPMMMまたはその任意の断片をコードする或るポリヌクレオチドに突然変異を誘導し得る。

30

【0180】

本発明の実施態様には、種々のストリンジェンシー条件下で、請求項に記載のポリヌクレオチド、特に、SEQ ID NO:32-62に示す配列を持つポリヌクレオチド、及びそれらの断片群にハイブリダイズ可能なポリヌクレオチド群が含まれる(Wahl, G.MおよびS.L. Berger (1987) *Methods Enzymol.* 152:399-407、Kimmel, A.R.(1987)*Methods Enzymol.* 152:507-511)。アニーリングおよび洗浄条件を含むハイブリダイゼーションの条件は、「定義」に記載した。

【0181】

DNAシーケンシングの方法は当分野では公知であり、本発明のいずれの実施例もDNAシーケンシング方法を用いて実施可能である。DNAシーケンシング方法には酵素を用い得る。例えばDNAポリメラーゼ1のクレノウ断片、SEQUENASE (US Biochemical, Cleveland OH)、Taqポリメラーゼ (Applied Biosystems)、熱安定性T7ポリメラーゼ (Amersham Biosciences, Piscataway NJ)を用い得る。あるいは、例えばELONGASE増幅システム (Invitrogen, Carlsbad CA)において見られるように、ポリメラーゼと校正エキソヌクレアーゼとを併用し得る。好適には、MICROLAB2200液体転移システム (Hamilton, Reno, NV)、PTC200サーマルサイクラー (MJ Research, Watertown MA) およびABI CATALYST 800サーマルサイクラー (Applied Biosystems) などの装置を用いて配列の準備を自動化する。次に、ABI 373或いは377 DNAシーケンシングシステム (Applied Biosystems)、MEGABA CE 1000 DNAシーケンシングシステム (Amersham Biosciences) または当分野でよく知

40

50

られている他の方法を用いてシーケンシングを行う。結果として得られた配列を当分野でよく知られている種々のアルゴリズムを用いて分析する (Ausubel 他, 前出, 7章、Meyers, R.A. (1995) Molecular Biology and Biotechnology, Wiley VCH, New York NY, 856-853ページ)。

【0182】

当分野で周知の、PCR法をベースにした種々の方法と、部分的ヌクレオチド配列とを利用して、PMMMをコードする核酸を伸長し、プロモーターや調節エレメントなど、上流にある配列を検出し得る。例えば、使用し得る方法の1つである制限部位PCR法は、ユニバーサルプライマー及びネステッドプライマーを用いてクローニングベクター内のゲノムDNAから未知の配列を増幅する方法である (Sarkar, G. (1993) *PCR Methods Applic* 2:318-322)。別の方法にインバースPCR法があり、これは広範な方向に伸長させたプライマーを用いて環状化した鋳型から未知の配列を増幅する方法である。鋳型は、或る既知のゲノム遺伝子座およびその周辺の配列群からなる制限酵素断片群から得る (Triglia, T. 他 (1988) *Nucleic Acids Res.* 16:8186)。第3の方法としてキャプチャPCR法があり、これはヒト及び酵母菌人工染色体DNAの既知の配列に隣接するDNA断片をPCR増幅する方法に關与している (Lagerstrom, M. 他 (1991) *PCR Methods Applic.* 1:111119)。この方法では、PCRを行う前に複数の制限酵素の消化及びライゲーション反応を用いて未知の配列領域内に組換え二本鎖配列を挿入することが可能である。未知の配列群を検索するために用い得る他の複数の方法も当分野で既知である (Parker, J.D. 他 (1991) *Nucleic Acids Res.* 19:30553060)。更に、PCR、ネステッドプライマー及びPromoterFinderライブラリ (Clontech, Palo Alto CA) を用いてゲノムDNAをウォーキングすることができる。この手順は、ライブラリ類をスクリーニングする必要がなく、イントロン/エキソン接合部の発見に有用である。全てのPCRベースの方法では、市販ソフトウェア、例えばOLIGO 4.06プライマー分析ソフトウェア (National Biosciences, Plymouth MN) 或いは別の好適なプログラムを用いて、長さが約22~30ヌクレオチド、GC含有率が約50%以上で、温度約68~72で鋳型に対してアニーリングするように、プライマー群を設計し得る。

【0183】

完全長cDNA群をスクリーニングする際は、より大きなcDNA群を含むようにサイズ選択されたライブラリ群を用いるのが好ましい。更に、ランダムプライマーのライブラリは、遺伝子群の5'領域を有する配列をしばしば含んでおり、オリゴd(T)ライブラリが完全長cDNAを作製できない状況に対して好適である。ゲノムライブラリ群は、5'非転写調節領域への配列の伸長に有用であろう。

【0184】

市販のキャピラリー電気泳動システムを用いて、シーケンシングまたはPCR産物のサイズを分析し、またはそのヌクレオチド配列を確認することができる。具体的には、キャピラリーシーケンシングは、電気泳動による分離のための流動性ポリマーと、4つの異なるヌクレオチドに特異的であるような、レーザーで刺激される蛍光色素と、発光された波長の検出に利用するCCDカメラとを有し得る。出力/光の強度は、適切なソフトウェア (Applied Biosystems社のGENOTYPER、SEQUENCE NAVIGATOR等) を用いて電気信号に変換し得る。サンプルのロードからコンピュータ分析及び電子データ表示までの全プロセスがコンピュータ制御可能である。キャピラリー電気泳動法は、特定のサンプルに少量しか存在しないようなDNA小断片のシーケンシングに特に適している。

【0185】

本発明の別の実施様態では、PMMMをコードするポリヌクレオチドまたはその断片を組換えDNA分子にクローニングして、適切な宿主細胞内にPMMM、その断片または機能的等価物を発現させることが可能である。遺伝暗号に固有の縮重により、実質的に同じ或いは機能的に等価のポリペプチドをコードする別のポリヌクレオチドが作られ得り、これらの配列をPMMMの発現に利用可能である。

【0186】

様々の目的で、PMMMをコードする配列群を改変するために、当分野で一般に既知の複数

10

20

30

40

50

の方法を用いて、本発明のポリヌクレオチド群を組換えることができる。この組換えの多様な目的には、遺伝子産物のクローン化、あるいはプロセッシングおよび/または発現のモディフィケーションが含まれるが、これらに限定されるものではない。遺伝子断片及び合成オリゴヌクレオチドのランダムなフラグメンテーション及びPCR再アセンブリによるDNAシャッフリングを用い、ヌクレオチド配列を組み換えることが可能である。例えば、オリゴヌクレオチドを介した部位特異的変異誘導を利用して、新規な制限部位の作製、グリコシル化パターンの変更、コドン優先の変更、スプライス変異体の生成等を起こす突然変異を導入し得る。

【0187】

本発明のヌクレオチドは、MOLECULARBREEDING (Maxygen Inc., Santa Clara CA, 米国特許第5,837,458号、Chang, C.-C.他(1999) Nat. Biotechnol. 17:793-797; Christians, F.C. 他(1999) Nat. Biotechnol. 17:259-264; Cramer, A. 他(1996) Nat. Biotechnol. 14:315-319)などのDNAシャッフリング技術の対象となり得る。これにより、生物活性または酵素活性、あるいは他の分子や化合物と結合する能力など、PMMMの生物学的特性を改変あるいは改良し得る。DNAシャッフリングは、遺伝子断片のPCRを介する組換えを用いて遺伝子変異体のライブラリを作製するプロセスである。ライブラリはその後、所望の特性を持つ遺伝子変異体群を同定する、選択またはスクリーニングの手順を経る。続いて、これら好適な変異体をプールし、更に反復してDNAシャッフリングおよび選択/スクリーニングを行い得る。従って、「人工的な」育種及び急速な分子の進化によって遺伝的多様性が生み出される。例えば、ランダムポイント突然変異を持つ単一の遺伝子の断片を組換えて、スクリーニングし、その後所望の特性が最適化されるまでシャッフリングし得る。或いは、所与の遺伝子を同種または異種のいずれかから得た同一遺伝子ファミリーの相同遺伝子と組み換え、それによって天然に存在する複数の遺伝子の遺伝的多様性を、管理され制御可能な方法で、最大化させることができる。

【0188】

別の実施態様によれば、PMMMをコードするポリヌクレオチドは、当分野で周知の1つ以上の化学的方法を用いて、全体あるいは一部が合成可能である(Caruthers, M.H. 他.(1980) Nucleic Acids Symp. Ser. 7:215-223; Horn, T.他(1980) Nucleic Acids Symp. Ser. 7:225-232)。或いはPMMM自体またはその断片の合成に、当分野で既知の化学的方法を用い得る。例えば種々の液相または固相技術を用いてペプチド合成を行い得る(Creighton, T. (1984) Proteins, Structures and Molecular Properties, WH Freeman, New York NY, 55-60ページ; Roberge, J.Y.他(1995) Science 269:202-204)。自動合成はABI 431Aペプチドシンセサイザ(Applied Biosystems)を用いて達成し得る。更にPMMMのアミノ酸配列または任意のその一部は、直接的な合成の際の変更、及び/または他のタンパク質の配列または任意のその一部からの配列との組み合わせにより、天然のポリペプチド配列を有するポリペプチドまたは変異体ポリペプチドを作製することが可能である。

【0189】

ペプチドは、分離用高速液体クロマトグラフィーを用いて実質上精製可能である(Chiez, R.M.及び F.Z. Regnier (1990) Methods Enzymol. 182:392-421)。合成ペプチドの組成は、アミノ酸分析またはシーケンシングによって確認することができる(前出のCreighton, 28-53ページ)。

【0190】

生物学的に活性なPMMMを発現させるために、PMMMをコードするポリヌクレオチドまたはその誘導体を好適な発現ベクターに挿入する。この発現ベクターは、好適な宿主に挿入されたコード配列の転写及び翻訳の調節に必要なエレメントを含む。必要なエレメントとしては、ベクター内およびPMMMをコードするポリヌクレオチドにおける調節配列(例えばエンハンサー、構造型および発現誘導型のプロモーター、5'および3'の非翻訳領域など)が含まれる。必要なエレメント群は、強度および特異性が様々である。特定の開始シグナルによって、PMMMをコードするポリヌクレオチドのより効果的な翻訳を達成することが可能である。開始シグナルの例には、ATG開始コドンと、コザック配列など近傍の配列とが

10

20

30

40

50

含まれる。PMMMをコードするポリヌクレオチド配列、およびその開始コドンや、上流の調節配列が好適な発現ベクターに挿入された場合は、更なる転写制御シグナルや翻訳制御シグナルは必要ないこともある。しかしながら、コード配列あるいはその断片のみが挿入された場合は、インフレームATG開始コドンなど外来性の翻訳制御シグナルが発現ベクターに含まれるようにすべきである。外来性の翻訳エレメント及び開始コドンは、様々な天然物及び合成物を起源とし得る。用いられる特定の宿主細胞系に好適なエンハンサーを含めることで発現の効率を高めることが可能である (Scharf, D.他(1994) *Results Probl.Cell Differ.* 20:125162)。

【0191】

当業者に周知の方法を用いて、PMMMをコードするポリヌクレオチド、好適な転写及び翻訳調節エレメントを含む発現ベクターを作製することが可能である。これらの方法には、*in vitro*組換えDNA技術、合成技術、及び *in vivo*遺伝子組換え技術が含まれる (Sambrook および Russell, 前出, 1-4、8章、Ausubel 他, 前出, 1, 3, 15章)。

【0192】

種々の発現ベクター/宿主系を利用して、PMMMをコードするポリヌクレオチドの保持及び発現が可能である。限定するものではないがこのような発現ベクター/宿主系には、組換えバクテリオファージ、プラスミドまたはコスミドDNA発現ベクターで形質転換させた細菌や、酵母菌発現ベクターで形質転換させた酵母菌などの微生物や、ウイルス発現ベクター (例えばバキュロウイルス) に感染した昆虫細胞系や、ウイルス発現ベクター (例えばカリフラワーモザイクウイルス: CaMVまたはタバコモザイクウイルス: TMV) または細菌発現ベクター (例えばTiまたはpBR322プラスミド) で形質転換させた植物細胞系、動物細胞系等がある (SambrookおよびRussell, 前出、Ausubel 他、前出、Van Heeke, G. および S.M. Schuster (1989) *J. Biol. Chem.* 264:55035509; Engelhard, E.K. 他(1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:3224-3227; Sandig, V.他(1996) *Hum.Gene Ther.* 7:1937-1945; Takamatsu, N. (1987) *EMBO J.* 6:307-311; 『マグローヒル科学技術年鑑』 (*The McGraw Hill Yearbook of Science and Technology*) (1992) McGraw Hill, New York NY, 191-196ページ、Logan, J.およびT. Shenk (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:3655-3659; Harrington, J.J. 他(1997) *Nat. Genet.* 15:157-355)。レトロウイルス、アデノウイルス、ヘルペスウイルスまたはワクシニアウイルス由来の発現ベクター、または種々の細菌性プラスミド由来の発現ベクターを用いて、ポリヌクレオチドを標的器官、組織または細胞集団へ送達することができる (Di Nicola, M.他(1998) *Cancer Gen. Ther.* 5:350-356; Yu, M.他(1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6340-6344; Buller, R.M.他(1985) *Nature* 317:813-815; McGregor, D.P.他(1994) *Mol. Immunol.* 31:219-226; Verma, I.M. およびN. Somia (1997) *Nature* 389:239-242)。本発明は使用する宿主細胞によって限定されない。

【0193】

細菌系では、多数のクローニングベクター及び発現ベクターが、PMMMをコードするポリヌクレオチドの使用目的に応じて選択可能である。例えばPMMMをコードするポリヌクレオチドの慣例的なクローニング、サブクローニング、増殖には、PBLUESCRIPT(Stratagene, La Jolla CA)またはPSPORT1プラスミド(Invitrogen)などの多機能の大腸菌ベクターを用いることができる。ベクターの多数のクローニング部位にPMMMをコードするポリヌクレオチドを連結反応するとlacZ遺伝子が破壊され、組換え分子を含む形質転換された細菌の同定のための比色スクリーニング法が可能となる。更にこれらのベクターは、クローニングされた配列における *in vitro*転写、ジデオキシのシーケンシング、ヘルパーファージによる一本鎖のレスキュー、入れ子状態の欠失の生成にも有用であろう (Van Heeke, G. および S.M. Schuster (1989) *J. Biol. Chem.* 264:5503-5509)。例えば、抗体の産生のためなどに多量のPMMMが必要な場合は、PMMMの発現をハイレベルで誘導するベクターが使用できる。例えば、強力な誘導SP6バクテリオファージプロモーターまたは誘導T7バクテリオファージプロモーターを含むベクターが使用できる。

【0194】

10

20

30

40

50

PMMMの発現に酵母の発現系の使用が可能である。因子、アルコールオキシダーゼ、PGHプロモーター等の構成型或いは誘導型のプロモーターを含む多数のベクターが、出芽酵母菌 (*Saccharomyces cerevisiae*) またはピキア酵母 (*Pichia pastoris*) に使用可能である。更に、このようなベクターは、発現したタンパク質の、分泌か細胞内での保持かのどちらかを指示するものであり、安定した増殖のために宿主ゲノムの中に外来ポリヌクレオチド配列群を組み込むことを可能にする (Ausubel 他、前出; Bitter, G.A. 他、(1987) *Methods Enzymol.* 153:516-544; Scorer, C.A. 他 (1994) *Bio/Technology* 12:181-184)。

【0195】

植物系もPMMMの発現に使用可能である。PMMMをコードするポリヌクレオチドの転写は、ウイルスプロモーター、例えば単独あるいはTMV由来のオメガリーダー配列と組み合わせて用いられるようなCaMV由来の35Sおよび19Sプロモーターによって促進される (Takamatsu, N. (1987) *EMBO J.* 6:307311)。あるいは、RUBISCOの小サブユニットなどの植物プロモーター、または熱ショックプロモーターを用い得る (Coruzzi, G. 他 (1984) *EMBO J.* 3:1671-1680; Broglie, R. 他 (1984) *Science* 224:838-843; および Winter, J. 他 (1991) *Results Probl. Cell Differ.* 17:85105)。これらの構成物は、直接DNA形質転換または病原体を媒介とする形質移入によって、植物細胞内に導入可能である (『マグローヒル科学技術年鑑』 (*The McGraw Hill Yearbook of Science and Technology*) (1992) McGraw Hill New York NY, 191-196ページ)。

【0196】

哺乳類細胞においては、多数のウイルスベースの発現系を利用し得る。アデノウイルスが発現ベクターとして用いられる場合、後発プロモーター及び3連リーダー配列からなるアデノウイルス転写物/翻訳複合体にPMMMをコードするポリヌクレオチドを結合し得る。アデノウイルスゲノムの非必須のE1またはE3領域への挿入することにより、感染した宿主細胞にPMMMを発現する生ウイルスを得ることが可能である (Logan, J. 及び Shenk, T. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:3655-3659)。更に、ラウス肉腫ウイルス (RSV) エンハンサー等の転写エンハンサーを用いて、哺乳動物宿主細胞における発現を増大させ得る。SV40またはEBVをベースにしたベクターを用いてタンパク質を高レベルで発現させることもできる。

【0197】

また、ヒト人工染色体 (HAC) 類を用いて、或るプラスミドに含まれ得る断片やプラスミドから発現し得る断片より大きなDNAの断片群を送達し得る。治療のために約6 kb ~ 10 MbのHACsが作製され、従来の送達方法 (リポソーム、ポリカチオンアミノポリマー、またはベシクル) で送達されている (Harrington, J.J. 他 (1997) *Nat. Genet.* 15:157-355)。

【0198】

哺乳動物系の組換えタンパク質の長期にわたる産生のためには、株化細胞におけるPMMMの安定した発現が望ましい。例えば、発現ベクターを用いて、PMMMをコードするポリヌクレオチドを株化細胞に形質転換することが可能である。このような発現ベクターは、ウイルス起源の複製及び/または内在性の発現要素や、同じ或いは別のベクターの上の選択マーカー遺伝子を含む。ベクターの導入後、選択培地に移す前に強化培地で約1 ~ 2日間、細胞を増殖させ得る。選択可能マーカーの目的は選択剤への抵抗性を与えることであり、選択可能マーカーの存在により、導入した配列をうまく発現するような細胞の成長および回収が可能となる。安定的に形質転換された細胞の耐性クローンは、その細胞型に適した組織培養技術を用いて増殖できる。

【0199】

任意の数の選択系を用いて、形質転換細胞株を回収できる。限定するものではないがこのような選択系には、tk^r細胞のために用いられる単純ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼ遺伝子と、apr^r細胞のために用いられる単純ヘルペスウイルスのアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ遺伝子がある (Wigler, M. 他 (1977) *Cell* 11:223-232; Lowy, I. 他 (1980) *Cell* 22:817-823)。また、選択の基礎として代謝拮抗物質、抗生物質あるいは

10

20

30

40

50

は除草剤への耐性を用いることができる。例えばdhfrはメトトレキセートに対する耐性を与え、neoはアミノグリコシドであるネオマイシンおよびG-418に対する耐性を与え、alsはクロルスルフロンに対する耐性を、patはホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼに対する耐性を各々与える(Wigler, M. 他(1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:35673570、Colbere-Garapin, F.他(1981) J. Mol. Biol. 150:1-14)。この他の選択可能な遺伝子、例えば、代謝のための細胞の必要条件を変えるtrpB及びhisDは、文献に記載されている(Hartman, S.C.及び R.C. Mulligan (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:8047-8051)。可視マーカー、例えばアントシアニン、緑色蛍光タンパク質(GFP; Clontech)、グルクロニダーゼ及びその基質グルクロニド、またはルシフェラーゼ及びその基質ルシフェリン等を用いてもよい。これらのマーカーを用いて、形質転換体を同定するだけでなく、特定のベクター系に起因する一過性或いは安定したタンパク質発現を定量することも可能である(Rhodes, C.A. (1995) Methods Mol. Biol. 55:121-131)。

10

【0200】

マーカー遺伝子発現の有無によって目的の遺伝子の存在が示唆されても、その遺伝子の存在および発現の確認が必要な場合もある。例えば、PMMMをコードする配列がマーカー遺伝子配列の中に挿入された場合、PMMMをコードするポリヌクレオチドを含む形質転換された細胞は、マーカー遺伝子機能の欠落により同定可能である。または、1つのプロモーターの制御下でマーカー遺伝子がPMMMをコードする配列とタンデムに配置することも可能である。誘導または選択に应答したマーカー遺伝子の発現は通常、タンデム遺伝子の発現も示す。

20

【0201】

一般に、PMMMをコードするポリヌクレオチドを持ち、PMMMを発現する宿主細胞は、当業者に周知の種々の方法を用いて特定できる。これらの方法には、DNA-DNA或いはDNA-RNAハイブリダイゼーションや、PCR法、核酸或いはタンパク質の検出及び/または数量化のための膜系、溶液ベース、或いはチップベースの技術を含むタンパク質生物学的試験法または免疫学的アッセイが含まれるが、これらに限定されるものではない。

【0202】

特異的なポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体のどちらかを用いるPMMMの発現の検出及び計測のための免疫学的方法は、当分野で周知である。このような技法には、酵素に結合した免疫吸着剤検定法(ELISA)、ラジオイムノアッセイ(RIA)、フローサイトメーター(FACS)などがある。PMMM上の2つの非干渉エピトープに反応するモノクローナル抗体を用いた、2部位のモノクローナルベースイムノアッセイ(two-site, monoclonal-based immunoassay)が好ましいが、競合の結合アッセイも用いることもできる。これらのアッセイおよび他のアッセイは、当分野で周知である(Hampton, R.他(1990) Serological Methods, a Laboratory Manual, APS Press, St. Paul MN, Sect.IV、Coligan, J.E.他(1997) Current Protocols in Immunology, Greene Pub.Associates and Wiley-Interscience, New York NY; Pound, J.D. (1998) Immunochemical Protocols, Humana Press, Totowa NJ)。

30

【0203】

多岐にわたる標識方法及び抱合方法が、当業者に知られており、様々な核酸アッセイおよびアミノ酸アッセイにこれらの方法を用い得る。PMMMをコードするポリヌクレオチドに関連する配列を検出するための、標識されたハイブリダイゼーションプローブ或いはPCRプローブを生成する方法には、オリゴ標識化、ニックトランスレーション、末端標識化、または標識されたヌクレオチドを用いるPCR増幅が含まれる。別法として、PMMMをコードするポリヌクレオチド群、またはその任意の断片群を、mRNAプローブを生成するためのベクターにクローニングできる。このようなベクターは、当分野において知られており、市販もされており、T7、T3またはSP6などの好適なRNAポリメラーゼおよび標識されたヌクレオチドを加えて、in vitroでRNAプローブの合成に用いることができる。これらの方法は、例えばAmersham Biosciences、Promega(Madison WI)、U.S. Biochemicalなどの種々の市販キットを用いて実行できる。検出を容易にするために用い得る好適なレポーター

40

50

分子あるいは標識には、基質、補助因子、インヒビター、磁気粒子のほか、放射性核種、酵素、蛍光剤、化学発光剤、発色剤などがある。

【0204】

PMMMをコードするポリヌクレオチドで形質転換した宿主細胞を、細胞培地での該タンパク質の発現と回収とに好適な条件下で培養しうる。形質転換細胞から製造されたタンパク質が分泌されるか細胞内に留まるかは、使用される配列、ベクター、あるいはその両者に依存する。PMMM をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターは、原核細胞膜及び真核細胞膜を透過するPMMM の分泌を誘導するシグナル配列を含むように設計できることは、当業者には理解されよう。

【0205】

更に、宿主細胞株の選択は、挿入したポリヌクレオチドの発現をモジュレートする能力、または発現したタンパク質を所望の形に処理する能力によって行い得る。限定するものではないがこのようなポリペプチドの修飾には、アセチル化、カルボキシル化、グリコシル化、リン酸化、脂質化およびアシル化がある。タンパク質の「プレプロ」または「プロ」形を切断する翻訳後のプロセッシングを利用して、タンパク質の標的への誘導、折りたたみ及び/または活性を特定することが可能である。翻訳後の活性のための、特定の細胞装置および特徴的な機序を持つ、種々の宿主細胞（例えばCHO、HeLa、MDCK、HEK293、WI38など）は、American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA) から入手可能であり、外来タンパク質の正しい修飾およびプロセッシングを確実にするように選択し得る。

【0206】

本発明の別の実施例では、PMMMをコードする天然のポリヌクレオチド、修飾されたポリヌクレオチド、または組換えのポリヌクレオチドを上記した任意の宿主系の融合タンパク質の翻訳となる異種配列に連結させ得る。例えば、市販の抗体によって認識できる異種部分を含むキメラPMMM タンパク質が、PMMM の活性のインヒビターに対するペプチドライブラリのスクリーニングを促進し得る。また、異種タンパク質部分および異種ペプチド部分も、市販されている親和性マトリックスを用いて融合タンパク質の精製を促進し得る。限定されるものではないがこのような部分には、グルタチオンSトランスフェラーゼ (GST)、マルトース結合タンパク質 (MBP)、チオレドキシシン (Trx)、カルモジュリン結合ペプチド (CBP)、6-His、FLAG、c-myc、赤血球凝集素 (HA) がある。GSTは固定化グルタチオン上で、MBPはマルトース上で、Trxはフェニルアルシノキシド上で、CBPはカルモジュリン上で、そして6-Hisは金属キレート樹脂上で、同族の融合タンパク質の精製を可能にする。FLAG、c-mycおよび赤血球凝集素 (HA) は、これらのエピトープ標識を特異的に認識する市販のモノクローナル抗体およびポリクローナル抗体を用いた、融合タンパク質の免疫親和性精製を可能にする。また、PMMM をコードする配列と異種タンパク質配列との間にあるタンパク質分解切断部位を融合タンパク質が含むように遺伝子操作すると、PMMM が精製の後に異種部分から切断され得る。融合タンパク質の発現および精製方法は、前出のAusubel他(前出、10および16章)に記載がある。市販されている種々のキットを用いて融合タンパク質の発現および精製を促進することもできる。

【0207】

本発明の別の実施例では、TNTウサギ網状赤血球可溶液またはコムギ胚芽抽出系 (Promega) を用いて *in vitro* で放射能標識したPMMMの合成が可能である。これらの系は、T7、T3またはSP6プロモーターと機能的に連結したタンパク質コード配列の転写及び翻訳をカプセルさせる。翻訳は、例えば³⁵Sメチオニンのような放射能標識したアミノ酸前駆体の存在下で起こる。

【0208】

PMMM或いはその断片またはその変異体を用いて、PMMMに特異結合する化合物をスクリーニングすることができる。1つ以上の試験化合物を用いて、PMMMへの特異的な結合をスクリーニングすることが可能である。種々の実施様態において、PMMMに対する特異結合について、1、2、3、4、5、10、20、50、100または200の試験化合物をスクリーニングすることができる。試験化合物の例として、抗体、アンティカリン (anticalins)、オリゴ

10

20

30

40

50

ヌクレオチド、タンパク質（例えばリガンドや受容体）、または小分子が挙げられる。

【0209】

関連の実施態様で、PMMM変異体を用いて試験化合物たとえば抗体の、PMMMへの結合や、PMMM変異体へ、または組み合わせたPMMMおよび/または1つ以上のPMMM変異体への結合をスクリーニングできる。ある実施態様においては、SEQ ID NO:1-31の配列の正確な配列を有するPMMMではなく、PMMMの変異体に結合する化合物のスクリーニングにPMMMの変異体を用いることができる。このようなスクリーニングを行うために使うPMMM変異体はPMMMに約50%から約99%の範囲で配列同一性を有し得る。また、種々の実施態様で60%、70%、75%、80%、85%、90%、および95%の配列同一性を有することができる。

【0210】

或る実施態様でPMMMへの特異結合スクリーニングで同定された化合物は、PMMMの天然リガンドに密接に関連する場合があります、例えばリガンドやその断片であり、または天然基質や、構造的または機能的な擬態物質（mimetic）、あるいは自然結合パートナーである（Colligan, J.E. 他（1991）Current Protocols in Immunology 1(2):5章）。別の実施態様では、こうして同定した化合物は、受容体PMMMの天然リガンドであり得る（Howard, A.D. 他（2001）Trends Pharmacol.Sci.22:132-140; Wise, A. 他（2002）Drug Discovery Today 7:235-246）。

【0211】

別の実施態様で、PMMMへの特異的結合のためのスクリーニングで同定される或る化合物はPMMMが結合する天然受容体、少なくとも該受容体の或る断片、または例えばリガンド結合部位や結合ポケットの全体または一部を含む該受容体の或る断片に、密接に関連し得る。例えば該化合物は、シグナルを伝播可能なPMMM受容体の場合や、シグナルを伝播できないPMMMおとり受容体の場合がある（Ashkenazi, A.およびV.M. Divit（1999）Curr. Opin. Cell Biol. 11:255-260、Mantovani, A. 他（2001）Trends Immunol.22:328-336）。該化合物は既知の技術を用いて合理的に設計できる。こうした技術の例としては、化合物エタネルセプト（etanercept）（ENBREL; Immunex Corp., Seattle WA）作製に用いた技術を含む。エタネルセプトは、ヒトリウマチ様関節炎の治療に有効である。エタネルセプトは遺伝子操作されたp75腫瘍壊死因子（TNF）受容体ダイマーであり、ヒトIgG₁のFc部分に連結されている（Taylor, P.C. 他（2001）Curr. Opin. Immunol. 13:611-616）。

【0212】

ある実施態様においては、類似した、あるいは異なる特異性を持つ2つ以上の抗体を、PMMM、PMMMの断片またはPMMMの変異体への結合についてスクリーニングすることができる。こうしてスクリーニングした抗体の結合特異性を選択し、PMMMの特定の断片または変異体を同定できる。1つの実施態様で、PMMMの特定の断片または変異体を優先的に同定できる結合特異性を持つ抗体を選択できる。別の実施態様で、PMMM産生の増加、低下、或いは異常を有する特定の疾患または病状を優先的に診断できる結合特異性を持つ抗体を選択できる。

【0213】

1つの実施態様で、anticalinを、PMMMまたはその断片あるいは変異体への特異結合につきスクリーニングできる。anticalinはリポカリン足場に基づいて作成されたりガンド結合タンパク質である（Weiss, G.A. 及び H.B. Lowman（2000）Chem. Biol. 7:R177-R184、Skerra, A.（2001）J. Biotechnol. 74:257-275）。リポカリンのタンパク質構造には、8つの逆平行ベータストランドを持つバレルが含まれ得り、それらのストランドはバレルの開放末端に4つのループを支持する。これらのループはリポカリンの天然リガンド結合部位を形成し、この部位は*in vitro*でアミノ酸置換によって再度人工操作して、新規な結合特異性を与えることができる。このアミノ酸置換は当分野で既知の方法または本明細書に記載の方法を用いて行うことができる。また、保存的置換（例えば、結合特異性を変えないような置換）、あるいは、結合特異性を少し、中等度、または大きく変えるような置換を行うこともできる。

【0214】

一実施態様では、PMMMに特異的に結合、もしくは刺激または阻害する化合物のスクリーニングには、分泌タンパク質或いは細胞膜上のタンパク質の何れか一方としてPMMMを発現する適切な細胞の作製が含まれる。好適な細胞には、哺乳動物、酵母、ショウジョウバエ、または大腸菌からの細胞が含まれ得る。PMMMを発現する細胞またはPMMMを含有する細胞膜断片を試験化合物と接触させて、DMEまたは化合物の何れかの結合、刺激または阻害を分析する。

【0215】

あるアッセイは、単に試験化合物をポリペプチドに実験的に結合させ、結合を、蛍光色素、放射性同位体、酵素抱合体またはその他の検出可能な標識により検出することができる。例えば、このアッセイは、少なくとも1つの試験化合物を、溶液中の或いは固体支持物に固定されたPMMMと結合させるステップと、PMMMとこの化合物との結合を検出するステップを含み得る。別法では、標識された競合物の存在下での試験化合物の結合の検出および測定を行うことができる。更にこのアッセイは、無細胞再構成標本、化学ライブラリ、または、天然産物の混合物を用いて実施でき、試験化合物(群)は、溶液中で遊離させるか固体支持体に固定する。

10

【0216】

アッセイを用いて、或る化合物が、その天然リガンドに結合する能力、および/または、その天然リガンドの、その天然受容体への結合を阻害する能力を評価しうる。こうしたアッセイの例としては、米国特許第5,914,236号および第6,372,724号に記載されたような放射ラベルアッセイを含む。関連した実施態様では、1つ以上のアミノ酸置換が或るポリペプチド化合物(受容体など)に導入され、その天然リガンドに結合する能力を向上または改変しうる(Matthews, D.J. および J.A. Wells. (1994) Chem. Biol. 1:25-30)。もう一つの関連する実施態様においては、ポリペプチド化合物(たとえばリガンド)に1つ以上のアミノ酸置換を行うことにより、天然受容体への結合能力を改善または改変することができる(Cunningham, B.C.およびJ.A. Wells (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:3407-3411; Lowman, H.B. 他 (1991) J. Biol. Chem. 266:10982-10988)。

20

【0217】

PMMMまたはその断片、あるいはPMMMの変異体を用いて、PMMMの活性を変調する化合物をスクリーニングすることができる。このような化合物としては、アゴニスト、アンタゴニスト、部分的アゴニストまたは逆アゴニストなどが含まれ得る。一実施例では、PMMMの活性が許容される条件下でアッセイを実施し、そのアッセイでは少なくとも1つの試験化合物をPMMMと混合し、試験化合物の存在下でPMMMの活性を試験化合物不在下でのPMMMの活性と比較する。試験化合物の存在下でのPMMMの活性の変化は、PMMMの活性を調整する化合物の存在を示唆する。別法では、試験化合物をPMMMの活性に適した条件下でPMMMを含む *in vitro* または無細胞再構成系と結合させてアッセイを実施する。これらアッセイの何れかにおいて、PMMMの活性を調整する試験化合物は間接的に結合することが可能であり、試験化合物と直接接触する必要がない。少なくとも1つ、または複数の試験化合物をスクリーニングすることができる。

30

【0218】

別の実施例では、胚性幹細胞(ES細胞)における相同組換えを用いて動物モデル系内で、PMMM またはその哺乳動物相同体をコードするポリヌクレオチドを「ロックアウト」する。このような技術は当技術分野において周知であり、ヒト疾患動物モデルの作製に有用である(米国特許第5,175,383号及び第5,767,337号等を参照)。例えば129/SvJ細胞系などのマウスES細胞は初期のマウス胚に由来し、培地で増殖させることができる。このES細胞は、ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ遺伝子(neo: Capecchi, M.R. (1989) Science 244:1288-1292)などのマーカー遺伝子で破壊した、目的の遺伝子を持つベクターで形質転換される。このベクターは、相同組換えにより、宿主ゲノムの対応する領域に組込まれる。或いは、Cre-loxP系を用いて相同組換えを行い、組織特異的または発生段階特異的に目的遺伝子をロックアウトする(Marth, J.D. (1996) Clin. Invest. 97:1999-2002、Wagner, K.U.他(1997) Nucleic Acids Res. 25:4323-4330)。形質転換したES細胞を同定

40

50

し、例えばC57BL/6マウス株などから採取したマウス細胞胚盤胞に微量注入する。これらの胚盤胞を偽妊娠メスに外科的に導入し、得られるキメラ子孫の遺伝形質を特定し、これらを交配させてヘテロ接合性系またはホモ接合性系を作製する。このようにして作製した遺伝子組換え動物は、潜在的な治療薬や毒性薬物で検査されうる。

【0219】

PMMM をコードするポリヌクレオチドを *in vitro* でヒト胚盤胞由来のES細胞において操作することが可能である。ヒトES細胞は、内胚葉、中胚葉および外胚葉の細胞タイプを含む、少なくとも8つの別々の細胞系統に分化する可能性を有する。これらの細胞系統は、例えば神経細胞、造血系統および心筋細胞に分化する (Thomson, J.A.他(1998) Science 282:1145-1147)。

10

【0220】

PMMM をコードするポリヌクレオチドを用いて、ヒト疾患をモデルとした「ノックイン」ヒト化動物(ブタ)または遺伝子組換え動物(マウスまたはラット)を作製することが可能である。ノックイン技術を用いて、PMMM をコードするポリヌクレオチドの或る領域を動物ES細胞に注入し、注入した配列を動物細胞ゲノムに組み込ませる。形質転換細胞を胞胚に注入し、胞胚を上記のように移植する。遺伝子組換え子孫または近交系について試験し、潜在的医薬品を用いて処理し、ヒトの疾患の治療に関する情報を得る。別法では、例えばPMMMを乳汁内に分泌するなどPMMMを過剰発現する哺乳動物近交系は、このタンパク質の簡便な源泉ともなり得る (Janne, J. 他 (1998) Biotechnol. Annu. Rev. 4:55-74)。

20

【0221】

(治療)

PMMMの領域とタンパク質修飾およびメンテナンス分子の領域との間に、例えば配列及びモチーフの内容における化学的及び構造的類似性が存在する。さらに、PMMMを発現する組織の例が、表6および実施例11に見つけられる。従って、PMMMは胃腸障害、心血管障害、自己免疫/炎症疾患、細胞増殖異常、発生・発達障害、上皮障害、神経疾患、生殖障害、内分泌障害、代謝異常、膵臓病、副腎と関連する疾患、性腺ステロイドホルモンと関連する疾患、癌、および感染症において、或る役割を果たすと考えられる。PMMMの発現若しくは活性の増大に関連する疾患の治療においては、PMMMの発現または活性を低下させることが望ましい。また、PMMMの発現または活性の低下に関連する疾患の治療においては、PMMMの発現または活性を増大させることが望ましい。

30

【0222】

従って、一実施例において、PMMM の発現または活性の低下に関連した疾患の治療または予防のために、患者にPMMM またはその断片や誘導体を投与することが可能である。限定するものではないが、このような疾患として、胃腸障害には、嚥下障害、消化性食道炎、食道痙攣、食道狭窄、食道癌、消化不良、消化障害、胃炎、胃癌、食欲不振、悪心、嘔吐、胃不全麻痺、洞または幽門の浮腫、腹部アングナ、胸焼け、胃腸炎、イレウス、腸管感染、消化性潰瘍、胆石症、胆嚢炎、胆汁うっ滞、膵臓炎、膵臓癌、胆道疾患、肝炎、高ビリルビン血症、硬変症、肝臓の受動的うっ血、ヘパトーム、感染性結腸炎、潰瘍性結腸炎、潰瘍性直腸炎、クローン病、ホウィップル病、マロリー ワイス症候群、大腸癌、大腸閉塞、過敏性腸症候群、短小腸症候群、下痢、便秘、胃腸出血、後天性免疫不全症候群 (AIDS) 腸症、黄疸、肝性脳症、肝腎症候群、脂肪肝、血色素症、ウィルソン病、アンチトリプシン欠損症、ライ症候群、原発性硬化性胆管炎、肝梗塞、門脈循環閉塞および血栓、小葉中心壊死、肝臓紫斑病、肝静脈血栓、肝静脈閉塞症、子癇前症、子癇、妊娠性急性脂肪肝、妊娠性肝臓内胆汁うっ滞と、結節性過形成および腺腫、癌腫など肝癌を含む。心血管障害には、動静脈瘤、アテローム硬化、高血圧、脈管炎、レイノー病、動脈瘤、動脈解離、静脈瘤、血栓静脈炎および静脈血栓、血管系腫瘍、血栓溶解の合併症、バルーン血管形成術、血管置換術 (vascular replacement)、冠動脈バイパス移植術、鬱血性心不全、虚血性心疾患、狭心症、心筋梗塞、高血圧性心疾患、変性弁膜性心疾患、石灰化大動脈弁狭窄症、先天性2尖大動脈弁、僧帽弁輪部石灰化 (mitral annular calcification)

40

50

)、僧帽弁逸脱、リウマチ熱、リウマチ性心疾患、感染性心内膜炎、非細菌性血栓性心内膜炎、全身性エリテマトーデスの心内膜炎、カルチノイド心疾患、心筋症、心筋炎、心膜炎、腫瘍性心疾患、先天性心臓疾患、心移植の合併症を含む。自己免疫/炎症疾患には、後天性免疫不全症候群(AIDS)、アジソン病(慢性原発性副腎機能不全)、成人呼吸窮迫症候群、アレルギー、強直性脊椎炎、アミロイド症、貧血、喘息、アテローム性動脈硬化、アテローム性粥腫崩壊、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性甲状腺炎、自己免疫性多腺性内分泌カンジダ症外胚葉ジストロフィー(APECED)、気管支炎、胆嚢炎、接触皮膚炎、クローン病、アトピー性皮膚炎、皮膚筋炎、糖尿病、肺気腫、リンパ球傷害因子性偶発性リンパ球減少症、新生児溶血性疾患(胎児赤芽球症)、結節性紅斑、萎縮性胃炎、糸球体腎炎、グッドパスチャー症候群、痛風、グレーブス病、橋本甲状腺炎、過好酸球増加症、過敏性腸症候群、多発性硬化症、重症筋無力症、心筋または心膜炎症、骨関節炎、関節軟骨劣化、骨粗しょう症、脾炎、多発性筋炎、乾癬、ライター症候群、リウマチ様関節炎、強皮症、シェーグレン症候群、全身性アナフィラキシー、全身性エリテマトーデス、全身性強皮症(systemic sclerosis)、血小板減少性紫斑病、潰瘍性大腸炎、ぶどう膜炎、ウェルナー症候群、癌合併症、血液透析、体外循環、ウイルス感染症、細菌感染症、真菌感染症、寄生虫感染症、原虫感染症、蠕虫感染症、外傷を含む。細胞増殖異常には光線性角化症、動脈硬化、アテローム硬化、滑液包炎、硬変、肝炎、混合性結合組織病(MCTD)、骨髓線維症、発作性夜間ヘモグロビン尿症、真性多血症、乾癬、原発性血小板血症を含む。発生・発達障害には尿細管性アシドーシス、貧血、クッシング症候群、軟骨形成不全性小人症、デュシェンヌ/ベッカー型筋ジストロフィー、骨吸収、癩癧、性腺形成異常、WAGR症候群(ウィルムス腫瘍、無虹彩症、尿生殖器異常、精神遅滞)、スミス マジェニス症候群(Smith-Magenis syndrome)、骨髓異形成症候群、遺伝性粘膜上皮異形成、遺伝性角皮症や、シャルコーマリーツース病および神経線維腫症などの遺伝性神経病、甲状腺機能低下症、水頭症や、Sydenham舞蹈病(Sydenham's chorea)および脳性小児麻痺などの発作障害、二分脊椎、無脳症、頭蓋脊椎披裂、先天性緑内障、白内障、加齢黄斑変性、感音難聴を含む。上皮性疾患には、発汗異常性湿疹、アレルギー性接触皮膚炎、毛孔性角化症、肝斑、白斑、光線性角化症、基底細胞癌、扁平細胞癌、脂漏性角化症、毛囊炎、単純疱疹、带状疱疹、水痘、カンジダ症、皮膚糸状菌症、疥癬、虫刺され、サクランボ色血管腫、ケロイド、皮膚線維腫、先端線維性軟疣、蕁麻疹、一過性棘融解性皮膚症、乾燥症、湿疹、アトピー性皮膚炎、接触皮膚炎、手湿疹、貨幣状湿疹、慢性単純性苔癬、皮脂減少性湿疹、鬱血性皮膚炎および鬱血性潰瘍化、脂漏性皮膚炎、乾癬、扁平苔癬、薔薇色秕糠疹、膿痂疹、膿瘡、皮膚糸状菌症、癩風、疣、尋常性座瘡、赤鼻、尋常性天疱瘡、落葉状天疱瘡、腫瘍随伴性天疱瘡、水疱性類天疱瘡、妊娠性疱疹、疱疹状皮膚炎、線状IgA病、後天性表皮水疱症、皮膚筋炎、紅斑性狼瘡、強皮症、限局性強皮症、紅皮症、脱毛症、修飾皮膚病変(figurate skin lesion)、毛細血管拡張、色素脱失、色素沈着過剰、小疱疹/水疱、発疹、皮膚薬物反応、丘疹結節皮膚損傷、慢性不治傷、光過敏症、単純型表皮水疱症、表皮剥離性角質増殖症、表皮溶解性掌蹠角皮症および非表皮溶解性掌蹠角皮症、ジームス水疱型魚鱗癬、剥脱性魚鱗癬、手掌角化症および足底角化症、掌蹠角化症、掌蹠角皮症、点状角化症、メースマン角膜ジストロフィ、先天性爪肥厚、白色海綿状母斑、多発性皮脂嚢腫症、上皮性母斑/表皮剥離性角質増殖症、連珠毛、裂毛症、慢性肝炎/特発性肝硬変、および、結腸直腸過形成を含む。神経疾患には、癩癧、虚血性脳血管障害、脳卒中、脳腫瘍、アルツハイマー病、ピック病、ハンチントン病、痴呆、パーキンソン病およびその他の錐体外路障害、筋萎縮性側索硬化および他の運動ニューロン障害、進行性神経性筋萎縮症、網膜色素変性症(色素性網膜炎)、遺伝性運動失調、多発性硬化症および他の脱髄疾患、細菌性およびウイルス性髄膜炎、脳膿瘍、硬膜下膿瘍、硬膜外膿瘍、化膿性頭蓋内血栓性静脈炎、脊髄炎および神経根炎、ウイルス性中枢神経系疾患と、プリオン病(クールー、クロイツフェルト ヤコブ病、およびGerstmann-Straussler-Scheinker症候群を含む)、致死性家族性不眠症、神経系性栄養病および代謝病、神経線維腫症、結節硬化症、小脳網膜血管腫症(cerebelloretinal hemangioblastomatosis)、脳三叉神経血管症候群(encephalotrigeminal syndrome)、精神遅滞および他の中枢神経系発達障害(ダ

10

20

30

40

50

ウン症を含む)、脳性麻痺、神経骨格異常症、自律神経系障害、脳神経疾患、脊髄疾患、筋ジストロフィー他の神経筋障害、末梢神経疾患、皮膚筋炎および多発性筋炎と、遺伝性、代謝性、内分泌性、および中毒性ミオパシーと、重症筋無力症、周期性四肢麻痺、精神障害(気分性、不安性の障害、統合失調症/分裂病)、季節性感情障害(SAD)、静座不能、健忘症、緊張病、糖尿病性ニューロパシー、遅発性ジスキネジア、ジストニー、パラノイド精神病、帯状疱疹後神経痛、トゥーレット病、進行性核上麻痺、大脳皮質基底核変性(corticobasal degeneration)、および家族性前頭側頭型痴呆を含む。生殖系疾患には、不妊症(卵管疾患、排卵欠損症、子宮内膜症)、プロラクチン産生障害、性周期障害、月経周期障害、多嚢胞性卵巣症候群、卵巣過刺激症候群、子宮内膜癌、卵巣癌、子宮筋腫、自己免疫疾患、子宮外妊娠、催奇形、乳がん、繊維嚢胞性乳房疾患、乳漏症、精子形成破壊、精子異常生理、精巣癌、前立腺癌、良性前立腺肥大、前立腺炎、パイロニー病、性交不能、男性乳癌、女性化乳房が含まれる。内分泌疾患の中には原発脳腫瘍及び腺腫、妊娠性梗塞、下垂体切除、動脈瘤、血管奇形、血栓症、感染症、免疫異常、頭部外傷による合併症などの病変から起こる視床下部及び下垂体の障害と、性機能低下及びシーハン症候群、尿崩症、カルマン病、ハンド シュラークリスチャン病、レトラ シヴェ病、サルコイドーシス、エンプティセラ症候群、小人症を含む下垂体低下に関連した障害と、良性線種によって発生しやすい不适当抗利尿ホルモン(ADH)分泌症候群(SIADH)及び先端巨大症、巨人症を含む下垂体亢進に関連した障害と、甲状腺腫及び粘液水腫、細菌感染性急性甲状腺炎、ウイルス感染性亜急性甲状腺炎、自己免疫性甲状腺炎(橋本病)、クレチン病を含む甲状腺機能低下症に関連した障害と、甲状腺中毒症及びその様々な型、グレーブス病、前脛骨粘液水腫、中毒性多結節性甲状腺腫、甲状腺癌、プランマー病を含む甲状腺機能亢進症と、Conn病(chronic hypercalemia)を含む副甲状腺機能亢進症を含む。代謝障害の中には、副腎機能不全、脳髄黄色腫症、副腎皮質過形成、クマリン耐性、嚢胞性線維症、糖尿病、脂肪性肝硬変、果糖-1,6-ジホスファターゼ欠損症、ガラクトース血症、甲状腺腫、グルカゴノーマ、糖原病、遺伝性果糖不耐症、副腎髄質機能亢進症、低アドレナリン症、上皮小体亢進症、副甲状腺低下症、高コレステロール血症、甲状腺亢進症、低血糖症、甲状腺低下症、高脂血症、脂質ミオパシー(lipid myopathies)、脂肪異栄養症、リソソーム蓄積症、マンノシドーシス、ノイラミニダーゼ欠損症、肥満症、ペントース-フェニルケトン尿症、プソイドビタミンD欠損症を含む。糖質代謝の疾患には、先天性I型異常赤血球産生症性貧血、糖尿病、インスリン依存型真性糖尿病、非インスリン依存型真性糖尿病、フルクトース-1,6-ジホスファターゼ欠乏症、ガラクトース血症、グルカゴノーマ、遺伝性フルクトース不耐症、低血糖症、マンノシドーシス、ノイラミニダーゼ欠乏症、肥満、ガラクトースエピメラーゼ欠乏症、糖原病、リソソーム蓄積症、果糖尿、五炭糖尿症、および遺伝性ピルビン酸代謝異常が含まれる。脂質代謝異常の中には、脂肪肝、胆汁うっ滞、原発性胆汁性肝硬変、カルニチン欠乏症、カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ欠乏症、ミオアデニレートデミナーゼ欠乏症、高トリグリセリド血症、ファブリー病などの脂質貯蔵病、ゴーシェ病、ニーマン ピック病、変染色性白質ジストロフィー、副腎性白質ジストロフィー、 G_{M2} にガングリオシドーシス、セロイドリポフスチン症、無リポ蛋白血症、タンジアー病、リポ蛋白過剰血症、糖尿病、脂肪異栄養症、脂肪腫症、急性皮下脂肪組織炎、播種性脂肪組織壊死症、有痛脂肪症、リポイド副腎過形成、リポイドネフロゼ、脂肪腫、アテローム性動脈硬化症、高コレステロール血症、高トリグリセリド血症を伴った高コレステロール血症、原発性低リポ蛋白血症、甲状腺症機能低下症、腎臓病、肝疾患、レシチン-コレステロールアシルトランスフェラーゼ欠乏症、脳髄黄色腫症、シトステロール血症、低コレステロール血症、テイ サックス病、サンドホフ病、高脂血症、脂肪過剰血症、脂質筋障害、肥満症が含まれる。銅代謝に関する疾患には、メンケス病、ウィルソン病、エラー・ダンロス症候群IX型が含まれる。膵臓疾患には、I型及びII型糖尿病及び合併症などが含まれる。副腎と関連のある疾患には、過形成及び副腎皮質の癌腫や腺腫、アルカローシスに関連した高血圧、アミロイド症、低カリウム血、クッシング病、リドル症候群、Arnold-Healy-Gordon症候群、褐色細胞腫瘍、アジソン病があり、生殖腺ステロイドホルモンに関連した疾患には、女性の異常プロ

10

20

30

40

50

ラクチン産生及び不妊症、子宮内膜症、月経周期の摂動、多嚢胞性卵巣疾患、高プロラクチン血症、選択的性腺刺激ホルモン不全 (isolated gonadotropin deficiency)、無月経、乳汁漏出症、半陰陽、多毛症及び男性化、乳癌、閉経期後の骨粗鬆症、男性のライジッヒ細胞過形成、男性更年期、生殖細胞無形成症、ライジッヒ細胞腫瘍に関連した性機能亢進、アンドロゲン受容体の欠如に関連したアンドロゲン耐性、5 - 還元酵素症候群、女性化乳房症などが含まれる。癌には、腺癌、白血病、リンパ腫、黒色腫、骨髄腫、肉腫、および奇形癌など癌、具体的には、副腎、膀胱、骨、骨髄、脳、乳房、頸部、胆嚢、神経節、消化管、心臓、腎臓、肝臓、肺、筋肉、卵巣、膵臓、副甲状腺、陰茎、前立腺、唾液腺、皮膚、脾臓、精巣、胸腺、甲状腺、および子宮の癌を含む。感染症には、アデノウイルス、アレナウイルス、ブンヤウイルス (bunyavirus)、カリチウイルス (calicivirus)、コロナウイルス、フィロウイルス、ヘパドナウイルス、ヘルペスウイルス、フラビウイルス、オルソミクソウイルス、パルボウイルス、パポバウイルス、パラミクソウイルス、ピコルナウイルス、ポックスウイルス、レオウイルス、レトロウイルス、ラブドウイルス、トガウイルスに分類されるウイルス病原体による感染や、細菌による感染 (肺炎球菌、ブドウ球菌、連鎖球菌、バシラス菌、コリネバクテリウム、クロストリジウム、髄膜炎菌、淋菌、リステリア、モラクセラ、キングラ、ヘモフィルス、レジオネラ、百日咳菌類 (ボルデテラ) や、シゲラ、サルモネラ、カンピロバクターを含むグラム陰性腸内細菌、シュドモナス、ピブリオ、ブルセラ、野兔病菌類 (フランシセラ)、エルシニア、バルトネラ、nocardium、放線菌、ミコバクテリウム、spirochaetale、リケッチア、クラミジア、マイコプラズマに分類)、真菌感染 (分類はアスペルギルス、プラストミセス、皮膚糸状菌、クリプトコッカス、コクシジオイデス、malassezia、ヒストプラズマ、または他の真菌症起因菌)、寄生虫感染 (分類はプラスモディウムすなわちマラリア原虫、寄生性アメーバ、リーシュマニア、トリパノソーマ、トキソプラズマ、ニューモシスチスカリニ、腸内原虫 (ジアルジアなど)、トリコモナス、組織線虫 (旋毛虫など)、腸管寄生線虫 (回虫など)、リンパ管フィラリア線虫、吸虫 (住血吸虫など)、および糸虫 (サナダムシなど)) が含まれる。

10

20

【0223】

別の実施例では、限定するものではないが上に列記した疾患を含むPMMMの発現または活性の低下に関連した疾患の治療または予防のために、PMMMまたはその断片や誘導体を発現し得るベクターを患者に投与することも可能である。

30

【0224】

更に別の実施例では、限定するものではないが上に列記した疾患を含むPMMMの発現または活性の低下に関連した疾患の治療または予防のために、実質的に精製されたPMMMを含む組成物を好適な医薬用キャリアと共に患者に投与することも可能である。

【0225】

更に別の実施例では、限定するものではないが上に列記した疾患を含むPMMMの発現または活性の低下に関連した疾患の治療または予防のために、PMMMの活性を調節するアゴニストを患者に投与することも可能である。

【0226】

更なる実施例では、PMMMの発現または活性の増大に関連した疾患の治療または予防のために、患者にPMMMのアンタゴニストを投与することが可能である。限定するものではないが、このような疾患として、上記の胃腸障害、心血管障害、自己免疫/炎症疾患、細胞増殖異常、発生・発達障害、上皮障害、神経疾患、生殖障害、内分泌障害、代謝異常、膵臓病、副腎と関連する疾患、性腺ステロイドホルモンと関連する疾患、癌、および感染症が含まれる。一実施態様では、PMMMと特異的に結合する抗体が直接アンタゴニストとして、或いはPMMMを発現する細胞または組織に薬剤を運ぶターゲティング或いは送達機構として間接的に用いられ得る。

40

【0227】

別の実施例では、限定するものではないが上に列記した疾患を含むPMMMの発現または活性の増大に関連した疾患の治療または予防のために、PMMMをコードするポリヌクレオ

50

チドの相補配列を発現するベクターを患者に投与することも可能である。

【0228】

他の実施態様において、タンパク質、アゴニスト、アンタゴニスト、抗体、相補的配列、またはベクターは他の適切な治療剤と併用して投与し得る。併用療法で用いる好適な治療薬は、当業者が従来 of 医薬原理に従って選択し得る。治療薬と組合せることにより、上記した種々の疾患の治療または予防に相乗効果をもたらす得る。この方法により、少量の各薬物で医薬効果をあげることが可能となり、それによって副作用の可能性を低減し得る。

【0229】

PMMMのアンタゴニストは、当分野で一般的な方法を用いて製造することが可能である。詳しくは、精製されたPMMMを用いて抗体を作ったり、治療薬のライブラリをスクリーニングしてPMMMと特異的に結合するものの同定が可能である。PMMMの抗体も、当分野で一般的な方法を用いて製造することが可能である。このような抗体には、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、一本鎖、Fabフラグメント、及びFab発現ライブラリによって作られたフラグメントが含まれる。但し、これらに限定されるものではない。或る実施態様では、中和抗体（すなわち二量体の形成を阻害する抗体）は治療用に用いることが可能である。一本鎖抗体（例えばラクダまたはラマに由来する）は強力な酵素インヒビターであり得る。またペプチド擬態物質の設計及び免疫吸着剤とバイオセンサーの開発に用途を有し得る (Muyldermans, S. (2001) J. Biotechnol. 74:277-302)。

10

【0230】

抗体の産生のためには、ヤギ、ウサギ、ラット、マウス、ラクダ、ヒトコブラクダ、ラマ、ヒト及びその他のものを含む種々の宿主が、PMMMまたは任意の断片、または免疫原性の特性を備えるそのオリゴペプチドの注入によって免疫化され得る。宿主の種に応じて、種々のアジュバントを用いて免疫応答を高めることもできる。限定するものではないがこのようなアジュバントには、フロイントアジュバントと、水酸化アルミニウムなどのミネラルゲルアジュバントと、リゾレシチン、プルロニックポリオール、ポリアニオン、ペプチド、油性乳剤、スカシガイのヘモシアニン (KLH)、ジニトロフェノールなどの界面活性剤とがある。ヒトに用いられるアジュバントの中では、BCG (カルメット ゲラン桿菌) およびコリネバクテリウム パルバム (*Corynebacterium parvum*) が特に好ましい。

20

【0231】

PMMMに対する抗体を誘発するために用いられるオリゴペプチド、ペプチド、または断片は、少なくとも約5個のアミノ酸からなり、一般的には約10個以上のアミノ酸からなるものが好ましい。これらのオリゴペプチド、ペプチドまたは断片はまた、天然のタンパク質のアミノ酸配列の一部と実質的に同一であることが望ましい。PMMMアミノ酸の短いストレッチは、KLHなどの別のタンパク質の配列と融合し、キメラ分子に対する抗体を産生され得る。

30

【0232】

PMMMに対するモノクローナル抗体は、培地内の連続した細胞株によって、抗体分子を産生する任意の技術を用いて作製することが可能である。限定するものではないがこのような技術には、ハイブリドーマ技術、ヒトB細胞ハイブリドーマ技術、およびEBV-ハイブリドーマ技術がある (Kohler, G. 他 (1975) Nature 256:495-497; Kozbor, D. 他 (1985) J. Immunol. Methods 81:31-42; Cote, R.J. 他 (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:2026-2030; Cole, S.P. 他 (1984) Mol. Cell Biol. 62:109-120)。

40

【0233】

更に、「キメラ抗体」作製のために開発された技術、例えば、ヒト抗体遺伝子にマウス抗体遺伝子をスプライシングするなどの技術が、好適な抗原特異性および生物学的活性を有する分子を得るために用いられる (Morrison, S.L. 他 (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855; Neuberger, M.S. 他 (1984) Nature 312:604-608; Takeda, S. 他 (1985) Nature 314:452-454)。別法では、当分野で周知の方法を用いて、一本鎖抗体の産生のための記載された技術を適用して、PMMM特異性一本鎖抗体を生成する。関連特異性を有するがイディオタイプ組成が異なるような抗体を、ランダムな組合せの免疫グロブリンライ

50

ブラリからチェーンシャッフリングによって産生することもできる (Burton D.R. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:10134-10137)。

【0234】

抗体の産生は、リンパ球集団における *in vivo* 産生の誘導によって、或いは文献に開示されているように非常に特異的な結合試薬の免疫グロブリンのライブラリまたはパネルのスクリーニングによっても行い得る (Orlandi, R. 他 (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:3833-3837, Winter, G. 他 (1991) Nature 349:293-299)。

【0235】

PMMM に対する特異的な結合部位を含む抗体断片も得ることができる。例えば、限定するものではないが、このような断片には、抗体分子のペプシン消化によって作製される F (ab')₂ 断片と、F (ab')₂ 断片のジスルフィド架橋を還元することによって作製される Fab 断片とがある。あるいは、Fab 発現ライブラリを作製することによって、所望の特異性を持つモノクローナル Fab 断片を迅速且つ容易に同定することが可能となる (Huse, W.D. 他 (1989) Science 246:1275-1281)。

【0236】

種々の免疫学的検定 (イムノアッセイ) を用いてスクリーニングすることにより、所望の特異性を有する抗体を同定し得る。確立された特異性を有するポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体の何れかを用いる競合的な結合、または免疫放射線活性のための数々のプロトコルが、当分野では周知である。通常このようなイムノアッセイには、PMMM とその特異性抗体との間の複合体形成の計測が含まれる。二つの非干渉性 PMMM エピトープに対して反応性のモノクローナル抗体を用いる、2 部位モノクローナルベースのイムノアッセイが一般に利用されるが、競合的結合アッセイも利用することができる (Pound, 前出)。

【0237】

ラジオイムノアッセイ技術と共に Scatchard 分析などの様々な方法を用いて、PMMM に対する抗体の親和性を評価する。親和性を結合定数 K_a で表すが、この K_a は、平衡状態の下で PMMM 抗体複合体のモル濃度を遊離抗体と遊離抗原のモル濃度で除して得られる値である。多数の PMMM エピトープに対して親和性が不均一なポリクローナル抗体試薬の K_a は、PMMM に対する抗体の平均親和性または結合活性を表す。特定の PMMM エピトープに単一特異的なモノクローナル抗体試薬の K_a は、親和性の真の測定値を表す。 K_a 値が $10^9 \sim 10^{12}$ L/mol の高親和性抗体医薬は、PMMM 抗体複合体が過酷な処理に耐えなければならないイムノアッセイに用いるのが好ましい。 K_a 値が $10^6 \sim 10^7$ L/mol の低親和性抗体医薬は、PMMM が抗体から最終的に活性化状態で解離する必要がある免疫精製 (immuno purification) 及び類似の処理に用いるのが好ましい。(Catty, D. (1988) Antibodies, Volume 1: A Practical Approach. IRL Press, Washington, DC; Liddell, J. E. および Cryer, A. (1991) A Practical Guide to Monoclonal Antibodies, John Wiley & Sons, New York NY)。

【0238】

ポリクローナル抗体製剤の抗体価および結合活性を更に評価して、後に使う或る適用例に対するこのような試薬の品質および適性を決定することができる。例えば、少なくとも $1 \sim 2$ mg/ml の特異的な抗体、好ましくは $5 \sim 10$ mg/ml の特異的な抗体を含むポリクローナル抗体医薬は一般に、PMMM 抗体複合体を沈殿させなければならない処理に用いられる。抗体の特異性、抗体価、結合活性、様々な適用例における抗体の品質や使用に対する指針については、一般に入手可能である (Catty, 前出, Coligan 他, 前出)。

【0239】

本発明の別の実施様態では、PMMM をコードするポリヌクレオチド、またはその任意の断片や相補配列が、治療目的で使用することができる。ある実施様態では、PMMM をコードする遺伝子のコーディング領域や調節領域に相補的な配列やアンチセンス分子 (DNA、RNA、PNA、修飾ヌクレオチド) を設計して遺伝子発現を変更することができる。このような技術は当分野では周知であり、センスまたはアンチセンスオリゴヌクレオチドまたは大きな

10

20

30

40

50

断片が、PMMMをコードする配列の制御領域、またはコード領域に沿ったさまざまな位置から設計可能である (Agrawal, S., 編集 (1996) Antisense Therapeutics, Humana Press Inc., Totawa NJ 等を参照)。

【0240】

治療に用いる場合、アンチセンス配列を適切な標的細胞に導入するのに好適な、任意の遺伝子送達系を用いることができる。アンチセンス配列は、転写時に標的タンパク質をコードする細胞配列の少なくとも一部に相補的な配列を作製する発現プラスミドの形で、細胞内に送達し得る (Slater, J.E.他 (1998) *J. Allergy Clin. Immunol.* 102:469-475, Scanlon, K.J.他 (1995) 9:1288-1296)。アンチセンス配列はまた、例えばレトロウイルスやアデノ関連ウイルスベクター等のウイルスベクターを用いて細胞内に導入することもできる (Miller, A.D. (1990) *Blood* 76:271、前出のAusubel, Uckert, W. 及び W. Walther (1994) *Pharmacol. Ther.* 63:323-347)。その他の遺伝子送達機構には、リポソーム系、人工的なウイルスエンベロープおよび当分野で公知のその他のシステムが含まれる (Rossi, J.J. (1995) *Br. Med. Bull.* 51:217-225; Boado, R.J.他 (1998) *J. Pharm. Sci.* 87(11):1308-1315, Morris, M.C.他 (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:2730-2736)。

10

【0241】

本発明の別の実施例では、PMMM をコードするポリヌクレオチドを、体細胞若しくは生殖細胞の遺伝子治療に用いることが可能である。遺伝子治療により、(i) 遺伝子欠損症を治療し (例えば X 染色体連鎖遺伝 (Cavazzana-Calvo, M.他 (2000) *Science* 288:669-672) により特徴付けられる重症複合型免疫不全 (SCID)-X1病の場合)、先天性アデノシンデアミナーゼ (ADA) 欠損症に関連する重症複合型免疫不全症候群 (Blaese, R.M. 他 (1995) *Science* 270:475-480; Bordignon, C.他 (1995) *Science* 270:470-475)、囊胞性繊維症 (Zabner, J.他 (1993) *Cell* 75:207-216; Crystal, R.G.他 (1995) *Hum. Gene Therapy* 6:643-666; Crystal, R.G.他 (1995) *Hum. Gene Therapy* 6:667-703)、サラセミア (thalassaemia)、家族性高コレステロール血症や、第 8 因子若しくは第 9 因子欠損に起因する血友病 (Crystal, R.G. (1995) *Science* 270:404-410, Verma, I.M. および N. Somia (1997) *Nature* 389:239-242)、(ii) 条件的致死性遺伝子産物を発現させ (例えば制御不能な細胞増殖に起因する癌の場合)、(iii) 細胞内の寄生生物、例えばヒト免疫不全ウイルス (HIV) (Baltimore, D. (1988) *Nature* 335:395-396, Poeschla, E.他 (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93:11395-11399) などヒトレトロウイルス、B型若しくはC型肝炎ウイルス (HBV, HCV)、Candida albicans および Paracoccidioides brasiliensis 等の寄生真菌、並びに熱帯熱マラリア原虫およびクルーズトリパノソーマ等の寄生原虫に対する防御機能を有するタンパク質を発現できる。PMMMの発現若しくは調節に必要な遺伝子の欠損が疾患を引き起こす場合、導入した細胞の好適な集団から PMMM を発現させて、遺伝子欠損によって起こる症状の発現を緩和することが可能である。

20

30

【0242】

本発明の更なる実施例では、PMMM の欠損による疾患や異常症は、PMMM をコードする哺乳動物発現ベクターを作製して、これらのベクターを機械的手段によって PMMM 欠損細胞に導入することによって治療する。in vivoあるいはex vitroの細胞に用いる機械的導入技術には、(i) 個々の細胞内への直接的な DNA 微量注射法、(ii) 遺伝子銃、(iii) リポソームを介した形質移入、(iv) 受容体を介した遺伝子導入、および (v) DNA トランスポゾンの使用がある (Morgan, R.A. および W.F. Anderson (1993) *Annu. Rev. Biochem.* 62:191-217, Ivics, Z. (1997) *Cell* 91:501-510; Boulay, J-L. および H. Recipon (1998) *Curr. Opin. Biotechnol.* 9:445-450)。

40

【0243】

PMMM の発現に効果的である発現ベクターには、限定するものではないが、PCDNA 3.1、EPITAG、PRCCMV2、PREP、PVAX、PCR2-TOPOTA ベクター (Invitrogen, Carlsbad CA)、PCMVSCRIPT、PCMV-TAG、PEGSH/PERV (Stratagene, La Jolla CA) および PTETOFF、PTETON、PTRE2、PTRE2LUC、PTKHYG (Clontech, Palo Alto CA) が含まれる。PMMM を発現させるために、(i) 恒常的に活性化プロモーター (例えば、サイトメガロウイルス (CMV)、

50

ラウス肉腫ウイルス (RSV)、SV40ウイルス、チミジンキナーゼ (TK)、若しくは - アクチン遺伝子等)、(ii)誘導性プロモーター (例えば、市販されているT-REXプラスミド (Invitrogen)に含まれている、テトラサイクリン調節性プロモーター (Gossen, M. and H. Bujard (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89:5547-5551、Gossen, M. 他 (1995) Science 268:1766-1769、Rossi, F.M.V. and H.M. Blau (1998) Curr. Opin. Biotechnol. 9:451-456))、エクジソン誘導性プロモーター (市販されているプラスミドPVGRXR及びPINDに含まれている: Invitrogen)、FK506/ラパマイシン誘導性プロモーター、またはRU486/ミフェプリストーン誘導性プロモーター (Rossi, F.M.V. and H.M. Blau, 前出)、または (iii) 正常な個体に由来するPMMMをコードする内因性遺伝子の天然のプロモーター若しくは組織特異的プロモーターを用いることが可能である。

10

【0244】

市販のリポソーム形質転換キット (例えばInvitrogen社のPERFECT LIPID TRANSFECTION KIT)を用いれば、当業者は経験にそれほど頼らないでもポリヌクレオチドを培養中の標的細胞に導入することが可能になる。別法では、リン酸カルシウム法 (Graham, F.L. および A.J. Eb (1973) Virology 52:456-467)若しくは電気穿孔法 (Neumann, E. 他 (1982) EMBO J. 1:841-845)。初代培養細胞にDNAを導入するためには、標準化された哺乳類の形質移入プロトコルの修正が必要である。

【0245】

本発明の別の実施例では、PMMMの発現に関連する遺伝子欠損によって起こる疾患や異常症は、(i)レトロウイルス末端反復配列 (LTR)プロモーター若しくは独立したプロモーターのコントロール下でATRSをコードするポリヌクレオチドと、(ii)好適なRNAパッケージングシグナルと、(iii)追加のレトロウイルス・シス作用性RNA配列及び効率的なベクターの増殖に必要なコーディング配列を伴うRev応答性エレメント (RRE)とからなるレトロウイルスベクターを作製して治療することができる。レトロウイルスベクター (例えばPFBおよびPFBNE0)はStratagene社から市販されており、刊行データ (Riviere, I. 他 (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:6733-6737)に基づく。上記データを引用することを以て本明細書の一部とする。このベクターは、好適なベクター産生細胞株 (VPCL)において増殖される。VPCLは、各標的細胞上の受容体への親和性を持つエンベロープ遺伝子を、またはVSVgなど汎親和性エンベロープタンパク質を発現する (Armentano, D. 他 (1987) J. Virol. 61:1647-1650; Bender, M.A.他 (1987) J. Virol. 61:1639-1646; Adam, M.A. および A.D. Miller (1988) J. Virol. 62:3802-3806; Dull, T.他 (1998) J. Virol. 72:8463-8471; Zufferey, R.他 (1998) J. Virol. 72:9873-9880)。Riggに付与された米国特許第5,910,434号 (「Method for obtaining retrovirus packaging cell lines producing high transducing efficiency retroviral supernatant」)において、レトロウイルスパッケージング細胞株を得るための方法が開示されており、引用することをもって本明細書の一部とする。レトロウイルスベクター類の繁殖や、細胞集団 (例えばCD4⁺T細胞群)の形質導入、および形質導入した細胞群の患者への戻しは、遺伝子治療分野では当業者に周知の手法であり、多数の文献に記載がある (Ranga, U.他 (1997) J. Virol. 71:7020-7029; Bauer, G.他 (1997) Blood 89:2259-2267; Bonyhadi, M.L. (1997) J. Virol. 71:4707-4716; Ranga, U.他 (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:1201-1206; Su, L. (1997) Blood 89:2283-2290)。

20

30

40

【0246】

或る実施様態では、アデノウイルス系遺伝子治療の送達系を用いて、PMMMの発現に関連する1つ或いは複数の遺伝子異常を有する細胞にPMMMをコードするポリヌクレオチドを送達する。アデノウイルス系ベクター類の作製およびパッケージングについては、当業者に周知である。複製欠損型アデノウイルスベクター類は、種々の免疫調節タンパク質をコードする遺伝子群を、無損傷の臍島内に導入する目的で多様に利用し得ることが証明された (Csete, M.E.他 (1995) Transplantation 27:263-268)。使用できる可能性のあるアデノウイルスベクターは、Armentanoに付与された米国特許第5,707,618号 (「Adenovirus vectors for gene therapy」)に記載されており、引用することをもって本明細書の一部と

50

する。アデノウイルスベクター類については、Antinozzi, P.A. 他(1999; Annu. Rev. Nu tr. 19:511-544) 並びに、Verma, I.M. および N. Somia (1997; Nature 18:389:239-24 2)。

【0247】

別の実施様態では、ヘルペス系遺伝子治療の送達系を用いて、PMMMの発現に関連する1つ或いは複数の遺伝子異常を有する標的細胞にPMMMをコードするポリヌクレオチドを送達する。単純疱疹ウイルス(HSV)系のベクターは、HSV親和性の中枢神経細胞にPMMMを導入する際に特に役立つ。ヘルペス系ベクター類の作製およびパッケージングは、当業者に公知である。或る複製適格性単純ヘルペスウイルス(HSV)1型系のベクターが、或るレポーター遺伝子の、霊長類の眼への送達に用いられている(Liu, X. 他(1999) Exp. Eye Res. 169:385395)。HSV-1ウイルスベクターの作製についても、DeLucaに付与された米国特許第5,804,413号(「Herpes simplex virus strains for gene transfer」)に開示されており、該特許の引用をもって本明細書の一部とする。米国特許第5,804,413号には、ヒト遺伝子治療を含む目的のために好適なプロモーターの制御下において細胞に導入される少なくとも1つの外在性遺伝子を有するゲノムを含む組換えHSV d92の使用についての記載がある。上記特許はまた、ICP4、ICP27及びICP22を欠失した組換えHSV系統の作製及び使用について開示している。HSVベクター類については、Goins, W.F. 他(1999; J. Virol. 73:519532)、Xu, H. 他(1994; Dev. Biol. 163:152161)。クローン化ヘルペスウイルス配列の操作、巨大ヘルペスウイルスのゲノムの異なったセグメント群を含む多数のプラスミドを形質移入した後の組換えウイルスの産生、ヘルペスウイルスの成長及び増殖、並びにヘルペスウイルスの細胞への感染は、当業者に公知の技術である。

【0248】

別の実施様態では、ウイルス(正の一本鎖RNAウイルス)ベクターを用いてPMMMをコードするポリヌクレオチドを標的細胞に送達する。プロトタイプのウイルスであるセムリキ森林熱ウイルス(Semliki Forest Virus, SFV)の生物学的研究が広範に行われており、遺伝子導入ベクターはSFVゲノムに基づいている(Garoff, H. 及び K.-J. Li (1998) Cun. Opin. Biotech. 9:464-469)。ウイルスRNAの複製中に、通常はウイルスのカプシドタンパク質をコードするサブゲノムRNAが作り出される。このサブゲノムRNAは、完全長のゲノムRNAより高いレベルに複製されるため、酵素活性(例えばプロテアーゼ及びポリメラーゼ)を有するウイルスタンパク質に比べてカプシドタンパク質が過剰産生される。同様に、PMMMをコードする配列をウイルスゲノムのカプシドをコードする領域に導入することによって、ベクター導入細胞において多数のPMMMをコードするRNAが産生され、高いレベルでPMMMが合成される。通常、ウイルスの感染は、数日以内の細胞溶解を伴う。一方、シンドビスウイルス(SIN)の或る変異体を有するハムスター正常腎臓細胞(BHK-21)群が持続的な感染を確立する能力は、ウイルス類の溶解複製を、遺伝子治療に応用し得るように好適に改変可能であることを示唆する(Dryga, S.A. 他(1997) Virology 228:74-83)。様々な宿主にウイルスを導入できることから、様々なタイプの細胞にPMMMを導入することできる。或る集団における或るサブセットの細胞群の特異的形質導入は、形質導入前に細胞の選別を必要とし得る。ウイルスの感染性cDNAクローンの処置方法、ウイルスのcDNAおよびRNAの形質移入方法およびウイルスの感染方法は、当業者に公知である。

【0249】

転写開始部位(transcription initiation site)由来のオリゴヌクレオチドを用いて遺伝子発現を阻害することも可能である。この位置は、例えばスタート部位(start site)から数えて約-10と約+10の間である。同様に、三重らせん塩基対の形成方法を用いて阻害が可能となる。三重らせん塩基対形成は、ポリメラーゼ、転写因子または調節分子と結合できるように十分に開こうとする、二重らせんの能力を阻害するため有用である。三重らせんDNAを用いる最近の治療の進歩については文献に記載がある(Gee, J.E. 他(1994) in Huber, B.E. および B.I. Carr, Molecular and Immunologic Approaches, Futura Publishing, Mt. Kisco NY, 163-177ページ)。相補配列またはアンチセンス分子もまた、

転写物がリボソームに結合するのを阻止することによってmRNAの翻訳を阻止するように設計することができる。

【0250】

リボザイムは酵素的RNA分子であり、RNAの特異的切断を触媒するためにリボザイムを用いることもできる。リボザイム作用のメカニズムは、相補的標的RNAへのリボザイム分子の配列特異的ハイブリダイゼーションとその後に起こる内ヌクレオチド鎖切断に参与している。例えば、遺伝子操作で作ったハンマーヘッド型リボザイム分子が、PMMMをコードするRNA分子の、内ヌクレオチド鎖切断を特異的且つ効果的に触媒できる可能性がある。

【0251】

任意のRNA標的内の特異的リボザイム切断部位は、GUA、GUU、GUC配列を含めたりボザイム切断部位に対して標的分子をスキャンすることによって先ず同定される。一度同定されると、切断部位を持つ標的遺伝子の領域に対応する15~20リボヌクレオチドの短いRNA配列が、そのオリゴヌクレオチドを機能不全にするような2次構造の特徴をもっていないかを評価することが可能になる。候補標的の適合性の評価も、リボヌクレアーゼ保護アッセイを用いて相補的オリゴヌクレオチド群とのハイブリダイゼーションへのアクセス可能性をテストすることによって行い得る。

【0252】

相補リボ核酸分子及びリボザイムは、核酸分子の合成のために当分野で既知の任意の方法を用いて作製し得る。作製方法には、固相ホスホラミダイト化学合成など、オリゴヌクレオチドを化学的に合成する方法がある。或いは、PMMMをコードするDNA分子の *in vitro* 及び *in vivo* 転写によってRNA分子を産出し得る。このようなDNA配列は、T7やSP6などの好適なRNAポリメラーゼプロモーターを用いて多様なベクター内に取り込むことが可能である。或いは、相補的RNAを構成的或いは誘導的に合成するようなこれらcDNA産物を、細胞株、細胞または組織内に導入することができる。

【0253】

細胞内の安定性を高め、半減期を長くするために、RNA分子を修飾し得る。限定するものではないが可能な修飾としては、分子の5'末端、3'末端、あるいはその両方において隣接配列群を追加することや、分子の主鎖内においてホスホジエステラーゼ結合ではなくホスホオチオエートまたは2'-O-メチルを使用することが含まれる。この概念は、本来はPNA群の産出におけるものであるが、これら全ての分子に拡大することができる。そのためには、内因性エンドヌクレアーゼによって容易には認識されない、アデニン、シチジン、グアニン、チミン、およびウリジンにアセチル -、メチル -、チオ - および同様の修飾をしたものや、非従来型塩基、例えばイノシン、クエオシン (queosine)、ワイブトシン (wybutosine) を加える。

【0254】

本発明の別の実施様態では、本発明の1つ以上の選択されたポリヌクレオチドの発現を、当分野で知られているRNA干渉(RNAi)または転写後遺伝子サイレンシング(PTGS)方法を用いて変更、阻害、低下、または抑制し得る。RNAiは、遺伝子サイレンシングの転写後モードであり、標的細胞に導入された二本鎖RNA(dsRNA)が相同遺伝子(例えば、dsRNAに相補的な配列を有する遺伝子)の発現を特異的に抑制する。これは効果的に標的遺伝子の発現をロックアウトするか、実質的に低下させる。PTGSはまた、DNAあるいはDNA断片の使用によっても達成され得る。RNAiの方法はFire, A. 他.(1998; Nature 391:806-811)およびGura, T. (2000; Nature 404:804-808)によって記述されている。PTGSはまた、本明細書に記載された、または当分野で既知である遺伝子送達法そして/またはウイルスベクター送達方法を用いてDNAの相補的なセグメントを選択された組織に導入することによっても開始することができる。

【0255】

RNAiは、siRNAとしても知られる低分子干渉RNAの使用により哺乳動物細胞に導入し得る。siRNAはdsRNA(通常は長さが約21から23ヌクレオチドである)の短いセグメントであり、内因性リボヌクレアーゼの作用により導入されたdsRNAの *in vivo* での分解から生じる。

SiRNAは哺乳動物でRNAi効果のメディエーターのように思われる。最も効果的なsiRNAは、2ヌクレオチドの3'でのオーバーハングを有する21ヌクレオチドdsRNAであると思われる。哺乳動物細胞でのRNAiの導入のためのsiRNAの利用は、Elbashir, S.M. 他. (2001; Nature 411:494-498)に記述されている。

【0256】

SiRNAはdsRNAの標的細胞への導入により間接的に生成されるか、あるいは本明細書で記述されているまたは当分野で既知の、哺乳類の形質移入方法と試薬(リボソームを介した形質移入、ウイルスベクター方法、または他のポリヌクレオチド送達/導入方法等)により直接的に生成される。好適なSiRNAは、AUG開始コドンから下流のヌクレオチド配列のための標的ポリヌクレオチド(例えばmRNA)の転写物を試験し、および各ヌクレオチドそして3'に隣接する19から23ヌクレオチドを潜在的なsiRNA標的部位(好ましくは21ヌクレオチド長を有する配列をもつ)としての存在を記録することにより選択され得る。標的siRNA部位のために避けられる領域には、5'および3'の非翻訳領域(UTR)また開始コドンに近くの領域(75塩基内)が含まれるが、その理由は、これらが調節タンパク質結合部位に関して豊富であり得るからである。UTR-結合タンパク質そして/または翻訳開始複合体は、siRNPエンドヌクレアーゼ複合体の結合と干渉し得る。siRNAの選択された標的部位は、当分野で既知のBLASTあるいは他の配列比較アルゴリズム一式を用いて適切なゲノムデータベース(例えばヒト等)と比較し得る。他のコード配列に対して著しく相同的な標的配列は、考慮から排除することができる。選択されたSiRNAは、当分野で既知の化学的合成方法または市販の方法とSILENCER siRNA作成キット(Ambion, Austin TX)等キットを用いて*in vitro*転写によって生成され得る。

10

20

【0257】

別の実施様態では、長期の遺伝子サイレンシングそして/またはRNAi効果は、siRNAを連続的に発現する発現ベクターを用いて選択された組織に導入され得る。これは、当分野で既知の方法を用いてヘアピンRNA(shRNA)を発現するよう遺伝子操作された発現ベクターを用いて達成され得る(Brummelkamp, T.R. 他. (2002) Science 296:550-553、Paddison, P.J. 他. (2002) Genes Dev. 16:948-958等を参照)。これらの実施様態とそれらに関連する実施様態では、shRNAは当分野で既知の発現ベクターを用いて標的細胞に送達され得る。siRNAの送達のための好適な発現ベクターの一例は、PSILENCER1.0-U6 (circular)プラスミド(Ambion)である。一旦標的組織に送達されると、shRNAは遺伝子特異的サイレンシングを実行可能なsiRNA様分子へと*in vivo*で処理される。

30

【0258】

様々な実施様態で、RNAiまたはPTGS方法により標的にされた遺伝子の発現レベルは、mRNAそして/またはタンパク質分析のためのアッセイにより測定され得る。標的遺伝子のmRNAの発現レベルは、例えばNORTHERNMAX-GLYキット(Ambion)を用いたノーザン分析法、マイクロアレイ法、PCR法、リアルタイムPCR法、そして当分野で既知または本明細書に記載の他のRNA/ポリヌクレオチドアッセイにより測定され得る。標的遺伝子によってコードされたタンパク質の発現レベルは、当分野で既知の標準技術を用いるウェスタン分析により測定され得る。

【0259】

本発明の更なる実施例は、PMMMをコードするポリヌクレオチドの発現の変化に有効な化合物をスクリーニングする方法を含む。限定するものではないが特異ポリヌクレオチドの発現の改変に効果的な化合物には、オリゴヌクレオチド、アンチセンスオリゴヌクレオチド、三重らせん形成オリゴヌクレオチド、転写因子その他のポリペプチド転写制御因子、及び特異ポリヌクレオチド配列と相互作用し得る非高分子化学的実体がある。有効な化合物は、ポリヌクレオチド発現のインヒビターまたはエンハンサーのいずれかとして作用することによりポリヌクレオチド発現を改変し得る。従って、PKINの発現または活性の増加に関連する疾患の治療においては、PMMMをコードするポリヌクレオチドの発現を特異的に阻害する化合物が治療上有用であり、PMMMの発現または活性の低下に関連する疾患の治療においては、PMMMをコードするポリヌクレオチドの発現を特異的に促進する化合物

40

50

が治療上有用であり得る。

【0260】

多様な実施様態において、特異ポリヌクレオチドの発現改変における有効性に対して、1つ以上の試験化合物をスクリーニングし得る。試験化合物は、当分野で通常知られている任意の方法により得られる。このような方法には、ポリヌクレオチドの発現を変異させる場合と、既存の、市販のまたは私的な、天然または非天然の化合物ライブラリから選択する場合と、標的ポリヌクレオチドの化学的及び/または構造的特性に基づく化合物を合理的にデザインする場合と、組合せ的にまたは無作為に生成した化合物のライブラリから選択する場合に有効であることが知られているような化合物の化学修飾がある。PMMMをコードするポリヌクレオチドを含むサンプルは、少なくとも1つの試験化合物に曝露して得る。サンプルは例えば、無傷細胞、透過処理した細胞、あるいは*in vitro*無細胞系すなわち再構成生化学系があり得る。PMMMをコードするポリヌクレオチドの発現における変化は、当分野で通常知られている任意の方法でアッセイする。通常、PMMMをコードするポリヌクレオチドの配列に相補的なヌクレオチド配列を有するプローブを用いたハイブリダイゼーションにより、特異ヌクレオチドの発現を検出する。ハイブリダイゼーション量を定量し、それによって1つ以上の試験化合物に曝露される及び曝露されないポリヌクレオチドの発現の比較に対する基礎を形成し得る。試験化合物に曝露されるポリヌクレオチドの発現における変化の検出は、ポリヌクレオチドの発現を改変する際に試験化合物が有効であることを示している。或る特定ポリヌクレオチドの改変発現に有効な化合物のためのスクリーニングを実行でき、例えば分裂酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*) 遺伝子発現系 (Atkins, D. 他(1999) 米国特許第5,932,435号、Arndt, G.M. 他(2000) *Nucleic Acids Res.* 28:E15) またはHeLa細胞等のヒト細胞株 (Clarke, M.L. 他(2000) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 268:8-13)。本発明の或る特定の実施様態は、或る特定ポリヌクレオチド配列に対するアンチセンス活性について、オリゴヌクレオチド (デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド、ペプチド核酸、修飾したオリゴヌクレオチド) の組合せライブラリをスクリーニングする過程に関する (Bruce, T.W. 他(1997) 米国特許第5,686,242号、Bruce, T.W. 他(2000) 米国特許第6,022,691号)。

10

20

【0261】

ベクターを細胞または組織に導入する多数の方法が利用可能であり、*in vivo*、*in vitro*及び*ex vivo*の使用に対して同程度に適している。*ex vivo*治療の場合、ベクターを、患者から採取した幹細胞内に導入し、クローニング増殖して同患者に自家移植で戻すことができる。トランスフェクションによる、またはリポソーム注入やポリカチオンアミノポリマーによる送達は、当分野で周知の方法を用いて実行することができる (Goldman, C.K. 他(1997) *Nat. Biotechnol.* 15:462-466)。

30

【0262】

上記の治療方法はいずれも、例えば、ヒト、イヌ、ネコ、ウシ、ウマ、ウサギ、サルなどの哺乳類を含めて治療が必要な全ての被験体に適用できる。

【0263】

本発明の或る更なる実施様態は、薬物として許容できる或る賦形剤と共に製剤される或る活性成分を一般に有する、或る組成物の投与に関する。賦形剤には例えば、糖、でんぷん、セルロース、ゴムおよびタンパク質がある。様々な剤型が広く知られており、詳細は *Remington's Pharmaceutical Sciences* (Maack Publishing, Easton PA) の最新版に記載されている。このような組成物は、PMMM、PMMMの抗体、擬態、アゴニスト、アンタゴニスト、またはPMMMのインヒビターなどからなる。

40

【0264】

多様な実施様態において、医薬品成分等の本明細書に記載されている組成物は、任意の数の経路によって投与することができ、限定するものではないが経路には、経口、静脈内、筋肉内、動脈内、骨髄内、クモ膜下腔内、心室内、肺、経皮、皮下、腹腔内、鼻腔内、腸内、局所、舌下または直腸がある。

【0265】

50

肺から投与する組成物は、液状または乾燥粉末状で調製し得る。このような組成物は通常、患者が吸入する直前にエアロゾル化する。小分子（例えば伝統的な低分子量有機薬）の場合には、速効製剤のエアロゾル送達は当分野で公知である。高分子（例えばより大きなペプチドおよびタンパク質）の場合には、当該分野において肺の肺胞領域を介しての肺送達が最近向上したことにより、インスリンなどの薬物を実質的に血液循環へ輸送することを可能にした（Patton, J.S. 他, 米国特許第5,997,848号などを参照）。肺送達は、針注射なしに投与することが可能であり、有毒な可能性のある浸透エンハンサーの必要性をなくす。

【0266】

本発明での使用に適した組成物には、所定の目的を達成するために必要なだけの量の活性成分を含有する組成物が含まれる。有効投与量の決定は、当業者の能力の範囲内で行う。

10

【0267】

PMMMまたはその断片を含む高分子を直接細胞内に送達するべく、特殊な形態に組成物が調製されるのが好ましい。例えば、細胞不透過性高分子を含むリポソーム製剤は、その高分子の細胞融合と細胞内送達とを促進し得る。別法では、PMMMまたはその断片をHIV Tat-1タンパク質の陽イオンN末端部に結合することもできる。このようにして生成された融合タンパク質類は、或るマウスモデル系の、脳を含む全ての組織の細胞群に形質導入することがわかっている（Schwarze, S.R. 他(1999) Science 285:1569-1572）。

【0268】

任意の化合物に対して、細胞培養アッセイ、例えば新生物性細胞の細胞培養アッセイにおいて、或いは、動物モデル、例えばマウス、ウサギ、イヌまたはブタ等において、先ず治療有効投与量を推定することができる。動物モデルはまた、好適な濃度範囲および投与経路を決定するためにも用い得る。このような情報を用いて、次にヒトに対する有益な投与量および投与経路を決定することができる。

20

【0269】

治療有効量は、症状や容態を回復させる、たとえばPMMMまたはその断片、PMMMの抗体、PMMMのアゴニストまたはアンタゴニスト、インヒビターなどの活性処方成分の量に関連する。治療有効性及び毒性は、細胞培養または動物実験における標準的な薬剤手法によって、例えばED₅₀（集団の50%の治療有効量）またはLD₅₀（集団の50%の致死量）を測定するなどして決定することができる。毒性効果の治療効果に対する投与量の比が治療指数であり、LD₅₀/ED₅₀比として表すことができる。高い治療指数を示すような組成物が望ましい。細胞培養アッセイと動物実験とから得られたデータは、ヒトに用いる投与量の範囲の策定に用いられる。このような組成物に含まれる投与量は、毒性を殆どあるいは全く持たず、ED₅₀を含むような血中濃度の範囲にあることが好ましい。投与量は、用いられる投与形態、患者の感受性および投与の経路によってこの範囲内で変わる。

30

【0270】

正確な投与量は、治療が必要な被験者に関する要素を考慮して、現場の医者が決定することになる。十分なレベルの活性成分を与え、あるいは所望の効果を維持すべく、用法および用量を調整する。被験者に関する要素としては、疾患の重症度、患者の全身の健康状態、患者の年齢、体重及び性別（ジェンダー）、投与の時間及び頻度、併用薬、反応感受性及び治療に対する応答等を考慮しうる。作用期間が長い組成物は、特定の製剤の半減期及びクリアランス率によって3～4日毎に1度、1週間に1度、或いは2週間に1度の間隔で投与し得る。

40

【0271】

通常の投与量は、投与の経路にもよるが約0.1～100,000 μgであり、合計で約1gまでとする。特定の投与量および送達方法に関するガイダンスは文献に記載されており、現場の医者は通常それを利用することができる。当業者は、ヌクレオチドの処方では、タンパク質またはそれらのインヒビター類とは異なる処方を利用することになる。同様に、ポリヌクレオチドまたはポリペプチドの送達は、特定の細胞、症状、部位などに特異的なものと

50

なる。

【0272】

(診断)

別の実施例では、PMMM に特異的に結合する抗体が、PMMM の発現によって特徴付けられる疾患の診断、またはPMMM やPMMM のアゴニストまたはアンタゴニスト、インヒビターで治療を受けている患者をモニターするためのアッセイに用いられる。診断目的に有用な抗体は、上記の治療の箇所で記載した方法と同じ方法で作成される。PMMM の診断アッセイには、抗体及び標識を用いてヒトの体液或いは細胞や組織から採取されたものからPMMM を検出する方法が含まれる。この抗体は修飾されたものも、されていないものも可能であり、レポーター分子との共有結合または非共有結合で標識化できる。レポーター分子として 10 は広くさまざまな種類が本分野で知られており、また使用可能であるが、そのうちのいくつかは上記で説明されている。

【0273】

PMMMを測定するためのELISA, RIA, 及びFACSを含む種々のプロトコルは、当分野では周知であり、変わった或いは異常なレベルのPMMMの発現を診断する元となるものを提供する。正常或いは標準的なPMMM の発現の値は、複合体の形成に適した条件の下、正常な哺乳動物、例えばヒトなどの被験者から採取した体液または細胞とPMMM に対する抗体とを結合させることによって決定する。標準複合体形成量は、種々の方法、例えば測光法で定量できる。被験者のPMMM の発現の量、制御及び疾患、生検組織からのサンプルが基準値と比較される。標準値と被験体との偏差が、疾患を診断するパラメータを確定する。 20

【0274】

本発明の別の実施態様では、PMMMをコードするポリヌクレオチドを、診断目的で用い得る。用いることができるポリヌクレオチドには、オリゴヌクレオチド配列、相補的RNA及びDNA分子、そしてPNAが含まれる。このポリヌクレオチドを用いて、疾患と相関し得るPMMMを発現する生検組織における遺伝子の発現を検出し定量する。この診断アッセイを用いて、PMMM の存在の有無、更に過剰な発現を調べ、治療中のPMMM 値の調節を監視する。

【0275】

一実施形態では、PMMMまたは近縁の分子をコードする遺伝子配列を含むポリヌクレオチドを検出可能なPCRプローブを用いたハイブリダイゼーションによって、PMMMをコードする核酸配列を同定することが可能である。プローブが高度に特異的な領域(例えば5'調節領域)から作られている、或いはやや特異性の低い領域(例えば保存されたモチーフ)から作られているかにかかわらず、そのプローブの特異性と、ハイブリダイゼーション或いは増幅のストリンジェントによって、そのプローブがPMMMをコードする自然界の配列のみを同定するかどうか、或いは対立遺伝子や関連配列をコードする自然界の配列のみを同定するかどうかが決まるであろう。 30

【0276】

プローブはまた、関連する配列の検出に利用され、PMMM をコードする任意の配列と少なくとも50%の配列同一性を有し得る。目的の本発明のハイブリダイゼーションプローブには、DNAあるいはRNAが可能であり、SEQ ID NO:32-62の配列、或いはPMMM 遺伝子のプロモーター、エンハンサー、イントロンを含むゲノム配列に由来し得る。 40

【0277】

PMMMをコードするポリヌクレオチドに対して特異的なハイブリダイゼーションプローブの作製方法には、PMMM及びPMMM誘導体をコードするポリヌクレオチドをmRNAプローブの作製のためのベクターにクローニングする方法がある。mRNAプローブ作製のためのベクターは、当業者に知られており、市販されており、好適なRNAポリメラーゼ及び好適な標識されたヌクレオチドを加えることによって、*in vitro*でRNAプローブを合成するために用いられ得る。ハイブリダイゼーションプローブは、種々のレポーター集団によって標識され得る。レポーター集団の例としては、 ^{32}P または ^{35}S 等の放射性核種、或いはアビジン/ビオチン結合系を介してプローブに結合されたアルカリホスファターゼ等の酵素標識などが挙げられる。 50

【0278】

PMMAをコードするポリヌクレオチドを用いて、PMMAの発現に関連する疾患を診断することが可能である。限定するものではないが、このような疾患としては、胃腸障害には、嚥下障害、消化性食道炎、食道痙攣、食道狭窄、食道癌、消化不良、消化障害、胃炎、胃癌、食欲不振、悪心、嘔吐、胃不全麻痺、洞または幽門の浮腫、腹部アングナ、胸焼け、胃腸炎、イレウス、腸管感染、消化性潰瘍、胆石症、胆嚢炎、胆汁うっ滞、膵臓炎、膵臓癌、胆道疾患、肝炎、高ビリルビン血症、硬変症、肝臓の受動的うっ血、ヘパトーム、感染性結腸炎、潰瘍性結腸炎、潰瘍性直腸炎、クローン病、ホウィップル病、マロリー-ワイス症候群、大腸癌、大腸閉塞、過敏性腸症候群、短小腸症候群、下痢、便秘、胃腸出血、後天性免疫不全症候群(AIDS)腸症、黄疸、肝性脳症、肝腎症候群、脂肪肝、血色素症、ウィルソン病、 α_1 アンチトリプシン欠損症、ライ症候群、原発性硬化性胆管炎、肝梗塞、門脈循環閉塞および血栓、小葉中心壊死、肝臓紫斑病、肝静脈血栓、肝静脈閉塞症、子癇前症、子癇、妊娠性急性脂肪肝、妊娠性肝臓内胆汁うっ滞と、結節性過形成および腺腫、癌腫など肝臓を含む。心血管障害には、動静脈瘤、アテローム硬化、高血圧、脈管炎、レイノー病、動脈瘤、動脈解離、静脈瘤、血栓静脈炎および静脈血栓、血管系腫瘍、血栓溶解の合併症、バルーン血管形成術、血管置換術(vascular replacement)、冠動脈バイパス移植術、鬱血性心不全、虚血性心疾患、狭心症、心筋梗塞、高血圧性心疾患、変性弁膜性心疾患、石灰化大動脈弁狭窄症、先天性2尖大動脈弁、僧帽弁輪部石灰化(mitral annular calcification)、僧帽弁逸脱、リウマチ熱、リウマチ性心疾患、感染性心内膜炎、非細菌性血栓性心内膜炎、全身性エリテマトーデスの心内膜炎、カルチノイド心疾患、心筋症、心筋炎、心膜炎、腫瘍性心疾患、先天性心臓疾患、心移植の合併症を含む。自己免疫/炎症疾患には、後天性免疫不全症候群(AIDS)、アジソン病(慢性原発性副腎機能不全)、成人呼吸窮迫症候群、アレルギー、強直性脊椎炎、アミロイド症、貧血、喘息、アテローム性動脈硬化、アテローム性粥腫崩壊、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性甲状腺炎、自己免疫性多腺性内分泌カンジダ症外胚葉ジストロフィー(APECED)、気管支炎、胆嚢炎、接触皮膚炎、クローン病、アトピー性皮膚炎、皮膚筋炎、糖尿病、肺気腫、リンパ球傷害因子性偶発性リンパ球減少症、新生児溶血性疾患(胎児赤芽球症)、結節性紅斑、萎縮性胃炎、糸球体腎炎、グッドパスチャー症候群、痛風、グレーブス病、橋本甲状腺炎、過好酸球増加症、過敏性腸症候群、多発性硬化症、重症筋無力症、心筋または心膜炎症、骨関節炎、関節軟骨劣化、骨粗しょう症、膵炎、多発性筋炎、乾癬、ライター症候群、リウマチ様関節炎、強皮症、シェーグレン症候群、全身性アナフィラキシー、全身性エリテマトーデス、全身性強皮症(systemic sclerosis)、血小板減少性紫斑病、潰瘍性大腸炎、ぶどう膜炎、ウェルナー症候群、癌合併症、血液透析、体外循環、ウイルス感染症、細菌感染症、真菌感染症、寄生虫感染症、原虫感染症、蠕虫感染症、外傷を含む。細胞増殖異常には光線性角化症、動脈硬化、アテローム硬化、滑液包炎、硬変、肝炎、混合性結合組織病(MCTD)、骨髄線維症、発作性夜間ヘモグロビン尿症、真性多血症、乾癬、原発性血小板血症を含む。発生・発達障害には尿細管性アシドーシス、貧血、クッシング症候群、軟骨形成不全性小人症、デュシェンヌ/ベッカー型筋ジストロフィー、骨吸収、癲癇、性腺形成異常、WAGR症候群(ウィルムス腫瘍、無虹彩症、尿生殖器異常、精神遅滞)、スミス-マジエニス症候群(Smith-Magenis syndrome)、骨髄異形成症候群、遺伝性粘膜上皮異形成、遺伝性角皮症や、シャルコー-マリー-トゥース病および神経線維腫症などの遺伝性神経病、甲状腺機能低下症、水頭症や、Sydenham's chorea)および脳性小児麻痺などの発作障害、二分脊椎、無脳症、頭蓋脊椎披裂、先天性緑内障、白内障、加齢黄斑変性、感音難聴を含む。上皮性疾患には、発汗異常性湿疹、アレルギー性接触皮膚炎、毛孔性角化症、肝斑、白斑、光線性角化症、基底細胞癌、扁平細胞癌、脂漏性角化症、毛嚢炎、単純疱疹、帯状疱疹、水痘、カンジダ症、皮膚糸状菌症、疥癬、虫刺され、サクランボ色血管腫、ケロイド、皮膚線維腫、先端線維性軟疣、蕁麻疹、一過性棘融解性皮膚症、乾燥症、湿疹、アトピー性皮膚炎、接触皮膚炎、手湿疹、貨幣状湿疹、慢性単純性苔癬、皮脂減少性湿疹、鬱血性皮膚炎および鬱血性潰瘍化、脂漏性皮膚炎、乾癬、扁平苔癬、薔薇色靴糠疹、膿痂疹、膿瘡、皮膚糸状菌症、癬風、疣、尋常性座瘡、赤鼻、

10

20

30

40

50

尋常性天疱瘡、落葉状天疱瘡、腫瘍随伴性天疱瘡、水疱性類天疱瘡、妊娠性疱疹、疱疹状皮膚炎、線状IgA病、後天性表皮水疱症、皮膚筋炎、紅斑性狼瘡、強皮症、限局性強皮症、紅皮症、脱毛症、修飾皮膚病変(figurate skin lesion)、毛細血管拡張、色素脱失、色素沈着過剰、小疱疹/水疱、発疹、皮膚薬物反応、丘疹結節皮膚損傷、慢性不治傷、光過敏症、単純型表皮水疱症、表皮剥離性角質増殖症、表皮溶解性掌蹠角皮症および非表皮溶解性掌蹠角皮症、ジーズス水疱型魚鱗癬、剥脱性魚鱗癬、手掌角化症および足底角化症、掌蹠角化症、掌蹠角皮症、点状角化症、メースマン角膜ジストロフィ、先天性爪肥厚、白色海綿状母斑、多発性皮脂腫瘍症、上皮性母斑/表皮剥離性角質増殖症、連珠毛、裂毛症、慢性肝炎/特発性肝硬変、および、結腸直腸過形成を含む。神経疾患には、癲癇、虚血性脳血管障害、脳卒中、脳腫瘍、アルツハイマー病、ピック病、ハンチントン病、痴呆 10、パーキンソン病およびその他の錐体外路障害、筋萎縮性側索硬化および他の運動ニューロン障害、進行性神経性筋萎縮症、網膜色素変性症(色素性網膜炎)、遺伝性運動失調、多発性硬化症および他の脱髄疾患、細菌性およびウイルス性髄膜炎、脳膿瘍、硬膜下膿瘍、硬膜外膿瘍、化膿性頭蓋内血栓性静脈炎、脊髄炎および神経根炎、ウイルス性中枢神経系疾患と、プリオン病(クールー、クロイツフェルト ヤコブ病、およびGerstmann-Straussler-Scheinker症候群を含む)、致死性家族性不眠症、神経系性栄養病および代謝病、神経線維腫症、結節硬化症、小脳網膜血管腫症(cerebelloretinal hemangioblastomatosis)、脳三叉神経血管症候群(encephalotrigeminal syndrome)、精神遅滞および他の中枢神経系発達障害(ダウン症を含む)、脳性麻痺、神経骨格異常症、自律神経系障害、脳神経疾患、脊髄疾患、筋ジストロフィー他の神経筋障害、末梢神経疾患、皮膚筋炎および多発性 20、筋炎と、遺伝性、代謝性、内分泌性、および中毒性ミオパシーと、重症筋無力症、周期性四肢麻痺、精神障害(気分性、不安性の障害、統合失調症/分裂病)、季節性感情障害(SAD)、静座不能、健忘症、緊張病、糖尿病性ニューロパシー、遅発性ジスキネジア、ジストニー、パラノイド精神病、帯状疱疹後神経痛、トゥーレット病、進行性核上麻痺、大脳皮質基底核変性(corticobasal degeneration)、および家族性前頭側頭型痴呆を含む。生殖系疾患には、不妊症(卵管疾患、排卵欠損症、子宮内膜症)、プロラクチン産生障害、性周期障害、月経周期障害、多嚢胞性卵巣症候群、卵巣過刺激症候群、子宮内膜癌、卵巣癌、子宮筋腫、自己免疫疾患、子宮外妊娠、催奇形、乳がん、繊維嚢胞性乳房疾患、乳漏症、精子形成破壊、精子異常生理、精巣癌、前立腺癌、良性前立腺肥大、前立腺炎、パイロニー病、性交不能、男性乳癌、女性化乳房が含まれる。内分泌疾患の中には原発 30、脳腫瘍及び腺腫、妊娠性梗塞、下垂体切除、動脈瘤、血管奇形、血栓症、感染症、免疫異常、頭部外傷による合併症などの病変から起こる視床下部及び下垂体の障害と、性機能低下及びシーハン症候群、尿崩症、カルマン病、ハンド シュラークリスチャン病、レトラシヴェ病、サルコイドーシス、エンプティセラ症候群、小人症を含む下垂体低下に関連した障害と、良性線種によって発生しやすい不适当抗利尿ホルモン(ADH)分泌症候群(SIADH)及び先端巨大症、巨人症を含む下垂体亢進に関連した障害と、甲状腺腫及び粘液水腫、細菌感染性急性甲状腺炎、ウイルス感染性亜急性甲状腺炎、自己免疫性甲状腺炎(橋本病)、クレチン病を含む甲状腺機能低下症に関連した障害と、甲状腺中毒症及びその様々な型、グレーブス病、前脛骨粘液水腫、中毒性多結節性甲状腺腫、甲状腺癌、プランマー病を含む甲状腺機能亢進症と、Conn病(chronic hypercalcemia)を含む副甲状腺機能亢進症を含む。代謝障害の中には、副腎機能不全、脳髄黄色腫症、副腎皮質過形成、クマリ 40、ン耐性、嚢胞性線維症、糖尿病、脂肪性肝硬変、果糖-1,6-ジホスファターゼ欠損症、ガラクトース血症、甲状腺腫、グルカゴノーマ、糖原病、遺伝性果糖不耐症、副腎髄質機能亢進症、低アドレナリン症、上皮小体亢進症、副甲状腺低下症、高コレステロール血症、甲状腺亢進症、低血糖症、甲状腺低下症、高脂血症、脂質ミオパシー(lipid myopathies)、脂肪異常栄養症、リソソーム蓄積症、マンノシドーシス、ノイラミニダーゼ欠損症、肥満症、ペントース-フェニルケトン尿症、プソイドビタミンD欠損症を含む。糖質代謝の疾患には、先天性II型異常赤血球産生症性貧血、糖尿病、インスリン依存型真性糖尿病、非インスリン依存型真性糖尿病、フルクトース-1,6-ジホスファターゼ欠乏症、ガラクトース血症、グルカゴノーマ、遺伝性フルクトース不耐症、低血糖症、マンノシドーシス、

ノイラミニダーゼ欠乏症、肥満、ガラクトースエピメラーゼ欠乏症、糖原病、リソソーム蓄積症、果糖尿、五炭糖尿症、および遺伝性ピルビン酸代謝異常が含まれる。脂質代謝異常の中には、脂肪肝、胆汁うっ滞、原発性胆汁性肝硬変、カルニチン欠乏症、カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ欠乏症、ミオアデニレートデミナーゼ欠乏症、高トリグリセリド血症、ファブリー病などの脂質貯蔵病、ゴーシェ病、ニーマンピック病、変染色性白質ジストロフィー、副腎性白質ジストロフィー、 G_{M2} にガングリオシドーシス、セロイドリボフスチン症、無リボ蛋白血症、タンジアー病、リボ蛋白過剰血症、糖尿病、脂肪異常養症、脂肪腫症、急性皮下脂肪組織炎、播種性脂肪組織壊死症、有痛脂肪症、リポイド副腎過形成、リポイドネフローゼ、脂肪腫、アテローム性動脈硬化症、高コレステロール血症、高トリグリセリド血症を伴った高コレステロール血症、原発性低リボ蛋白血症、甲状腺機能低下症、腎臓病、肝疾患、レシチン-コレステロールアシルトランスフェラーゼ欠乏症、脳髄黄色腫症、シトステロール血症、低コレステロール血症、テイサックス病、サンドホフ病、高脂血症、脂肪過剰血症、脂質筋障害、肥満症が含まれる。銅代謝に関する疾患には、メンケス病、ウィルソン病、エーラー・ダンロス症候群IX型が含まれる。膵臓疾患には、I型及びII型糖尿病及び合併症などが含まれる。副腎と関連のある疾患には、過形成及び副腎皮質の癌腫や腺腫、アルカローシスに関連した高血圧、アミロイド症、低カリウム血、クッシング病、リドル症候群、Arnold-Healy-Gordon症候群、褐色細胞腫瘍、アジソン病があり、生殖腺ステロイドホルモンに関連した疾患には、女性の異常プロラクチン産生及び不妊症、子宮内膜症、月経周期の摂動、多嚢胞性卵巣疾患、高プロラクチン血症、選択的性腺刺激ホルモン不全 (isolated gonadotropin deficiency)、無月経、乳汁漏出症、半陰陽、多毛症及び男性化、乳癌、閉経期後の骨粗鬆症、男性のライジッヒ細胞過形成、男性更年期、生殖細胞無形成症、ライジッヒ細胞腫瘍に関連した性機能亢進、アンドロゲン受容体の欠如に関連したアンドロゲン耐性、5-還元酵素症候群、女性化乳房症などが含まれる。癌には、腺癌、白血病、リンパ腫、黒色腫、骨髄腫、肉腫、および奇形癌など癌、具体的には、副腎、膀胱、骨、骨髄、脳、乳房、頸部、胆嚢、神経節、消化管、心臓、腎臓、肝臓、肺、筋肉、卵巣、膵臓、副甲状腺、陰茎、前立腺、唾液腺、皮膚、脾臓、精巣、胸腺、甲状腺、および子宮の癌を含む。感染症には、アデノウイルス、アレナウイルス、ブンヤウイルス (bunyavirus)、カリチウイルス (calicivirus)、コロナウイルス、フィロウイルス、ヘパドナウイルス、ヘルペスウイルス、フラビウイルス、オルソミクソウイルス、パルボウイルス、パポーバウイルス、パラミクソウイルス、ピコルナウイルス、ポックスウイルス、レオウイルス、レトロウイルス、ラブドウイルス、トガウイルスに分類されるウイルス病原体による感染や、細菌による感染 (肺炎球菌、ブドウ球菌、連鎖球菌、バシラス菌、コリネバクテリウム、クロストリジウム、髄膜炎菌、淋菌、リステリア、モラクセラ、キングセラ、ヘモフィルス、レジオネラ、百日咳菌類 (ボルデテラ) や、シゲラ、サルモネラ、カンピロバクターを含むグラム陰性腸内細菌、シュードモナス、ビブリオ、ブルセラ、野兔病菌類 (フランシセラ)、エルシニア、パルトネラ、nocardium、放線菌、ミコバクテリウム、spirochaetale、リケッチア、クラミジア、マイコプラズマに分類)、真菌感染 (分類はアスペルギルス、プラストミセス、皮膚糸状菌、クリプトコッカス、コクシジオイデス、malassezia、ヒストプラズマ、または他の真菌症起因菌)、寄生虫感染 (分類はプラスモディウムすなわちマラリア原虫、寄生性アメーバ、リーシュマニア、トリパノソーマ、トキソプラズマ、ニューモシスチスカリニ、腸内原虫 (ジアルジアなど)、トリコモナス、組織線虫 (旋毛虫など)、腸管寄生線虫 (回虫など)、リンパ管フィラリア線虫、吸虫 (住血吸虫など)、および条虫 (サナダムシなど)) が含まれる。このような定性方法または定量方法は、当分野で公知である。

【0279】

或る特定の実施態様では、PMMMをコードするポリヌクレオチドは、関連する疾患、特に前記したこれらを検出するアッセイにおいて有用であり得る。PMMMをコードする配列に相補的なポリヌクレオチドを、標準的な方法で標識化し、ハイブリダイゼーション複合体の形成に好適な条件の下、患者から採取した体液或いは組織のサンプルに加えることができ

る。好適なインキュベーション期間が経過したらサンプルを洗浄し、シグナルを定量して標準値と比較する。患者のサンプルのシグナルの量が対照サンプルと比較して著しく変化している場合は、そのサンプル内のPMMMをコードするポリヌクレオチド群のレベル変化の存在により、関連する疾患の存在が明らかになる。このようなアッセイは、動物実験、臨床試験における特定の治療効果を評価するため、あるいは個々の患者の治療をモニターするために用いることもできる。

【0280】

PMMMの発現に関連する疾患の診断の基準となるものを提供するために、発現の正常すなわち標準的なプロファイルが確立される。これは、ハイブリダイゼーション或いは増幅に好適な条件下で、動物或いはヒトの何れかの正常な被験者から抽出された体液或いは細胞と、PMMMをコードする配列或いはその断片とを結合させることにより達成され得る。実質的に精製されたポリヌクレオチドを既知量で用いて行った実験から得た値を正常な被験者から得た値と比較することにより、標準ハイブリダイゼーションを定量することができる。このようにして得た標準値は、疾患の徴候を示す患者から得たサンプルから得た値と比較することができる。標準値からの偏差を用いて疾患の存在を確定する。

10

【0281】

疾患の存在が確定されて治療プロトコルが開始されると、患者の発現レベルが正常な被検者に観察されるレベルに近づき始めたかどうかを測定するため、ハイブリダイゼーションアッセイを定期的に繰り返し得る。連続アッセイから得られた結果を用いて、数日から数ヶ月の期間にわたる治療の効果を示し得る。

20

【0282】

癌に関しては、個体からの生体組織における異常な量の転写物（過少発現または過剰発現）の存在は、疾患の発生素質を示したり、実際に臨床的症状が現れる前に疾患を検出する方法を提供し得る。この種のより明確な診断により、医療の専門家が予防方法または積極的な治療法を早くから利用し、それによって癌の発生または更なる進行を防止することが可能となる。

【0283】

PMMM をコードする配列から設計されたオリゴヌクレオチドのさらなる診断への利用には、PCRの利用が含まれ得る。これらのオリゴマーは、化学的に合成するか、酵素により生産するか、あるいはin vitroで産出し得る。オリゴマーは、好ましくはPMMMをコードするポリヌクレオチドの断片、或いはPMMMをコードするポリヌクレオチドと相補的なポリヌクレオチドの断片を含み、最適な条件下で、特定の遺伝子や条件を識別するために利用される。また、オリゴマーは、やや緩いストリンジェンシー条件下で、近縁のDNA或いはRNA配列の検出、定量、或いはその両方のため用いることが可能である。

30

【0284】

或る特定態様で、PMMMをコードするポリヌクレオチド群に由来のオリゴヌクレオチドプライマー類を用い一塩基多型(SNP)を検出し得る。SNPは、多くの場合にヒトの先天性または後天性遺伝病の原因となるような置換、挿入及び欠失である。限定するものではないがSNPの検出方法には、SSCP (single-stranded conformation polymorphism) 及び蛍光SSCP (fSSCP) がある。SSCPでは、PMMMをコードするポリヌクレオチド配列由来のオリゴヌクレオチドプライマーを用いたポリメラーゼ連鎖反応(PCR)でDNAを増幅する。このDNAは例えば、病変組織または正常組織、生検サンプル、体液などに由来し得る。DNA内のSNPによって、一本鎖形状のPCR生成物の2次及び3次構造に差異が生じる。この差異は非変性ゲル中でのゲル電気泳動法を用いて検出可能である。fSSCPでは、オリゴヌクレオチドプライマーを蛍光性に標識する。それによってDNAシーケンシング機などの高処理機器でアンプリマー(amplimer)の検出が可能になる。更に、インシリコSNP(in silico SNP, isSNP)と呼ばれる配列データベース分析法は、一般的なコンセンサス配列へアセンブリされるような個々のオーバーラップするDNA断片の配列を比較することにより、多型性を同定し得る。これらのコンピュータベースの方法は、DNAの実験室での調製に、また統計モデル及びDNA配列クロマトグラムの自動分析を用

40

50

いたシーケンシングのエラーに起因する配列の変異をフィルタリングして除去する。別の態様では、例えば高処理MASSARRAYシステム (Sequenom, Inc., San Diego CA) を用いた質量分析によりSNPを検出し、特徴付ける。

【0285】

SNPを利用して、ヒト疾患の遺伝的基礎を研究しうる。例えば、少なくとも16の一般的SNPが非インスリン依存型真性糖尿病と関連がある。SNPはまた、嚢胞性線維症、鎌状赤血球貧血、慢性肉芽腫性疾患等の単一遺伝子病の転帰の違いを研究するために有用である。例えば、マンノース結合レクチンでの変異体 (MBL2) は、嚢胞性線維症の肺での有害な転帰と関連することがわかっている。SNPはまた、生命を脅かす毒性等の薬剤への患者の反応に影響する遺伝変異体の同定という薬理ゲノミクスにおいても有用性がある。例えば、N-アセチルトランスフェラーゼにおける変異は抗結核剤、イソニアジドに反応した末梢神経障害の発生率が高くなるが、ALOX5 遺伝子のコアプロモータの変異は5-リポキシゲナーゼ経路を標的とする抗喘息薬での治療に対する臨床的反応を減少する。異なった集団でのSNPの分布についての分析は遺伝的浮動、突然変異、組み換えおよび選択の研究に有用であると共に、集団の起源と移動の調査にも有用である (Taylor, J.G. 他 (2001) Trends Mol. Med. 7:507-512、Kwok, P.-Y.およびZ. Gu (1999) Mol. Med. Today 5:538-543、Nowotny, P. 他 (2001) Curr. Opin. Neurobiol. 11:637-641)。

10

【0286】

PMMMの発現を定量するために用い得る方法には、ヌクレオチドの放射標識またはビオチン標識、調節核酸の相互増幅 (coamplification)、及び標準曲線から得た結果の補間もある (Melby, P.C.他 (1993) J. Immunol. Methods 159:235-244、Duplax, C.他 (1993) Anal. Biochem. 212:229-236)。目的のオリゴマーが種々の希釈液中に存在し、分光光度法または比色反応によって定量が迅速になるような高処理フォーマットのアッセイを行うことによって、複数のサンプルの定量速度を加速することができる。

20

【0287】

更に別の実施態様では、本明細書に記載した任意のポリヌクレオチドに由来するオリゴヌクレオチドまたはより長い断片を、或るマイクロアレイにおけるエレメント群として用いることができる。大多数の遺伝子の相対発現レベルを同時にモニターする転写イメージング技術にマイクロアレイを用いることが可能である。これについては、以下に記載する。マイクロアレイはまた、遺伝変異体、突然変異および多型性の同定に用いることができる。この情報を用いることで、遺伝子機能を決定し、疾患の遺伝的根拠を理解し、疾患を診断し、遺伝子発現の機能としての疾病の進行/後退をモニターし、疾病治療における薬物の活性を開発およびモニターすることができる。特に、患者にとって最もふさわしく、有効な治療法を選択するために、この情報を用いて患者の薬理ゲノムプロファイルを開発することができる。例えば、患者の薬理ゲノムプロファイルに基づき、患者に対して高度に効果的で副作用の最も少ない治療薬を選択することができる。

30

【0288】

別の実施例では、PMMM、PMMMの断片、PMMMに特異的な抗体をマイクロアレイ上のエレメントとして用いることができる。マイクロアレイを用いて、上記のようなタンパク質-タンパク質相互作用、薬物-標的相互作用および遺伝子発現プロファイルをモニターまたは測定することが可能である。

40

【0289】

或る実施態様は、或る組織または細胞タイプの転写イメージを作製する、本発明のポリヌクレオチドの使用に関連する。転写イメージは、特定の組織または細胞タイプによる遺伝子発現の包括的パターンを表す。包括的遺伝子発現パターンは、所与の条件下で所与の時間に発現した遺伝子の数および相対存在量を定量することにより分析し得る (Seilhamer 他 (米国特許第5,840,484号「Comparative Gene Transcript Analysis」は特に引用することを以って本明細書の一部となす)。従って、特定の組織または細胞タイプの転写物または逆転写物全体に本発明のポリヌクレオチドまたはその相補体をハイブリダイズすることにより、転写イメージを生成し得る。或る実施例では、本発明のポリヌクレオチドま

50

たはその相補体がマイクロアレイ上のエレメントのサブセットを複数含むような高処理フォーマットでハイブリダイゼーションを発生させる。結果として得られる転写イメージは、遺伝子活性のプロファイルを提供し得る。

【0290】

転写イメージは、組織、細胞株、生検またはその生体サンプルから単離した転写物を用いて作製し得る。転写イメージはしたがって、組織または生検サンプルの場合には *in vivo*、細胞株の場合には *in vitro* での遺伝子発現を反映する。

【0291】

本発明のポリヌクレオチドの発現のプロフィールを作製する転写イメージはまた、工業的または天然の環境化合物の毒性試験のみならず、*in vitro* モデル系及び薬剤の前臨床評価と併せて使用し得る。全ての化合物は、作用および毒性のメカニズムを標示し、しばしば分子フィンガープリントまたは毒性シグネチャ (toxicant signatures) と称される、特徴的な遺伝子発現パターンを惹起する (Nuwaysir, E.F. 他 (1999) *Mol. Carcinog.* 24:153-159; Steiner, S. および N.L. Anderson (2000) *Toxicol. Lett.* 112-113:467-471)。試験化合物が、既知の毒性を有する化合物のシグネチャと同様のシグネチャを有する場合には、毒性特性を共有している可能性がある。フィンガープリントまたはシグネチャは、多数の遺伝子および遺伝子ファミリーからの発現情報を含んでいる場合に、最も有用且つ正確である。理想的には、ゲノム全域にわたる発現の測定が、最高品質のシグネチャを提供する。たとえ、発現が任意の試験された化合物によって変容しない遺伝子があったとしても、それらの発現レベルを残りの発現データをノーマライズするために使用できるため、それらの遺伝子は重要である。ノーマライズ手順は、種々の化合物で処理した後の発現データの比較に有用である。毒性シグネチャの要素への遺伝子機能を割り当てることは毒性機構の解明に役立つが、毒性の予測につながるシグネチャの統計的な一致には遺伝子機能の知識は必要ではない (例えば 2000 年 2 月 29 日に米国国立環境健康科学研究所 (National Institute of Environmental Health Sciences) より 2000 年 2 月 29 日に発行された Press Release 00-02 を参照されたい。これについては <http://www.niehs.nih.gov/oc/news/toxchip.htm> で入手可能である)。したがって、毒性シグネチャを用いる中毒学的スクリーニングの際に、全ての発現した遺伝子配列を含めることは、重要且つ望ましい。

【0292】

或る実施例では、核酸を有する生体サンプルを試験化合物で処理することにより、この試験化合物の毒性を算定する。処理した生物学的サンプル中で発現した核酸は、本発明のポリヌクレオチドに特異的な 1 つ以上のプローブでハイブリダイズし、それによって本発明のポリヌクレオチドに対応する転写物レベルを定量し得る。処理した生体サンプル中の転写レベルを、未処理生体サンプル中のレベルと比較する。両サンプルの転写物レベルの差は、処理されたサンプル中で試験化合物が引き起こす毒性反応を示す。

【0293】

別の実施態様は、本明細書に開示するポリペプチド配列群を用いて或る組織または細胞タイプのプロテオームを分析することに関する。プロテオームの語は、特定の組織または細胞タイプでのタンパク質発現の包括的パターンを指す。プロテオームの各タンパク質成分は、個々に更なる分析にかけることができる。プロテオーム発現パターンすなわちプロファイルは、所与の条件下で所与の時間に発現したタンパク質の数および相対存在量を定量することにより分析し得る。したがって、或る細胞のプロテオームのプロファイルは、特定の組織または細胞タイプのポリペプチドを分離および分析することにより作成し得る。或る実施例では、1 次元等電点電気泳動によりサンプルからタンパク質を分離し、2 次元ドデシル硫酸ナトリウムスラブゲル電気泳動により分子量に応じて分離するような 2 次元ゲル電気泳動により、分離が達成される (前出の Steiner および Anderson)。タンパク質は、通常はクーマシーブルー、あるいは銀染色液または蛍光染色液などの物質を用いてゲルを染色することにより、分散した、独自の位置にある点としてゲル中で可視化される。各タンパク質スポットの光学密度は、通常、サンプル中のタンパク質レベルに比例する。異なるサンプル、例えば試験化合物または治療薬で処理または未処理のいずれかの生

10

20

30

40

50

体サンプルからの、同等に位置したタンパク質スポットの光学密度を比較し、処理に関連するタンパク質スポット密度の変化を同定する。スポット内のタンパク質は、例えば化学的または酵素的切断とそれに続く質量分析を用いる標準的な方法を用いて部分的にシーケンシングする。或るスポット内のタンパク質の同一性は、その部分配列を、好適には少なくとも5個の連続するアミノ酸残基を、目的のポリペプチド配列と比較することにより決定し得る。場合によっては、決定的なタンパク質同定のための更なる配列データが得られる。

【0294】

プロテオームのプロファイルは、PMMM に特異的な抗体を用いてPMMM 発現レベルを定量することによっても作成可能である。或る実施態様では、マイクロアレイ上のエレメントとしてこれら抗体を用い、マイクロアレイをサンプルに曝して各アレイエレメントへのタンパク質結合レベルを検出することにより、タンパク質発現レベルを定量する (Lueking, A. 他(1999) Anal. Biochem. 270:103-111、Mendoza, L.G.他(1999) Biotechniques 27:778-788)。検出は当分野で既知の様々な方法で行うことができ、例えば、チオール反応性またはアミノ反応性蛍光化合物とサンプル中のタンパク質を反応させ、各アレイエレメントにおける蛍光結合の量を検出し得る。

【0295】

プロテオームレベルでの毒性シグネチャも中毒学的スクリーニングに有用であり、転写レベルでの毒性シグネチャと並行に分析するべきである。いくつかの組織のいくつかのタンパク質については、転写物の存在量とタンパク質の存在量との相関が乏しいので (Anderson, N.L. および J. Seilhamer (1997) Electrophoresis 18:533-537)、転写イメージにはそれ程影響しないがプロテオームのプロファイルを改変するような化合物の分析において、プロテオーム毒性シグネチャは有用たり得る。更に、体液中の転写物の分析はmRNAの急速な分解のために困難なので、プロテオームのプロファイル作成はこのような場合により信頼でき、情報価値があり得る。

【0296】

別の実施態様では、タンパク質を含有する生体サンプルを試験化合物で処理することにより試験化合物の毒性を算定する。処理された生体サンプル中で発現したタンパク質は、各タンパク質の量を定量し得るように分離する。各タンパク質の量を、未処理生物学的サンプル中の対応するタンパク質の量と比較する。両サンプルのタンパク質量の差は、処理サンプル中の試験化合物に対する毒性反応を示す。個々のタンパク質は、個々のタンパク質のアミノ酸残基をシーケンシングし、これら部分配列を本発明のポリペプチドと比較することにより同定する。

【0297】

別の実施態様では、タンパク質を含有する生体サンプルを試験化合物で処理することにより試験化合物の毒性を算定する。生体サンプルから得たタンパク質は、本発明のポリペプチドに特異的な抗体を用いてインキュベートする。抗体により認識されたタンパク質の量を定量する。処理された生物学的サンプル中のタンパク質の量を、未処理生物学的サンプル中のタンパク質の量と比較する。両サンプルのタンパク質量の差は、処理サンプル中の試験化合物に対する毒性反応を示す。

【0298】

マイクロアレイは、本技術分野で既知の方法で調製し、使用し、分析する(例えばBrennan, T.M. 他(1995) 米国特許第5,474,796号、Schena, M. 他(1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:10614-10619、Baldeschweiler 他(1995) PCT出願第W095/251116号、Shalton, D.他(1995) PCT出願第W095/35505号、Heller, R.A. 他(1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:2150-2155、Heller, M.J. 他(1997) 米国特許第5,605,662号)。様々なタイプのマイクロアレイが公知であり、詳細については、Schena, M 編集 (1999、DNA Microarrays: A Practical Approach, Oxford University Press, London) に記載されている。

【0299】

本発明の別の実施例ではまた、PMMM をコードする核酸配列を用いて、天然のゲノム配

列をマッピングするのに有用なハイブリダイゼーションプローブを作製することが可能である。コード配列または非コード配列のいずれかを用いることができ、或る例では、コード配列より非コード配列の方が好ましい。例えば、多重遺伝子族のメンバー内でのコード配列の保存により、染色体マッピング中に望ましくないクロスハイブリダイゼーションが生じる可能性がある。核酸配列は、特定の染色体、染色体の特定領域または人工形成の染色体、例えば、ヒト人工染色体 (HAC)、酵母人工染色体 (YAC)、細菌人工染色体 (BAC)、細菌 P1 産物、或いは単一染色体 cDNA ライブラリに対してマッピングされる (Harrington, J.J. 他 (1997) *Nat. Genet.* 15:345-355、Price, C.M. (1993) *Blood Rev.* 7:127134、Trask, B.J. (1991) *Trends Genet.* 7:149154)。一度マッピングすると、核酸配列を用いて、例えば病状の遺伝と特定の染色体領域やまたは制限酵素断片長多型 (RFLP) の遺伝とが相関するような遺伝子連鎖地図を作成可能である (Lander, E.S. 及び D. Botstein (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:7353-7357)。

10

【0300】

蛍光原位ハイブリッド形成法 (FISH) は、他の物理的および遺伝的地図データと相関し得る (Heinz-Ulrich 他 (1995) in Meyers, 前出、965-968 ページ)。遺伝的地図データの例は、種々の科学雑誌あるいは Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) のウェブサイトに見ることができる。物理的な染色体地図上の PMMM をコードする遺伝子の位置と、特定の疾患との相関性、あるいは特定の疾患に対する素因との相関性は、この疾患と関連する DNA の領域の決定に役立ち得るため、位置を決定するクローニングの作業を促進し得る。

20

【0301】

確定した染色体マーカーを用いた連鎖分析等の物理的マッピング技術及び染色体標本原位ハイブリッド形成法を用いて、遺伝的地図を拡張することができる。例えばマウスなど別の哺乳類の染色体上に遺伝子を配置することにより、正確な染色体上の遺伝子座が未知でも、関連するマーカー類をしばしば明らかにし得る。この情報は、ポジショナルクローニング、またはその他の遺伝子発見技術を用いて疾患遺伝子を探す研究者にとって価値がある。疾患または症候群に關与する遺伝子が、血管拡張性失調症の 11q22-23 領域等、特定の遺伝子領域への遺伝的結合によって大まかに位置決めがなされると、該領域にマップされる任意の配列は、更なる調査のための関連遺伝子あるいは調節遺伝子を提示している可能性がある (Gatti, R.A. 他 (1988) *Nature* 336:577-580)。転座、反転などに起因する、健康者、保有者、罹病者の三者間における染色体位置の相違を検出する場合にも、本発明のヌクレオチド配列を用い得る。

30

【0302】

本発明の別の実施例では、PMMM、その触媒作用断片或いは免疫原断片またはそのオリゴペプチドを、種々の任意の薬剤スクリーニング技術における化合物のライブラリのスクリーニングに用いることができる。薬剤スクリーニングに用いる断片は、溶液中に遊離しているか、固体支持物に固定されるか、細胞表面上に保持されるか、細胞内に位置しうる。PMMM と検査する薬剤との結合による複合体の形成を測定してもよい。

【0303】

別の薬物スクリーニング方法は、目的のタンパク質に対して好適な結合親和性を有する化合物を高い処理能力でスクリーニングするために用いられる (Geysen 他 (1984) PCT 出願 W084/03564)。この方法においては、多数の様々な低分子の試験用化合物を固体基板上で合成する。試験用化合物は、PMMM、或いはその断片と反応してから洗浄する。次に、結合された PMMM が、当分野で周知の方法で検出される。精製された PMMM はまた、前記した薬剤をスクリーニングする技術に用いられるプレート上で直接被覆することもできる。別法では、非中和抗体を用いてペプチドを捕捉し、ペプチドを固体支持物に固定することもできる。

40

【0304】

別の実施例では、PMMM と結合可能な中和抗体が DME と結合するため試験用化合物と特に競合する、競合的薬剤スクリーニングアッセイを用いることができる。この方法では、抗

50

体が、PMMMと1つ以上の抗原決定因子を共有するどのペプチドの存在も検出する。

【0305】

別の実施例では、発展途上の分子生物学技術にPMMMをコードするヌクレオチド配列を用いて、限定はされないが、現在知られているトリプレット暗号及び特異的な塩基対相互作用などのヌクレオチド配列の特性に依存する新しい技術を提供することができる。

【0306】

更に詳細説明をしなくとも、当業者であれば以上の説明を以って本発明を最大限に利用できるであろう。したがって、これ以下に記載する実施例は単なる例示目的にすぎず、いかようにも本発明を限定するものではない。

【0307】

本明細書において開示した全ての特許、特許出願及び刊行物、特に米国特許第60/322,196号、第60/324,134号、第60/327,233号、第60/332,423号、第60/334,145号、第60/334,229号、第60/337,451号、第60/343,980号、第60/346,198号、第60/348,887号、第60/351,928号、第60/366,837号は、言及することをもって本明細書の一部となす。

【実施例】

【0308】

1 cDNAライブラリの作製

Incyte cDNA群の由来は、LIFESEQ GOLDデータベース (Incyte Genomics, Palo Alto CA) に記載されたcDNAライブラリ群である。幾つかの組織はホモジナイズしてグアニジニウムイソチオシアネート溶液に溶解し、他の組織はホモジナイズしてフェノールにまたは変性剤群の好適な混合液に溶解した。混合液の1例であるTRIZOL (Invitrogen) は、フェノールとグアニジンイソチオシアネートとの単相溶液である。結果として得た溶解物は、塩化セシウムのクッション液の上に重層して遠心分離するか、クロロフォルムで抽出した。イソプロパノールか、酢酸ナトリウムとエタノールか、いずれか一方、或いは別の方法を用いて、溶解物からRNAを沈殿させた。

【0309】

RNAの純度を高めるため、RNAのフェノールによる抽出及び沈殿を必要な回数繰り返した。場合によっては、DNA分解酵素でRNAを処理した。殆どのライブラリでは、オリゴd(T) 連結常磁性粒子 (Promega)、OLIGOTEXラテックス粒子 (QIAGEN, Chatsworth CA) またはOLIGOTEX mRNA精製キット (QIAGEN) を用いて、ポリ(A)+RNAを単離した。別法では、別のRNA単離キット、例えばPOLY(A) PURE mRNA精製キット (Ambion, Austin TX) を用いて、組織溶解物からRNAを直接単離した。

【0310】

場合によってはStratagene社へのRNA提供を行い、対応するcDNAライブラリをStratagene社が作製することもあった。そうでない場合は、UNIZAPベクターシステム (Stratagene) またはSUPERSCRIPトラスミドシステム (Invitrogen) を用いて本技術分野で公知の推奨される方法または類似の方法でcDNAを合成し、cDNAライブラリを作製した (前出のAusubel、他、5章)。逆転写は、オリゴd(T) またはランダムプライマーを用いて開始した。合成オリゴヌクレオチドアダプターを二本鎖cDNAに連結反応させ、好適な制限酵素または酵素群でcDNAを消化した。殆どのライブラリに対しcDNAのサイズ選択 (300~1000bp) は、SEPHACRYL S1000、SEPHAROSE CL2BまたはSEPHAROSE CL4Bカラムクロマトグラフィ (Amersham Biosciences)、あるいは分取用アガロースゲル電気泳動法を用いて行った。cDNAは好適なトラスミドのポリリンカーの、適合する制限酵素部位にライゲーションされた。好適なトラスミドは、例えばPBLUESCRIPTトラスミド (Stratagene)、PSPORT1トラスミド (Invitrogen, Carlsbad CA)、PCDNA2.1トラスミド (Invitrogen)、PBK-CMVトラスミド (Stratagene)、PCR2-TOPOTAトラスミド (Invitrogen)、PCMV-ICISトラスミド (Stratagene)、pGEN (Incyte Genomics, Palo Alto CA)、pRARE (Incyte Genomics)、またはpINCY (Incyte Genomics)、またはこれらの誘導体である。組換えトラスミドは、Stratagene社のXL1-Blue、XL1-BlueMRFまたはSOLR、あるいはInvitrogen社のDH5、DH10BまたはElectroMAX DH10Bなど適格な大腸菌細胞に形質転換した。

10

20

30

40

50

【0311】

2 cDNAクローンの単離

UNIZAPベクターシステム (Stratagene) を用いた *in vivo* 切除によって、或いは細胞溶解によって、実施例 1 のようにして得たプラスミドを宿主細胞から回収した。プラスミドを精製する方法は、MagicまたはWIZARD Minipreps DNA精製システム (Promega)、AGTC Miniprep精製キット (Edge Biosystems, Gaithersburg MD)、QIAGEN社のQIAWELL 8 Plasmid、QIAWELL 8 Plus PlasmidおよびQIAWELL 8 Ultra Plasmid 精製システム、R.E.A.L. Prep 96プラスミド精製キットの中から少なくとも1つを用いた。プラスミドは、沈殿させた後、0.1mlの蒸留水に再懸濁して、凍結乾燥して或いは凍結乾燥しないで4℃で保管した。

10

【0312】

別法では、高処理フォーマットにおいて直接結合PCR法を用いて宿主細胞溶解物からプラスミドDNAを増幅した (Rao, V.B. (1994) Anal. Biochem. 216:1-14)。宿主細胞の溶解および熱サイクリング過程は、単一反応混合液中で行った。サンプルを処理し、それを384穴プレート内で保管し、増幅したプラスミドDNAの濃度をPICOGREEN色素 (Molecular Probes, Eugene OR) 及びFLUOROSKAN 2 蛍光スキャナ (Labsystems Oy, Helsinki, Finland) を用いて蛍光分析的に定量した。

【0313】

3 シークエンシング及び分析

実施例 2 に記載したようにプラスミドから回収したIncyte cDNAを、以下に示すようにシークエンシングした。cDNAのシークエンス反応は、標準的方法あるいは高処理装置、例えばABI CATALYST 800 サーマルサイクラー (Applied Biosystems) またはPTC-200 サーマルサイクラー (MJ Research) を、HYDRAマイクロディスペンサー (Robbins Scientific) またはMICROLAB 2200 (Hamilton) 液体転移システムと併用して処理した。cDNAのシークエンス反応は、Amersham Biosciences社が提供する試薬、またはABIシークエンシングキット、例えばABI PRISM BIGDYE Terminator cycle sequencing ready reaction kit (Applied Biosystems) の試薬を用いて準備した。cDNAのシークエンス反応の電気泳動的分離及び標識したポリヌクレオチドの検出には、MEGABACE 1000 DNAシークエンシングシステム (Applied Biosystems) が、標準ABIプロトコル及び塩基呼び出し (base calling) ソフトウェアを用いるABI PRISM 373または377シークエンシングシステム (Applied Biosystems) が、或いはその他の本技術分野で既知の配列解析システムを用いた。cDNA配列内のリーディングフレームは、標準的方法 (前出のAusubel, 7章) を用いて決定した。cDNA配列の幾つかを選択して、実施例 8 に記載した方法で配列を伸長させた。

20

30

【0314】

IncyteのcDNA配列に由来するポリヌクレオチド配列は、ベクター、リンカー及びポリ(A)配列を除去し、あいまいな塩基をマスクすることによって有効性を確認した。その際、BLAST、動的プログラミング及び隣接ジヌクレオチド頻度分析に基づくアルゴリズム及びプログラムを用いた。次に、Incyte cDNA配列またはそれらの翻訳の問い合わせを、以下のデータベース群に対して行った。すなわち、選抜した公共のデータベース群 (例えばGenBankの霊長類、げっ歯類、哺乳類、脊椎動物、真核生物のデータベースと、BLOCKS、PRINTS、DOMO、PRODOM) と、ヒト、ラット、マウス、線虫 (*Caenorhabditis elegans*)、出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)、分裂酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*) および *Candida albicans* からの配列群を持つPROTEOMEデータベース群 (Incyte Genomics, Palo Alto CA)、および、隠れマルコフモデル (HMM) ベースのタンパク質ファミリーデータベース群、例えばPFAM、INCY、およびTIGRFAM (Haft, D.H. 他 (2001) Nucleic Acids Res. 29:41-43)、並びにHMMベースのタンパク質ドメインデータベースたとえばSMART (Schultz, J. 他 (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:5857-5864; Letunic, I. 他 (2002) Nucleic Acid Res. 30:242-244)。 (HMMは、遺伝子ファミリーのコンセンサス1次構造を分析する確率的アプローチである。Eddy, S.R. (1996) Cuff. Opin. Struct. Biol. 6:361-365等を参照)。問い合わせは、BLAST、FASTA、BLIMPS、およびHMMERに基づくプログラムを用いて行

40

50

った。Incyte cDNA配列は、完全長のポリヌクレオチド配列を産出するようにアセンブリした。あるいは、GenBank cDNA群、GenBank EST群、スティッチされた配列群、ストレッチされた配列群、またはGenscan予測コード配列群（実施例 4 および 5を参照）を用い、Incyte cDNAのアセンブリ体群を完全長まで伸長させた。PhredとPhrapとConsedとに基づくプログラムを用いてアセンブリし、GenMarkとBLASTとFASTAとに基づくプログラムを用いて、cDNAのアセンブリ体を、オープンリーディングフレームについてスクリーニングした。完全長ポリヌクレオチド配列を翻訳し、対応する完全長ポリペプチド配列を得た。あるいは、或るポリペプチドは、完全長翻訳ポリペプチドの任意のメチオニン残基で開始し得る。完全長ポリペプチド配列群の続いたの分析としての問い合わせを、GenBankタンパク質データベース群（genpept）、SwissProt、PROTEOMEデータベース群、BLOCKS、PRINTS、DOMO、PRODOMおよびProsites等のデータベースや、PFAM、INCY、およびTIGRFAM等の隠れマルコフモデル（HMM）ベースのタンパク質ファミリーデータベース群、並びにSMART等のHM Mベースのタンパク質ドメインデータベース群に対し行った。完全長ポリヌクレオチド配列はまた、MACDNASIS PROソフトウェア（MiraiBio, Alameda CA）および LASERGENEソフトウェア（DNASTAR）を用いて分析する。ポリヌクレオチド及びポリペプチド配列アラインメントは、アラインメントした配列間の一致率も計算するMEGALIGNマルチシークエンスアラインメントプログラム（DNASTAR）に組み込まれているようなCLUSTALアルゴリズムによって指定されるデフォルトパラメータを用いて作製する。

10

【0315】

Incyte cDNA及び完全長配列の分析及びアセンブリに利用したツール、プログラム及びアルゴリズムの概略と、適用可能な説明、参照文献、閾値パラメータを表7に示す。用いたツール、プログラム及びアルゴリズムを表7の列1に、それらの簡単な説明を列2に示す。列3は好適な参照文献であり、全ての文献は全体を引用を以って本明細書の一部となす。適用可能な場合には、列4は2つの配列が一致する強さを評価するために用いたスコア、確率値その他のパラメータを示す（スコアが高いほど、または確率値が低いほど、2配列間の相同性が高くなる）。

20

【0316】

完全長ポリヌクレオチド配列およびポリペプチド配列のアセンブリ及び分析に用いる上記のプログラムは、SEQ ID NO:32-62のポリヌクレオチド配列断片の同定にも利用できる。ハイブリダイゼーション及び増幅技術に有用である約20～約4000ヌクレオチド

30

の断片を表4の列2に示した。

【0317】

4 ゲノムDNAからのコード配列の同定及び編集

推定上のタンパク質修飾および維持分子類の同定には、先ずGenscan遺伝子同定プログラムを、公共のゲノム配列データベース（例えば、gbpriやgbhtg）に対して実行した。Genscanは、様々な生物からのゲノムDNA配列を分析する汎用遺伝子同定プログラムである（Burge, C. 及び S. Karlin (1997) J. Mol. Biol. 268:78-94、Burge, C. 及び S. Karlin (1998) Curr. Opin. Struct. Biol. 8:346-354）。プログラムは予測エキソンを連結し、メチオニンから停止コドンに及ぶアセンブリされたcDNA配列を形成する。Genscanの出力は、ポリヌクレオチドおよびポリペプチド配列のFASTAデータベースである。Genscanが一度に分析する配列の最大範囲は、30 kbに設定した。これらのGenscan予測cDNA配列の内、どの配列がタンパク質修飾および維持分子をコードするかを判定するために、コードされるポリペプチドを、PFAMモデル群に対し、タンパク質修飾および維持分子について問合せて分析した。潜在的なタンパク質修飾および維持分子はまた、既にタンパク質修飾および維持分子としてアノテーションが付けられたIncyte cDNA配列に対する相同性を基に同定された。こうして選択されたGenscan予測配列は、次にBLAST分析により公共データベースgenpept及びgbpriと比較した。必要であれば、genpeptからのトップBLASTヒットと比較することによりGenscan予測配列を編集し、余分なまたは省略されたエキソンなど、Genscanが予測した配列におけるエラーを補正した。BLAST分析はまた、Genscan予測配列の、いかなるIncyte cDNAまたは公共cDNAカバレッジ（coverage）の発見にも用いられ、したが

40

50

って転写の証拠を提供した。Incyte cDNAカバレッジが利用できた場合には、この情報を用いてGenscan予測配列を補正または確認した。完全長ポリヌクレオチド配列は、実施例 3に記載したアセンブリプロセスを用いて、Incyte cDNA配列および/または公共cDNA配列でGenscan予測コード配列をアセンブリして得た。或いは、完全長ポリヌクレオチド配列は、編集した、または非編集のGenscan予測コード配列に完全に由来する。

【0318】

5 cDNA配列データを使ったゲノム配列データのアセンブリ ステッチ配列 (Stitched Sequence)

部分cDNA配列は、実施例 4に記載のGenscan遺伝子同定プログラムにより予測されたエキソンを用いて伸長させた。実施例 3に記載されたようにアセンブリされた部分cDNAは、ゲノムDNAにマッピングし、関連するcDNA及び1つ以上のゲノム配列から予測されたGenscanエキソンを含むクラスターに分解した。cDNA及びゲノム情報を統合するべくグラフ理論及び動的プログラミングに基づくアルゴリズムを用いて各クラスターを分析し、引き続いて確認、編集または伸長して完全長配列を産出するような潜在的スプライス変異体を生成した。区間の全長が、2つ以上の配列に在るような配列区間群をクラスター内で同定し、そのように同定された区間群は、推移性により、等しいと考えた。例えば、1つのcDNAと2つのゲノム配列上に或る区間が存在する場合、この3つの区間は全て等しいと考えられた。このプロセスは、無関係であるが連続したゲノム配列をcDNA配列により結び合わせて架橋し得る。このようにして同定された区間を、親配列 (parent sequence) に沿って現われる順にステッチアルゴリズムで縫い合わせ、可能な最も長い配列および変異配列を製作する。1種類の親配列に沿って発生した区間間の連鎖 (cDNA - cDNAまたはゲノム配列 - ゲノム配列) は、親の種類を変える連鎖 (cDNA - ゲノム配列) に優先した。結果として得たステッチ配列群を翻訳し、BLAST分析で公共データベースgenpeptおよびgbpriと比較した。Genscanが予測した不正確なエキソン群は、genpeptからのトップBLASTヒットとの比較により補正した。必要な場合には、追加cDNA配列を用いるかゲノムDNAの検査により配列を更に伸長させた。

10

20

【0319】

ストレッチ配列 (Stretched Sequence)

部分DNA配列は、BLAST分析に基づくアルゴリズムにより完全長まで伸長された。まず、BLASTプログラムを用いて、GenBankの霊長類、げっ歯類、哺乳動物、脊椎動物及び真核生物のデータベースなどの公共データベースに対し、実施例 3に記載したようにアセンブリされた部分cDNAを問い合わせた。次に、最も近いGenBankタンパク質相同体を、BLAST分析により、Incyte cDNA配列または実施例 4に記載のGenScanエキソン予測配列のいずれかと比較した。結果として得られる高スコアリングセグメント対 (HSP) を用いてキメラタンパク質を産出し、翻訳した配列をGenBankタンパク質相同体上にマッピングした。元のGenBankタンパク質相同体に対し、キメラタンパク質内では挿入または欠失が起こり得る。GenBankタンパク質相同体、キメラタンパク質またはその両方をプローブとして用い、公共のヒトゲノムデータベースから相同ゲノム配列を検索した。このようにして、部分的なDNA配列を、相同ゲノム配列の付加によりストレッチすなわち伸長した。結果として得られるストレッチ配列を検査し、完全遺伝子を含んでいるか否かを判定した。

30

40

【0320】

6 PMMMをコードするポリヌクレオチドの染色体マッピング

SEQ ID NO:32-62をアセンブリするために用いた配列を、BLAST及びSmith-Watermanアルゴリズムを用いて、Incyte LIFESEQデータベース及び公共のドメインデータベースの配列と比較した。SEQ ID NO:32-62と一致するこれらのデータベースの配列を、Phrapなどのアセンブリアルゴリズム (表7) を使用して、連続及びオーバーラップした配列のクラスターにアセンブリした。スタンフォード・ヒトゲノムセンター (SHGC)、ホワイトヘッド・ゲノム研究所 (WIGR)、Genethonなどの公的な情報源から入手可能な放射線ハイブリッドおよび遺伝地図データを用いて、いずれかのクラスター化された配列が既にマッピングされているかを判定した。マッピングされた配列が或るクラスターに含まれている場合、

50

そのクラスターの全配列が、個々の配列番号と共に、地図上の位置に割り当てられた。

【0321】

地図上の位置は、ヒト染色体の範囲または区間として表される。センチモルガン単位での或る区間の地図上の位置は、染色体の短腕 (p-arm) の末端に対して測定する (センチモルガン (cM) は、染色体マーカー間の組換え頻度に基づく計測単位である。平均して、1 cMは、ヒト中のDNAの1メガベース (Mb) にほぼ等しい。もっとも、この値は、組換えのホットスポット及びコールドスポットによって広範囲に変化する)。cM距離は、各クラスター内に配列が含まれる放射線ハイブリッドマーカー類に対して境界を提供するGenethonによってマッピングされた遺伝マーカー群に基づく。NCBI「GeneMap'99」 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genemap/>) などの一般個人が入手可能なヒト遺伝子マップおよびその他の情報源を用いて、既に同定されている疾患遺伝子群が、上記した区間内若しくは近傍に位置するかを決定できる。

10

【0322】

7 ポリヌクレオチド発現の分析

ノーザン分析は、遺伝子の転写物の存在を検出するために用いられる実験用技術であり、特定の細胞種或いは組織からのRNAが結合されている膜への標識されたヌクレオチド配列のハイブリダイゼーションを伴う (SambrookおよびRussell, 前出, 7章、Ausubel 他、前出, 4章)。

【0323】

BLASTを適用する類似のコンピュータ技術を用いて、GenBankやLifeSeq (Incyte Genomics) 等のデータベースにおいて同一または関連分子を検索した。ノーザン分析は、多数の膜系ハイブリダイゼーションよりも非常に速い。更に、任意の特定の一致を厳密なあるいは相同的なものとして分類するか否かを決定するため、コンピュータ検索の感度を修正することができる。検索の基準は積スコアであり、次式で定義される。

20

【0324】

【数1】

(BLASTスコア×配列一致率)

$5 \times (\text{長さ(配列1)}, \text{長さ(配列2)})$ の最小値

30

【0325】

積スコアは、2つの配列間の類似度と、配列が一致する長さとの両方を考慮している。積スコアは、0~100のノーマライズされた値であり、次のようにして求める。BLASTスコアにヌクレオチドの配列一致率を乗じ、その積を2つの配列の短い方の長さの5倍で除する。BLASTスコアを計算するには、或る高スコアリングセグメント対 (HSP) 内の一致する各塩基に+5のスコアを割り当て、各不一致塩基に-4を割り当てる。2つの配列は、2以上のHSPを共有し得る (ギャップにより隔離される)。2以上のHSPがある場合には、最高BLASTスコアのセグメント対を用いて積スコアを計算する。積スコアは、断片的オーバーラップとBLASTアラインメントの質とのバランスを表す。例えば積スコア100は、比較した2つの配列の短い方の長さ全体にわたって100%一致する場合のみ得られる。積スコア70は、一端が100%一致し、70%オーバーラップしているか、他端が88%一致し、100%オーバーラップしているかのいずれかの場合に得られる。積スコア50は、一端が100%一致し、50%オーバーラップしているか、79%一致し、100%オーバーラップしているかのいずれかの場合に得られる。

40

【0326】

或いは、PMMMをコードするポリヌクレオチドを、由来する組織に対して分析する。例えば幾つかの完全長配列は、少なくとも一部は、オーバーラップするIncyte cDNA配列群を用いてアセンブリされる (実施例3を参照)。各cDNA配列は、ヒト組織から作製されたcDNAライブラリに由来する。各ヒト組織は、以下の臓器/組織カテゴリーの1つに分類される。すなわち心血管系、結合組織、消化器系、胎芽構造、内分泌系、外分泌腺、女性生殖

50

器、男性生殖器、生殖細胞、血液および免疫系、肝、筋骨格系、神経系、脾臓、呼吸器系、感覚器、皮膚、顎口腔系、非分類性/混合性または尿路である。各カテゴリーのライブラリ数を数えて、全カテゴリーの総ライブラリ数で除する。同様に、各ヒト組織は、以下の疾患/条件カテゴリー即ち癌、細胞株、発達、炎症、神経性、外傷、心血管、プール、その他の1つに分類される。各カテゴリーのライブラリ数を数えて、全カテゴリーの総ライブラリ数で除する。得られるパーセンテージは、PMMMをコードするcDNAの疾患特異的な発現を反映する。cDNA配列およびcDNAライブラリ/組織の情報は、LIFESEQ GOLD データベース (Incyte Genomics, Palo Alto CA) から得ることができる。

【0327】

8 PMMMをコードするポリヌクレオチドの伸長

完全長のポリヌクレオチドもまた、完全長分子の適切な断片から設計したオリゴヌクレオチドプライマーを用いて該断片を伸長させて生成した。或るプライマーは既知の断片の5'伸長を開始するべく合成し、別のプライマーは既知の断片の3'伸長を開始するべく合成した。開始プライマーは、長さが約22~30ヌクレオチド、GC含有率が約50%以上となり、約68~72の温度で標的配列にアニーリングするように、OLIGO 4.06ソフトウェア (National Biosciences) 或いは別の適切なプログラムを用いて、cDNAから設計した。ヘアピン構造及びプライマー-プライマー二量体を生ずるようなヌクレオチドの伸長は全て回避した。

10

【0328】

選択したヒトcDNAライブラリ群を用い、配列を伸長した。2段階以上の伸長が必要または望ましい場合には、付加的プライマーあるいはプライマーのネステッドセットを設計した。

20

【0329】

高忠実度の増幅が、当業者によく知られている方法を利用したPCR法によって得られた。PCRは、PTC-200 サーマルサイクラー (MJ Research, Inc.) を用いて96ウェルプレート内で行った。反応混合液は、鋳型DNA及び200nmolの各プライマーを有する。また、 Mg^{2+} と $(NH_4)_2SO_4$ と2-メルカプトエタノールを含む反応バッファー、Taq DNAポリメラーゼ (Amersham Biosciences)、ELONGASE酵素 (Invitrogen)、Pfu DNAポリメラーゼ (Stratagene)を含む。プライマーの組、PCI AとPCI Bに対して以下のパラメータで増幅を行った。ステップ1: 94 で3分間、ステップ2: 94 で15秒間、ステップ3: 60 で1分間、ステップ4: 68 で2分間、ステップ5: ステップ2、3および4を20回繰り返す、ステップ6: 68 で5分間、ステップ7: 4 で保存。別法では、プライマー対であるT7とSK+とに対して以下のパラメータで増幅を行った。ステップ1: 94 で3分間、ステップ2: 94 で15秒間、ステップ3: 57 で1分間、ステップ4: 68 で2分間、ステップ5: ステップ2、3および4を20回繰り返す、ステップ6: 68 で5分間、ステップ7: 4 で保存。

30

【0330】

各ウェルのDNA濃度は、1×TE及び0.5µlの希釈していないPCR産物に溶解した100µlのPICOGREEN定量試薬 (0.25(v/v) PICOGREEN; Molecular Probes, Eugene OR)を不透明な蛍光光度計プレート (Corning Costar, Acton MA)の各ウェルに分配してDNAが試薬と結合できるようにして測定した。サンプルの蛍光を計測してDNAの濃度を定量すべく、プレートをFluoroskan II (Labsystems Oy, Helsinki, Finland)でスキャンした。反応混合物のアリコット5~10µlを1%アガロースゲル上で電気泳動法によって解析し、どの反応が配列の伸長に成功したかを判定した。

40

【0331】

伸長したヌクレオチドは、脱塩および濃縮して384穴プレートに移し、CviJIコレラウイルスエンドヌクレアーゼ (Molecular Biology Research, Madison WI)を用いて消化し、音波処理またはせん断し、pUC 18ベクター (Amersham Biosciences)への再連結を行った。ショットガン・シーケンシングのために、消化したヌクレオチドを低濃度 (0.6~0.8%)のアガロースゲル上で分離し、断片を切除し、寒天をAgar ACE (Promega)で消化した。伸長したクローンをT4リガーゼ (New England Biolabs, Beverly MA)を用

50

いてpUC 18ベクター (Amersham Biosciences) に再連結し、Pfu DNAポリメラーゼ (Stratagene) で処理して制限部位のオーバーハング部分を満たし、大腸菌細胞に形質移入した。形質移入した細胞を抗生物質含有培地上で選択し、個々のコロニーを選択してLB/2x carb液体培地の384穴プレート内において37 で一晩培養した。

【0332】

細胞を溶解して、Taq DNAポリメラーゼ (Amersham Biosciences) 及びPfu DNAポリメラーゼ (Stratagene) を用いて以下の手順でDNAをPCR増幅した。ステップ1: 94 で3分間、ステップ2: 94 で15秒間、ステップ3: 60 で1分間、ステップ4: 72 で2分間、ステップ5: ステップ2、3および4を29回繰り返す、ステップ6: 72 で5分間、ステップ7: 4 で保存。上記したようにPICOGREEN試薬 (Molecular Probes) でDNAを定量化した。DNAの回収率が低いサンプルは、上記と同一の条件を用いて再増幅した。サンプルは20%ジメチルスルホキシド (1:2, v/v) で希釈し、DYENAMIC エネルギートランスファー シークエンシングプライマー、及びDYENAMIC DIRECT kit (Amersham Biosciences) またはABI PRISM BIG DYE ターミネーターサイクル シークエンシング反応キット (Terminator cycle sequencing ready reaction kit) (Applied Biosystems) を用いてシークエンシングした。

10

【0333】

同様に、上記手順を用いて完全長ポリヌクレオチドを検証した。あるいは、完全長ポリヌクレオチドを用い、上記手順で、そのような伸長のために設計したオリゴヌクレオチド類と、或る適切なゲノムライブラリとを用いて5'調節配列を得た。

【0334】

9 PMMMをコードするポリヌクレオチドにおける1塩基多型性の同定
一塩基多型性 (SNP) として知られる一般的なDNA配列変異体は、LIFESEQデータベース (Incyte Genomics) を用いてSEQ ID NO:32-62において同定された。実施例3に記述されているように、同じ遺伝子からの配列を共にクラスターにしてアセンブリし、これによって遺伝子内のすべての配列変異体の同定ができた。一連のフィルタからなるアルゴリズムを使って、SNPを他の配列変異体から区別した。前段フィルターは、最小限Phredクオリティスコア15を要求することにより大多数のベースコールのエラーを除去し、また、配列アライメントエラーや、ベクター配列、キメラおよびスプライス変異体の不適当なトリミングにより生じるエラーを取り除いた。染色体の高度解析の自動化手順により、推定SNPの近傍におけるオリジナルのクロマトグラムファイルが解析された。クローンエラーフィルタは統計的に生み出されたアルゴリズムを用いて、逆転写酵素、ポリメラーゼ、または体細胞突然変異によって引き起こされるエラーのような、実験処理時に導入されるエラーを識別した。クラスターエラーフィルターは、統計的に生み出されたアルゴリズムを用いて、近縁の相同体または偽遺伝子のクラスター化に起因するエラー、または非ヒト配列によるコンタミネーションにより生じたエラーを同定した。最後のフィルター群によって、免疫グロブリンまたはT細胞受容体に存在する重複 (duplicates) とSNPが除去された。

20

30

【0335】

異なる4つのヒト集団のSNP部位における対立遺伝子頻度を分析するために、高処理MASSARRAYシステム (Sequenom, Inc.) を用いる質量分析によって、更なる特徴付けのためにいくつかのSNPが選択された。白人母集団は、ユタ州の83人、フランス人4人、ベネズエラ3人およびアーミッシュ派2人を含む92人 (男性46人、女性46人) で構成された。アフリカ人母集団はすべてアフリカ系アメリカ人である194人 (男性97人、女性97人) からなる。ヒスパニック母集団はすべてメキシコ系ヒスパニックの324人 (男性162人、女性162人) からなる。アジア人母集団は126人 (男性64人、女性62人) からなり、親の内訳は中国人43%、日本人31%、コリアン13%、ベトナム人5%およびその他のアジア人8%と報告されている。対立形質の発生頻度は最初に白人母集団において分析し、いくつかの例において、この母集団で対立形質分散を示さなかったSNPは他の三つの母集団においてさらに検査しなかった。

40

【0336】

10 個々のハイブリダイゼーションプローブの標識化及び使用

50

SEQ ID NO:32-62から導き出されたハイブリダイゼーションプローブを用いて、cDNA、mRNA、またはゲノムDNAをスクリーニングする。約20塩基対からなるオリゴヌクレオチドの標識について特に記載するが、より大きなヌクレオチド断片に対しても本質的に同一の手順が用いられる。オリゴヌクレオチドは、OLIGO 4.06ソフトウェア(National Bioscience s)等の最新ソフトウェアを用いて設計し、各オリゴマー50 pmolと、[$^{-32}$ P]アデノシン3リン酸(Amersham Biosciences)250 μ Ciと、T4ポリヌクレオチドキナーゼ(DuPont NE N, Boston MA)とを化合させることにより標識する。標識したオリゴヌクレオチドは、SEP HADEx G-25超細繊維分子サイズ排除デキストラン ピーズカラム(Amersham Biosciences)を用いて実質的に精製する。Ase I、Bgl II、Eco RI、Pst I、Xba1またはPvu II(DuPont NEN)のいずれか1つのエンドヌクレアーゼで消化されたヒトゲノムDNAの典型的な膜ベースのハイブリダイゼーション解析において、毎分 10^7 カウントの標識されたプローブを含むアリコットを用いる。

10

【0337】

各消化物から得たDNAは、0.7%アガロースゲル上で分画してナイロン膜(Nytran Plus, Schleicher & Schuell, Durham NH)に移す。ハイブリダイゼーションは、40°Cで16時間行う。非特異的シグナル群を除去するため、最大で例えば0.1 \times クエン酸ナトリウム食塩水および0.5%ドデシル硫酸ナトリウムの条件下で、プロット群を室温で順次洗浄する。オートラジオグラフィまたはそれに代わるイメージング手段を用いてハイブリダイゼーションパターンを視覚化し、比較する。

【0338】

20

11 マイクロアレイ

マイクロアレイの表面上でアレイエレメントの結合または合成は、フォトリソグラフィ、ピエゾ式印刷(インクジェット印刷、前出のBaldeschweiler他等を参照)、機械的マイクロスポッティング技術及びこれらから派生したものを用いて達成することが可能である。上記各技術において基板は、均一且つ無孔の固体とするべきである(Schena, M., ed. (1999) DNA Microarrays: A Practical Approach, Oxford University Press, London). 推奨する基板には、シリコン、シリカ、スライドガラス、ガラスチップおよびシリコンウエハがある。あるいは、ドットプロット法またはスロットプロット法に類似した手順を利用し、熱的、紫外線的、化学的または機械的結合手順を用いて基板の表面にエレメントを配置および結合させてもよい。通常のアレイは、利用可能な、当業者に公知の方法と機械とを用いて作製でき、任意の適正数のエレメントを有し得る(Schena, M. 他(1995) *Science* 270:467-470; Shalon, D. 他(1996) *Genome Res.* 6:639-645; Marshall, A. および J. Hodgson (1998) *Nat. Biotechnol.* 16:27-31を参照)。

30

【0339】

完全長cDNA、発現配列タグ(EST)、またはその断片またはオリゴマーが、マイクロアレイのエレメントと成り得る。ハイブリダイゼーションに好適な断片またはオリゴマーを、LASERGENEソフトウェア(DNASTAR)など本技術分野で公知のソフトウェアを用いて選択することが可能である。アレイエレメント群を、生体サンプル中のポリヌクレオチド群とハイブリダイズする。生体サンプル中のポリヌクレオチドは、検出を容易にするために蛍光標識などの分子タグに抱合させる。ハイブリダイゼーション後、生体サンプルからのハイブリダイズされていないヌクレオチドを除去し、蛍光スキャナを用いて各アレイエレメントでのハイブリダイゼーションを検出する。あるいは、レーザー脱離および質量スペクトロメトリを用いてもハイブリダイゼーションを検出し得る。マイクロアレイ上の或るエレメントにハイブリダイズする各ポリヌクレオチドの、相補性の度合と相対存在度とを算定し得る。一実施態様におけるマイクロアレイの調製および使用について、以下に詳述する。

40

【0340】

組織または細胞サンプルの調製

全RNAを組織サンプルから単離するためグアニジニウムチオシアネート法を用い、ポリ(A)⁺RNA精製にオリゴ(dT)セルロース法を用いる。各ポリ(A)⁺RNAサンプルを逆転写する

50

ため、MLLV逆転写酵素を用い、また、0.05pg/ μ lのオリゴ(dT)プライマー(21mer)、1 \times 第一鎖バッファ、0.03unit/ μ lのRNアーゼ阻害因子、500 μ MのdATP、500 μ MのdGTP、500 μ MのdTTP、40 μ MのdCTP、40 μ MのdCTP-Cy3(BDS)またはdCTP-Cy5(Amersham Biosciences)を用いる。逆転写反応は、GEMBRIGHTキット(Incyte)を用いて200ngのポリ(A)⁺RNA含有の25体積ml内で行う。特異的対照ポリ(A)⁺RNAは、非コード酵母ゲノムDNAから *in vitro* 転写により合成する。37^oで2時間インキュベートした後、各反応サンプル(1つはCy3、もう1つはCy5標識)は、2.5mlの0.5M水酸化ナトリウムで処理し、85^oで20分間インキュベートし、反応を停止させてRNAを分解させる。サンプルを精製するため、2つの連続するCHROMA SPIN 30ゲル濾過スピナラム(Clontech, Palo Alto CA)を用いる。混合後、2つの反応サンプルをエタノール沈殿させるため、1mlのグリコーゲン(10 mg/ml)、60mlの酢酸ナトリウム、および300mlの100%エタノールを用いる。サンプルは次に、SpeedVAC(Savant Instruments Inc., Holbrook NY)を用いて乾燥して仕上げ、14 μ l 5 \times SSC/0.2% SDS中で再懸濁する。

10

【0341】

マイクロアレイの調製

本発明の配列を用いて、アレイエレメントを作製する。各アレイエレメントは、クローニングcDNAインサートを持つベクター含有細菌細胞から増幅する。PCR増幅は、cDNAインサートに隣接するベクター配列に相補的なプライマーを用いる。30サイクルのPCRで1~2ngの初期量から5 μ gより大きい最終量までアレイエレメントを増幅する。増幅したアレイエレメントは、SEPHACRYL-400(Amersham Biosciences)を用いて精製する。

20

【0342】

精製したアレイエレメントは、ポリマーコートされたスライドガラス上に固定する。顕微鏡スライドガラス(Corning)は、0.1%のSDSおよびアセトン中で超音波洗浄し、処理の間および処理後に十分に蒸留水で洗浄する。スライドガラスは、4%フッ化水素酸(VWR Scientific Products Corporation(VWR), West Chester PA)中でエッチングし、十分に蒸留水中で洗浄し、95%エタノール中で0.05%アミノプロピルシラン(Sigma)を用いてコーティングする。コーティングしたスライドは、110^oのオーブンで硬化させる。

【0343】

米国特許第5,807,522号に記載されている手順を用いて、コーティングしたガラス基板にアレイエレメント群を付加する。この特許は、引用を以って本明細書の一部とする。平均濃度100ng/ μ lのアレイエレメントDNA1 μ lを、高速ロボット装置(robotic apparatus)により、開放型キャピラリープリンティングエレメント(open capillary printing element)に充填する。装置はここで、スライド毎に約5nlのアレイエレメントサンプルを置く。

30

【0344】

マイクロアレイには、STRATALINKER UV架橋剤(Stratagene)を用いてUV架橋する。マイクロアレイは、室温において0.2%SDSで1度洗浄し、蒸留水で3度洗浄する。リン酸緩衝生理食塩水(PBS)(Tropix, Inc., Bedford MA)中の0.2%カゼイン中において60^oで30分間マイクロアレイをインキュベートした後、前に行ったように0.2%SDS及び蒸留水で洗浄することにより、非特異結合部位をブロックする。

40

【0345】

ハイブリダイゼーション

ハイブリダイゼーション反応に用いる9 μ lのサンプル混合体には、Cy3またはCy5で標識したcDNA合成産物群の各0.2 μ gを、5 \times SSC, 0.2%SDSハイブリダイゼーション緩衝液中に含む。サンプル混合体は、65^oまで5分間加熱し、マイクロアレイ表面上で等分して1.8cm²のカバーガラスで覆う。アレイは、顕微鏡スライドより僅かに大きい空洞を有する防水チェンバーに移す。チェンバーのコーナーに140 μ lの5 \times SSCを加えることにより、チェンバー内部を湿度100%に保持する。アレイを含むチェンバーは、60^oで約6.5時間インキュベートする。アレイは、第1洗浄緩衝液中(1 \times SSC, 0.1%SDS)において4

50

5 で10分間洗浄し、第2洗浄緩衝液中(0.1×SSC)において各々45 で10分間、3度洗浄して乾燥させる。

【0346】

検出

レポーター標識したハイブリダイゼーション複合体を検出するには、Cy3の励起のために488nm、Cy5の励起のために632nmでスペクトル線が発生し得るInnova70混合ガス10Wレーザー(Coherent, Inc., Santa Clara CA)を備えた顕微鏡を用いる。励起レーザー光の焦点をアレイ上に置くため、20×顕微鏡対物レンズ(Nikon, Inc., Melville NY)を用いる。アレイを含むスライドを、顕微鏡の、コンピュータ制御のX-Yステージに置き、対物レンズを通してラスタースキャンする。本実施例で用いる1.8cm×1.8cmのアレイは、解像度20μmでスキャンする。

10

【0347】

2回の異なるスキャンで、混合ガスマルチラインレーザーは2つのフルオロフォアを連続的に励起する。発光された光は、波長に基づき分離され、2つのフルオロフォアに対応する2つの光電子増倍管検出器(PMT R1477, Hamamatsu Photonics Systems, Bridgewater NJ)に送られる。好適なフィルタ群をアレイと光電子増倍管との間に設置して、シグナルをフィルタする。用いるフルオロフォアの最大発光の波長は、Cy3では565nm、Cy5では650nmである。装置は両方の蛍光色素からのスペクトルを同時に記録し得るが、レーザー源において好適なフィルターを用いて、蛍光色素1つにつき1度スキャンし、各アレイを通常2度スキャンする。

20

【0348】

スキャンの感度は通常、既知濃度のサンプル混合体に添加されるcDNA対照種により生成されるシグナル強度を用いて校正する。アレイ上の特定の位置には相補的DNA配列が含まれ、その位置におけるシグナルの強度を、ハイブリダイズする種の重量比1:100,000に相関させる。異なる源泉(例えば試験される細胞及び対照細胞など)からの2つのサンプルを、各々異なる蛍光色素で標識し、他と異なって発現した遺伝子を同定するために単一のアレイにハイブリダイズする場合には、その校正を、校正するcDNAのサンプルを2つの蛍光色素で標識し、ハイブリダイゼーション混合体に各々等量を加えることによって行う。

30

【0349】

光電子増倍管の出力は、IBMコンパチブルPCコンピュータにインストールされた12ビットRTI-835Hアナログ-デジタル(A/D)変換ボード(Analog Devices, Inc., Norwood MA)を用いてデジタル化される。デジタル化したデータは、青色(低シグナル)から赤色(高シグナル)までの擬似カラースケールへのリニア20色変換を用いて、シグナル強度がマッピングされたイメージとして表示される。データは、定量的にも分析される。2つの異なるフルオロフォアを同時に励起および測定する場合には、各フルオロフォアの発光スペクトルを用いて、データは先ずフルオロフォア間の光学的クロストーク(発光スペクトルの重なり起因する)を補正される。

【0350】

グリッドが蛍光シグナルイメージ上に重ねられ、それによって各スポットからのシグナルはグリッドの各エレメントに集められる。各エレメント内の蛍光シグナルは統合され、シグナルの平均強度に応じた数値が得られる。シグナル分析に用いるソフトウェアは、GEMTOOLS遺伝子発現分析プログラム(Incyte Genomics)である。発現が少なくとも約2倍変化したアレイエレメント、SB比が少なくとも約2.5であるもの、およびエレメントスポットサイズが少なくとも約40%であるものは差次的に発現しているとみなされた。

40

【0351】

発現

例えば、SEQ ID NO:40は、未処理のPBMCに対してPMAとイオノマイシンで処理された末梢血単核細胞(PBMC)において発現の減少を示したことがマイクロアレイ分析で判定された。末梢血単核細胞(PBMC)は、新規に得た末梢血から単離された。PBMCは、in vitroで可溶

50

性PMAとイオノマイシンで、1、2、4、8、20時間刺激された。これらの処理された細胞は、培養で維持した未処理のPBMCと比較された。したがって、様々な実施様態でSEQ ID NO:40は下記の1つ以上の目的で使用することができる。すなわち、i) 免疫疾患、および関連する疾患、症状の治療のモニタリング、ii) 免疫疾患、および関連する疾患、症状の診断アッセイ、そしてiii) 免疫疾患、および関連する疾患、症状の治療そして/あるいは他の療法の開発である。

【0352】

別の実施例で、SEQ ID NO:43は非悪性乳房上皮細胞株MCF-10Aと比較して、ヒト乳房腫瘍細胞株で差次的発現した。乳房腫瘍の組織学的および分子的評価が示しているところでは、乳癌の発達の進展が経る多段階プロセスにおいて、前癌状態の乳腺上皮細胞は、腫瘍形成につながる比較的確定した一連の事象を経験する。早期の腫瘍発達イベントとして導管過形成がある。急速な新生物成長中の細胞は次第に浸潤性の癌に進行し、肺、骨、そして潜在的には他の臓器へ転移するようになる。腫瘍進行と悪性転換との過程に影響しうる変数としては、遺伝因子、環境因子、成長因子、及びホルモンがある。この過程の複雑さに基づいて、悪性転換の過程を受けるヒト乳腺上皮細胞集団を研究し、特定進行段階と、表現型と分子との特徴を関連付けることが重要である。相互比較研究では、試験された9つ中2つの細胞株が、対照と比較して差次的発現を示した。BT20は74歳の女性から単離された腫瘍塊の薄切片から遊出した細胞から *in vitro* で得られた乳癌細胞株である。MDA-mb-435Sは乳房の転移性管腺癌の31歳の女性の胸水に由来した紡錘状の株である。この実験で、SEQ ID NO:43の発現は、これらの乳房腫瘍細胞株で少なくとも2倍増加した。したがって、様々な実施様態でSEQ ID NO:43は下記の1つ以上の目的で使用することができる。すなわち、i) 乳癌の治療のモニタリング、ii) 乳癌の診断アッセイ、そしてiii) 乳癌の治療法そして/あるいは他の療法の開発である。

【0353】

別の実施例では、SEQ ID NO:43-44は同じ提供者の正常な肺との対比較で、ヒトの肺腫瘍細胞が試験された3つの個別の実験において差次的発現を示した。肺癌は、4つの組織病理的に異なる群に分けられる。3群(扁平上皮癌、腺癌、大細胞癌)は、非小細胞肺癌(NSCLC)に分類される。第4群の癌は、小細胞肺癌(SCLC)という。NSCLCを全部合わせると全症例中の約70%になり、SCLCは約18%である。肺癌の発生と進行に関する分子生物学および細胞生物学的理解は不完全である。3番染色体での欠失は肺癌に一般的であり、この領域に腫瘍抑制遺伝子の存在を示すと思われる。K-rasの活性化突然変異は肺癌で一般的に見られ、この疾患の1つのマウスモデルの基礎である。肺癌の発生と進行に伴う遺伝子発現パターンの解析はこの病気の生物学的基盤に対するすばらしい洞察を生み出すだろうし、また診断と治療の改善にもつながるだろう。これらの実験において、SEQ ID NO:43-44の発現は、同じ提供者の正常肺組織に比べると腫瘍性肺組織において少なくとも2倍の増加があった。

【0354】

これらの、マイクロアレイ技術を用いた実験は、SEQ ID NO:43とSEQ ID NO:44が有意な差次的発現パターンを示すことを示唆する。したがって、様々な実施様態でSEQ ID NO:43-44は下記の1つ以上の目的で使用することができる。すなわち、i) 肺癌の治療のモニタリング、ii) 肺癌の診断アッセイ、そしてiii) 肺癌の治療法そして/あるいは他の療法の開発である。

【0355】

別の実施例で、SEQ ID NO:45は非悪性乳房上皮細胞株と比較して、ヒト乳房腫瘍細胞株で差次的発現した。乳房腫瘍の組織学的および分子的評価が示しているところでは、乳癌の発達の進展が経る多段階プロセスにおいて、前癌状態の乳腺上皮細胞は、腫瘍形成につながる比較的確定した一連の事象を経験する。早期の腫瘍発達イベントとして導管過形成がある。急速な新生物成長中の細胞は次第に浸潤性の癌に進行し、肺、骨、そして潜在的には他の臓器へ転移するようになる。腫瘍進行と悪性転換との過程に影響しうる変数としては、遺伝因子、環境因子、成長因子、及びホルモンがある。この過程の複雑さに基づく

10

20

30

40

50

と、悪性転換の過程中的ヒト乳房上皮細胞集団を研究することが重要である。

【0356】

1つのセットの実験において、正常ドナーから単離された初代ヒト乳房上皮細胞株(HMEC)は、様々なタイプの乳癌細胞株と比較された。試験された6つの乳癌細胞株の中で、MCF-7(乳癌)とSK-BR-3(ヌードマウスにおいても発癌性のヒト乳癌)の2つはSEQ ID NO:45においてHMECと比較して少なくとも2分の1の発現の低下を示した。

【0357】

SEQ ID NO:45はまた、正常な乳房上皮組織由来の非悪性MCF10A細胞と比較して、MCF-7乳房腺癌細胞において少なくとも2分の1の発現の低下を示した。

【0358】

これらの、マイクロアレイ技術を用いた実験は、SEQ ID NO:45が有意な差次的発現パターンを示すことを示唆する。したがって、様々な実施形態でSEQ ID NO:45は下記の1つ以上の目的で使用することができる。すなわち、i)乳癌の治療のモニタリング、ii)乳癌の診断アッセイ、そしてiii)乳癌の治療法そして/あるいは他の療法の開発である。

【0359】

別の例でSEQ ID NO:49は差次的発現を乳癌組織で示し、これはマイクロアレイ分析で判定した。異なる段階の乳癌と関連する分子的特徴と表現型の特徴のより良い判定のために、腫瘍進行の様々な段階の乳癌細胞株が、初代ヒト乳房上皮細胞と比較された。乳癌細胞株には、69才女性の胸水から単離した乳癌細胞株であるMCF7、乳癌細胞株で43才の女性の悪性胸水から単離したSk-BR-3、乳癌細胞株で74才の女性から単離した腫瘍塊の薄片から遊出した細胞から *in vitro*で単離されたBT-20がある。初代乳房上皮細胞系のHMECは健常乳房組織(Clonetics San Diego, CA)から得た。全ての培養細胞は供給業者の推奨事項に従ってケミカリー・ディファインド培地で繁殖させ、70~80%コンフルエントまで成長させてからRNA単離を行った。マイクロアレイ実験が示したところでは、初代乳房上皮細胞株と比較して3つの乳癌株(MCF7、Sk-BR-3、BT20)すべてにおいてSEQ ID NO:49の発現は少なくとも2分の1減少した。したがって、様々な実施形態でSEQ ID NO:49は下記の1つ以上の目的で使用することができる。すなわち、i)乳癌の治療のモニタリング、ii)乳癌の診断アッセイ、そしてiii)乳癌の治療法そして/あるいは他の療法の開発である。SEQ ID NO:49はまた、ベクロメタゾン、デキサメサゾン、プロゲステロン、ブデソニドのステロイドのうちの一つで処理した肝臓C3A細胞で差次的発現を示すことがマイクロアレイ分析で明らかになった。ヒトC3A細胞株はHepG2/C3のクローン誘導体であり、成熟したヒト肝臓の *in vitro* モデルとして確立された(Mickelson 他(1995) Hepatology 22:866-875; Nagendra 他(1997) Am J Physiol 272:G408-G416)。3つの時点のうち最低2時点で、ベクロメタゾン、ブデソニド、デキサメサゾン、またはベタメタゾンで1、3、または6時間処理したコンフルエント前期のC3A細胞において、SEQ ID NO:5の発現が少なくとも2分の1減少した。これらの実験は、SEQ ID NO:49は、肝臓疾患の診断アッセイまた肝臓疾患と障害の治療の潜在的な生物学的マーカーおよび治療薬として有用であることを示唆する。したがって、様々な実施形態でSEQ ID NO:49は下記の1つ以上の目的で使用することができる。すなわち、i)肝臓疾患と障害の治療のモニタリング、ii)肝臓疾患と障害の診断アッセイ、そしてiii)肝臓疾患と障害の治療法そして/あるいは他の療法の開発である。

【0360】

別の実施例においては、SEQ ID NO:51がアルツハイマー病(AD)で差次的発現を示すことがマイクロアレイ分析で明らかになった。重度のADを患う76歳男性由来の小脳組織と正常な67歳男性由来の小脳組織との比較では、SEQ ID NO:51の発現は少なくとも2分の1減少した。したがって、様々な実施形態でSEQ ID NO:51は下記の1つ以上の目的で使用することができる。すなわち、i)アルツハイマー病治療のモニタリング、ii)アルツハイマー病の診断アッセイ、そしてiii)アルツハイマー病の治療法そして/あるいは他の療法の開発である。

【0361】

SEQ ID NO:51はまた、結腸癌との関連において差次的発現を示したが、これはマイクロ

10

20

30

40

50

アレイ分析によって決定された。正常な結腸組織は、中分化腺癌の67才の提供者由来の結腸組織と比較された。SEQ ID NO:51の発現は、正常な組織と比較して腫瘍組織において少なくとも2分の1減少した。したがって、様々な実施様態でSEQ ID NO:51は下記の1つ以上の目的で使用することができる。すなわち、i)結腸癌の治療のモニタリング、ii)結腸癌の診断アッセイ、そしてiii)結腸癌の治療法そして/あるいは他の療法の開発である。

【0362】

別の実施例では、SEQ ID NO:56の発現は、PrEC即ち正常な提供者から単離した初代前立腺上皮細胞株において、3つの前立腺癌細胞株における場合と比較された。DU 145は、広領域に転移を有する前立腺癌の69才男性の脳転移部位から単離された前立腺癌細胞株である。DU 145には検出可能なホルモン感受性がなく、半固形培地でコロニーを形成する。そして酸性ホスファターゼに対してほんの弱陽性であり、前立腺特異抗原に対して陰性であるLNCaPは、転移性前立腺癌を有する50才男子のリンパ節生検から単離された前立腺癌細胞株である。LNCaP細胞は前立腺特異抗原を発現し、前立腺酸性フォスファターゼを産生し、そしてアンドロゲン受容体を発現する。PC-3は、グレード4の前立腺癌の62才男性の骨内転位部位から単離された前立腺癌細胞株である。SEQ ID NO:56の発現は、制限的な条件下で成長したPrEC細胞と比較して制限的な条件下で成長したDU 145細胞において少なくとも2倍上昇した。したがって、様々な実施様態でSEQ ID NO:56は下記の1つ以上の目的で使用することができる。すなわち、i)前立腺癌の治療のモニタリング、ii)前立腺癌の診断アッセイ、そしてiii)前立腺癌の治療法そして/あるいは他の療法の開発である。

【0363】

別の実施例で、SEQ ID NO:58、SEQ ID NO:59、SEQ ID NO:60は乳癌と関連する差次的発現を示し、これはマイクロアレイ分析で判定した。非悪性乳腺上皮細胞株の遺伝子発現プロファイルが、腫瘍進行の様々な段階で種々の乳癌株群の遺伝子発現プロファイルと比較された。比較した細胞株は次のとおりである。a) 74才の女性から単離された腫瘍塊の薄切片から遊出した細胞から *in vitro* で単離した乳癌細胞株であるBT-20、b) 60才の女性の乳房の、充実性の浸潤性管癌から単離した乳房管癌細胞株であるBT474、c) 家族歴に乳癌をもつ、正常に生理中の23才の経産の女性の乳頭状浸潤性管腫瘍から単離した乳房管癌細胞株であるBT483、d) 乳癌の74才の女性から単離した乳房管癌細胞株であるHS578T、e) 69才の女性の胸水から由来された非悪性乳癌細胞株であるMCF7、f) 36才の乳腺症疾患 (fibrocystic breast disease) の女性から単離された乳腺 (管腔の特徴: luminal ductal characteristics) 細胞株であるMCF-10A、g) 31才の転移性乳管腺癌の女性の胸水から R. Cailleau によって単離した親株細胞 (435) から由来した紡錘状の細胞株であるMDA-mb-435S、h) 43才の女性の悪性胸水から単離した乳癌細胞株であるSk-BR-3、i) 乳房の浸潤性腺管癌にかかった54才の女性から得られた胸水から単離された乳癌細胞株であるT-47D、j) 初代乳房上皮細胞株で正常なドナーから単離したHMECである。SEQ ID NO:58の発現は、HMEC細胞と比較してBT20とMCF7細胞において少なくとも2分の1減少した。SEQ ID NO:59の発現は、HMEC細胞と比較して、癌細胞株BT20、Sk-BR-3、T-47D、MDA-mb-435S、MCF7において少なくとも2分の1減少した。SEQ ID NO:60の発現は、HMEC細胞株と比較して癌細胞株Hs578Tにおいて少なくとも2倍上方制御された。したがって、様々な実施様態でSEQ ID NO:58、SEQ ID NO:59、SEQ ID NO:60は下記の1つ以上の目的で使用することができる。すなわち、i)乳癌の治療のモニタリング、ii)乳癌の診断アッセイ、そしてiii)乳癌の治療法そして/あるいは他の療法の開発である。

【0364】

別の例でSEQ ID NO:60は肺癌と関連して差次的発現を示し、これはマイクロアレイ分析で判定した。発現は、個別の提供者に由来する正常な組織および肺腫瘍組織の一致したサンプルで比較された。組織サンプルはRoy Castle International Centre for Lung Cancer Researchによって提供された。SEQ ID NO:60の発現は、68才の女性提供者由来の肺扁平上皮細胞癌組織において同じ提供者の正常肺組織に比べると少なくとも2倍上方制御された。したがって、様々な実施様態でSEQ ID NO:60は下記の1つ以上の目的で使用することができる。すなわち、i)肺癌の治療のモニタリング、ii)肺癌の診断アッセイ、そしてiii)

)肺癌の治療法そして/あるいは他の療法の開発である。

【0365】

別の実施例で、SEQ ID NO:58、SEQ ID NO:59は卵巣癌と関連する差次的発現を示し、これはマイクロアレイ分析で判定した。79才の女性提供者に由来する正常な卵巣が、同一の提供者に由来する卵巣腫瘍と比較された(Huntsman Cancer Institute, Salt Lake City, UT)。SEQ ID NO:58とSEQ ID NO:59の発現は、正常な組織と比較して腫瘍組織において少なくとも2分の1減少した。このようにSEQ ID NO:58とSEQ ID NO:59を、卵巣癌の治療モニタリングと診断アッセイとに用い得る。したがって、様々な実施様態でSEQ ID NO:58-59は下記の1つ以上の目的で使用することができる。すなわち、i)卵巣癌の治療のモニタリング、ii)卵巣癌の診断アッセイ、そしてiii)卵巣癌の治療法そして/あるいは他の療法の開発である。

10

【0366】

別の例でSEQ ID NO:59はステロイドホルモン応答と関連して差次的発現を示し、これはマイクロアレイ分析で判定した。ヒトC3A肝臓細胞株は、成長での、強力な接触阻害に関して選択されたHepG2/C3(肝臓腫瘍を患う15歳の男子から単離した肝臓癌細胞株)のクローン誘導体である。クローン集団の使用は、細胞の再現性を強化する。C3A細胞は、培養中の主要なヒト肝細胞の多くの特徴を有する。すなわち、i)インシュリン受容体とインシュリン様成長因子II受容体の発現、ii)フェトプロテインと比較した血清アルブミンの高率分泌、iii)アンモニアの尿素とグルタミンへの変換、iv)芳香アミノ酸の代謝、v)グルコースとインシュリンの無い培地での増殖、である。C3A細胞株は、成熟したヒト肝臓の*in vitro*モデルとして今や十分に確立されている(Mickelson 他(1995) Hepatology 22: 866-875; Nagendra 他(1997) Am J Physiol 272:G408-G416)。コンフルエント前期のC3A細胞は、1 μ M、10 μ M、100 μ Mの各濃度で、1、3、6時間の間、プロゲステロンまたはbudenosideで処理された。処理した細胞は、未処理のコンフルエント前期のC3A細胞と比較された。各時点で、10 μ Mまたは100 μ Mのbudenosideで処理したC3A細胞、そして10 μ Mのプロゲステロンで処理されたC3A細胞において、SEQ ID NO:59の発現が少なくとも2分の1減少した。このようにSEQ ID NO:59を、ステロイドホルモン誘発応答のモニタリングと診断アッセイとに用い得る。したがって、様々な実施様態でSEQ ID NO:59は下記の1つ以上の目的で使用することができる。すなわち、i)ステロイドホルモン誘発応答の治療のモニタリング、ii)ステロイドホルモン誘発応答の診断アッセイ、そしてiii)ステロイドホルモン誘発応答の治療法そして/あるいは他の療法の開発である。

20

30

【0367】

別の例でSEQ ID NO:61は肺癌と関連して差次的発現を示し、これはマイクロアレイ分析で判定した。同じ提供者からの肺腫瘍組織と微視的に正常な組織との対比較が実施された。SEQ ID NO:61の発現は、68才の女性提供者由来の肺扁平上皮細胞癌組織において同じ提供者の正常な肺組織に比べると少なくとも2倍上昇した(Roy Castle International Centre for Lung Cancer Research, Liverpool, UK)。したがって、様々な実施様態でSEQ ID NO:61は下記の1つ以上の目的で使用することができる。すなわち、i)肺癌の治療のモニタリング、ii)肺癌の診断アッセイ、そしてiii)肺癌の治療法そして/あるいは他の療法の開発である。

40

【0368】

1.2 相補的ポリヌクレオチド

PMMMをコードする配列或いはその任意の一部に対して相補的な配列は、天然のPMMMの発現を低下させるため即ち阻害するために用いられる。約15~30塩基対を含むオリゴヌクレオチドの使用について記すが、これより小さなあるいは大きな配列の断片の場合でも、本質的に同じ手順を用いる。Oligo4.06ソフトウェア(National Biosciences)及びPMMMのコーディング配列を用いて、適切なオリゴヌクレオチドを設計する。転写を阻害するためには、最も独特な5'配列から相補的オリゴヌクレオチドを設計し、これを用いて、プロモーターがコーディング配列に結合するのを防止する。翻訳を阻害するためには、相補的なオリゴヌクレオチドを設計して、リボソームがPMMMをコードする転写物に結合するのを阻

50

害する。

【0369】

13 PMMMの発現

PMMMの発現及び精製は、細菌若しくはウイルスを基にした発現系を用いて行うことができる。細菌でPMMMが発現するために、抗生物質耐性及びcDNAの転写レベルを高める誘導性のプロモーターを含む好適なベクターにcDNAをサブクローニングする。このようなプロモーターとしては、lacオペレーター調節エレメントと併用するT5またはT7バクテリオファージプロモーター、およびtrp-lac(tac)ハイブリッドプロモーターが含まれるが、これらに限定するものではない。組換えベクターを、BL21(DE3)などの好適な細菌宿主に形質転換する。抗生物質耐性をもつ細菌が、イソプロピル-Dチオガラクトピラノシド(IPTG)で誘発されるとPMMMを発現する。真核細胞でのPMMMの発現は、昆虫細胞株または哺乳動物細胞株に一般にバキュロウイルスとして知られているAutographica californica核多角体病ウイルス(AcMNPV)の組換え型を感染させて行う。バキュロウイルスの非必須ポリヘドリン遺伝子を、相同組換え或いは転移プラスミドの媒介を伴う細菌の媒介による遺伝子転移のどちらかによって、PMMMをコードするcDNAと置換する。ウイルスの感染力は維持され、強力なポリヘドリンプロモーターによって高レベルのcDNA転写が行われる。組換えバキュロウイルスは、多くの場合はSpodoptera frugiperda(Sf9)昆虫細胞への感染に用いられるが、ヒト肝細胞の感染にも用いられることもある。後者の感染の場合は、バキュロウイルスへの更なる遺伝的修飾が必要になる(Engelhard, E.K他、(1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:3224-3227、Sandig, V.他(1996) Hum. Gene Ther. 7:1937-1945)。

【0370】

殆どの発現系では、PMMMが、例えばグルタチオンSトランスフェラーゼ(GST)、またはFLAGや6-Hisなどのペプチドエピトープ標識で合成された融合タンパク質となるため、未精製の細胞溶解物からの組換え融合タンパク質の親和性ベースの精製が素早く1回で行うことができる。GSTは日本住血吸虫からの26kDaの酵素であり、タンパク質の活性および抗原性を維持した状態で、固定化したグルタチオン上での融合タンパク質の精製を可能とする(Amersham Biosciences)。精製の後、GST部分を特定の操作部位でPMMMからタンパク質分解的に切断できる。FLAGは8アミノ酸のペプチドであり、市販されているモノクローナルおよびポリクローナル抗FLAG抗体(Eastman Kodak)を用いた免疫親和性精製を可能にする。6ヒスチジン残基が連続して伸長した6-Hisは、金属キレート樹脂上での精製を可能にする(QIAGEN)。タンパク質の発現および精製の方法は、Ausubel他(前出、10および16章)に記載がある。これらの方法で精製したPMMMを直接用いて以下の実施例17、18、19、および20の、適用可能なアッセイを行うことができる。

【0371】

14 機能的アッセイ

PMMM機能は、哺乳動物細胞培養系において生理学的に高められたレベルでのPMMMをコードする配列の発現によって評価する。cDNAを高いレベルで発現する強いプロモーターを含む哺乳動物発現ベクターにcDNAをサブクローニングする。選択されるベクターとしては、PCMV SPORT(Invitrogen, Carlsbad CA)およびPCR 3.1プラスミド(Invitrogen,)があり、どちらもサイトメガロウイルスプロモーターを持つ。リポソーム製剤あるいは電気穿孔法を用いて、5~10μgの組換えベクターをヒト細胞株、例えば内皮由来または造血由来の細胞株に、一過的に形質移入する。更に、標識タンパク質をコードする配列を含む1~2μgのプラスミドを同時に形質移入する。標識タンパク質の発現により、形質移入細胞と非形質移入細胞を区別する手段が与えられる。また、標識タンパク質の発現によって、cDNAの組換えベクターからの発現を正確に予想できる。標識タンパク質は、例えば緑色蛍光タンパク質(GFP;Clontech)、CD64またはCD64-GFP融合タンパク質から選択できる。自動化された、レーザ光学に基づく技術であるフローサイトメトリー(FCM)を用いて、GFPまたはCD64-GFPを発現する形質移入された細胞を同定し、その細胞のアポトーシス状態や他の細胞特性を評価する。FCMは、細胞死に先行するか或いは同時に発生する現象を診断

する蛍光分子の取込を検出して計量する。このような現象として挙げられるのは、ヨウ化プロビジウムによるDNA染色によって計測される核DNA含量の変化、前方散乱光と90°側方散乱光によって計測される細胞サイズと粒度の変化、プロモデオキシウリジンの取込量の低下によって計測されるDNA合成の下方調節、特異抗体との反応性によって計測される細胞表面及び細胞内におけるタンパク質の発現の変容、及びフルオレセイン抱合したアネキシンVタンパク質の細胞表面への結合によって計測される原形質膜組成の変容とがある。フローサイトメトリー法については、Ormerod, M.G. (1994; *Flow Cytometry*, Oxford, New York NY)に記述がある。

【0372】

遺伝子発現におけるPMMMの影響は、PMMMをコードする配列とCD64またはCD64-GFPのどちらかが形質移入された高度に精製された細胞集団を用いて評価することができる。CD64またはCD64-GFPは、形質移入された細胞表面で発現し、ヒト免疫グロブリンG(IgG)の保存された複数の領域に結合する。形質転換された細胞と形質転換されない細胞とは、ヒトIgGがCD64に対する抗体のどちらかで被覆された磁気ビードを用いて分離することができる(DYNAL, Lake Success, NY)。mRNAは、当分野で周知の方法で細胞から精製することができる。PMMM及び目的の他の遺伝子をコードするmRNAの発現は、ノーザン分析やマイクロアレイ技術で分析することができる。

【0373】

15 PMMMに特異的な抗体の作製

実質的に精製されたPMMMを、ポリアクリルアミドゲル電気泳動法(PAGE; 例えば, Harrington, M.G. (1990) *Methods Enzymol.* 182:488-495を参照)または他の精製技術で行い、これを用いて標準的なプロトコルで動物(例えばウサギ、マウスなど)を免疫化して抗体を作り出す。

【0374】

或いは、レーザGENEソフトウェア(DNASTAR)を用いてPMMMアミノ酸配列を解析し、免疫原性の高い領域を決定する。そして対応するオリゴペプチドを合成し、このオリゴペプチドを用いて当業者によく知られている方法で抗体を生成する。例えばC末端付近或いは隣接する親水性領域等の、適切なエピトープの選択については、当分野で公知である(前出のAusubel, 他 11章)。

【0375】

通常は、長さ約15残基のオリゴペプチドを、FMOC化学法を用いるABI 431Aペプチドシンセサイザ(Applied Biosystems)を用いて合成し、N-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル(MBS)を用いた反応によってKLH(Sigma-Aldrich, St. Louis MO)に結合させて、免疫原性を高める(前出のAusubel 他)。完全フロイントアジュバントにおいて、オリゴペプチド-KLH複合体を用いてウサギを免疫化する。得られた抗血清の抗ペプチド活性及び抗DME活性を検査するには、ペプチドまたはPMMMを基板に結合し、1%BSAを用いてブロッキング処理し、ウサギ抗血清と反応させて洗浄し、さらに放射性ヨウ素標識されたヤギ抗ウサギIgGと反応させる。

【0376】

16 特異的な抗体を用いる天然PMMMの精製

天然PMMM 或いは組換えPMMM を、PMMM に特異的な抗体を用いるイムノアフィニティークロマトグラフィーにより実質的に精製する。イムノアフィニティークラムは、CNBr-活性化したSEPHAROSE(Amersham Biosciences)のような活性化クロマトグラフィー用レジンと抗PMMM抗体とを共有結合させることにより形成する。結合後に、製造者の使用説明書に従ってこのレジンをブロックし、洗浄する。

【0377】

PMMMを含む培養液をイムノアフィニティークラムに通し、PMMMを優先的に吸着できる条件で(例えば、界面活性剤の存在下において高イオン強度のバッファーで)そのカラムを洗浄する。そのカラムを、抗体とPMMMとの結合を切るような条件で(例えば、pH2~3のバッファー、或いは高濃度の尿素またはチオシアン酸塩イオンのようなカオトロピ

ックイオンで) 溶出させ、PMMM を回収する。

【0378】

17 PMMMと相互作用する分子の同定

PMMMまたは生物学的に活性なその断片を、 ^{125}I ボルトンハンター試薬で標識する (Bolton A.E.及びW.M. Hunter (1973) Biochem. J. 133:529-539)。マルチウェルプレートに予め配列しておいた候補の分子を、標識したPMMMと共にインキュベートし、洗浄して、標識したPMMM複合体を有する全てのウェルをアッセイする。様々なPMMM濃度で得られたデータを用いて、候補分子と結合したPMMMの数量及び親和性、会合についての値を計算する。

【0379】

別法では、PMMMと相互作用する分子を、Fields, S.及びO. Song(1989, Nature 340:245-246)に記載の酵母2-ハイブリッドシステムやMATCHMAKERシステム(Clontech)などの2-ハイブリッドシステムに基づいた市販のキットを用いて分析する。

【0380】

PMMMはまた、ハイスループット型の酵母2ハイブリッドシステムを使用するPATHCALLINGプロセス(CuraGen Corp., New Haven CT)に用いて、遺伝子の2大ライブラリによってコードされるタンパク質間の全ての相互作用を判定できる(Nandabalan, K. 他(2000) 米国特許第6,057,101号)。

【0381】

18 PMMM活性の実証

PMMM活性は一般的免疫プロット方法を用いて、または種々の特異的活性のアッセイを用いて実証でき、またそれらのいくつかを以下に概説する。一般的アプローチとして、PMMMコード配列を含むベクターで形質転換された細胞系または組織系は免疫プロットを行うことによってPMMM活性をアッセイできる。形質転換された細胞はβ-メルカプトエタノールの存在下、SDS中で変性され、核酸はエタノール沈澱によって除去され、タンパク質はアセトン沈澱によって精製される。ペレットはpH 7.5の20 mMトリス緩衝液で再懸濁し、PMMMに特異的な抗体で前もってコーティングされたプロテインGセファロースと共にインキュベートする。洗浄後、セファロースのビーズを電気泳動サンプル緩衝液中で煮沸し、溶出されたタンパク質をSDS-PAGEにかける。SDS-PAGEは免疫プロットの膜に移し、一次抗体としてPMMMに特異的な抗体を用い、二次抗体として一次抗体に特異的な ^{125}I で標識されたIgGを用いてプロット上のバンドを視覚化し定量することによって、PMMM活性を測定する。

【0382】

PMMMキナーゼ活性は、 ^{32}P -標識された ^{32}P -ATPの存在下で、PMMMによりタンパク質基質のリン酸化を定量化することによって測定される。PMMMをタンパク質基質、 ^{32}P -ATP、及び好適なキナーゼバッファと共にインキュベートする。基質に組み込まれた ^{32}P は、電気泳動法で遊離 ^{32}P -ATPより分離され、組み込まれた ^{32}P をラジオアイソトープカウンターでカウントする。組み込まれた ^{32}P の量は、PMMMの活性に比例する。リン酸化した特異的なアミノ酸残基の判定を、加水分解したタンパク質のホスホアミノ酸解析で行う。

【0383】

一態様では、PMMM活性はガラクトシルトランスフェラーゼ活性の試験により実証される。これは、UDP-ガラクトースからGlcNAc末端オリゴ糖鎖への放射標識したガラクトースの転移を測定して判定できる(Kolbinger, F.他(1998) J. Biol. Chem. 273:58-65)。サンプルは、14 μl のアッセイ用ストック溶液(180 mMのカコジル酸ナトリウム、pH 6.5、1 mg/mlのウシ血清アルブミン、0.26 mMのUDP-ガラクトース、2 μl のUDP-[^3H]ガラクトース)、1 μl の MnCl_2 (500 mM)および2.5 μl のGlcNAc 0-(CH_2)₈-CO₂Me (ジメチルスルホキシド中に37 mg/ml)で37 $^\circ\text{C}$ にて60分間インキュベートする。この反応は1mlの水を加えて停止させ、C18 Sep-Pak カートリッジ(Waters)に搭載し、カラムを2回5mlの水で洗浄して未反応のUDP-[^3H]ガラクトースを除去する。[^3H]ガラクトシル化GlcNAc 0-(CH_2)₈-CO₂Meは水で洗浄する間はカラムに結合されたままであり、5mlのメタノールで溶出す

10

20

30

40

50

る。溶出された物質の放射活性は液体シンチレーション計数で測定され、これは開始サンプルのガラクトシル基転移酵素活性に比例する。

【0384】

PMMMのホスファターゼ活性は、P-ニトロフェニルリン酸(PNPP)の加水分解によって測定する。PMMMを0.1%のメルカプトエタノールの存在下、37のHEPESバッファ(pH 7.5)中でPNPPと共に60分間インキュベートする。この反応は10Nの水酸化ナトリウムを6 ml加えて停止し、PNPP加水分解の結果の、410nmでの吸光度の増加を分光光度計で測定する。このアッセイでは、光吸収の増加がPMMMの活性に比例する(Diamond, R.H. 他(1994) Mol. Cell. Biol. 14:3752-3762)。

【0385】

別法では、PMMMのホスファターゼ活性は、リン酸化したタンパク質基質から除去されたリン酸の量を測定して決定する。反応は、60mM Tris(pH7.6)、1mM EDTA、1mM EGTA、0.1%の2-メルカプトエタノール、および10 μ M 基質(セリン/トレオニンまたはチロシン残基で好適に³²P標識された基質)を含む最終容量30 μ lに、2nM或いは4nMの酵素を加えて行なう。反応は基質で開始し、30で10~15分間インキュベートする。0.6 M HCl、90mM Na₄P₂O₇、および2mM NaH₂PO₄中の4%(w/v)活性化木炭450 μ lで停止させ、次に12,000 \times gで5分間遠心分離する。酸可溶性³²Piを液体シンチレーションカウンターで定量する(Sinclair, C. 他(1999) J. Biol. Chem. 274:23666-23672)。

【0386】

PMMMプロテアーゼ活性は、種々の色素原分子で抱合した適切な合成ペプチド基質の加水分解によって測定される。この加水分解の程度は遊離された発色団の分光光度的(または蛍光定量的)吸光度によって定量される(Beynon, R.J. および J.S. Bond (1994) Proteolytic Enzymes: A Practical Approach, Oxford University Press, New York, NY, 25-55ページ)。ペプチドの基質はプロテアーゼ活性のカテゴリにしたがって設計される。このカテゴリには、エンドペプチダーゼ(セリン、システイン、アスパラギン酸プロテアーゼ、メタロプロテアーゼ)、アミノペプチダーゼ(ロイシンアミノペプチダーゼ)、カルボキシペプチダーゼ(カルボキシペプチダーゼAおよびB、プロコラーゲンC-プロテイナーゼ)が含まれる。一般に使われる色素原は、2-ナフチルアミン、4-ニトロアニリンおよびフリルアクリル酸である。アッセイは室温で行い、適切なバッファに一定量の酵素および適切な基質を入れる。反応は光学的キュベットで行い、ペプチド基質の加水分解時に遊離される色素原の吸光度の増加または減少を測定する。このアッセイでは、吸光度の変化は酵素活性に比例する。

【0387】

あるいは、PMMMプロテアーゼ活性のアッセイは、蛍光共鳴エネルギー伝達(FRET)を利用しており、このエネルギー伝達は適切なスペクトルの重複を持つ一つの供与体と一つの受容体の蛍光色素が極めて近傍にある場合に発生する。PMMMに特異的な切断部位を含む可動性ペプチドリンカーは、グリーン蛍光タンパク質の赤にシフトした変異体(RSGFP4)と青い変異体(BFP5)の間で融合する。この融合タンパク質は、エネルギー移動がBFP5からRSGFP4へと起こっていることを示唆するスペクトル特性を有する。この融合タンパク質をPMMMとインキュベートすると、その基質が切断され、2つの蛍光タンパク質が分離される。これは著しいエネルギー伝達の減少を伴い、これはPMMMを加える前後の放射スペクトルを比較することによって測定される(Mitra, R.D. 他(1996) Gene 173:13-17)。このアッセイは生細胞内でも行われ得る。この場合、蛍光基質タンパク質は細胞中で恒常的に発現され、またPRTSが誘導ベクターで誘導され、よってPRTSの存在及び不在の両条件下でFRETがモニターされうる(Sagot, I. 他(1999) FEBS Letters 447:53-57)。

【0388】

ユビキチン加水分解酵素活性の或るアッセイは、ユビキチン前駆体の加水分解を測定する。アッセイは室温で行い、適切なバッファに一定量のPMMMと適切な基質を入れる。化学的に合成されたヒトユビキチン-バリンは基質として用いられ得る。基質からのC末端バリン残基の切断が、毛細管電気泳動でモニターされる(Franklin, K.他(1997) Anal. B

10

20

30

40

50

iochem. 247:305-309)。

【0389】

アルファ2-HS糖タンパク質(AHSG)のPMMMプロテアーゼ阻害物質の活性は、デキサメサゾンで処理したラット骨髄細胞培養(dex-RBMC)における骨形成活性の減少として測定される。アッセイは15%のウシ胎児血清、アスコルビン酸(50 mg/ml)、抗生物質(100 mg/mlのペニシリンG、50 mg/mlのゲンタマイシン、0.3 mg/mlのファンギゾン)、10 mMのB-グリセロリン酸、デキサメサゾン(10^{-8} M)を追加した最小必須培養液と種々の濃度のPMMMを含む96穴の培養プレートで12~14日間で行う。培地内のミネラル化した組織形成を96穴プレートリーダーを用いて525 nmで吸光度を測定して定量する(Binkert, C. 他、(1999) J. Biol. Chem. 274:28514-28520)。

10

【0390】

インターアルファトリプシンインヒビター(ITI)に対するPMMMプロテアーゼ阻害物質の活性は、トリプシン活性の分光光度率の連続測定によって測定され得る。このアッセイは、63 mMのリン酸ナトリウム、0.23 mM Na-ベンゾイル-L-アルギニンエチルエステル、0.06 mMの塩酸、100 ユニットのトリプシン、および種々の濃度のPMMMを含むpH 7.6の試験バッファ中で石英キュベットで室温にて行う。倒置によって混合した直後に、 A_{253nm} の増加を約5分間記録し、酵素活性を算出する(Bergmeyer, H.U. 他(1974) Meth. Enzym. Anal. 1:515-516)。

【0391】

ペプチジルプロリルシス/トランスイソメラーゼ活性のようなPMMMイソメラーゼの活性は、Rahfeld, J.U., 他(1994) (FEBS Lett. 352: 180-184)によって記載されている酵素アッセイによって測定できる。このアッセイは、キモトリプシン(0.5 mg/ml)と種々の濃度のPMMMを含む35 mMのHEPESバッファー(pH 7.8)で10 に行う。これらのアッセイ条件下で、基質であるSuc-Ala-Xaa-Pro-Phe-4-NAはプロリル結合に関して平衡になり、トランス構造が80~95%であり、シス構造が5~20%である。ジメチルスルフォキシド(10 mg/ml)中に溶解したアリコット(2 ml)の基質を上記の反応混合液に加える。シス異性体の基質のみがキモトリプシンによって切断される基質である。したがって、基質がPMMMによって異性化されると、生成物はキモトリプシンによって切断されて4-ニトロアニリドが生成され、これは390 nmでのその吸光度によって検出される。4-ニトロアニリドは時間依存性であり、またPMMM濃度依存性であると思われる。

20

30

【0392】

PMMMのガラクトシル基転移酵素活性は、UDP-ガラクトースからGlcNAc末端オリゴ糖鎖への放射標識したガラクトースの転移を測定して判定できる(Kolbinger, F.他(1998) J. Biol. Chem. 273:58-65)。サンプルは、14 μ lのアッセイ用ストック溶液(180 mMのカコジル酸ナトリウム、pH 6.5、1mg/mlのウシ血清アルブミン、0.26 mMのUDP-ガラクトース、2 μ lのUDP-[3 H]ガラクトース)、1 μ lのMnCl₂(500 mM)および2.5 μ lのGlcNAc 0-(CH₂)₈-CO₂Me(ジメチルスルホキシド中に37 mg/ml)で37 にて60分間インキュベートする。この反応は1mlの水を加えて停止させ、C18 Sep-Pak カートリッジ(Waters)に搭載し、カラムを2回5mlの水で洗浄して未反応のUDP-[3 H]ガラクトースを除去する。 [3 H]ガラクトシル化GlcNAc 0-(CH₂)₈-CO₂Meは水で洗浄する間はカラムに結合されたままであり、5mlのメタノールで溶出する。溶出された物質の放射活性は液体シンチレーション計数で測定され、これは開始サンプルのガラクトシル基転移酵素活性に比例する。

40

【0393】

熱または毒素によるPMMM誘導は、初代培養のヒト線維芽細胞またはCCL-13、HEK293またはHEP G2(ATCC)のようなヒト細胞株を用いて実証され得る。PMMMの発現を加熱誘導するために、アリコットの細胞を42 度で15、30または60分間インキュベートする。対照アリコートを37 度で同じ時間長、インキュベートする。PMMMの発現を毒素によって誘導するには、アリコットの細胞を100 μ Mの亜硫酸または20mMのアゼチジン-2-カルボン酸で0、3、6または12時間処理する。熱、亜硫酸またはアミノ酸類似体に晒した後、処理した細胞のサンプルを収集し、細胞溶解物を調製しウエスタンブロットで分析する。細胞

50

は1% Nonidet P-40、0.15 M NaCl、50 mMのTris-HCl、5 mMのEDTA、2 mMのN-エチルマレイミド、2 mMのフッ化フェニルメチルスルホニル、1 mg/mlのロイペプチンおよび1 mg/mlのペプスタチンを含む溶解バッファ内で溶解する。20マイクログラムの細胞溶解液を8% SDS-PAGEゲル上で分離し、膜に移す。5%の非脂肪性粉ミルク/リン酸緩衝食塩水で1時間ブロックした後、2%の非脂肪性粉ミルク/リン酸緩衝食塩水中に好適な希釈度の抗PMMM血清と共に、膜を4 で一晩インキュベートするか、または室温にて2~4時間インキュベートする。次にこの膜を洗浄し、2%粉乳/リン酸緩衝食塩水で1:1000希釈の西洋わさびペルオキシダーゼ結合ヤギ抗ウサギIgGを用いてインキュベートする。リン酸緩衝食塩水に溶かした0.1%Tween 20で洗浄した後、化学発光を用いてPMMM タンパク質を検出し、対照と比較する。

10

【0394】

PMMMリシルヒドキシラーゼ活性は、 $[^{14}\text{C}]$ リシンからヒドロキシ $[^{14}\text{C}]$ リシンの産生を測定して決定する。放射標識されたプロトコラーゲンを、アスコルビン酸、硫化鉄、ジチオスレイトール、ウシ血清アルブミン、およびカタラーゼを含むバッファ中のPMMMとインキュベートする。30分間のインキュベート後、反応を、アセトンを加えて停止させ、遠心する。沈降した物質を乾燥し、ヒドロキシ $[^{14}\text{C}]$ リジンを $[^{14}\text{C}]$ ホルムアルデヒドへ転換するため過ヨウ素酸で酸化し、次にトルエン中へ抽出する。トルエン中に抽出された ^{14}C の量が、シンチレーション計数によって定量化され、それはサンプル中のPMMMの活性に比例する (Kivirikko, K., およびR. Myllyla (1982) *Methods Enzymol.* 82:245-304)。

【0395】

20

19 PMMMの基質の同定

ファージ表示ライブラリを用いてPMMMに対する最適な基質配列を同定できる。後にリンカーと既知の抗体エピトープが付いたランダム六量体を、繊維状ファージライブラリ内の遺伝子IIIのN末端伸長としてクローンする。遺伝子IIIはコートタンパク質をコードし、エピトープは各々のファージ粒子の表面に表示されることとなる。このライブラリを六量体がPMMM切断部位をコードすると、エピトープが除去されるようなタンパク分解条件のもとでPMMM とインキュベートする。エピトープを認識する抗体を、固定化したタンパク質Aとともに加える。なおもエピトープを持つ未切断ファージは遠心分離で除去する。次に、上澄み中のファージを増幅し、更に数回スクリーニングする。その後、個々のファージクローンを単離し、配列決定する。これらペプチド基質の反応速度論は実施例18のアッセイを用いて試験でき、最適な切断配列が得られる (Ke, S.H. 他 (1997) *J. Biol. Chem.* 272:16603-16609)。

30

【0396】

in vivo のPMMM基質のスクリーニングをするには、この方法を拡大してファージ粒子 (T7SELECT103ファージディスプレイベクター、Novagen, Madison, WI) または酵母細胞 (pYD1酵母ディスプレイベクターキット、Invitrogen, Carlsbad, CA) の表面に提示されたcDNA発現ライブラリをスクリーニングすることができる。この場合、全体のcDNAが、遺伝子IIIと適切なエピトープの間に融合される。

【0397】

20 PMMM阻害剤の同定

40

実施例18のアッセイで説明したように、試験する化合物を、好適なバッファおよび基質と共に、様々な濃度でマルチウェルプレートのウェルに分注する。PMMM 活性はそれぞれのウェルについて測定し、PMMM 活性を阻害するそれぞれの化合物の能力および容量反応動態 (dose-response kinetics) を決定することができる。PMMM 活性を促進する分子の同定にも、このアッセイを用いることができる。

【0398】

別の実施例において、ファージ表示ライブラリを用いてペプチドPMMMインヒビターのスクリーニングをすることができる。インヒビターの候補はプロテアーゼに強く結合しているペプチドの内に見つられる。この場合、マルチウェルプレートのウェルをPMMMで被覆し、ランダムペプチドファージディスプレイライブラリ、またはサイクリックペプチドラ

50

イブラリでインキュベートする(Koivunen, E. 他(1999) Nature Biotech 17:768-774)。非結合ファージを洗い流し、選択したファージを増幅し、更に数回再スクリーニングする。候補は実施例18に記載のアッセイを用いてPMMM抑制活性をテストする。

【0399】

当業者には、本発明の要旨および精神から逸脱しない範囲での、本発明の記載した組成物、方法およびシステムの種々の修正および変更の手段は自明であろう。本発明が新規であり、有用なタンパク質およびそのコードするポリヌクレオチドを提供することは高く評価されるであろう。また、これらは薬物発見および疾患および症状の検出、診断および治療にこれらの組成物を使用する方法に用いられ得る。本発明について説明するにあたり幾つかの実施例に関連して説明を行ったが、本発明の請求の範囲が、そのような特定の実施例に不当に制限されるべきではないことを理解されたい。また、本発明をこのような実施態様の説明によって、開示した形態だけに網羅されるか、あるいは、制限されるものと見なされるべきでもない。さらに、一実施態様の要素は他の実施態様の一つ以上の要素と容易に組み合わせられ得る。このような組み合わせによって本発明の範囲内で多数の実施態様が形成され得る。本発明の範囲は下記の請求項およびそれに相当するものによって定義することを意図するものである。

10

【0400】

(表の簡単な説明)

表1は、本発明の完全長ポリヌクレオチドおよびポリペプチド実施態様の命名の概略である。

20

【0401】

表2は、本発明のポリペプチド実施例のGenBank識別番号と、最も近いGenBank相同体の注釈(annotation)と、PROTEOMEデータベース識別番号と、PROTEOMEデータベース相同体群の注釈とを示す。各ポリペプチドとそのGenBank相同体が一致する確率スコアも併せて示す。

【0402】

表3は、予測されるモチーフ及びドメインを含む本発明のポリペプチド実施態様の構造的特徴を、ポリペプチドの分析に用いるための方法、アルゴリズム及び検索可能なデータベースと共に示す。

【0403】

表4は、ポリヌクレオチド実施態様をアセンブリするために用いたcDNAやゲノムDNA断片を、ポリヌクレオチドの選択した断片と共に示す。

30

【0404】

表5は、ポリヌクレオチド実施態様の代表的なcDNAライブラリを示す。

【0405】

表6は、表5に示したcDNAライブラリの作製に用いた組織及びベクターを説明する付表である。

【0406】

表7は、ポリヌクレオチドとポリペプチドの分析に用いたツール、プログラム、アルゴリズムを、適用可能な説明、引用文献及び閾値パラメータと共に示す。

40

【0407】

表8は、本発明のポリヌクレオチド配列に見られる一塩基多型を、種々のヒト集団での対立遺伝子(アレル)頻度と共に示す。

【0408】

【表 1 - 1】

表 1 - 1

Incyte プロジェクト ID	ポリペプチド SEQ ID NO:	Incyte ポリペプチド ID	ポリヌクレオチド SEQ ID NO:	Incyte ポリヌクレオチド ID	Incyte 完全長
8268274	1	8268274CD1	32	8268274CB1	90020436CA2
7500515	2	7500515CD1	33	7500515CB1	
2256826	3	2256826CD1	34	2256826CB1	
7686186	4	7686186CD1	35	7686186CB1	
72617436	5	72617436CD1	36	72617436CB1	
7501945	6	7501945CD1	37	7501945CB1	
7500264	7	7500264CD1	38	7500264CB1	
7499935	8	7499935CD1	39	7499935CB1	
7982285	9	7982285CD1	40	7982285CB1	4872051CA2
7758505	10	7758505CD1	41	7758505CB1	
6885756	11	6885756CD1	42	6885756CB1	
7500748	12	7500748CD1	43	7500748CB1	
7500749	13	7500749CD1	44	7500749CB1	
7503401	14	7503401CD1	45	7503401CB1	2774614CA2
7503485	15	7503485CD1	46	7503485CB1	5500371CA2
7504076	16	7504076CD1	47	7504076CB1	90173111CA2, 90173203CA2, 90173227CA2
7500926	17	7500926CD1	48	7500926CB1	90205586CA2
7503216	18	7503216CD1	49	7503216CB1	6440464CA2
7503233	19	7503233CD1	50	7503233CB1	
7726576	20	7726576CD1	51	7726576CB1	
7503507	21	7503507CD1	52	7503507CB1	
7503506	22	7503506CD1	53	7503506CB1	90069502CA2
7503509	23	7503509CD1	54	7503509CB1	90208262CA2
7505800	24	7505800CD1	55	7505800CB1	3475431CA2

10

20

30

【表 1 - 2】

表 1 - 2

Incyte プロジェクト ID	ポリペプチド SEQ ID NO:	Incyte ポリペプチド ID	ポリヌクレオチド SEQ ID NO:	Incyte ポリヌクレオチド ID	Incyte 完全長
7503141	25	7503141CD1	56	7503141CB1	
7500362	26	7500362CD1	57	7500362CB1	
7503328	27	7503328CD1	58	7503328CB1	
7510464	28	7510464CD1	59	7510464CB1	
7510394	29	7510394CD1	60	7510394CB1	
7500745	30	7500745CD1	61	7500745CB1	
7500929	31	7500929CD1	62	7500929CB1	

10

20

30

40

【 0 4 1 0 】

表 2 - 1

ポリペプチド SEQ ID NO:	Incyte ポリ ペプチド ID	GenBank ID NO: または PROTEOME ID NO:	確率スコア	注釈
1	8268274CD1	g10441427	4.10E-126	[シヨウジウバエ] Paired のパートナー Raj, L. 他. (2000) Targeted localized degradation of Paired protein in Drosophila development. Curr. Biol. 10:1265-1272
2	7500515CD1	g4096840	0.0	[ヒト] インター-α トリプシンインヒビターファミリー-重鎖関連タンパク質 Saguchi K. 他. (1996) Isolation and characterization of the human inter-alpha-trypsin inhibitor family heavy chain-related protein (IHRP) gene (ITIH1). J. Biochem. 119:898-905
3	2256826CD1	g5919219	1.20E-188	[ヒト] ロインリッチリピート含有 F ボックスタンパク質 FBL3 Ilyin, G. P. 他. (2000) cDNA cloning and expression analysis of new members of the mammalian F-box protein family. Genomics 67:40-47
4	7686186CD1	g11994498	5.70E-72	[シロイヌナズナ (Arabidopsis thaliana)] DegP プロテアーゼ前駆体 Kaneko, T. 他. (2000) Structural analysis of Arabidopsis thaliana chromosome 3. II. Sequence features of the 4,251,695 bp regions covered by 90 P1, TAC and BAC clones. DNA Res. 7:217-221
5	72617436CD1	g2190297	1.10E-45	[メダカ] choriolysin H Yasumasu, S. 他. (1996) Eur. J. Biochem. 237:752-758 Different exon-intron organizations of the genes for two astacin-like proteases, high choriolytic enzyme (choriolyisin H) and low choriolytic enzyme (choriolyisin L), the constituents of the fish hatching enzyme.
6	7501945CD1	g213504	5.40E-37	[メダカ] プロテアーゼ Yasumasu, S. 他. (1992) Dev. Biol. 153:250-258 Isolation of cDNAs for LCE and HCE, two constituent proteases of the hatching enzyme of Oryzias Latipes, and concurrent expression of their mRNAs during development

表 2 - 2

ポリペプチド SEQ ID NO:	Incyte ポリ ペプチド ID	GenBank ID NO: または PROTEOME ID NO:	確率スコア	注釈
7	7500264CD1	g2924601	7.60E-12	[ヒト] 肝細胞成長因子活性化剤抑制剤 Shimomura, T. 他. (1997) J. Biol. Chem. 272:6370-6376 Hepatocyte growth factor activator inhibitor, a novel Kunitz-type serine protease inhibitor.
8	7499935CD1	g189842	7.00E-247	[ヒト] プロリダーゼ Endo, F. 他. (1989) J. Biol. Chem. 264:4476-4481 Primary structure and gene localization of human prolidase.
9	7982285CD1	g6567172	9.70E-102	[マウス] mDj10 Ohtsuka K, および Hata M. (2000) Cell Stress Chaperones 5:98-112 Mammalian HSP40/DNAJ homologs: cloning of novel cDNAs and a proposal for their classification and nomenclature.
10	7758505CD1	g1167860	1.10E-51	[Spodoptera frugiperda] エンドプロテアーゼ FURIN
11	6885756CD1	g14994718	3.20E-103	[マウス] (AF393638) 脱ユビキチン化酵素 2A Baek, K.-H. 他. (2001) Blood 98: 636-42
12	7500748CD1	g14456615	5.40E-280	[ヒト] ホスファチジルイノシトールグリカンクラス T Ohishi, K. 他. (2001) PIG-S and PIG-T, essential for GPI-anchor attachment to proteins, form a complex with GAA1 and GPI8. EMBO J. 20:4088-4098
13	7500749CD1	g14456615	4.70E-261	[ヒト] ホスファチジルイノシトールグリカンクラス T Ohishi, K. 他. (前出)
14	7503401CD1	g292031	1.30E-117	[ヒト] アルネシル-タンパク質トランスフェラーゼ α -サブユニット Omer, C.A., 他 I. (1993) Biochemistry 32:5167-76 Characterization of recombinant human farnesyl-protein transferase: Cloning, expression, farnesyl diphosphate binding and functional homology with yeast prenyl-protein transferases.

表 2 - 3

ポリペプチド SEQ ID NO:	Incyte ポリ ペプチド ID	GenBank ID NO: または PROTEOME ID NO:	確率スコア	注釈
	7503401CD1	335360 FNTA	1.10E-118	[ヒト]トランスフェラーゼ[細胞質] CAAX アルネシルトランスフェラーゼ (FPTase)とガラニルガラニルトランスフェラーゼタイプ-1 (GGTase-1)の α サブユニットであり、アルネシル基とガラニルガラニル基をタンパク質に転移する。
15	7503485CD1	g11036950 338766 UBE2A	3.30E-60 2.90E-61	[ヒト]ユビキチン抱合酵素 HRGB [ヒト]Uリガーゼ、タンパク質抱合因子[細胞タンパク質のユビキチン結合を触媒し、それらを分解のためにマークする、また DNA 修復にも関与するユビキチン抱合酵素ファミリーのメンバーである出芽酵母 (<i>S. cerevisiae</i>) Rad6p のヒト相合体
16	7504076CD1	g7677403	6.60E-105	[ヒト]F-ボックスタンパク質 FBG2 Ilyin, G.P., 他.(2000) Genomics 67: 40-47 cDNA cloning and expression analysis of new members of the mammalian F-box protein family
17	7500926CD1	598228 FBXO6 g3868871	5.80E-106 2.60E-16	[ヒト]Uリガーゼ、タンパク質抱合因子[F-ボックス含有タンパク質のファミリーのメンバーであり、タンパク質分解に関与する SCF ユビキチンリガーゼの推定のサブユニット。 [嫌気性有芽胞陽性桿菌 (<i>Clostridium histolyticum</i>)] Orf2u Matsushita, O., 他. (1999) Gene duplication and multiplicity of collagenases in <i>Clostridium histolyticum</i> . J. Bacteriol. 181:923-933
18	7503216CD1	377422 pi053 g8489879	6.90E-16 0.0	[分裂酵母 (<i>Schizosaccharomyces pombe</i>)] DUF28 ドメインを含む保存されたタンパク質 [ヒト] (AF272981) サイトソル内アミノペプチダーゼ P Cottrell, G.S., 他. (2000) Cloning, expression, and characterization of human cytosolic aminopeptidase P: a single manganese(II)-dependent enzyme. Biochemistry 39:15121-15128
		739810 XPNPE P1	0.0	[ヒト] X-プロリルアミノペプチダーゼ (アミノペプチダーゼ P)1, 可溶性

【表 2 - 4】

表 2 - 4

ポリペプチド SEQ ID NO:	Incyte ペプチド ID	GenBank ID NO:または PROTEOME ID NO:	確率スコア	注釈
18	567960 XPNPPE PL	344930 XPNPPE P2	0.0 9.4E-123	[ヒト][ヒドロラーゼ;プロテアーゼ(プロテアソーム以外)]X-プロリルアミノペプチ ダーゼ様(アミノペプチダーゼP-様)、遍在的に発現する推定的X-プロリルア ミノペプチダーゼ、 [ヒト][ヒドロラーゼ;プロテアーゼ(プロテアソーム以外)]X-プロリルアミノペプチ ダーゼ(アミノペプチダーゼP)2(膜結合)、N末端Xaa-Pro配列を有するペ プチドからN末端アミノ酸の除去を触媒するメタロペプチダーゼ;apstatinに よって阻害される;早発性卵巣不全症と関連があり得る
19	7503233CD1 g29664	661158 CAPN1	0.0 0.0	[ヒト]GAMP,大サブユニット(aa 1-714) Aoki, K., 他. (1986) Complete amino acid sequence of the large subunit of the low-Ca2+-requiring form of human Ca2+-activated neutral protease (muCANP) deduced from its cDNA sequence. FEBS Lett. 205:313-317 [ヒト][ヒドロラーゼ;プロテアーゼ(プロテアソーム以外)][原形質膜]カルパイン 1, mu-カルパインの触媒サブユニット; <u>in vitro</u> でカルシウムのマイクロモル濃度 を要するカルシウム依存性システイン(チオール)プロテアーゼ
		334452 CAPN2	1.6E-227	[ヒト][ヒドロラーゼ;プロテアーゼ(プロテアソーム以外)]カルパイン2、細胞周 期、アポトーシス、細胞分化を制御するシステインタイプロテアーゼ m-カル パインの大サブユニット、進行性筋肉ジストロフィーと筋萎縮性側索硬化症 の患者の筋肉で上方制御される

表 2 - 5

ポリペプチド SEQ ID NO:	Incyte ポリ ペプチド ID	GenBank ID NO: または PROTEOME ID NO:	確率スコア	注釈
20	7726576CD1	g4079809	2.8E-55	[ヒト] HERC2 Ji, Y., 他.(1999) The ancestral gene for transcribed, low-copy repeats in the Prader-Willi/Angelman region encodes a large protein implicated in protein trafficking, which is deficient in mice with neuromuscular and spermiogenic abnormalities. Hum. Mol. Genet. 8:533-542 [ヒト] ヒト HERC1 の領域と中程度の類似性を有し、ARF1 と相互作用する、また Hsp70 とクラスリン重鎖(CLIC)に結合するグアニンヌクレオチド交換因子である。 [ヒト][グアニンヌクレオチド交換因子] マウス Mm.20929 の相同体、細胞内タンパク質輸送に関与するグアニンヌクレオチド交換因子、; プラダー-ウィー症候群およびアンジェルマン症候群において欠失ブレイクポイントと関連する、対応する遺伝子の重複した複製と短縮された複製
		691012 FLJ21156	3.4E-110	
20		345082 HERC2	2.4E-56	
	7726576CD1	341506 HERC1	4.4E-44	[ヒト][グアニンヌクレオチド交換因子][ゴルジ; 細胞質] HECT (homologous to E6-AP (UBE3A) carboxy terminus; E6-AP (UBE3A) カルボキシ末端に相同的ドメインおよび RCC1 (CHC1) 様ドメイン(RLD) 1、Rab 関連タンパク質と ARF1 のグアニンヌクレオチド交換因子として機能、膜輸送プロセスに関与し得る。
21	7503507CD1	g2924601	3.40E-30	[ヒト] 肝細胞成長因子活性化抑制剤 Shimomura, T. 他.(1997) Hepatocyte growth factor activator inhibitor, a novel Kunitz-type serine protease inhibitor. J. Biol. Chem. 272 (10), 6370-6376

10

20

30

40

表 2 - 6

ポリペプチド SEQ ID NO:	Incyte ポリ ペプチド ID	GenBank ID NO: または PROTEOME ID NO:	確率スコア	注釈
22	7503506CD1	341496 SPINT1	5.9E-31	[ヒト]抑制因子またはリプレッサー[細胞外(細胞壁を除く); 不特定の膜; 原形質膜] セリンプロテアーゼ抑制因子(Kunitz 型 1)、肝細胞成長因子活性化剤を抑制し、また膜結合型および分泌型の両者で見出される Kunitz 型セリンプロテアーゼ抑制因子 Shimomura, T. 他. J. Biol. Chem. 272:6370-6 (1997) Kataoka, H. 他. Cancer Res. 60:6148-59 (2000)
588049 Spint1	7.7E-27			[マウス][抑制因子またはリプレッサー; 小分子結合タンパク質][不特定の膜; 細胞外(細胞壁を除く)] セリンプロテアーゼ抑制因子(Kunitz 型 1)、肝細胞成長因子活性化剤を阻害する Kunitz 型セリンプロテアーゼ抑制因子; 1つの膜貫通ドメインを含む。
23	7503509CD1	g13278723	2.40E-14	[ヒト]セリーネプロテアーゼ阻害因子、Kunitz 型 1
23	341496 SPINT1	2.10E-15		[ヒト][抑制因子またはリプレッサー][細胞外(細胞壁を除く); 原形質膜] セリンプロテアーゼ抑制因子(Kunitz 型 1)、肝細胞成長因子活性化剤を抑制し、また膜結合型および分泌型の両者で見出される Kunitz 型セリンプロテアーゼ抑制因子
588049 Spint1	4.60E-13			[マウス][抑制因子またはリプレッサー; 小分子結合タンパク質][細胞外(細胞壁を除く)] セリンプロテアーゼ抑制因子(Kunitz 型 1)、肝細胞成長因子活性化剤を阻害する Kunitz 型セリンプロテアーゼ抑制因子; 1つの膜貫通ドメインを含む。
24	7505800CD1	g292031	2.30E-134	[ヒト] アルネシル-タンパク質トランスフェラーゼ α -サブユニット

10

20

30

40

【表 2 - 7】

表 2 - 7

ポリペプチド SEQ ID NO:	Incyte ポリ ペプチド ID	GenBank ID NO;または PROTEOME ID NO:	確率スコア	注釈
		335360 FNTA	2.00E-135	[ヒト][トランスフェラーゼ][細胞質]ファルネシルトランスフェラーゼ α -サブユニット、ファルネシル基とガラニルゲラニル基をタンパク質に転移し、TGF β とアクテインシグナル伝達に関与すると思われる。 Zhang, F. L. 他.(1994) cDNA cloning and expression of rat and human protein geranylgeranyltransferase type-1. J. Biol. Chem. 269:3175-3180
		720247 lqbq_A	2.60E-128	[タンパク質データベース] Fpt α -サブユニット
		328782 Fnta	1.10E-127	[ラット][トランスフェラーゼ]ファルネシルトランスフェラーゼ α -サブユニット、ファルネシル基をタンパク質に転移する。 Chen, W. J. 他. (1991) Cloning and expression of a cDNA encoding the alpha subunit of rat p21ras protein farnesyltransferase. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 88:11368-11372
		725889 ld8d_A	1.10E-127	[タンパク質データベース]ファルネシルトランスフェラーゼ(α -サブユニット)
		582901 Fnta	3.80E-127	[マウス][トランスフェラーゼ]ヒトの FNTA に強い類似性を有するタンパク質、GAAX ファルネシルトランスフェラーゼ(FPTase)とガラニルゲラニルトランスフェラーゼタイプ-I (GGTase-I)の α サブユニットであり、ファルネシル基とガラニルゲラニル基をタンパク質に転移する。
25	750314 CD1	g15929143	3.9E-248	[ヒト]ペプチダーゼ D
25	339574 PEPD		1.1E-241	[ヒト][ヒドロラーゼ;プロテアーゼ(プロテアソーム以外)]ペプチダーゼ D (プロリダーゼ)、C 末端のプロリンを有するジペプチドの加水分解を触媒する、コラーゲン合成中プロリンサイクリングで機能する、欠乏はイミノペプチドウリア(iminodipeptiduria)、精神遅滞、膠原組織欠乏症、皮膚損傷を引き起こす。

10

20

30

40

表 2 - 8

ポリペプチド SEQ ID NO:	Incyte ペプチド ID	GenBank ID NO: または PROTEOME ID NO:	確率スコア	注釈
429336	Pep4	2.9E-221	[マウス][ヒドロラーゼ; プロテアーゼ(プロテアソーム以外)] ペプチダーゼ D (プロリダーゼ)、C 末端のプロリンを有するジペプチドの加水分解を触媒する推定的ジペプチダーゼ、コラーゲン代謝で機能し得る、ヒトの PEPD 欠乏は精神遅滞、膠原組織欠乏症(collagenous tissue defects)、皮膚損傷を引き起こす。	
687787	K12C1 1.1	3.3E-118	[線虫(Caenorhabditis elegans)][ヒドロラーゼ、プロテアーゼ(プロテアソーム性ではない)] ペプチダーゼに対する強い類似性を有する領域を持つ小タンパク質	
9721	YFR006 W	2.6E-54	[出芽酵母菌(Saccharomyces cerevisiae)][不明]ヒト X-pro ジペプチダーゼに対して弱い類似性を有するタンパク質	
646084	orf6.81 63	2.9E-53	[驚口瘡カンジダ(Candida albicans)][不明]メタロペプチダーゼファミリーM2 4のメンバー、出芽酵母 Yfr006p に対して高い類似性を有する、ヒト X-プロジペプチダーゼに対して弱い類似性を有するタンパク質である。	
26	7500362CD1	g20271451 0.0	[ヒト] ペプチダーゼ D	
	339574	PEPD 5.0E-250	[ヒト][ヒドロラーゼ; プロテアーゼ(プロテアソーム以外)] ペプチダーゼ D (プロリダーゼ)、C 末端のプロリンを有するジペプチドの加水分解を触媒する、コラーゲン合成中プロリンリサイクリングで機能する、欠乏はイミノペプチドuria (iminodipeptiduria)、精神遅滞、膠原組織欠乏症、皮膚損傷を引き起こす。 Endo, F. 他. J Biol Chem 264, 4476-81 (1989). Tanoue, A. 他. J Biol Chem 265, 11306-11 (1990).	

表 2 - 9

ポリペプチド SEQ ID NO:	Incyte ポリ ペプチド ID	GenBank ID NO: または PROTEOME ID NO:	確率スコア	注釈
26	429336 Pep4	8.9E-231		[マウス][ヒドロラーゼ; プロテアーゼ(プロテアソーム以外)] ペプチダーゼ D (プロリダーゼ)、C 末端のプロリンを有するジペプチドの加水分解を触媒する推定的ジペプチダーゼ、コラーゲン代謝で機能し得る、ヒトの PEPD 欠乏は精神遅滞、膠原組織欠乏症、皮膚損傷を引き起こす。Ishii, T. 他. <i>Biochim Biophys Acta</i> 1308, 15-6 (1996).
27	7503328CD1	g8489879	7.2E-210	[ヒト] サイトソール内アミノペプチダーゼ P Cottrell, G. S. 他. <i>Biochemistry</i> 39, 15121-15128 (2000)
567960 XPNPE PL	XPNPE 3.2E-210			[ヒト][ヒドロラーゼ; プロテアーゼ(プロテアソーム以外)] X-プロリルアミノペプチダーゼ様 (アミノペプチダーゼ P-様) 推定的 X-プロリルアミノペプチダーゼ、遍在的に発現する Vanhoof, G. 他. Isolation and sequence analysis of a human cDNA clone (XPNPEPL) homologous to X-prolyl aminopeptidase (aminopeptidase P). <i>Cytogenet Cell Genet</i> 78, 275-80 (1997).
332548 Rn.257 63	Rn.257 7.5E-202			[ラット][ヒドロラーゼ、プロテアーゼ(プロテアソーム性ではない)][細胞質]X-プロリルアミノペプチダーゼ(アミノペプチダーゼ P)1 (可溶性)、N 末端 Xaa-Pro 配列を有するペプチドから N 末端アミノ酸の除去を触媒する、ブライキニン、サブスタンス P、他の生体活性ペプチドに対する活性がある) Czirjak, G. 他. Cloning and functional expression of the cytoplasmic form of rat aminopeptidase P. <i>Biochim Biophys Acta</i> 1444, 326-36 (1999).

【表 2 - 1 0】

表 2 - 1 0

ポリペプチド SEQ ID NO:	Incyte ポリ ペプチド ID	GenBank ID NO:または PROTEOME ID NO:	確率スコア	注釈	
28	7510464CD1	g13477305	0.0	[ヒト] X-プロリルアミノペプチダーゼ (アミノペプチダーゼ P)1, 可溶性	10
29	7510394CD1	g14456615	3.60E-64	[ヒト] ホスファチジルイノシトールグリカンクラス T Ohishi, K. 他(前出)	20
30	7500745CD1	g14456615	1.30E-55	[ヒト] ホスファチジルイノシトールグリカンクラス T Ohishi, K. 他(前出)	30
					40

【 0 4 2 0】

【表 3 - 1】

表 3 - 1

SEQ ID NO:	Incyte ポリペプチド ID	アミノ酸残基数	潜在的リン酸化部位	潜在的グリコシル化部位	シグネチャ配列、ドメインおよびモチーフ	分析方法及びデータベース
1	8268274CD1	404	S77 S118 S178 S196 S219 S254 S278 S282 S287 S401 S402 T208 T344 T359 T370 T395	N96 N102 N123 N155 N234 N265	F-ボックスドメイン: T3-A50	IMMER_PFAM
2	7500515CD1	900	S45 S185 S286 S305 S366 S407 S510 S525 S535 S562 S564 S636 S672 S731 S751 S780 S808 T26 T54 T63 T121 T231 T384 T389 T594 T756 T834 T866 Y146	N81 N207 N517 N577	タンパク質 GRR1 反復 類似 C02F5.7 CAENORHA グルコース 代謝 ロイシノリッ チリポート T13E15.9 PD003743:K128-I266, N102-C238 signal_cleavage.M1-A28	BLAST_PRODOM
					シグナルペプチド: M1-H23, M1-Q24, M1-A28, M1-T27 フオンウイルスプラント因子タイプ A ドメイン: N274-V457 イノシン-ウリジン好適ヌクレオシドヒドローラー BLIMPS_BLOCKS ゼアミリー-シグネチャ BL01247: N353-S397, A531-N542, I298-L312	IMMER HMMER_PFAM

10

20

30

40

【表 3 - 2】

表 3 - 2

SEQ ID NO: 2	Incyte ポリペプチド残基数	アミノ酸	潜在的リン酸化部位	潜在的グリコシル化部位	シグネチャ配列、ドメインおよびモチーフ	分析方法及びデータベース
					インヒビター - 重鎖 PD01101: Q65-K98, N256-D308, G348-N367, R439-V493, W548-L557	BLIMPS_PROD0M
					重鎖 H4 前駆体 インター- α トリプシンインヒビター III ファミリー-鎖関連タンパク質 PD017446: P669-L900	BLAST_PROD0M
					重鎖 前駆体 インター- α トリプシンインヒビター III セリンプロテアーゼ リピート シグナル PD004379: Q24-K273 PD004369: A430-S620	BLAST_PROD0M
					インター- α トリプシン インヒビター 重鎖 H4 前駆体 III ファミリー-鎖関連 血漿 カリクレイン 感受性 糖タンパク質 120 セリン プロテアーゼ PD120343: A621-P668	BLAST_PROD0M
					インター- α トリプシンインヒビター複合体構成成分 II DM03009	BLAST_DOM0
					JX0368 372-855: L372-E738, K607-G826	
					S30350 378-841: L372-E610, P702-Q850	
					P19823 408-896: L372-S613, P645-E851	

10

20

30

40

【 0 4 2 2 】

【表 3 - 3】

表 3 - 3

SEQ ID NO: Incyte ポリペプチド残基数 アミノ酸 潜在的リン酸化部位 潜在的グリコシル化部位 シグネチャ配列、ドメインおよびモチーフ 分析方法及びデータベース

3 ヒトインター α トリプシンインヒター重鎖関連タンパク質 前駆体 DM03690|JX0368|96-278; K96-I279

BLAST_DOMO

ATP/GTP 結合部位モチーフ A(P-loop): A107-S114 MOTIFS

3 2256826CDI.436 S11 S17 S38 S86 N84 N158 S97 S160 S177 S333 T206 N175 N259 signal_cleavage:M1-A54 SPSCAN

F-ボックスドメイン: R99-R146 V23-L70, HMMER_PFAM

タンパク質 GRR1 反復類似 BLAST_PRODDOM

CAENORHA グルコース代謝ロイシシリ

ピート PD003743: S155-M304, L208-

E336, V104-L252, N259-L375, L286-

E385

仮説的 76.5 KD タンパク質 EEED8.10 BLAST_PRODDOM

IN 2 番染色体 PD135828: S17-R344

DNA 修復タンパク質 推定的切除 BLAST_PRODDOM

RAD7 PD135808: V104-L386

P45; サイクリン; CDK2 BLAST_DOMO

DM08625|P34284|62-155: K30-L124

チトクロム C ファミリーヘム結合部 MOTIFS

位シグネチャ: C243-K248

4 7686186CDI.356 S48 S201 T6 T58 T69 T131 T172 T278 Y140 signal_cleavage:M1-A45 SPSCAN

【 0 4 2 3 】

10

20

30

40

【表 3 - 4】

表 3 - 4

SEQ ID NO: ID	アミノ酸残基数	潜在的リン酸化部位	潜在的グリコシル化部位	シグネチャ配列、ドメインおよびモチーフ	分析方法及びデータベース
4				トリプシン: H116-V272 サイトソル内ドメイン:M1-R18 膜貫通ドメイン: F19-P41 非サイトソル内ドメイン:A42-C356 HtrA/DegQ プロテアーゼファミリーシグネチャ PR00834: S238-A255, G332-G344, G115-A127, D136-L156, V178-A202, I216-G233 V8 セリンプロテアーゼファミリーシグネチャ PR00839: V178-L191, I220-L236, D237-I249 α-lytic インドペプチダーゼ セリンプロテアーゼ(S2A)シグネチャ PR00861: H116-A130, L195-S212, I216-A239 プロテアーゼ セリンタンパク質 ペリプラズミックシグナル 先駆体 HTRA ヒドロラーゼ PD001397: S173-T302 プロテアーゼ DEGS 鎖 DM01722 P45129 3-373: R103-A330 DM01722 P09376 1-383: G106-V328 DM01722 P54925 11-395: P102-A346 DM01722 P39099 1-361: G104-V334 signal_cleavage:M1-G33	HMMER_PFAM TMHMMER BLIMPS_PRINTS BLIMPS_PRINTS BLIMPS_PRINTS BLIMPS_PRINTS BLAST_DOMO SPSCAN
5	72617436CD 432 1	S5 S10 S38 S92 S110 S111 S245 S269 S356 S360 S370 S393 T138 T196 T229 T299	N267		

【 0 4 2 4 】

【表 3 - 5】

表 3 - 5

SEQ ID NO: ID	Incyte ポリペプチド	アミノ酸残基数	潜在的リン酸化部位	潜在的グリコシル化部位	シグネチャ配列、ドメインおよびモチーフ	分析方法及びデータベース
5	7501945CDI 248	S5 S10 S38 S92 S110 S111 T138 T196 T229			シグナルペプチド: M1-A34, M1-G24, M1-S30 CUB ドメイン タンパク質プロファイル BL01180: G190-D201 アスタシン(ペプチダーゼファミリー-M12A): N93-P284 アスタシンファミリー-シグネチャ PR00480: P230-S245, L268-G281, I121-Y139, Q175-H193, E194-I211 タンパク質 糖タンパク質 EGF 様ドメイン ヒドロラーゼ メタロプロテアーゼ 亜鉛 前駆体シグナル 酵素前駆体 PD000834: S92-C282 アスタシン DM00570 P31580 5-269; E46-C282 P31579 6-271; L74-C282 P42662 1-183; G101-Y280 P55112 37-308; L87-C282	BLAST_DOMO
6	7501945CDI 248	S5 S10 S38 S92 S110 S111 T138 T196 T229			中性 亜鉛メタロプロテアーゼ、亜鉛結合領域 シグネチャ: I180-L189 signal_cleavage: M1-G33	MOTIFS SPSCAN
					シグナルペプチド: M1-A34, M1-G24, M1-S30 CUB ドメイン タンパク質プロファイル BL01180: G190-D201	HMMER BLIMPS_BLOCKS

【 0 4 2 5 】

【表 3 - 6】

表 3 - 6

SEQ ID NO: Incyte ポリペプチド残基数 アミノ酸 潜在的リン酸化部位 潜在的グリコシル化部位 シグネチャ配列、ドメインおよびモチーフ 分析方法及びデータベース

					アスタシン(ペプチダーゼファミリー M12A):N93-Q246	HMMER_PFAM
					中性 亜鉛メタロペプチダーゼ、亜鉛結合領域 シグネチャ: S161-N207	PROFILES SCAN
					アスタシンファミリー シグネチャ PR00480:E194-I211, P230-P245, I121-Y139, Q175-H193	BLIMPS_PRINTS
					タンパク質 糖タンパク質 EGF 様ドメインヒドロラーゼ メタロプロテアーゼ 亜鉛前駆体 シグナル 酵素前駆体 PD000834:S92-R241	BLAST_PROD OM
					アスタシン DM00570	BLAST_DOMO
					P31580 5-269:E46-R241	
					P31579 6-271:L74-R241	
					P42662 1-183:G101-G240	
					P55112 37-308:L87-G240	
					中性 亜鉛メタロペプチダーゼ、亜鉛結合領域 シグネチャ: I180-L189	MOTIFS
7	7500264CD1	388	S11 S34 S53 S201 S234 S261 S265 S270 S283 S310 S323 T166 T197 T285 T375 Y319	N164 N289	signal_cleavage:M1-A37	SPSCAN
					シグナルペプチド:M1-A37	HMMER

10

20

30

40

【 0 4 2 6 】

【表 3 - 7】

表 3 - 7

SEQ ID NO:	Incyte ポリペプチド残基数	アミノ酸	潜在的リン酸化部位	潜在的グリコシル化部位	シグネチャ配列、ドメインおよびモチーフ	分析方法及びデータベース
8	7499935CDI467	S138 S167 S224 S312 S434 T15 T54 T90 T146 T188 T198 T445 Y128			サイトゾル内ドメイン:R362-L388 膜貫通ドメイン:A339-L361 非サイトゾル内ドメイン:M1-G338 肝細胞成長因子 活性化剤 抑制剤 糖タンパク質 PD120361:G84-V254, S11-P44 ロイシンジッパーパーパターン: L45-L66, L347-L368 メタロペプチダーゼファミリー M24V185-E447	TMHMMER BLAST_PRODUM
8					アミノペプチダーゼ P とプロリンジペプチダーゼタンパク質 BL00491: A319-H330, H366-D378, G422-G435 プロリダーゼヒドロラーゼ XAAPRO ジペプチダーゼ XPRO プロリン イミドジペプチダーゼ (IMIDODIPEPTIDASE) アセチル化 マンガン ペプチダーゼ PD013444: A2-V185 アミノペプチダーゼヒドロラーゼ メチオニン ペプチダーゼタンパク質 コハルト M ジペプチダーゼ XPRO MAP PD000555: V185-T440	BLIMPS_BLOCKS BLAST_PRODUM

10

30

40

【 0 4 2 7 】

【表 3 - 8】

表 3 - 8

SEQ ID NO: ID	アミノ酸残基数	潜在的リン酸化部位	潜在的グリコシル化部位	シグネチャ配列、ドメインおよびモチーフ	分析方法及びデータベース
9	7982285	CD1 379 S42 S67 S160 S234 S319 T171 T197 T286 Y324	N53 N76	アミノペプチダーゼ P とプロリンシペプチダーゼ DM00816 P12955 179-467: I180-I389, I389-P443 P43590 225-509: E182-P383, Y390-T440 P15034 169-423: E182-T440 P44881 163-417: E182-P443 アミノペプチダーゼ P とプロリンシペプチダーゼシグネチャ: H366-D378 DnaJ ドメイン: N108-G172	BLAST_DOMO
				Nt-dnaJ ドメインタンパク質 BL00636: D123-K139, F149-D169 dnaJ ドメインシグネチャおよびプロファイル: R129-N187 DnaJ タンパク質ファミリーシグネチャ PR00625: A119-D138, F149-D169, S55-K74 タンパク質 HLJ1 B0035.14 染色体 IV シヤペロン PD036881: P198-L372 タンパク質 シヤペロン DNAJ 熱ショック DNA 複製リポーター抗原 PD000231: N108-D169	BLIMPS_BLOCKS PROFILESCAN BLIMPS_PRINTS BLAST_PROD0M BLAST_PROD0M

10

20

30

40

【 0 4 2 8】

【表 3 - 9】

表 3 - 9

SEQ ID NO: 9	Incyste ポリペプチド	アミノ酸残基数	潜在的リン酸化部位	潜在的リコシル化部位	シグネチャ配列、ドメインおよびモチーフ	分析方法及びデータベース
10	7758505CD1 737	S48 S217 S301 S477 S559 S572 S733 T390 T498 T524 T577 T579 T602 Y646			NT-DNAJ ドメイン DM00098 P35515 1-101:: K107-G208 P30725 1-102: K107-G20 P25685 1-107: K107-G208 S34632 1-99: Y109-G209 細胞接着配列:R242-D244 Nt-dnaJ ドメインシグネチャ:F149-Y168 N-6 アデニン特異的 DNA メチラーゼシグネチャ:M269-Y275 signal_cleavage:M1-G26	BLAST_DOMO MOTIFS MOTIFS MOTIFS SPSCAN
					シグナルペプチド:M1-A15; M1-H23; M1-G26; M1-P21 フォンウイブルランド因子タイプ C ドメイン: C159-C216, C285-C342, C28-C87, K366-C416, C95-C152, C221-C278 前駆体 シグナル 受容体 糖タンパク質 膜貫通 キナーゼ トランスフェラーゼ チロシンタンパク質 ATP 結合 リン酸化 PD000495: S395-C662	HMMER_PFAM BLAST_PROD0M

10

20

30

40

【 0 4 2 9 】

【表 3 - 1 0】

表 3 - 1 0

SEQ ID NO: ID	Incyte ポリペプチド残基数	アミノ酸	潜在的リン酸化部位	潜在的グリコシル化部位	シグネチャ配列、ドメインおよびモチーフ	分析方法及びデータベース
10					タンパク質 前駆体 リポート 糖タンパク質 シグナル NEL EGF 様ドメイン コーデン B0024.14 PD015143:C84-C152	BLAST_PRODCM
11	6885756CD1 530	S22 S23 S36 S38 S71 S72 S110 S232 S272 S284 S376 S432 S491 S511 S522 T47 T399 T404 T446 T495 T512 Y306 Y347	N92 N444 N488		フォンウイラブランド因子タイプ C 反復 DM00551 A38963 649-756:W41-V153 チトクロム C ファミリーヘム結合部位シグネチャ:C510-E515, C605-N610, C652-S657 VWFC ドメインシグネチャ:C46-C87, C113-M0TIFS C152, C177-C216, C239-C278, C303-C342, C379-C416	BLAST_DOMO
					ユビキチン カルボキシル末端ヒドロラーゼファミリー:A80-R111	HMMER_PFAM
					ユビキチン カルボキシル末端加水分解酵素ファミリー:G313-Q374	HMMER_PFAM
					ユビキチン カルボキシル末端ヒドロラーゼファミリー-2 タンパク質 BL00972:G81-L98, G156-L165, I193-Y207, Y317-A341, E343-S364	BLIMPS_BLOCKS

10 20 30 40

【 0 4 3 0】

【表 3 - 1 1 1】

表 3 - 1 1

SEQ ID NO: ID	Incyte ポリペプチド残基数	アミノ酸	潜在的リン酸化部位	潜在的グリコシル化部位	シグネチャ配列、ドメインおよびモチーフ	分析方法及びデータベース
11					プロテアーゼ ユビキチンヒドロラーゼ ユビキチン特異的酵素 脱ユビキチン化 カルボキシル末端 チオールエステラーゼ プロセシング 抱合 PD017412:F217-Q309	BLAST_PRODOR
12	7500748CD1 511	S29 S81 S108 S126 S156 S196 T52 T119 T121 T267 T303 T311 Y287 Y346		N164 N291 N327	ユビキチン カルボキシル末端ヒドロラーゼ7 アミリ 2 DM00659 [P40818 782-1103: H180-L370, I85-Y107 [P50102 141-420: Q158-G327 ユビキチン カルボキシル末端ヒドロラーゼ7 M0TIFS アミリー2 シグネチャ 2: Y317-Y335	BLAST_DOMO
					シグナルペプチド: M5-C21; M5-A23; M1-A23; M1-P25; サイトゾル内ドメイン: N478-L511 膜貫通ドメイン: F455-Y477 非サイトゾル内ドメイン: M1-D454 タンパク質 F17C11.7 IKHIERG9 遺伝子間領域 膜貫通 PD043343: E32-V245	EMMER TMHMMER

10

20

30

40

【 0 4 3 1 1】

【表 3 - 1 2】

表 3 - 1 2

SEQ ID NO: ID	アミノ酸残基数	潜在的リン酸化部位	潜在的グリコシル化部位	シグネチャ配列、ドメインおよびモチーフ	分析方法及びデータベース
13	7500749CDI 476	S29 S94 T52 T165 T201 T209 T301 Y67 Y185	N189 N225	タンパク質 F17C11.7 IKI1ERG9 遺伝子間領域 膜貫通 PD043344: H348-V399, L441-G474 signal_cleavage: M1-A23	BLAST_PRODOM SPSCAN
14	7503401CDI 344	S49 S93 S113 T315 T334 Y102	N130 N198 N211 N238	シグナルペプチド: M5-C21; M5-A23; M1-C21; M1-A23; M1-P25 サイトゾル内ドメイン: N443-L476 膜貫通ドメイン: F420-Y442 非サイトゾル内ドメイン: M1-D419 タンパク質 F17C11.7 IKI1ERG9 遺伝子間領域 膜貫通 PD043344: H313-V364 プレニルトランスフェラーゼ α サブユニット repe: Q149-K179, R115-R145, R223-G253, N183-T213 タンパク質 プレニルトランスフェラーゼ α サブユニットリピートタンパク質 BL00904: R115-S148, Q149-D189, R223-G247, I248-E285, Q291-T315, G14-Y63 トランスフェラーゼ サブユニット α タンパク質 プレニルトランスフェラーゼ リポトファルネシルトランスフェラーゼ タンパク質 CAAX RAS PD005875: V99-Q343	HMMER TMHMMER BLAST_PRODOM BLIMPS_BLOCKS

【表 3 - 1 3】

表 3 - 1 3

SEQ ID NO: ID Incyte ポ リペプチド アミノ酸 残基数 潜在的リン酸化 部位 潜在的グリコシル 化部位 シグネチャ配列、ドメインおよびモ チーフ 分析方法及びデー タベース

トランスフェラーゼサブユニット アルネシル BLAST_PROD0M
トランスフェラーゼタンパク質 α CAAX
RAS タンパク質 プレニルトランスフェラーゼ
FTase α PD011572; V64-V106

アルネシルトランスフェラーゼ; α ; BLAST_DOM0
DM07118|P49354|257-378; E222-Q344
タンパク質 プレニルトランスフェラーゼ α サ BLAST_DOM0
サブユニットリポート
DM01356|P49354|174-212; V139-F178
タンパク質プレニルトランスフェラーゼ α サブ MOTIFS
ユニットリポートシグネチャ: A128-R137,
A162-R171, V196-R205, P236-L245

15 7503485CD1 122 S81 S112 S118 T46 コビキチン抱合酵素:M1-Q117 HMMER_PFAM

signal_cleavage:M34-D84 SPSCAN
コビキチン抱合酵素活性部位:P21-E85 PROFILESCAN

15 コビキチンリガーゼ 酵素 タンパク質 抱 合 抱合キリヤ コビキチンタンパク質 多 重伝子族 PD000461: A53-R110, M1-E49 BLAST_PROD0M

【 0 4 3 3】

【表 3 - 1 4】

表 3 - 1 4

SEQ ID NO: ID Incyte ポ リペプチド アミノ酸 残基数 潜在的リン酸化 部位 リコシル 化部位 シグネチャ配列、ドメインおよびモ、分析方法及びデータベース

ユビキチン抱合酵素 DM00225
 |A41222|2-149: D50-R120, S20-D50
 |P52478|2-149: D50-W119, S20-D50
 |P25865|2-149: D50-W119, S2-E99
 |P23566|2-149: D50-W119, S20-D50

BLAST_DOMO

16	7504076CD1 255	T153 T154	N245	F-ボックスドメイン: G4-L52	HMMER_PFAM
17	7500926CD1 166	S35 S120 S157	N155	signal_cleavage:M1-A19 シグナルペプチド:M1-A26 タンパク質 遺伝子間領域 CONSERVED OF SECTION COAT MG332 VMA7RPS31A VMA7RPS25A PD004323: K62-K127	SPSCAN HMMER BLAST_PRODOM
18	7503216CD1 591	S54 S182 S214 S251 S259 S329 S375 S447 S473 S544 T102 T156 T370 T405 T476 T546 T559	N89 N371	メタロペプチダーゼファミリー M24 A288- N520	HMMER_PFAM

アミノペプチダーゼ P とプロリンジペプチダー
 ゼタンパク質 BL00491: I352-H363,
 H453-V465, L482-E496,
 G501-K514
 プロテアソーム A タイプと B タイプ
 PF00227: I31-Y42

BLIMPS_BLOCKS

BLIMPS_PFAM

【表 3 - 1 5】

表 3 - 1 5

SEQ ID NO: 18	Incyte ポリペプチド残基数	アミノ酸残基数	潜在的リン酸化部位	潜在的グリコシル化部位	シグネチャ配列、ドメインおよびモジュール	分析方法及びデータベース
					アミノペプチダーゼ アミノアシル プロリンヒド	BLAST_PROD0M
					ローゼ XAA PRO XPRO プロリン P タンパク質 前駆体 P-様	PD009635: K514-S588
					アミノペプチダーゼ ヒドロラーゼ アミノアシル プロリン XAA PRO P XPRO タンパク質 推定的 プロリン APP	PD004954: L10-D120
					アミノペプチダーゼ ヒドロラーゼ メチオニン ペプチダーゼ タンパク質 コバルト M ジペプチダーゼ XPRO MAP	PD000555: E369-V510, V289-G493
					アミノペプチダーゼ アミノアシル プロリンヒド	BLAST_PROD0M
					ローゼ P XAA PRO XPRO プロリン 前駆体 タンパク質 P-様	PD008419: E148-A288
					アミノペプチダーゼ P ヒプロリンジペプチダーゼ DM00816	
					S64780 449-697: I283-P534	
					P54518 121-347: K322-V510	
					P46545 131-358: E319-N506	
					Q10698 140-366: K287-V510	

10

20

30

40

【 0 4 3 5】

【表 3 - 1 6】

表 3 - 1 6

SEQ ID NO:	Incyte ポリペプチド ID	アミノ酸残基数	潜在的リン酸化部位	潜在的グリコシル化部位	シグネチャ配列、ドメインおよびモチーフ	分析方法及びデータベース
19	7503233CD1	652	S77 S147 S194 S248 S275 S317 S422 S437 S453 S477 S500 S527 S574 S602 T202 T284 T300 T307 T312 T632	N76 N137 N305 N406 III:K303-V460	カルバイン大サブユニット、ドメイン	HMMER_PFAM

19

カルバインファミリー システムインプロテアーゼ:L55-T292	HMMER_PFAM
EF ハンド:N557-A585, S527-I555, T622-HMMER_PFAM T649, N484-I511	HMMER_PFAM
EF-ハンド カルシウム結合ドメイン タンパク質	BLIMPS_BLOCKS
BL00018:D536-F548	BLIMPS_BLOCKS
カルバイン システムインプロテアーゼ (C2) フ	BLIMPS_PRINTS
ファミリー	
PR00704:Y83-I108, L113-V136, G138-L165, E268-C289, T318-F335, R426-E454	
プロテアーゼ カルバインヒドロラーゼ サブユニット 中性 チオール 大カルシウム活性プロテイナーゼ	BLAST_PRODUM
CANP PD001545:Y83-T292, L55-G82	
プロテアーゼ カルバインヒドロラーゼ サブユニット 大 中性 チオール カルシウム活性プロテイナーゼ	BLAST_PRODUM
CANP PD001874:K303-T459	

10

20

30

40

【 0 4 3 6】

【表 3 - 1 7】

表 3 - 1 7

SEQ ID NO: ID	Incyste リペプチド アミノ酸 潜在的リン酸化 潜在的リン酸化 リコシル 化部位	シグネチャ配列、ドメインおよびモチーフ	分析方法及びデータベース
19	カルバインサブユニットプロテアーゼ 中性	カルバインサブユニットプロテアーゼ 中性	BLAST_PRODOM
	カルシウム結合 カルシウム活性化プロテアーゼ	カルシウム結合 カルシウム活性化プロテアーゼ	BLAST_PRODOM
	ナージ CANP ヒドロラーゼ 大	ナージ CANP ヒドロラーゼ 大	
	PD003609:E480-F548		
	カルバインサブユニットプロテアーゼ 中性	カルバインサブユニットプロテアーゼ 中性	BLAST_PRODOM
	カルシウム結合 カルシウム活性化プロテアーゼ	カルシウム結合 カルシウム活性化プロテアーゼ	
	ナージ CANP ヒドロラーゼ 大	ナージ CANP ヒドロラーゼ 大	
	PD002827:N549-V614		
	カルバイン触媒ドメイン DM01305	カルバイン触媒ドメイン DM01305	BLAST_DOMO
	P07384 1-517: G82-S456, C11-G82		
	P00789 3-507: Y83-K455, G13-G82		
	P17655 1-505: N76-K455, G13-G82, V434-Q491		
	A48764 1-507: Q66-K455, V14-G82, Y432-Q491, K521-R554		
	EF-ハンドカルシウム-結合ドメイン:D536-F548, D566-M578	EF-ハンドカルシウム-結合ドメイン:D536-F548, D566-M578	MOTIFS

10

20

30

40

【 0 4 3 7】

【表 3 - 1 8】

表 3 - 1 8

SEQ ID NO: ID	Incyte ポリペプチド残基数	アミノ酸	潜在的リン酸化部位	潜在的グリコシル化部位	シグネチャ配列、ドメインおよびモジュール	分析方法及びデータベース
20	7726576CD1 861		S12 S29 S187 S239 S251 S264 S324 S327 S372 S465 S509 S547 S558 S591 S628 S834 S857 T106 T107 T268 T284 T289 T300 T399 T435 T735 T758 T781 T793 Y844	N257 N577 N779	HECT-ドメイン (ユビキチン-トランスフェラーゼ): P565-S857	HMMER_PFAM
					Pyrokinin タンパク質 BL00539:F470-L474	BLIMPS_BLOCKS
					HECT-ドメイン (ユビキチン-トランスフェラーゼ) PF00632:V680-G686, Y772-P799, L817-N848	BLIMPS_PFAM
					タンパク質リガーゼ ユビキチン抱合 リポート ユビキチンタンパク質 DNA 結合 推定 癌 原性 PD002225: V587-A845	BLAST_PRODUM
					HERC2 放出ユビキチン因子 リポート 抱合 グアニンヌクレオチド KIAA0076 HA0936 PD155960:E245-I370	BLAST_PRODUM

【 0 4 3 8 】

【表 3 - 1 9】

表 3 - 1 9

SEQ ID NO: 20	Incyste 7503507CD1 447	ポ アミノ酸 潜在的リン酸化 リコシル 化部位	シグネチャ配列、ドメインおよびモ チーフ	分析方法及びデータベース
		残基数		
		部位		
		部位		
			HECT ドメイン DM01690	BLAST_DOM0
			P51593 9-306; R583-C849	
			P40985 578-891; Y598-A845	
			P39940 513-808; N589-A845	
			A38919 785-1082; N574-A851	
			ロインジッパー/ターン:L404-L425	MOTIFS
			signal_cleavage:M1-A37	SPSCAN
		S11 S34 S53		
		S201 S234 S339		
		S377 S382 S395		
		S406 T166 T197		
		T263 T279 T397		
			シグナルペプチド:M1-A37	HMMER
			肝細胞 成長因子 活性化剤 抑制剤 糖タ	BLAST_PROD0M
			ンパク質	
			PD120361: G84-L297	
			signal_cleavage:M1-A37	SPSCAN
		S11 S34 S53		
		S201 S234 S339		
		S377 S382 S395		
		T166 T197 T263		
		T279 T397 T455		
			シグナルペプチド:M1-A37	HMMER
			低密度リポタンパク質受容体ドメイ	HMMER_PFAM
			ン:	
			H308-N346	
			サイトソル内ドメイン:A438-L468	TMHMMER
			膜貫通ドメイン:V415-V437	
			非サイトソル内ドメイン:M1-P414	

【 0 4 3 9】

10

20

30

40

【表 3 - 2 0】

表 3 - 2 0

SEQ ID NO: ID	アミノ酸残基数	潜在的リン酸化部位	潜在的グリコシル化部位	シグネチャ配列、ドメインおよびモチーフ	分析方法及びデータベース
22		S11 S34 S53 S201 S207 T166 T197		LDL-受容体クラス A (LDLRA) ドメインタンパク質 BL01209:C329-E341 肝細胞 成長因子 活性化剤 抑制剤 糖タンパク質 PD120361:G84-L297, S11-P44 LDL 受容体クラス A (LDLRA) ドメイン シグネチャ:C322-C344 ロイシンジッパーパターン: L45-L66, L427-L448 signal_cleavage:M1-A37	BLIMPS_BLOCKS BLAST_PRODUM MOTIFS MOTIFS SPSCAN
23	7503509CD1 236		N164	シグナルペプチド:M1-A37 肝細胞成長因子活性化剤 抑制剤 糖タンパク質 PD120361:G84-R188, S11-P44	HMMER BLAST_PRODUM
24	7505800CD1 312	S49 T283 Y87 T302	N166 N179 N206	ロイシンジッパーパターン:L45-L66 タンパク質 プレニルトランスフェラーゼ α サブユニット repe: Q117-K147, E83-R113, R191-G221, N151-T181 タンパク質 プレニルトランスフェラーゼ α サブユニットリピートタンパク質 BL00904:E83-S116, Q117-D157, R191-G215, I216-E253, Q259-T283	MOTIFS HMMER_PFAM

10

20

30

40

【 0 4 4 0】

【表 3 - 2 1】

表 3 - 2 1

SEQ ID NO: ID アミノ酸残基数 潜在的リン酸化部位 潜在的グリコシル化部位 シングネチャ配列、ドメインおよびモチーフ タンパク質データベース 分析方法及びデータベース

25	7503141CD1 452	S138 S167 S271 S355 S419 T15 T54 T90 T146 T358 T430 Y128	N13 N172	トランスフェラーゼサブユニット α タンパク質 プレニルトランスフェラーゼリポーター タンパク質 RAS PD005875:A40-Q236, D59-Q311 アルネシルトランスフェラーゼ; α ; DM07118 P49354 257-378;E190-Q312 タンパク質 プレニルトランスフェラーゼ α サブユニット DM01356 P49354 174-212;V107-F146 タンパク質 プレニルトランスフェラーゼ α サブユニット ユニットリポーターシグネチャ:P96-R105, A130-R139, V164-R173, P204-L213	BLAST_PRODDOM BLAST_PRODDOM CAAX BLAST_DOMO BLAST_DOMO BLAST_DOMO HMMER_PFAM
----	----------------	--	----------	---	--

アミノペプチダーゼ P とプロリンジペプチダーゼ
タンパク質 BL00491:A278-H289, H325-D337, L362-F376, G407-G420
ポリダーゼヒドラーゼ XAAPRO ジペプチダーゼ XPRO
プロリンイミドジペプチダーゼ (IMIDODIPEPTIDASE)
アセチル化マンガンペプチダーゼ
PD013444:A2-C183

10

20

30

40

【 0 4 4 1 】

【表 3 - 2 2】

表 3 - 2 2

SEQ ID NO: ID	アミノ酸残基数	潜在的リン酸化部位	潜在的グリコシル化部位	シグネチャ配列、ドメインおよびモチーフ	分析方法及びデータベース
26	7500362CD1 471	S116 S145 S202 S290 S374 S438 T15 T68 T124 T166 T176 T377 T449 Y106	N13 N150	アミノペプチダーゼヒドロラーゼメチオニンペプチダーゼタンパク質コバルトMジペプチダーゼ XPRO MAP PD000555:E160-Y375; G404-T425 アミノペプチダーゼPとプロリンジペプチダーゼ DM00816 P12955 179-467;V181-P428 P43590 225-509;V181-T425 P15034 169-423;H187-Y375; E397-T425 P44881 163-417;K168-Y375; E397-P428 アミノペプチダーゼPとプロリンジペプチダーゼ シグネチャ: H325-D337 signal_cleavage:M1-T56	BLAST_PRODOM BLAST_DOMO MOTIFS SPSCAN
				メタロペプチダーゼファミリー M24V163-E451 アミノペプチダーゼPとプロリンジペプチダーゼタンパク質 BL00491:A297-H308, H344-D356, L381-F395, G426-G439 Pyrokinin タンパク質 BL00539:F74-L78	HMMER_PPFAM BLIMPS_BLOCKS BLIMPS_BLOCKS

10

20

30

40

【 0 4 4 2】

【表 3 - 2 3】

表 3 - 2 3

SEQ ID NO: ID	アミノ酸残基数	潜在的リン酸化部位	潜在的グリコシル化部位	シグネチャ配列、ドメインおよびモチーフ	分析方法及びデータベース
27	7503328CD1 458	S4 S97 S220 S257 S289 S326 S334 S404 S431 T36 T145 T199 T243	NI32	アミノペプチダーゼ XAA PRO XPRO プロリンヒドローゼ P XAA PRO XPRO プロリン前駆体タンパク質 P-様 PD008419:G183-A363	BLAST_PRODUM
				アミノペプチダーゼ XAAPRO ジペプチダーゼ XPRO プロリン	BLAST_PRODUM
				IMIDODIPEPTIDASE アセチル化 マンガン ペプチダーゼ	BLAST_PRODUM
				PD013444:A2-F48, F48-V163	
				アミノペプチダーゼ ヒドロラーゼ メチオニン	BLAST_PRODUM
				ペプチダーゼ タンパク質 コバルト M ジペプチダーゼ XPRO MAP	
				PD000555:V163-Y394, G423-T444	
				アミノペプチダーゼ P とプロリンジペプチダーゼ DM00816	BLAST_DOMO
				P12955 I79-467: I158-P447	
				P43590 225-509: E160-T444	
				P15034 169-423: E160-Y394, E416-T444	
				P44881 163-417: E160-Y394, E416-P447	
				アミノペプチダーゼ P とプロリンジペプチダーゼ シグネチャ: H344-D356	MOTIFS
				アミノペプチダーゼ アミノアシル プロリンヒドローゼ P XAA PRO XPRO プロリン前駆体タンパク質 P-様 PD008419:G183-A363	BLAST_PRODUM
				アミノペプチダーゼ ヒドロラーゼ アミノアシル プロリン XAA PRO P XPRO タンパク質 推定的 プロリン APP PD004954: L53-D163	BLAST_PRODUM

【 0 4 4 3】

【表 3 - 2 4】

表 3 - 2 4

SEQ ID NO: ID	Incyte ポリペプチド残基数	アミノ酸	潜在的リン酸化部位	潜在的グリコシル化部位	シグネチャ配列、ドメインおよびモチーフ	分析方法及びデータベース
28	7510464CD1695	S4 S97 S220 S257 S289 S326 S334 S404 S450 S522 S548 S619 S670 T36 T145 T199 T243 T445 T480 T551 T621 T643		N132 N446	メタロペプチダーゼファミリー M24A363-N595	HMMER_PFAM
					アミノペプチダーゼ P とプロリンジペプチダーゼタンパク質 BL00491:I427-H438, H528-V540, L557-E571, G576-K589	BLIMPS_BLOCKS
					プロテアソーム A タイプと B タイプ PF00227:I74-Y85	BLIMPS_PFAM
					アミノペプチダーゼ アミノアシル プロリンヒドローゼ P XAA PRO XPRO プロリン前駆体タンパク質 P-様 PD008419:G183-A363	BLAST_PRODUM
					アミノペプチダーゼ ヒドロラーゼ アミノアシル プロリン XAA PRO P XPRO タンパク質 推定的 プロリン APP PD004954:L53-D163	BLAST_PRODUM
28					アミノペプチダーゼ ヒドロラーゼ メチオニン ペプチダーゼ タンパク質 コバルト M ジペプチダーゼ XPRO MAP PD000555:V364-G568, E444-V585	BLAST_PRODUM

10

20

30

40

【 0 4 4 4】

【表 3 - 2 5】

表 3 - 2 5

SEQ ID NO: ID	アミノ酸残基数	潜在的リン酸化部位	潜在的グリコシル化部位	シグネチャ配列、ドメインおよびモチーフ	分析方法及びデータベース
29	7510394CD1140	S29 S81 S108 T52 T119 T129		アミノペプチダーゼ P とプロリンジペプチダーゼ DM00816 S64780 449-697: I358-P609 DM00816 P54518 121-347: K397-V585 DM00816 P46545 131-358: E394-N581 DM00816 Q10698 140-366: K362-V585	BLAST_DOMO
30	7500745CD1191	S29 S81 T52		シグナルペプチド: M5-C21, M5-A23, M1-C21, M1-A23, M1-P25 発達関連 ニューロン性 T1B9.20 DJ453C12.7 CGI-06 PD043343: E32-A134	SPSCAN HMMER BLAST_PRODOM
31	7500929CD1145	S35		シグナルペプチド: M1-C21, M1-A23, M1-P25, M5-C21, M5-A23 シグナルペプチド: M1-A19 シグナルペプチド: M1-A26	SPSCAN HMMER

10

20

30

40

【 0 4 4 5】

【表 4 - 1】

表 4 - 1

ポリヌクレオチド SEQ ID NO/ Incyte ID/配 列長	配列断片
32/8268274CB1/ 2129	1-530, 53-231, 53-626, 81-845, 127-387, 174-746, 337-654, 369-766, 377-1014, 420-716, 443-887, 478-761, 505-745, 505-921, 505-1101, 523-1000, 545-838, 605-913, 645-864, 665-721, 671-962, 671-967, 714-922, 758-1019, 778-1249, 796-1046, 846-1358, 868-1104, 1146-1296, 1159-1613, 1236-1748, 1284-1319, 1316-1860, 1317-1714, 1361-1926, 1362-1597, 1421-1794, 1450-1747, 1471-1748, 1616-1913, 1616-2097, 1616-2119, 1618-1887, 1666-2129, 1699-1952, 1715-1960
33/7500515CB1/ 3489	1-799, 1-845, 1-851, 1-870, 1-880, 1-894, 1-907, 1-942, 1-2859, 8-171, 8-193, 11-229, 14-736, 108-845, 199-790, 217-577, 233-886, 288-898, 299-804, 302-942, 339-790, 350-859, 360-629, 391-890, 396-988, 461-739, 566-1183, 587-1301, 589-1360, 595-738, 621-1216, 632-981, 736-1009, 736-1288, 741-1363, 790-1019, 814-1581, 853-1339, 854-1114, 863-1536, 864-1206, 868-1340, 872-1479, 874-1195, 897-1596, 898-1165, 904-1173, 912-1626, 948-1626, 991-1220, 1001-1631, 1037-1250, 1047-1803, 1093-1751, 1101-1809, 1103-1738, 1127-1664, 1160-1409, 1189-1873, 1190-1874, 1235-1576, 1241-1506, 1297-1463, 1302-1880, 1370-1491, 1370-1624, 1390-1779, 1401-1574, 1404-1868, 1419-1651, 1437-1875, 1442-1854, 1456-1756, 1474-1880, 1495-1759, 1530-1810, 1542-1880, 1544-1797, 1609-2049, 1660-1933, 1676-1926, 1704-1866, 1710-1880, 1751-2098, 1835-2412, 1852-2366, 1866-2472, 1916-2859,
34/2256826CB1/2 996	1940-2861, 1963-2861, 1985-2858, 1991-2859, 1995-2608, 2007-2861, 2008-2859, 2014-2375, 2032-2557, 2083-2690, 2104-2667, 2104-2838, 2106-2617, 2107-2389, 2111-2606, 2138-2687, 2141-2775, 2148-2744, 2158-2692, 2160-2467, 2176-2822, 2188-2857, 2199-2383, 2221-2798, 2260-2483, 2265-2827, 2267-2789, 2276-2536, 2281-2603, 2282-2526, 2294-2876, 2307-2845, 2310-2429, 2325-2848, 2340-2591, 2342-2845, 2349-2582, 2365-2788, 2367-2702, 2374-2632, 2386-2518, 2388-2654, 2388-2847, 2388-2873, 2397-2826, 2401-2849, 2428-2646, 2435-2862, 2435-2876, 2435-2877, 2454-2863, 2456-2673, 2481-2865, 2493-2858, 2497-2753, 2498-2751, 2525-3489, 2533-2698, 2536-2839, 2542-2792, 2543-2785, 2550-2790, 2550-2846, 2550-2857, 2550-2871, 2576-2824, 2608-2858, 2662-2856, 2669-2857, 2735-2855, 2737-2898
34/2256826CB1/2 996	1-686, 424-2842, 443-1082, 452-978, 461-1074, 511-800, 511-867, 511-924, 530-597, 530-881, 567-987, 688-1062, 721-837, 721-956, 721-970, 721-1144, 721-1155, 721-1188, 721-1222, 721-1232, 721-1236, 721-1270, 721-1273, 721-1279, 721-1281, 721-1294, 721-1312, 721-1322, 722-1351, 725-1342, 785-1330, 851-1473, 919-1600, 971-1410, 982-1572, 985-1574, 998-1581, 1001-1478, 1055-1705, 1072-1724, 1105-1645, 1123-1745, 1142-1774, 1187-1828, 1217-1619, 1274-1827, 1280-1914, 1296-1936, 1341-1907, 1345-1836, 1363-1735, 1371-1814, 1379-1950, 1392-1852, 1440-1996, 1456-1935, 1458-1944, 1464-2017, 1469-1984, 1481-1987, 1488-1997, 1491-1967, 1491-1988, 1494-1988, 1504-1980, 1504-2035,

【表 4 - 2】

表 4 - 2

ポリスクレオチド SEQ ID NO/ Incyte ID/配 列長	配列断片
35/7686186CB1/ 1860	1517-2051, 1538-2209, 1547-2109, 1555-2183, 1580-2238, 1591-2236, 1610-2261, 1619-2099, 1657-2220, 1666-2180, 1671-2114, 1672-2315, 1675-2370, 1677-2222, 1686-2149, 1691-2250, 1697-2189, 1736-2292, 1755-2235, 1775-2375, 1789-2266, 1794-2363, 1828-2395, 1852-2368, 1859-2317, 1890-2529, 1911-2493, 1946-2352, 1953-2498, 1962-2435, 1977-2617, 2072-2610, 2093-2602, 2102-2498, 2113-2565, 2137-2498, 2141-2546, 2158-2706, 2173-2663, 2177-2803, 2191-2842, 2207-2719, 2208-2813, 2316-2799, 2330-2996, 2356-2817, 2375-2805, 2398-2822, 2452-2828
36/72617436CB1/ 1334	1-936, 4-820, 32-1002, 118-955, 135-957, 141-970, 142-951, 150-1094, 178-800, 208-1045, 223-1245, 235-1130, 244-1046, 254-1067, 271-1007, 314-1137, 318-946, 340-1181, 377-1000, 377-1005, 399-1218, 420-1190, 444-1017, 473-1086, 473-1321, 476-1219, 502-1002, 508-924, 542-1375, 580-1054, 594-1461, 620-1526, 625-1457, 649-1078, 732-1432, 735-1244, 744-1312, 769-945, 777-1648, 781-1314, 817-1629, 818-1618, 818-1626, 825-1721, 830-1667, 832-1814, 837-1381, 839-1216, 839-1389, 881-1668, 924-1756, 930-1696, 939-1844, 958-1844, 965-1830, 970-1814, 973-1457, 980-1814, 980-1826, 985-1814, 988-1737, 991-1814, 995-1834, 998-1814, 999-1770, 999-1846, 1003-1836, 1018-1400, 1022-1830, 1022-1860, 1024-1814, 1029-1842, 1035-1837, 1036-1830, 1037-1814, 1038-1845, 1039-1814, 1040-1833, 1042-1830, 1049-1828, 1055-1811, 1056-1814, 1060-1814, 1061-1814, 1064-1557, 1066-1814, 1069-1700, 1074-1844, 1082-1818, 1103-1841, 1111-1814, 1122-1814, 1129-1814, 1132-1840, 1141-1814, 1147-1814, 1153-1812, 1154-1814, 1160-1814, 1168-1814, 1176-1814, 1176-1823, 1186-1814, 1193-1842, 1196-1814, 1205-1814, 1222-1814, 1226-1814, 1257-1834, 1263-1814, 1266-1814, 1270-1814, 1271-1814, 1276-1814, 1277-1816, 1280-1814, 1288-1830, 1296-1814, 1310-1814, 1311-1600, 1311-1814, 1328-1842, 1336-1814, 1359-1814, 1446-1835, 1461-1844, 1462-1815, 1469-1814, 1536-1738
37/7501945CB1/ 2070	1-281, 1-1334, 77-432, 77-477, 78-375, 78-407, 78-456, 78-459, 78-485, 85-375, 94-317, 94-379, 94-380, 94-1334, 114-576, 159-622, 282-600, 282-917, 282-966, 282-1035, 376-758, 581-1334, 859-1334 1-655, 502-984, 792-2070, 892-1172, 969-1266, 969-1298, 985-1207, 985-1208, 985-1270, 1173-1832, 1173-1841, 1173-1867, 1173-1890, 1173-1918, 1173-1931, 1173-1966, 1173-1983, 1173-1995, 1173-1996, 1173-2044, 1173-2054, 1177-1979, 1233-2070, 1234-2069, 1236-1708, 1242-2070, 1277-2070, 1336-2070, 1417-1800, 1514-1801, 1524-2070, 1579-1899

【表 4 - 3】

表 4 - 3

【 0 4 4 8 】

ポリヌクレオチド SEQ ID NO/ Incyte ID/配列長	配列断片
38/7500264CB1/ 2265	1-471, 1-2265, 46-537, 113-743, 113-800, 113-850, 113-871, 114-589, 114-856, 117-857, 124-619, 649-1118, 649-1129, 653-785, 653-1234, 657-931, 657-1159, 657-1162, 660-1185, 665-1449, 667-1000, 672-908, 677-1137, 691-826, 691-880, 691-901, 693-891, 759-906, 915-1449, 937-1449, 948-1449, 1012-1290, 1025-1699, 1033-1457, 1034-1290, 1066-1363, 1144-1419, 1164-1396, 1238-1542, 1242-1471, 1242-1491, 1246-1496, 1251-1856, 1282-1539, 1282-1540, 1282-1807, 1282-1874, 1322-1813, 1328-1797, 1334-1847, 1334-1882, 1347-1808, 1381-1640, 1416-1707, 1417-1704, 1420-1641, 1420-2200, 1475-1950, 1486-1963, 1529-1832, 1551-1814, 1551-2113, 1589-1896, 1597-1876, 1603-1829, 1618-1858, 1638-1918, 1666-1914, 1666-1961, 1667-1931, 1673-1955, 1702-1968, 1716-2006, 1718-1905, 1747-2170, 1808-1952, 1808-2126, 1819-2035, 1819-2149, 1853-2064, 1853-2244, 1859-2149, 1859-2265, 1885-2167, 1892-2117, 1909-2176, 1941-2156, 1941-2161, 1954-2192, 1956-2222, 1956-2223, 2004-2251, 2012-2253, 2031-2197, 2031-2265, 2039-2265, 2075-2211
39/7499935CB1/ 1834	1-369, 1-654, 1-715, 1-1174, 2-285, 2-300, 2-429, 2-458, 2-514, 2-524, 2-583, 2-594, 2-608, 2-609, 2-637, 2-642, 2-646, 2-663, 2-691, 2-735, 2-772, 2-838, 3-290, 3-308, 3-362, 3-583, 5-146, 5-308, 5-343, 5-484, 5-536, 5-541, 6-609, 7-267, 7-285, 7-297, 8-199, 8-206, 8-236, 8-273, 8-547, 8-655, 9-633, 11-253, 11-585, 12-227, 12-243, 12-254, 12-283, 12-319, 14-524, 14-1834, 15-270, 15-272, 15-287, 16-247, 16-252, 16-277, 16-296, 16-297, 16-529, 16-652, 16-775, 17-282, 17-290, 17-294, 18-133, 18-260, 18-290, 18-311, 18-623, 25-260, 25-313, 25-320, 26-133, 26-147, 26-180, 26-259, 26-295, 26-296, 26-304, 26-305, 26-450, 26-532, 26-578, 26-593, 26-648, 28-497, 28-600, 31-373, 33-295, 34-646, 34-657, 37-452, 37-637, 37-676, 43-344, 51-305, 53-850, 89-583, 103-644, 105-576, 124-394, 143-305, 160-653, 164-470, 233-462, 234-848, 249-1031, 255-476, 255-541, 258-638, 278-490, 278-495, 289-925, 300-592, 306-700,
39	306-719, 306-816, 306-879, 306-887, 306-888, 306-900, 306-945, 306-947, 306-961, 306-986, 307-789, 307-824, 307-831, 307-840, 307-841, 307-855, 307-858, 307-865, 307-891, 307-899, 307-932, 307-944, 307-945, 307-952, 307-955, 307-978, 307-981, 307-1005, 308-884, 309-479, 309-977, 318-568, 322-563, 325-548, 328-641, 329-546, 346-933, 347-1045, 350-1032, 353-830, 354-1015, 364-607, 364-639, 376-1135, 413-673, 413-1012, 415-703, 415-980, 416-895, 422-1121, 423-833, 427-824, 427-933, 452-722, 465-1170, 507-757, 521-1242, 542-803, 547-1187, 563-891, 580-1181, 591-881, 592-889, 627-1000, 630-844, 653-874, 655-935, 663-886, 673-914, 683-953, 690-949, 693-925, 693-927, 693-1319, 693-1433, 693-1461, 856-1576, 884-1164, 884-1169, 896-1150, 939-1167, 947-1229, 947-1414, 947-1415, 947-1438, 947-1456, 947-1457, 947-1523, 947-1589, 947-1591, 947-1611, 947-1635, 947-1645, 952-1179, 953-1444, 1130-1667, 1170-1526, 1275-1830, 1352-1419, 1377-1830, 1450-1830, 1515-1831, 1534-1788

10

20

30

【表 4 - 4】

表 4 - 4

ポリヌクレオチド SEQ ID NO/ Incyte ID/配列長	配列断片
40/7982285CBI/ 1524	1-292, 2-421, 44-805, 57-109, 59-624, 61-272, 61-656, 61-697, 61-698, 67-216, 67-247, 68-749, 74-437, 74-544, 74-573, 74-579, 74-676, 74-679, 77-756, 81-388, 82-340, 83-388, 84-658, 89-352, 90-309, 90-530, 91-306, 91-313, 91-674, 93-216, 95-356, 95-432, 95-435, 95-500, 95-501, 95-534, 95-545, 95-548, 96-767, 97-919, 98-505, 98-754, 100-346, 101-635, 102-960, 118-368, 123-544, 123-617, 151-787, 154-409, 162-780, 203-880, 224-388, 239-815, 305-388, 369-1003, 392-853, 463-1070, 500-1100, 501-761, 519-1155, 536-565, 539-672, 608-1261, 628-1186, 678-1175, 697-1241, 804-1446, 839-1111, 845-1478, 916-1524, 929-1088, 938-1524, 957-1226, 957-1473, 972-1418, 1036-1085
41/7758505CBI/ 2973	1-635, 119-364, 119-742, 119-752, 244-735, 244-753, 244-755, 244-869, 666-755, 750-1300, 754-2973, 961-1142, 1033-1562, 1033-1938, 1034-1689, 1185-2973, 1327-1934, 1335-1847, 1353-1947, 1796-2305, 1937-1966
42/6885756CBI/ 2126	1-1789, 401-1789, 402-1789, 1674-2126
43/7500748CBI/1 973	1-482, 1-657, 1-671, 1-686, 2-597, 2-657, 8-256, 9-240, 11-361, 14-257, 14-266, 14-278, 15-276, 15-321, 15-529, 15-579, 19-271, 19-281, 19-284, 19-286, 20-273, 20-282, 20-285, 20-287, 20-288, 20-315, 22-242, 22-267, 22-277, 23-255, 23-294, 23-304, 23-321, 34-284, 36-642, 37-649, 42-273, 60-299, 93-228, 240-392, 255-489, 283-828, 313-1049, 361-923, 367-524, 367-540, 367-559, 405-557, 502-842, 520-766, 701-934, 726-953, 732-974, 755-1182, 758-920, 758-1015, 777-1038, 779-1029, 781-1035, 805-1049, 838-977, 863-1049, 897-1080, 934-1239, 940-1208, 1070-1360, 1073-1872, 1077-1708, 1080-1629, 1086-1472, 1090-1305, 1102-1966, 1113-1395, 1115-1314, 1119-1351, 1119-1784, 1126-1765, 1133-1525, 1136-1539, 1138-1426, 1138-1912, 1146-1724, 1166-1438, 1166-1598, 1186-1444, 1191-1437, 1205-1541, 1210-1930, 1210-1944, 1220-1552, 1221-1973, 1226-1479, 1235-1488, 1235-1840, 1236-1822,

【表 4 - 5】

表 4 - 5

ポリヌクレオチド SEQ ID NO/ Incyte ID/配列長	配列断片
	1241-1502, 1242-1536, 1242-1861, 1256-1494, 1256-1523, 1256-1813, 1259-1460, 1260-1854, 1262-1460, 1265-1722, 1279-1589, 1282-1909, 1287-1929, 1296-1834, 1299-1876, 1300-1927, 1303-1605, 1305-1787, 1307-1565, 1309-1555, 1316-1788, 1316-1953, 1317-1805, 1318-1718, 1319-1929, 1327-1594, 1333-1583, 1333-1737, 1334-1554, 1335-1590, 1336-1576, 1336-1588, 1339-1562, 1342-1604, 1345-1966, 1346-1723, 1349-1444, 1353-1808, 1356-1851, 1357-1958, 1357-1968, 1359-1631, 1361-1939, 1362-1956, 1363-1643, 1366-1973, 1367-1638, 1375-1637, 1387-1967, 1394-1679, 1394-1695, 1395-1631, 1397-1665, 1404-1621, 1404-1801, 1406-1550, 1406-1661, 1406-1682, 1406-1967, 1411-1617, 1418-1669, 1418-1852, 1422-1953, 1431-1968, 1435-1681, 1441-1845, 1454-1968, 1465-1949, 1467-1952, 1467-1973, 1471-1775, 1475-1726, 1481-1938, 1493-1763, 1499-1781, 1504-1769, 1529-1624, 1529-1933, 1531-1794, 1539-1934, 1540-1930, 1555-1814, 1561-1898, 1628-1829, 1664-1901
44/7500749CB1/ 1884	1-190, 1-1846, 22-670, 158-358, 190-408, 190-416, 190-456, 190-507, 190-523, 190-661, 190-662, 190-697, 190-724, 190-775, 190-794, 194-626, 195-801, 199-772, 201-447, 201-598, 208-729, 218-472, 221-813, 223-780, 224-818, 229-767, 235-834, 236-764, 239-830, 242-511, 246-866, 253-944, 259-915, 261-492, 264-506, 266-411, 266-526, 267-566, 271-542, 271-883, 278-873, 281-773, 284-651, 285-916, 297-704, 309-579, 316-859, 335-581, 339-702, 339-733, 340-835, 342-611, 342-889, 347-702, 353-952, 359-932,
44	365-629, 365-640, 368-616, 370-859, 372-955, 374-1118, 376-668, 381-793, 382-615, 382-640, 382-652, 385-670, 385-784, 386-1210, 387-589, 387-883, 390-975, 392-513, 395-651, 398-944, 407-634, 407-702, 413-655, 413-1003, 433-1091, 436-730, 439-601, 439-696, 441-1065, 452-913, 452-961, 452-985, 452-1193, 452-1197, 452-1218, 452-1274, 452-1303, 455-1162, 458-719, 459-639, 460-710, 462-716, 469-937, 474-1042, 477-1074, 486-734, 489-777, 491-1090, 493-1023, 493-1066, 496-1158, 497-959, 509-1018, 519-658, 522-1167, 523-1090, 532-1061, 542-1079, 544-772, 549-811, 551-838, 561-794, 563-986, 564-1169, 565-814, 565-1227, 571-875, 573-1271, 574-1256, 578-727, 583-1204, 588-824, 588-831,

表 4 - 6

ポリヌクレオチド SEQ ID NO/ Incyte ID/配 列長	配列断片
	592-1213, 593-887, 603-1111, 606-887, 611-950, 611-1245, 612-895, 614-859, 620-1228, 625-870, 629-755, 629-817, 639-1345, 642-922, 644-884, 649-1310, 650-1225, 652-920, 653-1191, 654-899, 656-995, 661-933, 665-934, 665-942, 670-902, 671-1164, 673-925, 675-948, 675-952, 675-963, 675-1208, 678-908, 680-1319, 683-935, 683-1262, 683-1279, 693-988, 697-858, 697-943, 700-908, 708-1363, 710-978, 710-1142, 713-1331, 715-1291, 719-978, 720-972, 720-974, 720-1018, 723-1035, 726-926, 726-941, 726-988, 728-887, 734-1365, 736-983, 742-973, 744-978, 744-1316, 745-1332, 746-923, 746-1032, 770-1381, 773-1076, 783-1090, 785-1051, 788-977, 790-1013, 793-1122, 793-1329, 798-1051, 798-1080, 798-1093, 800-1072, 800-1421, 802-1451, 803-893, 803-1116, 814-1344, 819-1405, 822-1523, 823-1095, 831-1088, 831-1328, 831-1345, 833-1264, 837-1341, 837-1346, 840-965, 842-1126, 842-1480, 843-1430, 848-1415, 848-1492, 852-1388, 861-1095, 862-1115, 876-1054, 886-1130, 895-1387, 901-1158, 906-1155, 908-1191, 911-1614, 912-1114, 913-1604, 915-1053, 922-1572, 925-1189, 925-1387, 926-1618, 932-1045, 932-1178, 939-1207, 942-1458, 943-1512, 952-1242, 953-1195, 953-1638, 955-1754, 959-1590, 962-1511, 965-1177, 966-1213, 968-1354, 969-1254, 971-1258, 972-1187, 984-1848, 993-1798, 995-1277, 997-1196, 1001-1233, 1001-1666, 1003-1235, 1003-1402, 1007-1601, 1008-1647, 1015-1407, 1018-1421, 1020-1281, 1020-1308, 1020-1515, 1020-1794, 1021-1254, 1028-1606, 1040-1316, 1042-1288, 1043-1349, 1045-1574, 1045-1669, 1048-1320, 1048-1480, 1055-1316, 1055-1318, 1060-1282, 1068-1326, 1073-1319, 1080-1629, 1084-1340, 1087-1423, 1087-1801, 1088-1145, 1092-1812, 1092-1826, 1097-1338, 1102-1330, 1102-1434, 1103-1855, 1105-1322, 1105-1436, 1108-1361, 1110-1663, 1112-1369, 1117-1370, 1117-1413, 1117-1722, 1118-1704, 1122-1403, 1122-1416, 1122-1785, 1123-1384, 1124-1418, 1124-1743, 1137-1376, 1138-1376, 1138-1405, 1138-1695, 1141-1342, 1142-1736, 1144-1342, 1146-1820, 1147-1604, 1153-1721, 1159-1803, 1161-1471, 1163-1794, 1164-1791, 1169-1811, 1172-1806, 1178-1716, 1180-1837, 1181-1758, 1182-1777, 1182-1809, 1185-1487, 1187-1669, 1189-1447, 1191-1437, 1195-1761, 1198-1670, 1198-1835, 1199-1687, 1200-1600, 1200-1881, 1201-1811, 1201-1879, 1208-1446, 1209-1476, 1215-1465, 1215-1503, 1215-1619, 1216-1436, 1217-1472, 1218-1458, 1218-1470, 1220-1806, 1221-1444, 1222-1849, 1224-1486, 1224-1487, 1224-1492, 1227-1848, 1228-1605, 1231-1326, 1235-1690, 1238-1733, 1239-1840, 1239-1850, 1241-1513, 1243-1821, 1244-1838, 1245-1525, 1248-1863, 1249-1520, 1253-1847, 1255-1860, 1257-1519, 1262-1778, 1265-1863, 1266-1560, 1269-1849, 1276-1561, 1276-1577, 1276-1876, 1277-1513, 1279-1547, 1286-1503, 1286-1523, 1286-1586,

44

10

20

30

【表 4 - 7】

表 4 - 7

ポリヌクレオチド SEQ ID NO/ Incyte ID/配 列長	配列断片
	1286-1683, 1288-1432, 1288-1485, 1288-1543, 1288-1564, 1288-1849, 1288-1883, 1293-1499, 1295-1882, 1300-1551, 1300-1734, 1304-1835, 1310-1850, 1313-1881, 1317-1563, 1318-1882, 1323-1727, 1324-1470, 1334-1583, 1336-1850, 1338-1581, 1341-1622, 1341-1880, 1343-1809, 1347-1666, 1347-1831, 1348-1565, 1349-1572, 1349-1834, 1349-1864, 1353-1657, 1354-1608, 1357-1608, 1359-1880, 1363-1820, 1375-1645, 1381-1663, 1382-1821, 1382-1850, 1385-1847, 1386-1651, 1388-1884, 1392-1851, 1394-1636, 1396-1850, 1399-1883, 1402-1873, 1404-1848, 1409-1853, 1411-1506, 1411-1815, 1413-1676, 1414-1848, 1421-1816, 1422-1812, 1424-1858, 1426-1853, 1432-1850, 1433-1807, 1433-1849, 1433-1853, 1436-1849, 1436-1855, 1437-1696, 1438-1722, 1439-1849, 1441-1871, 1442-1849, 1442-1871, 1443-1780, 1443-1850, 1443-1862, 1443-1863, 1446-1849, 1448-1858, 1450-1856,
	1452-1847, 1452-1855, 1453-1849, 1454-1753, 1455-1822, 1456-1734, 1456-1849, 1458-1827, 1459-1849, 1465-1859, 1468-1638, 1471-1883, 1472-1756, 1481-1696, 1481-1849, 1485-1850, 1486-1717, 1486-1867, 1488-1850, 1492-1883, 1495-1849, 1502-1524, 1502-1821, 1506-1849, 1510-1711, 1510-1853, 1515-1735, 1515-1850, 1524-1849, 1526-1805, 1526-1849, 1528-1812, 1528-1850, 1531-1850, 1532-1849, 1533-1851, 1537-1737, 1537-1796, 1544-1833, 1545-1760, 1545-1770, 1545-1790, 1545-1853, 1546-1783, 1547-1831, 1547-1844, 1547-1878, 1549-1830, 1550-1830, 1558-1849, 1560-1855, 1594-1793, 1596-1884, 1602-1855, 1604-1853, 1605-1849, 1648-1865, 1649-1883, 1654-1883, 1668-1872, 1682-1849, 1689-1883, 1692-1850, 1699-1868, 1711-1877, 1713-1849, 1734-1849, 1735-1863, 1736-1850, 1738-1883, 1753-1812, 1753-1848, 1753-1849, 1753-1850, 1758-1850, 1760-1864, 1765-1849
45/7503401CB1/1 581	1-255, 1-328, 1-359, 1-436, 4-332, 10-295, 12-362, 13-317, 20-641, 21-272, 21-281, 21-436, 22-239, 22-616, 22-644, 26-341, 27-286, 27-287, 31-265, 34-311, 34-328, 35-299, 35-307, 37-327, 39-154, 46-289, 81-395, 85-380, 112-366, 143-413, 144-411, 146-399, 149-436, 178-436, 179-436, 185-947, 189-436, 237-429, 427-668, 432-755, 433-1284, 458-918, 487-712, 489-995, 490-1360, 493-743, 494-991, 494-1134, 503-783, 507-910, 516-772, 517-753, 518-731, 520-763, 522-814, 522-1149, 524-703, 532-1024, 541-699, 543-807, 557-688, 559-818, 568-788, 569-1290, 586-849, 596-874, 599-882, 623-735, 642-904, 665-1282, 670-904, 676-922, 676-931, 678-1531, 681-1532, 693-1512, 694-899, 694-1059, 699-867, 701-941, 704-865, 704-997, 716-878,

表 4 - 8

ポリヌクレオチド SEQ ID NO/ Incyte ID/配 列長	配列断片
	716-1207, 717-1264, 725-1155, 734-1061, 737-1514, 741-1355, 743-1241, 748-1563, 759-1194, 770-1224, 775-1547, 781-1254, 788-1085, 788-1278, 794-1341, 800-1563, 801-1236, 807-1450, 820-1581, 822-1502, 835-1528, 836-1563, 839-1565, 841-1388, 841-1569, 846-1138, 846-1221, 850-1579, 861-1427, 863-1171, 865-1568, 865-1575, 874-1568, 875-1518, 878-1569, 882-1101, 883-1569, 884-1508, 885-1123, 888-1568, 897-1569, 898-1234, 901-1569, 906-1577, 919-1569, 925-1568, 927-1579, 932-1578, 933-1187, 933-1519, 937-1554, 938-1569, 948-1182, 948-1223, 950-1261, 950-1553, 952-1487, 954-1431, 954-1569, 955-1235, 960-1548, 964-1564, 967-1151, 970-1210, 973-1489, 975-1232,
	980-1575, 985-1249, 989-1576, 991-1497, 992-1248, 992-1577, 992-1579, 993-1291, 996-1173, 996-1579, 998-1429, 1004-1224, 1010-1569, 1014-1261, 1019-1242, 1020-1248, 1028-1579, 1036-1579, 1042-1579, 1043-1523, 1050-1574, 1050-1579, 1055-1526, 1065-1579, 1068-1271, 1069-1579, 1076-1557, 1076-1575, 1078-1499, 1079-1350, 1081-1354, 1091-1306, 1092-1364, 1092-1565, 1094-1280, 1094-1579, 1096-1579, 1101-1566, 1102-1564, 1102-1579, 1104-1579, 1106-1569, 1109-1416, 1109-1568, 1109-1569, 1115-1567, 1115-1569, 1116-1566, 1121-1565, 1121-1567, 1126-1579, 1131-1567, 1132-1407, 1133-1581, 1134-1399, 1134-1420, 1136-1566, 1136-1579, 1137-1579, 1139-1564, 1139-1569, 1143-1567, 1143-1569, 1143-1579, 1144-1569, 1145-1427, 1146-1564, 1146-1579, 1148-1570, 1149-1564, 1150-1565, 1151-1562, 1152-1563, 1152-1565, 1154-1564, 1157-1569, 1157-1579, 1158-1487, 1158-1579,
45	1159-1567, 1164-1579, 1167-1564, 1168-1445, 1170-1564, 1173-1569, 1180-1451, 1181-1579, 1182-1569, 1183-1560, 1184-1564, 1184-1565, 1186-1579, 1186-1581, 1187-1564, 1187-1579, 1188-1563, 1188-1564, 1188-1570, 1189-1565, 1193-1579, 1195-1570, 1198-1562, 1206-1499, 1206-1569, 1209-1560, 1209-1579, 1214-1564, 1216-1473, 1220-1422, 1220-1567, 1221-1579, 1223-1493, 1223-1501, 1225-1579, 1226-1507, 1240-1565, 1246-1565, 1247-1564, 1254-1552, 1260-1567, 1261-1529, 1262-1567, 1268-1571, 1269-1564, 1272-1564, 1272-1565, 1277-1547, 1277-1562, 1278-1567, 1279-1485, 1288-1530, 1289-1564, 1289-1565, 1305-1581, 1308-1567, 1316-1572, 1316-1577, 1320-1564, 1322-1579, 1334-1574, 1355-1564, 1355-1565, 1374-1562, 1374-1564, 1376-1579, 1387-1569, 1392-1578, 1397-1564, 1414-1567, 1414-1571, 1427-1579, 1434-1564, 1448-1564, 1449-1564, 1469-1564

表 4 - 9

ポリヌクレオチド SEQ ID NO/ Incyte ID/配 列長	配列断片
46/7503485CBI/ 1996	<p>1-282, 9-1724, 29-300, 30-292, 30-293, 34-305, 34-326, 52-266, 52-299, 52-325, 53-330, 53-338, 54-317, 54-328, 54-330, 54-335, 55-314, 57-303, 57-321, 57-323, 57-325, 57-328, 59-314, 60-268, 60-285, 60-305, 60-315, 60-318, 60-321, 60-338, 60-342, 61-342, 62-272, 62-319, 63-308, 65-337, 66-298, 70-323, 72-330, 73-325, 106-287, 142-429, 176-668, 176-826, 238-520, 242-503, 242-532, 242-782, 242-873, 242-912, 325-958, 340-911, 348-649, 365-597, 371-936, 376-549, 377-641, 378-640, 387-704, 394-671, 397-586, 443-720, 443-1010, 447-705, 452-897, 455-966, 466-807, 472-1026, 486-610, 486-817, 505-1117, 506-651, 506-803, 528-980, 528-981, 529-1048, 537-1122, 548-776, 549-810, 550-859, 551-807, 556-1132, 560-778, 562-724, 593-858, 610-669, 611-875, 618-902, 619-921, 620-1249, 633-868,</p> <p>641-876, 643-898, 645-911, 646-842, 646-900, 647-895, 656-864, 668-881, 676-1065, 676-1223, 677-916, 677-1012, 684-881, 684-965, 687-1135, 688-865, 688-968, 695-938, 702-1312, 708-970, 715-1343, 721-992, 735-949, 745-1336, 750-1362, 755-992, 757-1263, 777-1057, 777-1352, 788-999, 799-1062, 820-1271, 830-1087, 855-1092, 855-1298, 856-986, 856-1288, 869-1113, 871-1342, 873-1159, 879-1274, 880-1147, 883-1443, 885-1486, 890-1696, 902-1529, 908-1135, 910-1197, 918-1068, 918-1084, 918-1105, 918-1145, 918-1168, 918-1169, 920-1454, 921-1719, 924-1674, 939-1191, 941-1086, 943-1103, 944-1135, 944-1174, 944-1184, 944-1198, 955-1431, 962-1215, 965-1226, 974-1224, 975-1600, 979-1679, 987-1260, 987-1536, 992-1308, 993-1268, 993-1314, 995-1254, 997-1732, 999-1275, 1004-1209, 1007-1458, 1007-1651, 1021-1279, 1022-1715, 1034-1256, 1037-1293, 1045-1249, 1046-1752, 1054-1661, 1055-1228,</p> <p>1055-1262, 1055-1269, 1055-1322, 1055-1324, 1056-1333, 1059-1655, 1066-1511, 1068-1718, 1069-1740, 1084-1302, 1086-1748, 1093-1336, 1093-1714, 1095-1379, 1097-1380, 1100-1707, 1111-1344, 1118-1252, 1119-1696, 1123-1747, 1125-1418, 1125-1432, 1126-1386, 1126-1666, 1132-1645, 1132-1723, 1135-1399, 1139-1471, 1142-1716, 1148-1742, 1158-1388, 1160-1403, 1160-1721, 1164-1748, 1168-1410, 1172-1434, 1177-1746, 1184-1770, 1187-1724, 1197-1458, 1197-1469, 1211-1439, 1211-1468, 1211-1486, 1212-1742, 1234-1747, 1235-1742, 1240-1600, 1244-1749, 1247-1747, 1248-1745, 1249-1730, 1250-1724, 1253-1648, 1253-1745, 1254-1728, 1254-1745, 1258-1720, 1260-1730, 1260-1744, 1261-1729, 1265-1703, 1267-1482, 1268-1758, 1269-1745, 1271-1692, 1272-1522, 1272-1728, 1275-1728, 1277-1730, 1277-1731, 1278-1728, 1281-1519, 1283-1508, 1288-1727, 1290-1723,</p>

46

表 4 - 1 0

ポリヌクレオチド SEQ ID NO/ Incyte ID/配 列長	配列断片
	1292-1720, 1293-1719, 1294-1720, 1296-1720, 1296-1725, 1296-1728, 1297-1720, 1297-1732, 1298-1673, 1298-1725, 1298-1752, 1300-1727, 1301-1724, 1301-1728, 1303-1729, 1303-1731, 1304-1720, 1305-1728, 1307-1729, 1308-1706, 1308-1727, 1308-1741, 1308-1747, 1309-1765, 1316-1720, 1319-1720, 1323-1720, 1325-1741, 1328-1727, 1330-1735, 1331-1720, 1333-1736, 1336-1732, 1337-1747, 1341-1677, 1346-1722, 1354-1727, 1356-1727, 1358-1500, 1361-1646, 1361-1732, 1367-1672, 1370-1503, 1370-1720, 1376-1718, 1377-1720, 1378-1720, 1382-1519, 1391-1734, 1409-1720, 1415-1663, 1421-1650, 1421-1672, 1421-1676, 1421-1759, 1422-1808, 1424-1727, 1433-1720, 1438-1709, 1439-1721, 1440-1725, 1453-1721, 1456-1714, 1457-1996, 1459-1738, 1459-1741, 1466-1715, 1468-1727, 1473-1727, 1475-1714, 1476-1728, 1479-1705, 1483-1729, 1512-1729, 1519-1729, 1524-1729, 1540-1729, 1550-1721, 1550-1783, 1560-1727, 1598-1721, 1610-1750, 1624-1724, 1642-1727
47/7504076CBI/ 1232	1-695, 16-646, 17-583, 27-487, 27-561, 46-668, 61-611, 83-448, 91-611, 159-614, 258-632, 258-693, 259-679, 259-845, 260-626, 260-632, 285-698, 285-848, 288-745, 298-590, 323-790, 361-791, 368-805, 373-832, 387-815, 393-873, 403-639, 429-774, 488-655, 497-746, 497-833, 497-1043, 506-813, 533-663, 543-783, 578-773, 583-1232
48/7500926CB1/ 810	1-537, 11-467, 11-475, 22-190, 22-285, 22-299, 22-400, 22-458, 22-468, 22-475, 22-478, 22-484, 23-386, 23-482, 23-484, 26-379, 27-276, 27-434, 38-468, 41-810, 69-355, 164-471, 257-549, 280-469, 299-481, 299-546, 391-558, 405-809
49/7503216CB1/2 625	1-586, 1-2598, 310-913, 335-913, 391-1023, 391-1043, 393-919, 393-928, 404-660, 580-884, 588-793, 928-1381, 930-1254, 930-1349, 930-1392, 931-1349, 937-1589, 953-1492, 953-1568, 955-1604, 959-1482, 972-1519, 975-1620, 976-1402, 996-1594, 1006-1227, 1009-1465, 1036-1732, 1043-1473, 1044-1640, 1052-1327, 1078-1345, 1100-1597, 1118-1603, 1136-1418, 1160-1749, 1167-1601, 1173-1548, 1184-1722, 1188-1417, 1193-1665, 1193-1736, 1196-1640, 1204-1489, 1222-1653, 1238-1506, 1246-2182, 1261-1676, 1267-2183, 1281-1753, 1291-1482, 1313-1789, 1318-1965, 1325-1792, 1337-1988, 1340-1678, 1341-1912, 1350-1747, 1352-2183, 1356-1633, 1358-1913, 1401-1969, 1408-1968, 1413-2183, 1418-1891, 1422-1975, 1434-1831, 1434-1904, 1434-2183, 1440-1995, 1451-1947, 1451-2183, 1452-2183, 1459-2108, 1479-1921, 1507-2183, 1536-1694, 1551-2075, 1579-2155, 1580-1809, 1580-1878,

表 4 - 1 1

ポリヌクレオチド SEQ ID NO/ Incyte ID/配 列長	配列断片
50/7503233CBI/ 2432	1580-2183, 1584-1890, 1610-1875, 1614-1839, 1614-1891, 1614-1899, 1614-1929, 1614-1935, 1622-2156, 1625-1870, 1626-1918, 1640-2083, 1655-1962, 1657-1893, 1665-1935, 1675-1919, 1678-2244, 1678-2302, 1680-2112, 1719-2031, 1719-2341, 1721-2314, 1726-1975, 1735-2131, 1744-1989, 1746-1965, 1748-2130, 1748-2307, 1751-2240, 1758-1962, 1763-1977, 1763-2349, 1778-1935, 1797-2249, 1799-2327, 1816-2358, 1847-2137, 1866-2113, 1872-2592, 1879-2136, 1879-2472, 1881-2091, 1888-2475, 1902-2551, 1903-2134, 1911-2149, 1926-2222, 1926-2578, 1942-2124, 1943-2154, 1946-2559, 1946-2580, 1953-2218, 1953-2369, 1958-2581, 1970-2239, 1972-2207, 1982-2208, 2190-2612, 2275-2625, 2455-2598
50	1-253, 1-272, 1-2432, 15-311, 18-288, 19-257, 21-311, 23-244, 23-275, 24-311, 24-335, 27-335, 28-285, 33-294, 33-299, 37-271, 37-279, 38-305, 38-313, 44-313, 44-336, 48-304, 48-315, 51-335, 58-335, 79-319, 144-688, 292-778, 331-590, 331-787, 331-820, 331-927, 331-958, 331-959, 331-961, 331-965, 333-562, 334-961, 334-963, 335-786, 340-589, 342-945, 349-625, 349-630, 349-631, 353-852, 362-980, 366-747, 379-830, 381-975, 410-981, 427-1006, 442-1051, 448-948, 455-715, 456-705, 462-961, 467-813, 469-1146, 475-666, 480-989, 480-1063, 482-924, 488-683, 489-747, 494-719, 494-762, 522-738, 523-1028, 547-864, 547-1184, 556-1349, 564-1190, 571-745, 577-1154, 581-848, 593-1148, 609-1033, 615-915, 618-826, 618-1183, 621-1098, 623-1174, 623-1261, 631-1167, 632-881, 635-831, 635-1107, 636-986, 647-1178, 650-1371,
50	653-989, 656-1107, 665-899, 669-923, 669-1347, 682-1275, 692-939, 693-953, 694-1456, 706-1037, 712-984, 714-902, 719-1121, 723-1367, 733-985, 736-1012, 747-1034, 747-1273, 750-1452, 752-1001, 754-1015, 754-1314, 756-1139, 756-1140, 758-1299, 771-1333, 776-1065, 777-1360, 777-1440, 778-1260, 780-1413, 782-1076, 786-999, 798-1081, 805-1423, 806-1254, 835-1249, 838-1336, 851-1470, 852-1455, 854-1356, 854-1407, 855-1499, 856-1510, 857-1373, 860-1415, 865-1106, 865-1118, 868-1517, 884-1131, 886-1068, 891-1602, 894-1193, 906-1383, 916-1360, 917-1396, 918-1523, 925-1345, 930-1104, 938-1231, 946-1425, 948-1425, 954-1183, 966-1412, 971-1534, 973-1407, 976-1257, 977-1219, 987-1728, 992-1548, 993-1245, 993-1250, 994-1346, 995-1297, 997-1598, 1005-1278, 1006-1236, 1006-1916, 1027-1414, 1028-1414, 1030-1506, 1034-1491, 1035-1597, 1053-1253, 1054-1345, 1059-1448,

表 4 - 1 2

ポリヌクレオチド SEQ ID NO/ Incyte ID/配列長	配列断片
	1063-1261, 1069-1423, 1070-1485, 1073-1231, 1074-1499, 1083-1683, 1099-1750, 1102-1401, 1103-1382, 1109-1284, 1114-1698, 1129-1414, 1141-1232, 1148-1635, 1154-1610, 1155-1696, 1157-1660, 1157-1785, 1158-1692, 1166-1839, 1174-1616, 1176-1492, 1186-1372, 1186-1661, 1190-1800, 1191-2008, 1192-1430, 1193-1765, 1202-1781, 1209-1735, 1209-1809, 1210-1451, 1213-1720, 1217-1431, 1219-1507, 1223-1331, 1224-1454, 1224-1467, 1230-1680, 1236-1936, 1241-1489, 1245-1808, 1258-1603, 1259-1517, 1264-1757, 1277-1907, 1289-1627, 1289-1864, 1292-1527, 1293-1702, 1295-1585, 1298-1621, 1299-1746, 1300-1584, 1308-1548, 1309-1833, 1309-2098, 1310-1851, 1312-1589, 1313-1902, 1314-1882, 1315-1809, 1317-1426, 1319-1765, 1326-1523, 1328-1447, 1351-1864, 1351-1977, 1354-1921, 1356-1941, 1366-2008, 1369-1844, 1377-1928, 1383-1792, 1389-1999, 1390-1890, 1394-2056,
	1399-2162, 1402-1934, 1402-2041, 1403-2087, 1404-1907, 1415-1684, 1419-1907, 1421-2365, 1422-1968, 1422-2036, 1422-2049, 1423-1632, 1423-2066, 1426-1846, 1426-1974, 1432-2046, 1435-1953, 1437-2065, 1456-1902, 1456-1904, 1458-1587, 1459-1692, 1465-1736, 1467-1724, 1468-1769, 1469-1763, 1472-1701, 1472-1758, 1472-1839, 1472-2106, 1475-1768, 1478-1988, 1479-1747, 1482-1704, 1482-1758, 1483-2082, 1489-1930, 1493-2172, 1496-2024, 1507-1804, 1513-1748, 1514-2272, 1521-2025, 1525-1773, 1526-1747, 1528-1744, 1528-2007, 1528-2125, 1531-2113, 1535-2158, 1544-2377, 1553-1844, 1557-2110, 1559-2187, 1565-2229, 1566-1837, 1573-1824, 1574-1757, 1579-1816, 1579-1854, 1579-1870, 1579-2156, 1580-1902, 1583-2032, 1589-1987, 1590-2159, 1591-2160, 1591-2206, 1598-1869, 1599-2077, 1600-1851, 1600-2173, 1604-1991, 1607-1889, 1608-2053, 1615-1872, 1624-1869, 1624-1874, 1625-1874, 1626-1840, 1626-1864, 1626-1866, 1626-1882, 1628-1869, 1632-1924,
50	1638-1879, 1645-2136, 1647-2103, 1647-2247, 1649-1908, 1651-1922, 1651-2191, 1651-2206, 1652-2236, 1653-1968, 1656-2190, 1657-1902, 1673-1976, 1673-2245, 1674-1930, 1678-1987, 1678-1988, 1682-1883, 1691-1899, 1694-1841, 1696-1975, 1696-1983, 1696-2331, 1702-1922, 1702-2291, 1704-1996, 1705-1946, 1708-1954, 1708-1977, 1709-1926, 1709-1961, 1710-2280, 1712-1904, 1712-2118, 1715-2189, 1721-2129, 1727-2251, 1742-2182, 1748-1990, 1749-2028, 1755-1941, 1756-2115, 1763-1988, 1768-2272, 1768-2373, 1773-2339, 1777-2054, 1778-2020, 1781-2313, 1788-2288, 1789-2000, 1790-2045, 1798-2052, 1804-2086, 1807-2366, 1812-2097, 1813-2039, 1813-2404, 1825-2053, 1828-1993, 1829-2122, 1832-2069, 1832-2077, 1835-2353, 1838-2086, 1838-2126, 1840-2024, 1843-2120, 1844-2398, 1849-2362, 1868-2144, 1872-2160, 1873-2150, 1874-2119, 1877-2127, 1885-2420, 1886-2145,

表 4 - 1 3

ポリヌクレオチド SEQ ID NO/ Incyte ID/配 列長	配列断片
51/7726576CB1/ 3969	1887-2170, 1894-2149, 1902-2174, 1907-2151, 1907-2157, 1907-2197, 1910-2123, 1912-2231, 1917-2098, 1917-2127, 1917-2169, 1917-2173, 1917-2198, 1917-2359, 1917-2398, 1919-2146, 1935-2132, 1935-2192, 1940-2122, 1940-2147, 1942-2190, 1944-2181, 1953-2266, 1959-2266, 1962-2202, 1962-2276, 1962-2279, 1963-2079, 1963-2116, 1970-2214, 1976-2430, 1977-2088, 1982-2214, 1982-2217, 1984-2225, 1984-2229, 1984-2232, 1984-2240, 1984-2255, 1984-2260, 1987-2254, 1995-2123, 1998-2266, 2001-2100, 2005-2216, 2021-2296, 2029-2313, 2030-2127, 2033-2151, 2035-2282, 2036-2243, 2044-2265, 2045-2265, 2080-2267, 2095-2353, 2099-2337, 2099-2349, 2102-2337, 2104-2337, 2107-2321, 2119-2398, 2121-2278, 2121-2285, 2121-2336, 2126-2349, 2127-2321, 2132-2323, 2132-2379, 2133-2381, 2133-2400, 2191-2389, 2205-2343, 2260-2398
51	1-473, 1-666, 27-604, 48-658, 151-666, 151-688, 151-800, 173-594, 184-666, 216-765, 298-910, 331-945, 378-666, 408-668, 408-678, 506-1234, 539-868, 578-1173, 656-1233, 681-1294, 714-1281, 725-1335, 727-1393, 749-1390, 759-1390, 762-1360, 787-1155, 802-1329, 803-869, 803-885, 822-1245, 879-1266, 883-1138, 883-1221, 883-1334, 883-1359, 883-1381, 883-1447, 883-1462, 883-1514, 883-1560, 929-1343, 929-1344, 929-1355, 929-1490, 931-1063, 932-1303, 952-1819, 955-1115, 955-1329, 973-1630, 994-1629, 1032-1710, 1049-1638, 1064-1723, 1068-1677, 1081-1686, 1114-1263, 1121-2063, 1126-1744, 1182-1724, 1255-1894, 1266-1907, 1274-1720, 1278-1573, 1298-1891, 1313-1615, 1322-1546, 1322-1601,
51	1342-1997, 1351-1581, 1352-1977, 1356-1816, 1366-1653, 1368-1877, 1379-1996, 1387-1989, 1409-1769, 1429-1917, 1460-1989, 1463-2071, 1468-1904, 1468-1919, 1477-1884, 1478-1919, 1486-2070, 1500-2011, 1552-2282, 1561-1786, 1561-1987, 1597-1665, 1639-2303, 1646-2253, 1699-1964, 1712-2264, 1714-2013, 1714-2269, 1724-2379, 1766-2368, 1775-2324, 1829-2379, 1864-2459, 1864-2521, 1946-2275, 1978-2445, 2096-2303, 2096-2643, 2127-2401, 2183-2525, 2244-2496, 2244-2497, 2344-2601, 2426-2952, 2466-2716, 2468-3032, 2472-3052, 2537-2659, 2537-3139, 2540-2777, 2540-2782, 2556-3171, 2560-2797, 2623-3268, 2626-3258, 2630-3136, 2638-2875, 2648-3269, 2731-2866, 2731-3006, 2731-3213, 2738-3283, 2774-3015, 2774-3059, 2774-3398, 2779-3380, 2807-3043, 2832-2958,

【表 4 - 1 4】

表 4 - 1 4

ポリヌクレオチド SEQ ID NO/ Incyte ID/配 列長	配列断片
---	------

2835-3100, 2835-3130, 2854-3116, 2868-3256, 2881-3100, 2881-3114, 2881-3241, 2885-3071, 2885-3134, 2887-3465, 2894-3139, 2896-3165, 2896-3172, 2897-3465, 2904-3165, 2911-3074, 2933-3199, 2933-3465, 2939-3156, 2939-3366, 2942-3318, 2947-3373, 2957-3465, 2965-3465, 2990-3258, 3008-3465, 3012-3292, 3044-3300, 3047-3350, 3057-3276, 3087-3340, 3127-3464, 3139-3402, 3153-3411, 3190-3440, 3278-3969, 3283-3465, 3309-3465, 3413-3465, 3442-3465, 3585-3672, 3586-3656, 3586-3667, 3586-3678, 3586-3685, 3586-3706, 3586-3727, 3586-3771, 3586-3782, 3586-3804, 3586-3848, 3586-3862, 3586-3924, 3586-3928, 3647-3899, 3647-3900, 3747-3928, 3829-3928, 3869-3928, 3875-3928

52/7503507CB1/
2537

1-471, 1-2516, 46-537, 113-743, 113-800, 113-850, 113-871, 114-589, 114-856, 117-857, 124-619, 648-1320, 649-984, 649-1030, 649-1036, 649-1040, 649-1067, 649-1092, 649-1121, 649-1128, 649-1130, 649-1131, 649-1132, 649-1135, 649-1147, 649-1149, 649-1167, 649-1174, 651-978, 653-785, 653-1030, 655-1197, 655-1300, 657-1053, 657-1086, 657-1154, 657-1195, 657-1244, 657-1262, 657-1297, 657-1300, 657-1320, 658-1069, 658-1249, 667-1001, 667-1128, 667-1135, 672-908, 676-1014, 684-1142, 691-826, 691-880, 691-901, 691-1025, 691-1029, 691-1149, 691-1156, 691-1173, 693-891, 700-1103, 710-981, 719-967, 759-906, 762-1255, 766-1309, 767-1000, 767-1133, 793-1322, 839-1255, 840-1345, 864-1328, 954-1265, 956-1265, 1055-1339, 1091-1338, 1178-1348, 1335-1700, 1335-1950, 1336-1614, 1395-1670,

52

1415-1647, 1489-1793, 1493-1722, 1493-1742, 1497-1747, 1502-2107, 1533-1784, 1533-1790, 1533-1791, 1533-2058, 1533-2125, 1573-2064, 1579-2048, 1585-2098, 1585-2133, 1598-2059, 1599-2008, 1599-2022, 1632-1891, 1655-1711, 1667-1958, 1668-1955, 1671-1892, 1671-2412, 1726-2201, 1737-2214, 1762-1936, 1780-2083, 1802-2065, 1802-2364, 1840-2147, 1848-2127, 1854-2080, 1869-2109, 1889-1989, 1889-2169, 1917-2165, 1917-2212, 1918-2182, 1924-2206, 1953-2219, 1967-2257, 1969-2156, 1998-2421, 2059-2203, 2059-2377, 2070-2286, 2070-2400, 2104-2315, 2104-2495, 2110-2400, 2110-2534, 2136-2418, 2143-2368, 2160-2427, 2192-2407, 2192-2412, 2205-2443, 2207-2473, 2207-2474, 2255-2502, 2263-2504, 2282-2448, 2282-2516, 2290-2537, 2326-2462

表 4 - 1 5

ボリヌクレオチド SEQ ID NO/ Incyte ID/配 列長	配列断片
53/7503506CB1/ 2526	1-471, 1-2505, 46-537, 113-743, 113-800, 113-850, 113-871, 114-589, 114-856, 117-857, 124-619, 648-1320, 649-984, 649-1030, 649-1036, 649-1040, 649-1067, 649-1092, 649-1121, 649-1128, 649-1130, 649-1131, 649-1132, 649-1135, 649-1147, 649-1149, 649-1167, 649-1174, 651-978, 653-785, 653-1030, 655-1197, 655-1300, 657-1053, 657-1086, 657-1154, 657-1195, 657-1244, 657-1262, 657-1297, 657-1300, 657-1320, 658-1069, 658-1249, 667-1001, 667-1128, 667-1135, 672-908, 676-1014, 684-1142, 691-826, 691-880, 691-901, 691-1025, 691-1029, 691-1149, 691-1156, 691-1173, 693-891, 700-1103, 710-981, 719-967, 759-906, 762-1255, 766-1309, 767-1000, 767-1133, 793-1322, 839-1255, 840-1395, 864-1328, 954-1265, 956-1265, 968-1603, 1055-1339, 1091-1338, 1151-1385, 1178-1398,
54/7503509CB1/2 464	1281-1705, 1396-1659, 1396-1689, 1404-1636, 1478-1782, 1482-1711, 1482-1731, 1486-1736, 1491-2096, 1522-1773, 1522-1779, 1522-1780, 1522-2047, 1522-2114, 1562-2053, 1568-2037, 1574-2087, 1574-2122, 1587-2048, 1588-1997, 1588-2011, 1621-1880, 1644-1700, 1656-1947, 1657-1944, 1660-1881, 1660-2401, 1715-2190, 1726-2203, 1751-1925, 1769-2072, 1791-2054, 1791-2353, 1829-2136, 1837-2116, 1843-2069, 1858-2098, 1878-1978, 1878-2158, 1906-2154, 1906-2201, 1907-2171, 1913-2195, 1942-2208, 1956-2246, 1958-2145, 1987-2410, 2048-2192, 2048-2366, 2059-2275, 2059-2389, 2093-2304, 2093-2484, 2099-2389, 2099-2523, 2125-2407, 2132-2357, 2149-2416, 2181-2396, 2181-2401, 2194-2432, 2196-2462, 2196-2463, 2244-2491, 2252-2493, 2271-2437, 2271-2505, 2279-2526, 2315-2451 1-471, 1-2443, 46-537, 113-743, 114-589, 124-619, 649-1123, 796-1107, 798-1107, 820-1312, 897-1181, 910-1554, 933-1180, 933-1280, 987-1528, 993-1227, 1002-1302, 1017-1266, 1020-1438, 1106-1627, 1109-1627, 1115-1627, 1126-1627, 1190-1468, 1203-1877, 1211-1635, 1212-1468, 1244-1541, 1322-1597, 1342-1574, 1416-1720, 1420-1649, 1420-1669, 1424-1674, 1429-2034, 1460-1711, 1460-1717, 1460-1718, 1460-1985, 1460-2052, 1500-1991, 1506-1975, 1512-2025, 1512-2060, 1525-1986, 1526-1935, 1526-1949, 1559-1818, 1582-1638, 1594-1885, 1595-1882, 1598-1819, 1598-2339, 1653-2128, 1664-2141, 1689-1863, 1707-2010, 1729-1992, 1729-2291, 1767-2074, 1775-2054, 1781-2007, 1796-2036, 1816-1916, 1816-2096, 1844-2092, 1844-2139, 1845-2109, 1851-2133, 1880-2146, 1894-2184, 1896-2083, 1925-2348, 1986-2130, 1986-2304, 1997-2213, 1997-2327, 2031-2242, 2031-2422, 2037-2327, 2037-2461, 2063-2345, 2070-2295, 2087-2354, 2119-2334, 2119-2339, 2132-2370, 2134-2400, 2134-2401, 2182-2429, 2190-2431, 2209-2375, 2209-2443, 2217-2464, 2253-2389

表 4 - 1 6

ポリヌクレオチド SEQ ID NO/ Incyte ID/配 列長	配列断片
55/7505800CBI/ 1452	1-211, 1-1447, 3-294, 3-369, 3-401, 3-402, 3-447, 3-517, 3-537, 3-577, 3-603, 3-607, 3-637, 3-639, 3-694, 3-721, 3-846, 6-728, 18-133, 39-503, 40-619, 40-767, 50-736, 51-327, 60-778, 80-285, 99-469, 129-866, 210-438, 210-463, 210-576, 210-735, 227-485, 241-590, 244-516, 248-551, 260-567, 263-396, 265-500, 265-1060, 268-520, 268-835, 271-567, 278-716, 298-551, 304-1167, 315-638, 341-801, 370-533, 370-595, 372-878, 373-1243, 376-626, 377-874, 377-1017, 386-666, 390-793, 399-655, 400-636, 401-614, 403-646, 405-697, 405-1032, 407-586, 415-907, 424-582, 426-690, 440-571, 442-701, 451-671, 452-1173, 469-732, 479-757, 482-765, 506-618, 524-1314, 525-787, 548-1165, 553-787, 559-805, 559-814, 561-1414, 564-1415, 576-1395, 577-782, 577-942, 582-750, 584-824, 587-748, 587-880, 592-882, 592-894, 599-807, 599-916, 599-1090, 600-1147, 601-814, 608-872, 608-1038, 617-944, 620-1397, 624-1238, 626-1124, 627-899, 628-889, 629-941, 630-806, 631-1446, 640-828, 641-918, 642-1077, 643-856, 653-1107, 655-881, 658-1430, 664-1137, 671-968, 671-1161, 677-1224, 683-1446, 684-1119, 690-1333, 703-1443, 705-1385, 709-1451, 715-1452, 718-1411, 719-1446, 722-1448, 722-1451, 724-1271, 724-1452, 725-1002, 729-1021, 729-1104, 733-1452, 734-1449, 743-1452, 744-1310, 746-1054, 748-1450, 748-1451, 757-1451, 758-1401, 759-1446, 761-1452, 765-984, 766-1452, 767-1391, 768-1006, 771-1451, 775-905, 780-1452, 781-1117, 784-1452, 789-1452, 791-1450, 802-1452, 808-1451, 810-1451, 815-1452, 816-1070, 816-1402, 820-1437, 821-1452, 831-1065, 831-1106, 833-1144, 833-1436, 835-1370, 837-1314, 837-1452, 838-1118, 843-1431, 847-1447, 850-1034, 853-1093, 856-1372, 858-1115, 863-1450, 868-1132, 872-1452, 874-1380, 875-1131, 875-1452, 876-1174, 879-1056, 879-1452, 881-1312, 887-1107, 893-1442, 893-1452, 896-1452, 897-1144, 902-1125, 903-1131, 911-1452, 919-1452, 925-1452, 926-1406, 933-1450, 933-1452, 938-1409, 943-1247, 948-1452, 951-1154, 952-1452, 959-1440, 959-1450, 961-1382, 962-1233, 964-1237, 974-1189, 975-1247, 975-1448, 977-1163, 977-1452, 979-1452, 984-1449, 985-1447, 985-1452, 987-1452, 989-1452, 992-1299, 992-1451, 992-1452, 998-1450, 998-1452, 999-1449, 1004-1448, 1004-1450, 1009-1452, 1014-1450, 1015-1290, 1016-1452, 1017-1282, 1017-1303, 1019-1449, 1019-1452, 1020-1452, 1022-1447, 1022-1452, 1024-1284, 1026-1450, 1026-1452, 1027-1452, 1028-1310, 1029-1447, 1029-1452, 1030-1289, 1031-1452, 1032-1447, 1033-1448, 1034-1445, 1035-1446, 1035-1448, 1037-1447, 1040-1452,

表 4 - 1 7

ポリヌクレオチド SEQ ID NO/ Incyte ID/配 列長	配列断片
56/7503141CB1/1 802	<p>1041-1370, 1041-1451, 1042-1450, 1045-1452, 1047-1452, 1050-1447, 1051-1328, 1053-1447, 1056-1452, 1063-1354, 1064-1452, 1065-1452, 1066-1443, 1067-1447, 1067-1448, 1069-1452, 1070-1443, 1070-1447, 1070-1452, 1071-1446, 1071-1447, 1071-1452, 1072-1448, 1076-1452, 1078-1452, 1081-1445, 1082-1318, 1083-1450, 1089-1382, 1089-1437, 1089-1452, 1092-1443, 1092-1452, 1097-1447, 1099-1356, 1103-1305, 1103-1450, 1104-1448, 1106-1376, 1106-1384, 1108-1452, 1109-1390, 1123-1448, 1129-1448, 1130-1447, 1137-1435, 1143-1450, 1144-1412, 1145-1450, 1150-1452, 1151-1452, 1152-1447, 1155-1448, 1155-1448, 1155-1452, 1160-1430, 1160-1445, 1160-1447, 1161-1450, 1162-1368, 1171-1413, 1172-1447, 1172-1448, 1188-1452, 1191-1450, 1199-1452, 1200-1448, 1201-1452, 1203-1447, 1205-1452, 1217-1452, 1238-1447, 1238-1448, 1238-1449, 1242-1452, 1257-1445, 1257-1447, 1259-1452, 1270-1452, 1275-1452, 1280-1447, 1297-1450, 1297-1452, 1310-1452, 1316-1448, 1317-1447, 1319-1445, 1331-1447, 1332-1447, 1352-1447</p> <p>1-142, 1-281, 1-286, 1-296, 1-304, 1-339, 1-358, 1-365, 1-369, 1-425, 1-454, 1-480, 1-510, 1-520, 1-532, 1-537, 1-565, 1-568, 3-194, 3-263, 3-281, 3-293, 4-195, 4-202, 4-232, 4-246, 4-264, 4-269, 4-302, 4-484, 4-543, 6-567, 7-249, 7-568, 8-223, 8-239, 8-250, 8-279, 8-315, 10-244, 10-446, 10-501, 10-520, 10-528, 10-1789, 11-266, 11-268, 11-283, 12-243, 12-248, 12-273, 12-292, 12-293, 12-525, 13-278, 13-286, 13-290, 14-129, 14-256, 14-286, 14-307, 19-481, 21-252, 21-256, 21-309, 21-316, 21-365, 21-369, 22-129, 22-143, 22-176, 22-255, 22-291, 22-292, 22-300, 22-301, 22-369, 22-413, 22-446, 22-528, 22-559, 22-568, 24-493, 24-568, 27-369, 29-291, 32-250, 33-448, 39-340, 47-301, 49-369, 51-458, 51-563, 53-252, 64-680, 82-504, 85-568, 101-568, 120-390, 139-301, 160-466, 229-458, 251-472, 251-537, 254-568, 274-486, 274-491, 296-568, 302-761, 303-379, 303-844, 305-475, 314-564, 318-559, 321-544, 325-542, 359-568,</p> <p>419-568, 566-798, 575-1270, 630-1325, 637-1271, 638-1133, 642-892, 645-1222, 645-1349, 646-887, 652-1026, 670-1392, 679-971, 701-1264, 705-1394, 709-1340, 713-969, 726-1325, 736-1308, 739-1002, 743-1376, 744-1386, 757-1037, 757-1042, 757-1065, 758-1394, 769-1023, 780-1332, 781-1027, 781-1281, 782-1063, 783-1440, 788-1638, 792-1061, 792-1081, 812-1040, 814-1044, 814-1214, 816-919, 817-1093, 822-1348, 825-1052, 828-1399, 831-1111, 846-1071, 849-1399, 860-1058, 860-1070, 860-1399, 866-1452, 866-1555, 874-1650, 875-1170, 875-1248, 875-1263, 875-1304, 875-1329, 875-1334, 875-1341, 875-1358, 875-1371, 875-1375, 875-1381, 875-1389, 875-1395, 875-1396, 875-1403, 875-1405, 875-1412, 875-1418, 875-1431, 875-1469, 875-1472, 875-1474, 875-1491, 875-1506, 875-1509, 875-1530, 875-1533, 875-1540, 875-1542, 875-1550, 875-1615, 875-1629, 875-1641, 875-1670, 882-1393, 886-1162, 886-1733, 893-1171, 893-1183, 894-1126, 896-1156, 900-1549, 904-1156, 904-1514, 907-1395, 921-1768, 923-1696.</p>

【表 4 - 1 8】

表 4 - 1 8

ポリヌクレオチド SEQ ID NO/ Incyte ID/配 列長	配列断片
56	927-1171, 931-1396, 941-1742, 945-1134, 952-1218, 953-1477, 959-1170, 959-1186, 969-1216, 976-1240, 989-1430, 992-1269, 995-1269, 1003-1343, 1010-1235, 1017-1727, 1023-1279, 1023-1300, 1023-1704, 1026-1304, 1027-1241, 1027-1325, 1027-1636, 1030-1744, 1040-1755, 1042-1787, 1043-1205, 1043-1308, 1045-1226, 1047-1671, 1064-1618, 1075-1748, 1076-1761, 1079-1351, 1084-1705, 1086-1719, 1092-1769, 1114-1393, 1121-1630, 1124-1706, 1124-1755, 1125-1799, 1127-1785, 1133-1395, 1134-1787, 1136-1758, 1138-1622, 1141-1765, 1141-1802, 1144-1477, 1145-1704, 1148-1786, 1156-1772, 1167-1333, 1168-1441, 1168-1701, 1168-1762, 1168-1786, 1176-1474, 1180-1423, 1186-1456, 1191-1798, 1200-1787, 1205-1515, 1212-1753, 1224-1761, 1224-1787, 1226-1785, 1234-1515, 1234-1787, 1236-1433, 1236-1752, 1236-1772, 1236-1785, 1237-1786, 1264-1500, 1264-1790, 1264-1793, 1275-1796, 1282-1604, 1282-1772, 1285-1795, 1286-1794, 1301-1796, 1302-1588, 1304-1772, 1308-1772,
57/7500362CB1/ 1833	1312-1766, 1315-1772, 1321-1772, 1322-1772, 1325-1796, 1327-1772, 1328-1766, 1328-1785, 1337-1772, 1337-1799, 1340-1780, 1342-1766, 1342-1772, 1343-1772, 1344-1772, 1345-1588, 1345-1772, 1348-1775, 1349-1781, 1356-1772, 1358-1770, 1359-1773, 1363-1772, 1366-1772, 1368-1802, 1369-1772, 1374-1772, 1375-1766, 1375-1772, 1379-1765, 1380-1802, 1386-1701, 1386-1714, 1393-1772, 1401-1785, 1401-1802, 1407-1772, 1408-1772, 1409-1703, 1415-1786, 1415-1787, 1423-1704, 1425-1772, 1433-1787, 1434-1782, 1437-1668, 1441-1692, 1448-1772, 1464-1772, 1466-1786, 1472-1757, 1477-1611, 1478-1789, 1479-1750, 1484-1759, 1485-1743, 1485-1772, 1491-1772, 1498-1748, 1498-1772, 1503-1772, 1512-1777, 1515-1786, 1530-1779, 1534-1772, 1553-1772, 1559-1772, 1568-1786, 1579-1785, 1599-1802, 1611-1802, 1612-1784, 1621-1802, 1629-1802, 1637-1767, 1637-1797, 1654-1775, 1673-1799, 1682-1767, 1711-1787 1-133, 1-147, 1-151, 1-1833, 5-120, 13-120, 13-134, 13-147, 89-761, 90-308, 90-309, 90-469, 90-508, 90-545, 90-682, 90-767, 154-383, 154-682, 155-769, 170-952, 176-397, 176-462, 179-559, 199-411, 199-416, 210-846, 214-834, 219-742, 219-809, 221-513, 227-621, 227-640, 227-700, 227-737, 227-762, 227-800, 227-808, 227-809, 227-821, 227-866, 227-882, 227-907, 228-304, 228-710, 228-745, 228-752, 228-761, 228-762, 228-776, 228-779, 228-786, 228-812, 228-820, 228-853, 228-865, 228-866, 228-873, 228-876, 228-899, 228-902, 228-926, 229-805, 230-400, 230-898, 239-489, 243-484, 246-469, 249-562,

表 4 - 1 9

ポリヌクレオチド SEQ ID NO/ Incyte ID/配 列長	配列断片
57	250-467, 267-854, 268-966, 271-953, 274-751, 275-936, 284-510, 285-528, 285-560, 297-1056, 334-594, 334-933, 336-624, 337-901, 337-816, 343-1042, 344-754, 348-745, 348-854, 373-643, 386-1091, 390-607, 420-676, 428-678, 444-659, 463-724, 468-1108, 474-730, 477-712, 480-723, 484-761, 484-776, 484-812, 491-758, 493-747, 494-1121, 498-725, 498-738, 498-773, 501-1102, 512-802, 513-810, 519-764, 528-996, 530-1180, 537-1184, 548-921, 551-765, 552-1073, 565-1212, 567-1203, 574-795, 576-856, 584-807, 590-1146, 594-835, 604-874, 611-870, 614-846, 614-848, 623-1318, 650-843, 678-1373, 685-1319, 686-1181, 690-940, 693-1270, 693-1397, 694-935, 698-986, 699-953, 700-976, 700-1074, 718-976, 718-1440, 727-1019, 749-1312, 753-1442, 757-1388, 761-1017, 774-1373, 784-1356, 787-1050, 791-1424, 792-1434, 805-1085, 805-1090, 805-1113, 806-1442, 817-1071, 828-1380, 829-1075, 829-1329, 830-1111, 831-1488, 836-1682, 840-1109, 840-1129, 860-1088, 862-1092, 862-1262, 864-967, 865-1141, 870-1396, 873-1100, 876-1447, 879-1159, 894-1119, 897-1447, 908-1447, 914-1500, 914-1634, 922-1694, 923-1218, 923-1296, 923-1311, 923-1352, 923-1377, 923-1382, 923-1389, 923-1406, 923-1419, 923-1423, 923-1429, 923-1437, 923-1443, 923-1444, 923-1451, 923-1453, 923-1460, 923-1466, 923-1479, 923-1517, 923-1520, 923-1522, 923-1539, 923-1554, 923-1557, 923-1578, 923-1581, 923-1588, 923-1590, 923-1598, 923-1659, 923-1673, 923-1685, 923-1714, 930-1441, 934-1210, 934-1777, 941-1219, 941-1231, 942-1174, 944-1204, 948-1609, 952-1204, 952-1562, 955-1443, 969-1812, 971-1740, 975-1219, 979-1444, 989-1786, 993-1182, 1001-1525, 1007-1234, 1037-1478, 1040-1317, 1043-1317, 1051-1391, 1058-1283, 1065-1771, 1071-1327, 1071-1348, 1071-1748, 1074-1352, 1075-1289, 1075-1373, 1075-1680, 1078-1788, 1088-1799, 1091-1253, 1091-1356, 1095-1715, 1112-1662, 1123-1792, 1124-1805, 1127-1399, 1132-1749, 1134-1763, 1140-1813, 1162-1441, 1169-1674, 1172-1750, 1172-1799, 1173-1833, 1175-1829, 1181-1443, 1184-1802, 1186-1666, 1189-1809, 1189-1833, 1192-1525, 1193-1748, 1196-1830, 1204-1816, 1216-1489, 1216-1745, 1216-1806, 1224-1522, 1228-1471, 1234-1504, 1239-1833, 1253-1563, 1260-1797, 1272-1805, 1274-1814, 1282-1563, 1282-1831, 1284-1481, 1284-1796, 1284-1829, 1285-1830, 1312-1548, 1323-1833, 1330-1648, 1330-1825, 1334-1833, 1352-1820, 1356-1818, 1360-1810, 1372-1652, 1373-1833, 1376-1814, 1385-1833, 1406-1814, 1455-1822, 1612-1830, 1643-1833, 1655-1833, 1656-1828, 1665-1833, 1673-1833, 1681-1833, 1717-1833, 1726-1811, 1737-1819

表 4 - 2 0

ポリヌクレオチド SEQ ID NO/ Incyte ID/配 列長	配列断片
58/7503328CBI/2 465	1-262, 1-286, 1-308, 1-317, 1-325, 1-496, 1-501, 1-512, 1-621, 2-201, 4-296, 8-233, 8-246, 8-524, 8-535, 8-2463, 15-699, 15-774, 15-783, 15-809, 15-854, 15-903, 16-771, 19-265, 22-187, 22-235, 27-457, 27-631, 38-731, 39-627, 44-243, 44-592, 44-642, 49-645, 50-181, 50-325, 56-175, 56-543, 58-170, 58-329, 60-352, 62-302, 63-206, 64-335, 67-330, 69-294, 69-360, 69-548, 69-598, 69-613, 71-630, 71-747, 73-560, 73-730, 76-545, 84-685, 88-392, 89-636, 90-312, 90-681, 97-377, 98-662, 100-375, 100-736, 103-368, 106-369, 109-691, 109-764, 134-386, 139-616, 139-767, 147-731, 182-675, 182-692, 184-710, 184-719, 190-758, 190-836, 195-451, 195-720, 195-747, 208-611, 232-780, 282-531, 290-520, 342-798, 345-790,
	351-914, 366-614, 371-675, 407-880, 407-984, 420-914, 439-883, 459-1000, 472-961, 473-810, 480-1017, 488-797, 491-1048, 510-1060, 524-1084, 549-1100, 574-1139, 578-856, 581-1139, 584-845, 586-789, 587-815, 593-1014, 593-1136, 593-1139, 593-1141, 600-850, 608-888, 608-1040, 615-1024, 615-1079, 615-1082, 617-1036, 636-884, 636-1106, 636-1153, 640-1270, 644-1278, 648-1192, 660-1105, 669-956, 669-1192, 669-1305, 677-956, 681-1325, 688-1010, 688-1075, 688-1279, 689-1265, 698-971, 698-1289, 705-1168, 705-1169, 705-1192, 709-1079, 709-1189, 719-1188, 726-1291, 730-1279, 734-1293, 747-1075, 748-1023, 764-1192, 764-1352, 765-1079, 765-1192, 767-1278, 770-1244, 794-1352, 799-1268, 802-1304, 804-1344, 816-1329, 816-1344, 816-1352, 817-1079, 817-1141, 817-1153, 817-1236, 817-1279,
	817-1280, 817-1350, 818-1236, 829-1111, 846-1062, 849-1222, 863-1289, 872-1093, 893-1114, 896-1352, 900-1157, 926-1351, 930-1352, 939-1214, 965-1232, 1008-1351, 1023-1305, 1059-1233, 1075-1304, 1125-1352, 1125-1418, 1125-1466, 1128-1410, 1178-1352, 1355-1904, 1360-2036, 1366-1862, 1376-1725, 1380-1645, 1384-1862, 1384-1883, 1404-1928, 1419-1639, 1426-1864, 1432-2008, 1433-1662, 1433-2036, 1437-1743, 1467-1752, 1467-1782, 1467-1788, 1475-2009, 1479-1771, 1490-1904, 1493-1936, 1498-2090, 1508-1815, 1518-1788, 1528-1772, 1572-2194, 1574-2167, 1579-1828, 1588-1984, 1597-1842, 1599-2178, 1601-1977, 1601-2159, 1601-2175, 1601-2189, 1610-1884, 1611-1815, 1616-1830, 1616-2202, 1631-1788, 1636-1860, 1650-2102, 1652-2180, 1659-2431, 1667-2405, 1668-1859, 1669-2211, 1681-2369, 1700-1990, 1719-1966, 1725-2445, 1727-2314, 1732-1989, 1732-2325, 1735-2434, 1741-2328, 1753-2381, 1755-2404, 1763-2434, 1779-2075, 1779-2431, 1783-2404, 1783-2442,

表 4 - 2 1

ポリヌクレオチド SEQ ID NO/ Incyte ID/配 列長	配列断片
---	------

58
 1791-2400, 1798-2398, 1799-2412, 1799-2433, 1806-2222, 1808-2437, 1810-2465, 1811-2434, 1823-2092, 1825-2060, 1830-2465, 1832-2325, 1835-2061, 1835-2104, 1838-2073, 1839-2435, 1843-2130, 1845-2102, 1850-2098, 1852-2410, 1859-2325, 1869-2142, 1873-2451, 1878-2382, 1902-2443, 1903-2172, 1903-2438, 1903-2445, 1903-2459, 1904-2156, 1905-2201, 1906-2378, 1912-2145, 1915-2325, 1919-2266, 1922-2440, 1923-2219, 1924-2406, 1925-2442, 1929-2169, 1929-2465, 1941-2240, 1943-2465, 1944-2465, 1952-2130, 1952-2199, 1952-2451, 1956-2189, 1964-2160, 1964-2464, 1964-2465, 1967-2231, 1970-2455, 1971-2167, 1974-2437, 1974-2465, 1984-2401, 1984-2464, 1984-2465, 1985-2453, 1991-2349, 1992-2449, 1992-2451, 1994-2451, 1995-2242, 1996-2451, 1996-2465, 2002-2216, 2002-2453, 2004-2250, 2007-2228, 2007-2457, 2011-2453, 2011-2465, 2015-2401, 2015-2454, 2015-2457, 2016-2401, 2019-2401, 2021-2401, 2021-2450, 2022-2465, 2023-2465, 2024-2465, 2025-2281, 2025-2465, 2030-2465, 2031-2238, 2033-2450, 2036-2450, 2037-2401, 2038-2401, 2039-2401, 2041-2401, 2042-2387, 2043-2401, 2043-2451, 2043-2465, 2045-2401, 2047-2455, 2048-2291, 2049-2465, 2052-2401, 2053-2401, 2055-2401, 2056-2318, 2057-2401, 2058-2318, 2058-2319, 2059-2307, 2061-2465, 2062-2401, 2063-2394, 2068-2401, 2070-2465, 2079-2291, 2082-2312, 2082-2338, 2086-2451, 2092-2349, 2093-2368, 2097-2352, 2097-2449, 2097-2451, 2098-2346, 2100-2401, 2101-2450, 2101-2465, 2103-2449, 2103-2451, 2103-2465, 2108-2401, 2109-2452, 2118-2401, 2121-2401, 2128-2465, 2136-2356, 2136-2427, 2143-2386, 2151-2401, 2158-2465, 2160-2401, 2166-2434, 2167-2455, 2169-2401, 2178-2401, 2180-2454, 2181-2463, 2188-2401, 2205-2465, 2214-2451, 2216-2443, 2219-2401, 2219-2451, 2234-2465, 2238-2451, 2239-2465, 2242-2376, 2243-2452, 2253-2464, 2272-2401, 2279-2401, 2286-2454, 2308-2451, 2323-2401, 2349-2465, 2396-2465

59/7510464CBI/2
 560
 1-308, 1-325, 1-374, 1-496, 1-501, 1-512, 2-201, 4-296, 6-249, 6-317, 8-233, 8-246, 8-480, 8-535, 8-2555, 15-699, 15-760, 15-783, 15-809, 16-771, 19-265, 22-187, 22-235, 27-457, 30-165, 38-731, 43-286, 44-243, 49-645, 50-181, 50-325, 50-729, 56-175, 56-543, 56-674, 57-639, 57-641, 57-772, 57-774, 58-170, 58-329, 60-352, 62-302, 67-330, 69-294, 69-360, 69-391, 69-548, 69-613, 70-335, 71-630, 71-747, 73-455, 75-545, 77-917, 80-557, 80-614, 84-685, 88-165, 88-392, 89-422, 89-730, 90-312, 90-642, 90-681, 96-631, 97-200, 100-375, 100-736, 101-704, 103-368, 106-369, 109-691, 109-764, 110-304, 126-704, 134-386, 139-616, 139-767, 147-731, 173-781, 182-675, 182-692, 184-710, 184-719, 187-373, 188-542, 190-758, 190-836, 195-451, 195-677, 195-747, 208-611, 212-921, 232-780, 261-797, 281-911, 281-934, 282-531, 285-662, 290-520, 303-852, 307-816, 329-583, 342-798, 345-790, 347-816, 347-861, 366-614, 371-675, 371-921, 372-898, 379-584, 402-932, 404-882, 407-969, 407-984, 443-833, 447-559, 452-838, 464-1045,

【表 4 - 2 2】

表 4 - 2 2

ポリヌクレオチド SEQ ID NO/ Incyte ID/配 列長	配列断片
59	581-1139, 593-1139, 600-850, 615-1024, 640-1270, 681-1325, 688-1087, 698-1289, 709-1189, 719-1188, 726-1291, 734-1293, 764-1192, 765-1192, 770-1244, 799-1268, 804-1344, 817-1083, 817-1153, 817-1236, 817-1279, 817-1280, 829-1111, 840-1379, 840-1455, 846-1062, 846-1369, 857-1404, 859-1406, 862-1507, 863-1289, 872-1093, 872-1415, 883-1481, 896-1352, 903-1507, 923-1619, 930-1360, 931-1374, 948-1507, 958-1506, 965-1232, 970-1458, 987-1484, 993-1535, 1005-1490, 1008-1351, 1019-1563, 1023-1305, 1030-1507, 1047-1442, 1054-1488, 1071-1609, 1076-1507, 1080-1473, 1080-1507, 1080-1552, 1083-1527, 1091-1376, 1091-1445, 1101-1617, 1105-1555, 1109-1540, 1111-1540, 1119-1650, 1125-1393, 1153-1552, 1154-1507, 1162-1417, 1168-1640, 1187-1467, 1197-1746, 1200-1676, 1205-1852, 1212-1468, 1212-1517, 1214-1564, 1216-1484, 1222-1507, 1224-1875, 1227-1565, 1227-1657, 1235-1664, 1237-1634, 1239-1446, 1239-2027, 1243-1520, 1245-1800, 1253-1590, 1268-1531, 1274-1609, 1278-1562, 1280-1731, 1288-1856, 1295-1855, 1305-1778, 1321-1718, 1321-1791, 1327-1882, 1338-1834, 1348-1799, 1349-1727, 1360-1452, 1365-1720, 1384-2025, 1389-1950, 1396-2128, 1400-1896, 1406-1609, 1406-1692, 1416-1970, 1418-1896, 1418-1917, 1423-1581, 1436-1854, 1437-2119, 1460-1898, 1471-1777, 1489-2004, 1501-1726, 1501-1822, 1512-1757, 1513-1805, 1522-2121, 1524-1959, 1534-2108, 1542-1849, 1544-1780, 1560-2128, 1562-1806, 1606-1918, 1619-2239, 1631-1876, 1644-1918, 1650-1864, 1665-1822, 1702-1893, 1803-2281, 1830-2444, 1860-2132, 1902-2504, 1965-2551, 1992-2508, 1994-2264, 1995-2535, 1999-2470, 2004-2237, 2007-2417, 2015-2311, 2016-2498, 2021-2261, 2021-2560, 2025-2504, 2035-2558, 2036-2560, 2044-2475, 2048-2281, 2056-2557, 2059-2323, 2062-2547, 2066-2503, 2066-2559, 2076-2493, 2076-2557, 2076-2558, 2077-2545, 2078-2502, 2081-2500, 2084-2551, 2087-2334, 2088-2560, 2091-2509, 2095-2308, 2096-2342, 2099-2320, 2099-2549, 2103-2545, 2104-2546, 2106-2549, 2107-2493, 2108-2493, 2111-2493, 2111-2493, 2113-2542, 2114-2559, 2115-2557, 2117-2373, 2117-2560, 2122-2560, 2123-2327, 2125-2542, 2128-2542, 2129-2493, 2130-2493, 2131-2493, 2133-2493, 2134-2479, 2135-2493, 2135-2504, 2135-2543, 2135-2557, 2137-2493, 2139-2547, 2140-2383, 2141-2557, 2143-2493, 2144-2493, 2145-2493, 2147-2493, 2149-2493, 2151-2399, 2153-2558, 2155-2486, 2160-2493, 2162-2560, 2171-2383, 2174-2404, 2174-2430, 2178-2543, 2184-2441, 2185-2460, 2189-2444, 2189-2551, 2190-2438, 2192-2493, 2193-2560, 2195-2543, 2195-2560, 2201-2544, 2210-2493, 2213-2493, 2228-2448, 2228-2519, 2235-2478, 2243-2493, 2250-2560, 2252-2493, 2258-2526, 2259-2547, 2261-2493, 2270-2493, 2272-2546, 2273-2555, 2280-2493, 2306-2543, 2311-2493, 2311-2543, 2326-2557, 2330-2543, 2331-2560, 2334-2468, 2335-2544, 2345-2560, 2364-2493, 2367-2560, 2371-2493, 2378-2546, 2415-2493, 2488-2557

表 4 - 2 3

ポリヌクレオチド SEQ ID NO/ Incyte ID/配 列長	配列断片
60/7510394CB1/2	1-351, 4-299, 4-2254, 5-266, 5-292, 5-311, 6-639, 9-261, 9-274, 9-276, 10-263, 10-277, 10-305, 12-232,
254	12-257, 13-245, 13-284, 13-294, 15-296, 24-274, 32-263, 50-289, 52-553, 83-218, 108-281, 450-714,
	452-914, 452-1035, 454-1108, 455-984, 455-993, 455-1039, 457-1294, 467-963, 474-1083, 482-1086,
	483-896, 487-994, 500-693, 500-796, 500-1000, 500-1088, 502-737, 502-1062, 512-777, 517-992, 517-
	1102, 519-896, 519-1068, 520-650, 524-1118, 529-1094, 543-841, 554-845, 556-1050, 564-797, 565-
	1423, 574-1164, 575-1051, 578-1086, 584-1190, 588-1161, 590-836, 597-1118, 607-861, 610-1202,
	612-1169, 613-1207, 618-1156, 635-1255, 642-1333, 648-1304, 650-881, 653-895, 655-915, 656-955,
	660-931, 660-1272, 667-1262, 670-1162, 673-1040, 674-1305, 686-1093, 698-968, 705-1248, 724-970,
	728-1091, 728-1122, 729-1224, 731-1000, 731-1278, 736-1091, 742-1341, 748-1321, 754-1018, 754-
	1029, 757-1005, 759-1248, 761-1344, 763-1507, 765-1057, 770-1182, 771-1004, 771-1029, 771-1041,
	774-1054, 774-1059,
	776-1272, 776-1484, 779-1364, 781-902, 784-1040, 787-1333, 796-1023, 796-1091, 802-1044, 802-
	1392, 822-1480, 828-1085, 830-1454, 840-1099, 841-1302, 841-1350, 841-1374, 841-1582, 841-1586,
	841-1607,
	841-1692, 844-1551, 847-1108, 848-1028, 849-1099, 851-1105, 858-1326, 863-1431, 866-1463, 875-
	1123, 878-1166, 880-1479, 882-1412, 882-1455, 885-1547, 886-1348, 898-1407, 908-1047, 911-1556,
	912-1479, 921-1450, 931-1468, 940-1227, 950-1183, 952-1375, 953-1558, 954-1203, 954-1616, 960-
	1264, 962-1660, 963-1645, 970-1582, 972-1593, 977-1213, 977-1220, 981-1602, 982-1276, 992-1500,
	995-1276, 1000-1339, 1000-1634, 1001-1284, 1003-1248, 1009-1617, 1014-1259, 1018-1144, 1018-
	1206, 1028-1734, 1031-1311, 1033-1273, 1038-1699, 1039-1614, 1041-1309, 1042-1580, 1045-1384,
	1050-1322, 1054-1323, 1054-1331, 1059-1291, 1060-1553, 1062-1314, 1064-1277, 1064-1337, 1064-
	1341, 1064-1352, 1067-1297, 1072-1324, 1072-1651, 1072-1668, 1082-1359, 1082-1377, 1097-1752,
	1099-1531, 1102-1720, 1104-1680, 1108-1367, 1109-1361, 1109-1363, 1109-1407, 1112-1424, 1115-
	1315, 1115-1330, 1123-1754, 1124-1371, 1125-1372, 1131-1362, 1133-1367, 1133-1705, 1134-1721,
	1135-1312,

表 4 - 2 4

ポリヌクレオチド SEQ ID NO/ Incyte ID/配 列長	配列断片
---	------

60
 1135-1421, 1159-1770, 1162-1465, 1172-1479, 1174-1440, 1177-1366, 1179-1402, 1182-1511, 1182-1718, 1187-1440, 1187-1469, 1187-1482, 1189-1461, 1189-1810, 1191-1840, 1192-1282, 1192-1505, 1203-1733, 1208-1794, 1211-1912, 1212-1484, 1220-1477, 1220-1717, 1220-1734, 1221-1488, 1222-1653, 1226-1730, 1229-1354, 1231-1515, 1231-1869, 1232-1819, 1237-1804, 1237-1881, 1241-1777, 1250-1484, 1251-1504, 1265-1443, 1275-1519, 1278-1918, 1284-1776, 1290-1547, 1295-1544, 1297-1580, 1301-1503, 1302-1993, 1304-1442, 1314-1578, 1314-1776, 1315-2007, 1321-1567, 1328-1596, 1331-1847, 1332-1901, 1341-1631, 1342-1584, 1342-1961, 1344-2131, 1348-1979, 1351-1900, 1354-1566, 1355-1602, 1357-1743, 1358-1643, 1360-1647, 1361-1576, 1373-2237, 1384-1666, 1386-1585, 1390-1622, 1390-2055, 1392-1624, 1392-1791, 1396-1990, 1397-2036, 1404-1796, 1407-1810, 1409-1670, 1409-1697, 1409-1904, 1410-1643, 1417-1995, 1428-1626, 1429-1705, 1431-1677, 1432-1738, 1434-1963, 1434-2058, 1437-1709, 1437-1869, 1444-1705, 1444-1707, 1449-1671, 1458-1715, 1462-1708, 1469-2018, 1473-1729, 1476-2190, 1477-1534, 1481-2201, 1486-1727, 1491-1719, 1491-1823, 1492-2244, 1494-1825, 1497-1750, 1499-2052, 1501-1758, 1506-1759, 1506-2111, 1507-2093, 1511-1792, 1511-1805, 1511-2174, 1512-1773, 1513-1807, 1513-2132, 1515-2052, 1527-1765, 1527-1794, 1527-2084, 1531-2125, 1533-1731, 1536-1993, 1542-2110, 1546-1796, 1548-2192, 1550-1860, 1558-2200, 1567-2105, 1570-2147, 1571-2052, 1571-2166, 1574-1876, 1576-2058, 1578-1836, 1580-1826, 1587-2059, 1588-2076, 1589-1989, 1589-2254, 1590-2200, 1590-2238, 1597-1835, 1598-1865, 1604-1854, 1604-1892, 1604-2008, 1604-2052, 1606-1861, 1607-1847, 1607-1859, 1609-2195, 1610-1833, 1611-2238, 1613-1875, 1613-1876, 1613-1881, 1616-2237, 1617-1994, 1620-1715, 1624-2079, 1627-2122, 1628-1913, 1628-2239, 1630-1902, 1632-2210, 1633-2227, 1634-1914, 1637-2252, 1638-1909, 1642-2236, 1644-2249, 1646-1908, 1654-2252, 1655-1949, 1658-2238, 1665-1950, 1665-1966, 1665-2254, 1666-1902, 1668-1936, 1675-1892, 1675-1912, 1675-2072, 1677-1874, 1677-1932, 1677-1953, 1677-2238, 1677-2251, 1678-2199, 1682-1888, 1684-2254, 1689-1940, 1689-2047, 1696-2200, 1699-2239, 1702-2254, 1706-1952, 1707-2254, 1712-2116, 1713-1859, 1723-1972, 1725-2239, 1727-1970, 1736-2055, 1736-2220, 1737-1954, 1738-1961, 1738-2201, 1738-2224, 1738-2227, 1742-2046, 1743-1997, 1746-1997, 1748-2253, 1752-2209, 1764-2034, 1770-2052, 1771-2210, 1771-2239, 1774-2246, 1775-2040, 1777-2254, 1781-2240, 1783-2025, 1785-2239, 1788-2254, 1791-2199, 1791-2254, 1793-2245, 1798-2242, 1800-1895, 1800-2204, 1802-2065, 1803-2237, 1805-2201, 1810-2205, 1811-2201, 1813-2247, 1815-2242, 1821-2239, 1822-2196, 1822-2238, 1822-2242, 1825-2238, 1825-2244, 1826-2085, 1827-2111, 1828-2238, 1830-2254, 1831-2238, 1831-2254, 1832-2169, 1832-2239, 1832-2251,

表 4 - 2 5

ポリヌクレオチド SEQ ID NO/ Incyte ID/配 列長	配列断片
---	------

60
 1832-2252, 1835-2238, 1837-2247, 1839-2245, 1841-2244, 1841-2247, 1842-2238, 1843-2142, 1844-2211, 1845-2123, 1845-2238, 1847-2216, 1848-2238, 1854-2248, 1857-2027, 1860-2254, 1861-2145, 1870-2085, 1870-2238, 1874-2239, 1875-2106, 1875-2254, 1877-2239, 1881-2254, 1884-2238, 1891-1913, 1891-2210, 1895-2238, 1899-2100, 1899-2242, 1904-2124, 1904-2239, 1913-2238, 1915-2194, 1915-2238, 1917-2201, 1917-2239, 1918-2238, 1920-2239, 1921-2238, 1922-2240, 1926-2126, 1926-2185, 1933-2222, 1934-2149, 1934-2159, 1934-2179, 1934-2242, 1935-2172, 1936-2213, 1936-2220, 1936-2239, 1938-2219, 1939-2219, 1947-2238, 1949-2244, 1971-2238, 1983-2182, 1985-2249, 1991-2244, 1993-2242, 1994-2238, 2037-2254, 2038-2254, 2043-2254, 2057-2254, 2071-2238, 2078-2254, 2081-2239, 2088-2254, 2100-2254, 2102-2238, 2123-2238, 2124-2252, 2125-2239, 2127-2254, 2142-2201, 2142-2237, 2142-2238, 2145-2254, 2149-2253, 2154-2238

61/7500745CBI/
2139

1-125, 1-249, 1-290, 1-294, 1-334, 2-233, 4-334, 7-250, 7-255, 7-259, 7-271, 7-279, 7-302, 7-2139, 8-269, 8-290, 8-295, 8-314, 8-324, 10-334, 12-264, 12-274, 12-277, 12-279, 13-266, 13-275, 13-278, 13-280, 13-281, 13-308, 15-235, 15-260, 15-270, 16-248, 16-287, 16-297, 16-314, 18-299, 27-277, 35-266, 53-292, 58-329, 71-254, 86-221, 86-314, 86-334, 111-284, 264-867, 333-597, 335-756, 335-797, 335-820, 335-844, 335-848, 335-918, 337-991, 338-867, 338-876, 338-922, 350-846, 356-816, 357-900, 357-966, 358-510, 358-616, 362-885, 365-934, 365-969, 366-779, 370-877, 377-759, 383-576, 383-620, 383-679, 383-940, 383-971, 385-620, 385-945, 395-660, 400-875, 400-985, 402-779, 402-951, 403-533, 407-1001, 412-977, 426-724, 437-728, 439-933, 447-680, 447-688, 454-996, 455-1066, 458-934, 461-969, 466-898, 467-1073,
 471-1044, 473-719, 490-744, 493-1085, 495-1052, 496-1090, 501-1039, 507-1106, 508-1036, 511-1102, 514-783, 518-1138, 525-1216, 531-1187, 533-764, 536-778, 538-683, 538-798, 539-838, 543-814, 550-1145, 553-1045, 556-923, 569-976, 581-851, 588-1131, 607-853, 611-974, 611-1005, 612-1107, 614-883, 614-1161, 619-974, 625-1224, 631-1204, 637-901, 637-912, 640-888, 642-1131, 644-1227, 646-1390, 648-940, 653-1065, 654-887, 654-924, 657-942, 657-1056, 658-1482, 659-861, 662-1247, 664-785, 667-923, 670-1216, 679-906, 679-974, 685-927, 685-1275, 705-1363, 711-873, 711-968, 713-1337, 724-1185, 724-1233, 724-1257, 724-1465, 724-1469, 724-1490, 724-1546, 724-1575, 727-1434, 730-991, 731-911, 732-982, 734-988, 741-1209, 746-1314, 758-1006, 761-1049, 763-1362, 765-1295, 765-1338, 768-1430, 769-1231, 781-1290, 791-930, 794-1439, 795-1362, 804-1333, 814-1351, 816-1044,

10

20

30

40

表 4 - 2 6

ポリヌクレオチド SEQ ID NO/ Incyte ID/配 列長	配列断片
---	------

61	<p>821-1083, 823-1110, 833-1066, 836-1441, 837-1086, 837-1499, 843-1147, 845-1543, 846-1528, 855-1476, 860-1096, 860-1103, 864-1485, 872-1159, 875-1383, 878-1159, 883-1517, 884-1167, 886-1131, 892-1500, 897-1142, 901-1027, 901-1089, 911-1617, 916-1156, 922-1497, 924-1192, 926-1171, 928-1267, 933-1205, 937-1206, 937-1214, 942-1174, 945-1197, 947-1220, 947-1224, 947-1235, 947-1480, 950-1180, 955-1207, 955-1534, 955-1551, 965-1260, 969-1130, 969-1215, 972-1180, 980-1635, 982-1250, 982-1414, 985-1603, 987-1563, 991-1250, 992-1244, 992-1246, 992-1290, 995-1307, 998-1198, 998-1213, 998-1260, 1000-1159, 1006-1637, 1008-1255, 1016-1250, 1016-1588, 1017-1604, 1018-1195, 1018-1304, 1055-1362, 1057-1323, 1060-1249, 1062-1285, 1070-1323, 1070-1365, 1072-1693, 1074-1723, 1094-1795, 1105-1536, 1109-1613, 1109-1618, 1112-1237, 1114-1752, 1115-1702, 1120-1687, 1120-1764, 1124-1660, 1133-1367, 1134-1387, 1158-1402, 1167-1659, 1178-1427, 1180-1463, 1185-1876, 1194-1844,</p> <p>1197-1461, 1197-1659, 1198-1890, 1204-1450, 1211-1479, 1214-1730, 1215-1784, 1225-1467, 1225-1910, 1237-1449, 1238-1485, 1243-1530, 1256-2125, 1265-2070, 1275-1507, 1275-1674, 1279-1873, 1292-1553, 1292-1787, 1293-1526, 1312-1588, 1314-1560, 1315-1621, 1317-1846, 1317-1941, 1327-1588, 1327-1590, 1332-1554, 1352-1901, 1359-2073, 1360-1417, 1364-2084, 1364-2098, 1369-1610, 1374-1602, 1375-2127, 1377-1708, 1380-1633, 1382-1935, 1384-1641, 1389-1642, 1389-1994, 1390-1976, 1394-1675, 1394-1688, 1394-2057, 1395-1656, 1396-1690, 1396-2015, 1409-1648, 1410-1643, 1410-1648, 1410-1677, 1410-1967, 1418-2092, 1419-1876, 1425-1993, 1431-2075, 1435-2066, 1436-2063, 1441-2083, 1444-2078, 1450-1988, 1452-2109, 1454-2049, 1454-2081, 1459-1941, 1461-1719, 1467-2033, 1470-2107, 1472-2137, 1473-2083, 1473-2129, 1480-1718, 1487-1737, 1487-1775, 1487-1891, 1489-1744, 1490-1742, 1492-2078, 1494-2124, 1496-1764, 1499-2120, 1500-1877, 1503-1598,</p> <p>1507-1962, 1511-2112, 1511-2121, 1513-1785, 1515-2093, 1516-2110, 1520-2135, 1525-2119, 1527-2132, 1534-2050, 1537-2135, 1538-1832, 1541-2121, 1548-1849, 1548-2137, 1549-1785, 1551-1819, 1558-1775, 1558-1795, 1558-1858, 1558-1955, 1560-1704, 1560-1757, 1560-1815, 1560-2121, 1560-2134, 1567-2137, 1572-1823, 1572-2006, 1576-2107, 1582-2121, 1585-2137, 1589-1835, 1590-2137, 1595-1999, 1596-1742, 1606-1855, 1608-2121, 1610-1853, 1613-1894, 1613-2137, 1615-2081, 1619-1938, 1619-2103, 1620-1837, 1621-1844, 1621-2106, 1621-2136, 1625-1929, 1626-1880, 1629-1880, 1631-2136, 1635-2092, 1647-1917, 1653-1935, 1654-2093, 1654-2121, 1657-2119, 1658-1923, 1660-2137, 1664-2121, 1666-1908, 1668-2121, 1671-2137, 1674-2137, 1676-2120, 1681-2125, 1683-1778, 1683-2087, 1685-1948, 1686-2120, 1693-2088, 1694-2084, 1696-2130, 1698-2125, 1704-2121, 1705-2079, 1705-2123, 1705-2125, 1708-2122, 1708-2127, 1709-1968, 1710-1994, 1711-2121, 1713-2137,</p>
----	--

10

20

30

【表 4 - 2 7】

表 4 - 2 7

ポリヌクレオチド SEQ ID NO/ Incyte ID/配 列長	配列断片
---	------

61 1714-2121, 1714-2137, 1715-2052, 1715-2121, 1715-2135, 1715-2139, 1718-2123, 1720-2130, 1722-2128, 1724-2119, 1724-2127, 1725-2121, 1725-2122, 1726-2025, 1727-2094, 1728-2006, 1728-2121, 1730-2099, 1731-2121, 1737-2121, 1740-1910, 1743-2137, 1744-2028, 1753-1968, 1753-2121, 1757-2121, 1758-1989, 1758-2137, 1760-2121, 1764-2137, 1767-2121, 1774-1796, 1774-2093, 1778-2121, 1782-1983, 1782-2125, 1787-2007, 1787-2121, 1796-2121, 1798-2077, 1798-2121, 1800-2084, 1800-2121, 1803-2121, 1804-2121, 1805-2121, 1809-2009, 1809-2068, 1816-2105, 1817-2032, 1817-2042, 1817-2062, 1817-2125, 1818-2055, 1819-2103, 1819-2116, 1819-2133, 1821-2102, 1822-2102, 1830-2124, 1832-2127, 1866-2065, 1868-2132, 1874-2127, 1876-2125, 1877-2121, 1920-2137, 1921-2137, 1926-2137, 1940-2137, 1954-2121, 1961-2137, 1971-2137, 1983-2137, 1985-2121, 2007-2135, 2008-2121, 2010-2137, 2025-2084, 2025-2120, 2025-2121, 2032-2136, 2037-2124

62/7500929CB1/
648 1-164, 1-250, 1-259, 1-269, 1-273, 1-354, 1-356, 1-469, 15-597, 43-329, 341-616, 343-598, 343-617, 343-622, 343-648, 345-594, 347-596, 384-606, 448-613, 451-610, 475-596, 511-601

10

20

30

40

【表 5 - 1】

表 5 - 1

ポリヌクレオチド SEQ ID NO:	Incyte プロジェクト エント ID:	代表的ライブラリ
32	8268274CB1	TESTTUT02
33	7500515CB1	LIVRTMR01
34	2256826CB1	UTRSNON03
35	7686186CB1	BRABDIK02
37	7501945CB1	UTRSTUE01
38	7500264CB1	LIVRTUT01
39	7499935CB1	BRABDIK02
40	7982285CB1	MIXDTME01
41	7758505CB1	HELAUNT01
42	6885756CB1	BRAWTDR02
43	7500748CB1	SCORNON02
44	7500749CB1	BRSTTUT03
45	7503401CB1	PLACFEF05
46	7503485CB1	BRSTNOT01
47	7504076CB1	SPLNTUE01
48	7500926CB1	HELATXT01
49	7503216CB1	FIBRTXS07
50	7503233CB1	PROSTUT09
51	7726576CB1	HIPONON02
52	7503507CB1	KIDEUNE02
53	7503506CB1	KIDEUNE02
54	7503509CB1	LIVRTUT01
55	7505800CB1	MUSCNOT02
56	7503141CB1	LIVRTMR01
57	7500362CB1	COLNPOT01
58	7503328CB1	UTRSNOT11

10

20

30

40

【表 5 - 2】

表 5 - 2

ポリヌクレオチド SEQ ID NO:	Incyte プロジエクト ID:	代表的ライブラリ
59	7510464CB1	BONMTUE02
60	7510394CB1	BRSTTUT03
61	7500745CB1	BRSTTUT03
62	7500929CB1	LUNGNOT09

10

20

30

40

表 6 - 1

ライブラリ	ベクター	ライブラリの説明	
BONMTUE02	PCDNA2.1	この5'に偏向してランダムプライムされたライブラリは、18歳白人女性の診査開腹手術時に摘出された仙骨腫瘍組織から単離したRNAを用いて作製した。病理検査では、仙骨の巨大細胞腫瘍が示された。患者は骨盤関節の痛み、便秘、尿失禁および不特定の腹部/骨盤症状を示していた。患者の病歴には、軟部組織の悪性腫瘍が含まれていた。患者の使用薬剤には Darvocet がある。家族の病歴には祖父の前立腺癌がある。	
BRABDIK02	PSPORT1	この増幅しノーマライズしたライブラリの作製には、3人の提供者からプールしたcDNAを用いた。cDNAは、肺炎のため死亡した79歳の白人女性（提供者A）、鬱血性心不全のため死亡した83歳の白人男性（提供者B）、および食道癌のため死亡した87歳の白人女性（提供者C）から採取した罹患小脳虫部組織から単離されたmRNAを使って作製された。病理検査によると、重度のアルツハイマー病（提供者A、B）および軽度のアルツハイマー病（提供者C）が示された。患者歴は、提供者Aにおいて緑内障、偽水晶体、胃腸出血を伴う胃炎、末梢血管病、慢性閉塞性肺疾患、てんかん発作、緩解期のタバコ乱用、および一過性虚血発作があり、提供者Bにおいては、パーキンソン病およびアテローム硬化が、提供者Cには高血圧、冠動脈疾患、脳血管事故、および甲状腺機能低下がある。家族歴には、アルツハイマー病（提供者Aの母および兄弟姉妹）があり、この増幅したライブラリからの独立クローン群は、Soares 他, PNAS (1994) 91:9228-9232 及び Bonaldo 他, Genome Research 6 (1996):791 を適用した条件を用いて1ラウンドでノーマライズした。ただし、有意に長い(1ラウンドが48時間)再アニーリングハイブリダイゼーションを用いた。	10 20 30
BRAWTDR02	PCDNA2.1	このランダムプライムしたライブラリは、胆管癌で死亡した55歳白人女性から切除した歯状核組織から単離したRNAを用いて作製した。病理は、円蓋全体に優勢な軽度の髄膜線維形成があり、帯状皮質白質および視床に軸索球体が散在し、嗅内皮質および中脳水道灰白質領域に、少数の神経原繊維変化が散在した。随伴する腫瘍組織の病理は、残存腫瘍または再発性腫瘍を持つ高分化型の肝臓胆管癌を示した。患者の病歴には、胆管癌、術後バッド・キアリー症候群、胆汁性腹水、水胸症、脱水症、栄養不良、乏尿、および急性腎不全がある。過去の手術には、胆嚢切除術および、肝臓の85%の摘除がある。	40

表 6 - 2

ライブラリ	ベクター	ライブラリの説明
BRSTNOT01	PBLUESCRIPT	ライブラリは、自動車事故で死亡した 56 才白人女性の乳房組織から単離された RNA を用いて作製された。
BRSTTUT03	PSPORT1	ライブラリは 58 才の白人女性の片側性拡大単純乳房切除時に採取した乳房腫瘍組織から単離した RNA を用いて作製した。病理は多中心性浸潤性、グレード 4 の小葉癌を示した。塊が左乳房の上外側の四半分で同定された。また結節 3 つが下方外側の四半分で発見された。患者の病歴には皮膚癌、リュウマチ性心疾患、骨関節炎および結核がある。家族の病歴には、脳血管疾患、冠動脈瘤、乳癌、前立腺癌、アテローム硬化型冠動脈疾患及び I 型糖尿病が含まれる。
COLNPOT01	pINCY	ライブラリは 40 才の白人女性の全結腸切除時に採取した大腸ポリープ組織から単離した RNA を用いて作製した。病理は炎症性偽ポリープを示しており、この組織は限局性侵襲性グレード 2 の腺癌と複数の管絨毛状腺腫を伴っていた。患者の病歴には良性的腸腫瘍が含まれている。
FIBRTXS07	pINCY	このサブトラクションされたライブラリは、皮膚フィブロブラストのライブラリの 130 万のクローンを用いて作製され、未処置の皮膚フィブロブラスト組織のライブラリの 280 万のクローンと 2 回のサブトラクションハイブリダイゼーションにかけられた。サブトラクション開始ライブラリは、31 才の白人女性の乳房から切除した、処理済み皮膚フィブロブラスト組織から単離した RNA を用いて作製した。この細胞は 9CIS レチノイン酸で処理した。サブトラクションハイブリダイゼーションプロープは同じドナーからの未処理の皮膚フィブロブラスト組織から単離された RNA から同様に作製されたライブラリから得られた。サブトラクションハイブリダイゼーションの諸条件は、Swaroop 他, NAR(1991)19:1954 および Bonaldo 他 of Genome Research 6 (1996):791 の方法に基づく。
HELATXT01	pINCY	ライブラリは TNF- α と IL-1 β で、各 10ng/ml、20 時間処理された HeLa 細胞系から単離した RNA を用いて作製した。HeLa 細胞系は、31 才の黒人女性から採取された頸部腺癌に由来する。
HELAUNT01	pINCY	ライブラリは、HeLa 細胞系から単離した RNA を用いて作製した。HeLa 細胞系は、31 才の黒人女性から採取された頸部腺癌に由来する。

10

20

30

40

表 6 - 3

ライブラリ	ベクター	ライブラリの説明	
HIPONON02	PSPORT1	ノーマライズした海馬ライブラリは、海馬組織ライブラリの 113 万個の独立性クロンから作製した。RNA は、頭蓋内出血で死亡した 72 才白人女性の海馬組織から単離された。患者の病歴には鼻癌、高血圧および関節炎がある。ノーマライズ条件およびハイブリダイズ条件は、Soares 他 (PNAS (1994) 91:9228) を適用した。(PNAS (1994) 91:9228).	
KIDEUNE02	pINCY	この 5' に偏向したランダムプライム法で得たライブラリは、腎臓上皮組織に由来する、無処理の形質転換した胎児細胞株 (293-EBNA) (Invitrogen) から単離した RNA を用いて作製した。これら細胞はアデノウイルス 5 DNA で形質転換した。	
LIVRTMR01	PCDNA2.1	このランダムプライムライブラリは、62 才の白人女性の部分肝切除と試験開腹時に採取した肝臓組織から単離した RNA を用いて作製した。マッチした腫瘍組織の病理は島細胞腫と一致した転移性で中グレードの神経内分泌癌を示し、癌腫は内側と外側の左肝葉でサイズの異なる結節を形成していた。膵臓には、偽性嚢胞と一致する、繊維症、慢性炎症及び脂肪壊死が見られた。胆嚢には軽度の慢性胆嚢炎が見られた。患者の病歴には、膵尾部の悪性腫瘍、肺塞栓症、高脂血症、血栓静脈炎、複数の関節における関節痛、II 型糖尿病、良性高血圧、脳血管疾患、正常な分娩がある。手術歴としては、膵尾部切除、脾臓全摘出、胆嚢摘出、および部分肝切除がある。家族の病歴には、膵臓癌（二次性肝臓癌を併発）、良性高血圧症、高脂血症が見られた。	
LIVRTUT01	pINCY	ライブラリは 51 才の白人女性の肝葉切除時に採取した肝腫瘍組織から単離した RNA を用いて作製した。病理は結腸癌に一致した転移性グレード 3 の腺癌を示した。患者の病歴には肝臓の悪性腫瘍が含まれている。	10
LUNGNOT09	pINCY	ライブラリは妊娠 23 週間の白人男子胎児の肺組織から単離した RNA を用いて作製した。妊娠は小児型多発性嚢胞腎を超音波にて診断後中絶された。	20
			30
			40

表 6 - 4

ライブラリ	ベクター	ライブラリの説明
MIXDTME01	PBK-CMV	この5に偏ってランダムにクライムされたライブラリは5人のドナーのcDNAのプールされたものを用いて作製した。cDNAは、妊娠23週で早産死亡の白人男子胎児(ドナーA)から抽出した小腸組織、自動車事故で死亡の13歳白人女子(ドナーB)から抽出した大腸上皮組織、胆嚢切除および部分的副甲状腺切除時に58才白人女性(ドナーC)から抽出された罹患胆嚢、部分的胃切除時に68才白人女性(ドナーD)から抽出された胃組織、および片側性拡張型単純乳房切除術時に71才白人女性(ドナーE)から摘除された乳房皮膚から単離したmRNAを用いて作製した。

ドナーCの病理は慢性胆嚢炎、および胆石症を示した。患者は腹部痛および良性副甲状腺腫瘍があった。患者の使用薬剤にはCapoten, Catapres, Norvasc, シンソロイド(Synthroid)およびXanaxが含まれる。ドナーDの病理は軽度の慢性胃炎を示す単純な胃組織を示した。使用薬剤にはPrilosec, zidoxin, Metamucil, カルシウムおよびビタミン類がある。ドナーEは悪性乳房腫瘍および硬結を示した。患者の服用薬剤には、インスリン、アスピリンおよびベータカロチンが含まれる。

MUSCNOT02 PSPORT1 ライブラリは12才の白人男性の腰筋組織から単離したRNAを用いて作製した。

PLACFEF05 PCMV-ICIS ライブラリは胎児性死亡および水頭症で妊娠16週目に死亡した白人胎児から採取した胎盤組織から単離したRNAを用いて作製した。患者の病歴としては、頭(3回)および肩(1回)に臍帯が巻きついていた。血清学は抗-CMVに陽性であり、残りの血清学検査項目は陰性であった。家族歴には母に複数の妊娠、生児出産および妊娠中絶がある。

PROSTUT09 pINCY ライブラリは、根治的前立腺除去、根治的膀胱切除、および尿路変更時の66才白人男性から摘除した前立腺腫瘍組織から単離されたRNAを用いて作製された。病理学検査では、グレード3の転移性細胞癌を示した。患者は前立腺炎症疾患があった。患者の病歴には肺腫瘍と良性の高血圧症がある。家族歴には、悪性乳房腫瘍、結核、脳血管疾患、アテローム性冠動脈疾患、および肺癌が含まれる。

表 6 - 5

ライブラリ	ベクター	ライブラリの説明
SCORNON02	PSPORT1	このノーマライズした背髄ライブラリは、或る背髄組織ライブラリの 324 万個の独立クローンから作製した。RNA を単離した背髄組織は、呼吸停止で死亡した 71 才の白人男性から採取した。患者の病歴には、心筋梗塞、壊疽、および末期腎臓病がある。ノーマライズ条件およびハイブリダイズ条件は、Soares 他 (PNAS (1994) 91:9228) を適用した。
SPLNTUE01	PCDNA2.1	この 5' に偏向してランダムプライムされたライブラリは 28 歳白人男性の脾臓全摘出術時に切除された脾臓腫瘍組織から単離した RNA を用いて作製した。病理は悪性リンパ腫、びまん性大細胞タイプ、B 細胞表現型を示し、ほぼ 45 個の小結節形成がある脾臓、肝臓および多数のリンパ節にわたって多くの反応性 T 細胞および著しい肉芽腫反応が示された。
TESTTUT02	pINCY	ライブラリは 31 才の白人男性の一側性睾丸摘出術時に取り除かれた精巣腫瘍から単離した RNA を用いて作製した。病理は胚性癌腫を示した。
UTRSNON03	pINCY	このノーマライズされたライブラリは UTRSNOT12 ライブラリからの 640 万の独立型クローンから作製した。RNA は、掻爬を伴う膣式子宮摘出術時に白人女性 (41 才) から摘除された子宮筋層組織から単離した RNA を用いて作製した。子宮内膜は分泌性であり、子宮内膜ポリープの断片が含まれていた。子宮頸管内に良性の頸管内外粘膜炎が確認された。随伴する腫瘍組織の病理学検査では、平滑筋腫が見られた。患者の病歴には腹部ヘルニアおよび良性の卵巣腫瘍がある。ノーマライズ条件およびハイブリダイズ条件は、Soares 他 (PNAS (1994) 91:9228) を適用した。(PNAS (1994) 91:9228).
UTRSNOT11	pINCY	ライブラリは、43 才女性の膣式子宮摘出ならびに卵管・卵巣摘出時に摘出した子宮筋組織から単離した RNA を用いて作製した。随伴する腫瘍組織の病理学検査では、子宮筋層には壁内粘膜炎下平滑筋腫が見られた。家族歴には、良性高血圧症、高脂血症、結腸癌、II 型糖尿病およびアテローム性冠動脈疾患が含まれている。

表 6 - 6

ライブラリ	ベクター	ライブラリの説明	10
UTRSTUE01	PCDNA2.1	<p>この5'に偏向してランダムプライムされたライブラリは、37歳の黒人女性の筋腫摘出術、掻爬、右卵管採生検および付随的虫垂切除術時に子宮腫瘍組織から単離されたRNAを使って作製された。病理検査では複数(12)の平滑筋腫が見られた。卵管採囊胞が見られた。患者は欠乏性貧血、臍ヘルニアおよび月経閉止前の月経過多を示した。患者の病歴は月経閉止前の月経過多および肺のサルコイドーシスを含んでいた。以前の手術としては、ヒステロスコピー、掻爬および肺の内視鏡的生検があった。患者の服用薬剤はChromagen およびClaritinがある。家族の病歴には、父親の急性心筋梗塞およびアテローム硬化型冠動脈疾患が含まれる。</p>	20
			30
			40

表 7 - 1

プログラム	説明	参考文献	パラメータ閾値
ABI FACTURA	核酸配列においてベクター配列を除去し、あいまいな塩基をマスクするプログラム	Applied Biosystems, Foster City, CA.	
ABI/PARACEL FDF	Fast Data Finder。アミノ酸配列または核酸配列の比較および注釈付けに有用である。	Applied Biosystems, Foster City, CA; Paracel Inc., Pasadena, CA.	不一致<50%
ABI AutoAssembler	核酸配列をアセンブリするプログラム。	Applied Biosystems, Foster City, CA.	
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool。アミノ酸配列および核酸配列の配列類似性検索に有用である。BLASTにはblastp、blastn、blastx、tblastnおよびtblastxの5つの機能がある。	Altschul, S.F. 他 (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410; Altschul, S.F. et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.	EST:確率値=1.0E-8以下、完全長配列:確率値=1.0E-10以下
FASTA	問合せ配列と同種の配列群との類似性を検索するPearson およびLipman アルゴリズム。FASTAには最少5つの機能(fasta、tfasta、fastx、tfastaおよびssearch)がある。	Pearson, W.R. 及びD.J. Lipman (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444-2448; Pearson, W.R. (1990) Methods Enzymol. 183:63-98, Smith, T.F. 及びM.S. Waterman (1981) Adv. Appl. Math. 2:482-489.	EST:fasta E値=1.06E-6; アセンブリされたEST:fasta同一性=95%以上、一致長さ=200塩基以上、fastx E値=1.0E-8以下、全長fastx スコア=100以上
BLIMPS	配列をBLOCKS、PRINTS、DOMO、PRODOMおよびPFAM データベースの配列と対応させて遺伝子ファミリー、配列相同性および構造的フィンガープリント領域を検索するBLocks IMProved Searcher。	Henikoff, S. 及びJ.G. Henikoff (1991) Nucleic Acids Res. 19:6565-6572, Henikoff, J.G. 及びS. Henikoff (1996) Methods Enzymol. 266:88-105, Attwood, T.K. 他. (1997) J. Chem. Inf. Comput. Sci. 37:417-424.	確率値=1.0E-3以下

表 7 - 2

プログラム	説明	参考文献	パラメータ閾値
HMMER	問合せ配列を、タンパク質ファミリーコンセンサス配列の隠れマルコフモデル(HMM)に基づいたデータベース(PFAM、SMART、TIGRFAMなど)に対して検索するアルゴリズム。	Krogh, A. 他. (1994) <i>J. Mol. Biol.</i> 285:1501-1531; Sonnhammer, E. L. L. 他. (1988) <i>Nucleic Acids Res.</i> 16:320-322; Durbin, R. 他. (1998) <i>Our World View, in a Nutshell</i> , Cambridge Univ. Press, 1-350ページ	PFAM、SMARTまたは TIGRFAM ヒット:確率値=1.0E-3以下、シグナルペプチドヒット:スコア=0以上
ProfileScan	Prositeで定義された配列パターンと一致するタンパク質配列内の構造的モチーフおよび配列モチーフを検索するアルゴリズム。	Gribskov, M. 他. (1988) <i>CABIOS</i> 4:61-66; Gribskov, M. 他. (1989) <i>Methods Enzymol.</i> 183:146-159; Bairoch, A. 他. (1997) <i>Nucleic Acids Res.</i> 25:217-221.	ノーマライズされた質スコア≧特定のPrositeモチーフに対するGCG指定「HIGH」値一般的に、スコア=1.4~2.1.
Phred	高い感度と確率で自動配列決定機トレースを調べるベースコーリングアルゴリズム。	Ewing, B. 他. (1998) <i>Genome Res.</i> 8:175-185; Ewing, B. および P. Green. (1998) <i>Genome Res.</i> 8:186-194.	
Phrap	Smith-Waterman アルゴリズムの効率的なインプリメンテーションに基づくSWATやCrossMatchを含むPhils Revised Assembly プログラムで、配列相同性の検索やDNA配列のアセンブリに有用である。	Smith, T.F. 及び M. S. Waterman (1981) <i>Adv. Appl. Math.</i> 2:482-489; Smith, T.F. 及び M. S. Waterman (1981) <i>J. Mol. Biol.</i> 147:195-197; および Green, P., University of Washington, Seattle, WA.	スコア≧120以上、一致した長さ=56以上
Consed	Phrapアセンブリの表示および編集用グラフィカルツール。	Gordon, D. 他. (1998) <i>Genome Res.</i> 8:195-202.	
SPScan	タンパク質配列をスキャンして、分泌シグナルペプチドの存在を調べる重み行列解析プログラム。	Nielson, H. 他. (1997) <i>Protein Engineering</i> 10:1-6; Claverie, J.M. 及び S. Audic (1997) <i>CABIOS</i> 12:431-439.	スコア=3.5以上
TMAP	重み行列を用いて蛋白配列での膜貫通セグメントを描写し配向を決定するプログラム。	Persson, B. および P. Argos (1994) <i>J. Mol. Biol.</i> 237:182-192; Persson, B. および P. Argos (1996) <i>Protein Sci.</i> 5:363-371.	

【表 7 - 3】

表 7 - 3

プログラム	説明	参考文献	パラメータ閾値
TMHMMER	隠れMarkov モデル(HMM) を使ってタンパク質配列上の膜貫通セグメントを描写し、配向を決定するプログラム。	Sonnhammer, E.L. 他(1998) Proc. Sixth Intl. Conf. On Intelligent Systems for Mol.Biol., Glasgow 他., 編集., The Am. Assoc. for Artificial Intelligence (AAAI) Press, Menlo Park, CA, MIT Press, Cambridge, MA, 175-182ページ。	
74Motifs	Prositeで定義された配列と一致したパターンのアミノ酸配列を検索するプログラム。	Bairoch, A. 他(1997) Nucleic Acids Res. 25:217-221, Wisconsin Package Program Manual, 第9版, M51-59ページ, Genetics Computer Group, Madison, WI.	

10

20

30

40

【表 8 - 1】

表 8 - 1

SEQ ID NO:	PID	EST ID	SNP ID	EST SNP	CBI SNP	EST SNP	アレル	アレル 1	アレル 2	アミノ酸	白人アレル 1 頻度	アフリカ系アレル 1 頻度	アジア系アレル 1 頻度	ヒスパニック系アレル 1 頻度
57	7500362	1239004H1	SNP0010019 124 3	603	T	T	C	C	Y198	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
57	7500362	1320137H1	SNP0006118 182 6	1013	G	G	C	C	G335	n/d	n/d	n/a	n/a	n/d
57	7500362	1402571H1	SNP0006118 251 6	1012	G	G	C	C	A335	n/d	n/d	n/a	n/a	n/d
57	7500362	1406223H1	SNP0005175 56 1	1340	C	C	A	A	T444	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d
57	7500362	1493274H1	SNP0005175 17 0	1074	C	C	T	T	H355	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
57	7500362	1532731H1	SNP0006118 5 6	1011	G	G	C	C	Q334	n/d	n/d	n/a	n/a	n/d
57	7500362	1819683H1	SNP0005175 212 0	1076	C	C	T	T	A356	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
57	7500362	2563605H2	SNP0000607 54 4	1246	T	T	C	C	F413	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
57	7500362	3095949H1	SNP0005175 268 0	1073	C	C	T	T	P355	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
57	7500362	3095949H1	SNP0006118 205 6	1010	G	G	C	C	R334	n/d	n/d	n/a	n/a	n/d
57	7500362	3097881H1	SNP0005175 266 0	1072	C	C	T	T	H355	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
57	7500362	3097881H1	SNP0006118 203 6	1009	G	G	C	C	E334	n/d	n/d	n/a	n/a	n/d
57	7500362	3356734H1	SNP0010019 104 3	601	T	T	C	C	Y198	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
57	7500362	3481734H1	SNP0010019 17 3	597	T	T	C	C	N196	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
57	7500362	3773311H1	SNP0010019 92 3	602	T	T	C	C	F198	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a

【 0 4 8 4 】

表 8 - 2

SEQ ID NO:	PID	EST ID	EST SNP	SNP ID	EST SNP	アレル	アレル1	アレル2	アミノ酸	白人アレル1頻度	アフリカ系アレル1頻度	アジア系アレル1頻度	ヒスパニック系アレル1頻度
57	7500362	4071254H1	1339	SNP0005175	39	C	C	A	P444	n/d	n/d	n/d	n/d
57	7500362	4436184H1	599	SNP0010019	110	T	T	C	V197	n/a	n/a	n/a	n/a
57	7500362	4601138H1	1245	SNP0000607	155	T	T	C	F412	n/a	n/a	n/a	n/a
57	7500362	4833716H1	1066	SNP0005175	228	C	C	T	H353	n/a	n/a	n/a	n/a
57	7500362	4833716H1	1001	SNP0006118	165	G	G	C	G331	n/d	n/d	n/a	n/d
57	7500362	4839758H2	1242	SNP0000607	170	T	T	C	S411	n/a	n/a	n/a	n/a
57	7500362	4839758H2	1336	SNP0005175	264	C	C	A	L443	n/d	n/d	n/d	n/d
57	7500362	6809701J1	1068	SNP0005175	123	C	C	T	D353	n/a	n/a	n/a	n/a
57	7500362	6809701J1	1005	SNP0006118	60	G	G	C	M332	n/d	n/d	n/a	n/d
57	7500362	7191933H2	1064	SNP0005175	225	T	C	T	I352	n/a	n/a	n/a	n/a
57	7500362	7191933H2	992	SNP0006118	161	G	G	C	S328	n/d	n/d	n/d	n/d
58	7503328	055117H1	2134	SNP0013100	104	C	C	T	非翻訳	n/a	n/a	n/a	n/a
58	7503328	1492725H1	1794	SNP0002516	61	G	G	A	非翻訳	n/a	n/a	n/a	n/a
58	7503328	1662163H1	688	SNP0014111	103	C	C	G	P208	n/a	n/a	n/a	n/a
58	7503328	1678911H1	2133	SNP0013100	127	C	C	T	非翻訳	n/a	n/a	n/a	n/a

10

20

30

40

表 8 - 3

SEQ ID NO:	PID	EST ID	SNP ID	EST SNP	CBI SNP	EST SNP	アレル	アレル1	アレル2	アミノ酸	白人アレル1頻度	アフリカ系アレル1頻度	アジア系アレル1頻度	ヒスパニック系アレル1頻度
58	7503328	2021005H1	SNP0002516 ⁷	135	1795	G	G	A	非翻訳	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
58	7503328	2078728H1	SNP0002516 ⁶	48	150	C	C	G	N28	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d
58	7503328	3001370H1	SNP0014111 ⁸	88	669	C	C	G	R201	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
58	7503328	3211368H1	SNP0002516 ⁶	100	149	G	C	G	S28	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d
58	7503328	3334882H1	SNP0002516 ⁶	93	151	C	C	G	Q29	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d
58	7503328	3411052H1	SNP0013100 ⁶	165	2130	C	C	T	非翻訳	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
58	7503328	3512172H1	SNP0013100 ⁶	181	2135	C	C	T	非翻訳	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
58	7503328	3596460H1	SNP0002516 ⁶	43	148	C	C	G	H28	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d
58	7503328	3775141H1	SNP0002516 ⁶	76	127	C	C	G	H21	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d
58	7503328	4175359H1	SNP0013100 ⁶	40	2132	C	C	T	非翻訳	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
58	7503328	4465166H1	SNP0013100 ⁶	41	2138	C	C	T	非翻訳	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
58	7503328	4785219H1	SNP0014111 ⁸	159	687	C	C	G	N207	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
58	7503328	572892H1	SNP0013100 ⁶	100	2147	C	C	T	非翻訳	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
58	7503328	6126847H1	SNP0006257 ⁷	418	2206	T	T	C	非翻訳	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
58	7503328	6550203H1	SNP0013100 ⁶	188	2151	C	C	T	非翻訳	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a

【 表 8 - 4 】

表 8 - 4

SEQ ID NO:	PID	EST ID	SNP ID	EST SNP	CB1 SNP	EST SNP	アレル	アレル1	アレル2	アミノ酸	白人アレル1頻度	アフリカ系アレル1頻度	アジア系アレル1頻度	ヒスパニック系アレル1頻度
59	7510464	055117H1	SNP0013100 ₆	104	2226	C	C	T	T	非翻訳	n/a	n/a	n/a	n/a
59	7510464	1662163H1	SNP0014111 ₈	103	688	C	C	G	G	P208	n/a	n/a	n/a	n/a
59	7510464	1678911H1	SNP0013100 ₆	127	2225	C	C	T	T	非翻訳	n/a	n/a	n/a	n/a
59	7510464	2021005H1	SNP0002516 ₇	135	1829	G	G	A	A	G588	n/a	n/a	n/a	n/a
59	7510464	2078728H1	SNP0002516 ₆	48	150	C	C	G	G	N28	n/d	n/d	n/d	n/d
59	7510464	2192713H1	SNP0006856 ₀	170	1381	T	T	C	C	Y439	n/a	n/a	n/a	n/a
59	7510464	2290110H1	SNP0002516 ₇	145	1828	G	G	A	A	V588	n/a	n/a	n/a	n/a
59	7510464	3001370H1	SNP0014111 ₈	88	669	C	C	G	G	R201	n/a	n/a	n/a	n/a
59	7510464	3211368H1	SNP0002516 ₆	100	149	G	C	G	G	S28	n/d	n/d	n/d	n/d
59	7510464	3334882H1	SNP0002516 ₆	93	151	C	C	G	G	Q29	n/d	n/d	n/d	n/d
59	7510464	3345590H1	SNP0006856 ₀	111	1379	T	T	C	C	L438	n/a	n/a	n/a	n/a
59	7510464	3411052H1	SNP0013100 ₆	165	2222	C	C	T	T	非翻訳	n/a	n/a	n/a	n/a
59	7510464	3512172H1	SNP0013100 ₆	181	2227	C	C	T	T	非翻訳	n/a	n/a	n/a	n/a
59	7510464	3596460H1	SNP0002516 ₆	43	148	C	C	G	G	H28	n/d	n/d	n/d	n/d
59	7510464	3775141H1	SNP0002516 ₆	76	127	C	C	G	G	H21	n/d	n/d	n/d	n/d

10

20

30

40

【 0 4 8 7 】

表 8 - 5

SEQ ID NO:	PID	EST ID	SNP ID	EST SNP	CBI SNP	FST SNP	アレル 1	アレル 2	アミノ酸	白人アレル 1 頻度	アフリカ系アレル 1 頻度	アジア系アレル 1 頻度	ヒスパニック系アレル 1 頻度
59	7510464	4175359H1	SNP0013100 6	40	2224	C	T	T	非翻訳	n/a	n/a	n/a	n/a
59	7510464	4465166H1	SNP0013100 6	41	2230	C	T	T	非翻訳	n/a	n/a	n/a	n/a
59	7510464	4708867H1	SNP0006856 0	136	1378	T	T	C	Y438	n/a	n/a	n/a	n/a
59	7510464	4785219H1	SNP0014111 8	159	687	C	C	G	N207	n/a	n/a	n/a	n/a
59	7510464	4875944H1	SNP0006856 0	102	1380	T	T	C	H438	n/a	n/a	n/a	n/a
59	7510464	572892H1	SNP0013100 6	100	2239	C	C	T	非翻訳	n/a	n/a	n/a	n/a
59	7510464	6550203H1	SNP0013100 6	188	2243	C	C	T	非翻訳	n/a	n/a	n/a	n/a
60	7510394	1282428H1	SNP0007528 6	180	1054	C	C	T	非翻訳	n/d	n/d	n/d	n/d
60	7510394	1282428H1	SNP0010645 9	90	964	C	C	G	非翻訳	n/a	n/a	n/a	n/a
60	7510394	1299002H1	SNP0010646 0	204	1175	G	G	C	非翻訳	n/d	n/a	n/a	n/a
60	7510394	1332279H1	SNP0000969 9	27	1457	G	A	G	非翻訳	n/a	n/a	n/a	n/a
60	7510394	1332279H1	SNP0009791 6	45	1475	C	C	T	非翻訳	n/a	n/a	n/a	n/a
60	7510394	1373856H1	SNP0000970 0	181	1706	T	C	T	非翻訳	n/a	n/a	n/a	n/a
60	7510394	1401460H1	SNP0005336 3	87	95	G	G	A	R30	n/d	n/a	n/a	n/a
60	7510394	1483017H1	SNP0007528 7	63	1337	G	G	A	非翻訳	n/a	n/a	n/a	n/a

表 8 - 6

SEQ ID NO:	PID	EST ID	SNP ID	EST SNP	CBI SNP	EST SNP	アレル	アレル1	アレル2	アミノ酸	白人アレル1頻度	アフリカ系アレル1頻度	アジア系アレル1頻度	ヒスパニック系アレル1頻度
60	7510394	1830710H1	SNP0000970	110	1707	T	C	T	非翻訳	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
60	7510394	2113488H1	SNP0005336	86	94	G	G	A	V30	n/d	n/a	n/a	n/a	n/a
60	7510394	2113488H1	SNP0006569	65	73	C	C	T	P23	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d
60	7510394	2481214H1	SNP0005336	81	93	G	G	A	R29	n/d	n/a	n/a	n/a	n/a
60	7510394	2481214H1	SNP0006569	59	71	C	C	T	P22	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d
60	7510394	2492955H1	SNP0006569	74	74	C	C	T	A23	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d
60	7510394	2530385H1	SNP0000970	5	1671	T	C	T	非翻訳	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
60	7510394	2542562H1	SNP0000970	227	1712	C	C	T	非翻訳	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
60	7510394	2560813H1	SNP0007528	163	1336	G	G	A	非翻訳	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
60	7510394	2683604H1	SNP0000969	23	1454	G	A	G	非翻訳	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
60	7510394	2683604H1	SNP0000970	272	1703	C	C	T	非翻訳	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
60	7510394	2683604H1	SNP0009791	41	1472	C	C	T	非翻訳	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
60	7510394	2878691H1	SNP0005336	87	96	G	G	A	L30	n/d	n/a	n/a	n/a	n/a
60	7510394	2984871H1	SNP0005336	80	91	G	G	A	G29	n/d	n/a	n/a	n/a	n/a
60	7510394	2984871H1	SNP0006569	58	69	T	C	T	C21	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d

表 8 - 8

SEQ ID NO:	PID	EST ID	SNP ID	EST SNP	CBI SNP	EST SNP	アレル	アレル1	アレル2	アミノ酸	白人アレル1頻度	アフリカ系アレル1頻度	アジア系アレル1頻度	ヒスパニック系アレル1頻度
60	7510394	4549591H1	SNP0000969	162	1456	G	A	G	非翻訳	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
60	7510394	4549591H1	SNP0009791	180	1474	C	C	T	非翻訳	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
60	7510394	4549592H1	SNP0000969	161	1455	G	A	G	非翻訳	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
60	7510394	4549592H1	SNP0009791	179	1473	C	C	T	非翻訳	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
60	7510394	4623402H1	SNP0005336	25	29	G	G	A	G8	n/d	n/a	n/a	n/a	n/a
60	7510394	4623402H1	SNP0006569	3	6	C	C	T	非翻訳	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d
60	7510394	4834608H1	SNP0000970	204	1704	T	C	T	非翻訳	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
60	7510394	5074436H1	SNP0010645	136	963	C	C	G	非翻訳	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
60	7510394	5594636H1	SNP0013460	86	856	A	A	C	非翻訳	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
60	7510394	5879206H1	SNP0007528	37	971	C	C	T	非翻訳	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d
60	7510394	5879206H1	SNP0010646	158	1089	G	G	C	非翻訳	n/d	n/a	n/a	n/a	n/a
60	7510394	5909982H1	SNP0005336	83	86	G	G	A	R27	n/d	n/a	n/a	n/a	n/a
60	7510394	5909982H1	SNP0006569	61	64	C	C	T	R20	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d
60	7510394	5955251H1	SNP0007528	50	1049	T	C	T	非翻訳	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d
60	7510394	5955251H1	SNP0010646	171	1170	G	G	C	非翻訳	n/d	n/a	n/a	n/a	n/a

10

20

30

40

表 8 - 9

SEQ ID NO:	PID	EST ID	SNP ID	EST SNP	CBI SNP	EST SNP	アレル1	アレル2	アミノ酸	白人アレル1頻度	アフリカ系アレル1頻度	アジア系アレル1頻度	ヒスパニック系アレル1頻度
60	7510394	5978154H1	SNP0007528 ₇	236	1334	G	A	A	非翻訳	n/a	n/a	n/a	n/a
60	7510394	6171175H1	SNP0007528 ₇	212	1324	G	A	A	非翻訳	n/a	n/a	n/a	n/a
60	7510394	6171175H1	SNP0010646 ₀	50	1162	G	C	C	非翻訳	n/d	n/a	n/a	n/a
60	7510394	6849471H1	SNP0000969 ₉	177	1436	A	A	G	非翻訳	n/a	n/a	n/a	n/a
60	7510394	6849471H1	SNP0009791 ₆	195	1454	C	C	T	非翻訳	n/a	n/a	n/a	n/a
60	7510394	953943H1	SNP0010646 ₀	94	1176	G	C	C	非翻訳	n/d	n/a	n/a	n/a
61	7500745	1282428H1	SNP0007528 ₆	180	937	C	C	T	非翻訳	n/d	n/d	n/d	n/d
61	7500745	1282428H1	SNP0010645 ₉	90	847	C	C	G	非翻訳	n/a	n/a	n/a	n/a
61	7500745	1299002H1	SNP0010646 ₀	204	1058	G	C	C	非翻訳	n/d	n/a	n/a	n/a
61	7500745	1332279H1	SNP0000969 ₉	27	1340	G	A	G	非翻訳	n/a	n/a	n/a	n/a
61	7500745	1332279H1	SNP0009791 ₆	45	1358	C	C	T	非翻訳	n/a	n/a	n/a	n/a
61	7500745	1373856H1	SNP0000970 ₀	181	1589	T	C	T	非翻訳	n/a	n/a	n/a	n/a
61	7500745	1401460H1	SNP0005336 ₃	87	99	G	A	A	L30	n/d	n/a	n/a	n/a
61	7500745	1483017H1	SNP0007528 ₇	63	1220	G	A	A	非翻訳	n/a	n/a	n/a	n/a
61	7500745	2113488H1	SNP0006569 ₄	65	77	C	C	T	A23	n/d	n/d	n/d	n/d

2005526484000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US02/29221
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : C12N 9/00; C07H 21/04 US CL : 435/183; 536/23.2 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 435/183; 536/23.2 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Please See Continuation Sheet		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 20030203363A1 (SPYTEK et al.) 10 October 2003 (10.10.2004), (see SEQ ID NO:60)	5-34, 41-55, 57, 88
E	Database GenBank, US National Library of Medicine, (Bethesda, MD, USA) No. ABG97506, SPYTEK et al., December 2002.	5-34, 41-55, 57, 88
X	RAJ. L. et al. Targeted localized degradation of Paired protein in Drosophila development.	5-34, 41-55, 57, 88
---	Curr. Biol. September 2000, Vol. 10, pages 1265-1272.	
Y		
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:		
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"B"	earlier application or patent published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
Date of the actual completion of the international search 08 November 2004 (08.11.2004)		Date of mailing of the international search report 04 JAN 2005
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703) 305-3230		Authorized officer <i>Manjunath N. Rao</i> Manjunath N. Rao, Ph.D. Telephone No. 703-306-0196

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US02/29221

BOX II. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group 1, claims 5-34, 41-55, 56, 87, drawn to a polypeptide with SEQ ID NO:1 and a polynucleotide with SEQ ID NO:32 encoding the same, an antibody specifically raised against the polypeptide, method of making and method of using said polypeptide and polynucleotide and the antibody, a microarray comprising said polynucleotide or polypeptide.

Group 2, claims 5-34, 41-55, 57, 88, drawn to a polypeptide with SEQ ID NO:2 and a polynucleotide with SEQ ID NO:33 encoding the same, an antibody specifically raised against the polypeptide, method of making and method of using said polypeptide and polynucleotide and the antibody, a microarray comprising said polynucleotide or polypeptide.

Group 3, claims 5-34, 41-55, 75, 106, drawn to a polypeptide with SEQ ID NO:20 and a polynucleotide with SEQ ID NO:51 encoding the same, an antibody specifically raised against the polypeptide, method of making and method of using said polypeptide and polynucleotide and the antibody, a microarray comprising said polynucleotide or polypeptide.

Group 4, claims 5-34, 41-55, 76, 107, drawn to a polypeptide with SEQ ID NO:21 and a polynucleotide with SEQ ID NO:52 encoding the same, an antibody specifically raised against the polypeptide, method of making and method of using said polypeptide and polynucleotide and the antibody, a microarray comprising said polynucleotide or polypeptide.

Group 5, claims 5-34, 41-55, 77, 108, drawn to a polypeptide with SEQ ID NO:22 and a polynucleotide with SEQ ID NO:53 encoding the same, an antibody specifically raised against the polypeptide, method of making and method of using said polypeptide and polynucleotide and the antibody, a microarray comprising said polynucleotide or polypeptide.

Group 6, claims 5-34, 41-55, 78, 109, drawn to a polypeptide with SEQ ID NO:23 and a polynucleotide with SEQ ID NO:54 encoding the same, an antibody specifically raised against the polypeptide, method of making and method of using said polypeptide and polynucleotide and the antibody, a microarray comprising said polynucleotide or polypeptide.

Group 7, claims 5-34, 41-55, 79, 110, drawn to a polypeptide with SEQ ID NO:24 and a polynucleotide with SEQ ID NO:55 encoding the same, an antibody specifically raised against the polypeptide, method of making and method of using said polypeptide and polynucleotide and the antibody, a microarray comprising said polynucleotide or polypeptide.

Group 8, claims 5-34, 41-55, 80, 111, drawn to a polypeptide with SEQ ID NO:25 and a polynucleotide with SEQ ID NO:56 encoding the same, an antibody specifically raised against the polypeptide, method of making and method of using said polypeptide and polynucleotide and the antibody, a microarray comprising said polynucleotide or polypeptide.

Group 9, claims 5-34, 41-55, 81, 112, drawn to a polypeptide with SEQ ID NO:26 and a polynucleotide with SEQ ID NO:57 encoding the same, an antibody specifically raised against the polypeptide, method of making and method of using said polypeptide and polynucleotide and the antibody, a microarray comprising said polynucleotide or polypeptide.

Group 10, claims 5-34, 41-55, 82, 113, drawn to a polypeptide with SEQ ID NO:27 and a polynucleotide with SEQ ID NO:58 encoding the same, an antibody specifically raised against the polypeptide, method of making and method of using said polypeptide and polynucleotide and the antibody, a microarray comprising said polynucleotide or polypeptide.

Group 11, claims 5-34, 41-55, 83, 114, drawn to a polypeptide with SEQ ID NO:28 and a polynucleotide with SEQ ID NO:59 encoding the same, an antibody specifically raised against the polypeptide, method of making and method of using said polypeptide and polynucleotide and the antibody, a microarray comprising said polynucleotide or polypeptide.

Group 12, claims 5-34, 41-55, 84, 115, drawn to a polypeptide with SEQ ID NO:29 and a polynucleotide with SEQ ID NO:60 encoding the same, an antibody specifically raised against the polypeptide, method of making and method of using said polypeptide and polynucleotide and the antibody, a microarray comprising said polynucleotide or polypeptide.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US02/29221

Group 13, claims 5-34, 41-55, 85, 116, drawn to a polypeptide with SEQ ID NO:30 and a polynucleotide with SEQ ID NO:61 encoding the same, an antibody specifically raised against the polypeptide, method of making and method of using said polypeptide and polynucleotide and the antibody, a microarray comprising said polynucleotide or polypeptide.

Group 14, claims 5-34, 41-55, 86, 117, drawn to a polypeptide with SEQ ID NO:31 and a polynucleotide with SEQ ID NO:62 encoding the same, an antibody specifically raised against the polypeptide, method of making and method of using said polypeptide and polynucleotide and the antibody, a microarray comprising said polynucleotide or polypeptide.

The inventions listed as Groups 1-14 do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons: The ISA considers that where multiple products and processes are claimed, the main invention shall consist of the first invention of the category first mentioned in the claims and the first recited invention of each of the other categories related thereto. Accordingly, the main invention (Group 1) comprises the first-recited product (SEQ ID NO:1, 32), a polynucleotide encoding the polypeptide, a vector, a host cell, a method for producing polypeptide, the antibody, a compound that acts as an agonist or an antagonist of the polypeptide and methods of its use. Furthermore the ISA considers that any feature which the subsequently recited products and methods share with the main invention does not constitute a special technical feature within the meaning of PCT Rule 13.2 and that each of such products and methods accordingly defines a separate invention.

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:

File BIOSIS, CAPLUS, EMBASE, MEDLINE, SCISEARCH, USPTO WEST, BIOTECHNO, BIOTECHABS, CANCERLIT, GENBANK,

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US02/29221

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

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

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

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
Please See Continuation Sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 5-34, 41-55, 56-87, SEQ ID NO:1 and 32

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

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 1/00	A 6 1 P 1/00	4 C 0 8 4
A 6 1 P 1/18	A 6 1 P 1/18	4 C 0 8 5
A 6 1 P 3/00	A 6 1 P 3/00	4 H 0 4 5
A 6 1 P 5/00	A 6 1 P 5/00	
A 6 1 P 5/24	A 6 1 P 5/24	
A 6 1 P 5/38	A 6 1 P 5/38	
A 6 1 P 9/00	A 6 1 P 9/00	
A 6 1 P 15/00	A 6 1 P 15/00	
A 6 1 P 17/00	A 6 1 P 17/00	
A 6 1 P 25/00	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 29/00	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 31/04	A 6 1 P 31/04	
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 37/06	A 6 1 P 37/06	
C 0 7 K 14/47	C 0 7 K 14/47	
C 0 7 K 16/18	C 0 7 K 16/18	
C 1 2 M 1/00	C 1 2 M 1/00	A
C 1 2 N 1/15	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10	C 1 2 P 21/02	C
C 1 2 N 15/02	C 1 2 P 21/08	
C 1 2 P 21/02	C 1 2 Q 1/68	A
C 1 2 P 21/08	G 0 1 N 33/53	D
C 1 2 Q 1/68	G 0 1 N 33/53	M
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/566	
G 0 1 N 33/566	G 0 1 N 33/577	B
G 0 1 N 33/577	G 0 1 N 37/00	1 0 2
G 0 1 N 37/00	C 1 2 N 5/00	A
	C 1 2 N 15/00	F
	C 1 2 N 15/00	C
	A 6 1 K 37/02	

- (31)優先権主張番号 60/346,198
(32)優先日 平成13年10月26日(2001.10.26)
(33)優先権主張国 米国(US)
- (31)優先権主張番号 60/343,980
(32)優先日 平成13年11月2日(2001.11.2)
(33)優先権主張国 米国(US)
- (31)優先権主張番号 60/348,887
(32)優先日 平成13年11月9日(2001.11.9)
(33)優先権主張国 米国(US)
- (31)優先権主張番号 60/332,423
(32)優先日 平成13年11月16日(2001.11.16)
(33)優先権主張国 米国(US)
- (31)優先権主張番号 60/334,145
(32)優先日 平成13年11月28日(2001.11.28)

- (33)優先権主張国 米国(US)
 (31)優先権主張番号 60/334,229
 (32)優先日 平成13年11月28日(2001.11.28)
 (33)優先権主張国 米国(US)
 (31)優先権主張番号 60/337,451
 (32)優先日 平成13年12月6日(2001.12.6)
 (33)優先権主張国 米国(US)
 (31)優先権主張番号 60/351,928
 (32)優先日 平成14年1月25日(2002.1.25)
 (33)優先権主張国 米国(US)
 (31)優先権主張番号 60/366,837
 (32)優先日 平成14年3月21日(2002.3.21)
 (33)優先権主張国 米国(US)

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW, ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES, FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,N O,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

- (72)発明者 チョーラ、ナリンダー・ケイ
 アメリカ合衆国カリフォルニア州94587・ユニオンシティ・#712・ユニオンスクエア 3
 3
 (72)発明者 ワレン、ブリジット・エイ
 アメリカ合衆国カリフォルニア州92024・エンシニタス・#ビー103・サウスエルカミーノ
 レアル 1810
 (72)発明者 タング、ワイ・トム
 アメリカ合衆国カリフォルニア州95118・サンノゼ・ランウィックコート 4230
 (72)発明者 エリオット、ビッキー・エス
 アメリカ合衆国カリフォルニア州95121・サンノゼ・ポルトンプレイスウェイ 3770
 (72)発明者 マーキス、ジョセフ・ピー
 アメリカ合衆国カリフォルニア州95135・サンノゼ・レイジーレーン 4428
 (72)発明者 リー、ジョアナ・エックス
 アメリカ合衆国カリフォルニア州94112・サンフランシスコ・ジュネーブアベニュー 126
 4
 (72)発明者 グリフィン、ジェニファー・エイ
 アメリカ合衆国カリフォルニア州94555・フレモント・メローウェイ 33691
 (72)発明者 ギーツェン、キンバリー・ジェイ
 アメリカ合衆国カリフォルニア州95123・サンノゼ・ロスウエコドライブ 691
 (72)発明者 ヤング、ジュンミング
 アメリカ合衆国カリフォルニア州95129・サンノゼ・パークレーン 7125
 (72)発明者 リュ、デュング・アイナ・エム
 アメリカ合衆国カリフォルニア州95123・サンノゼ・コイドライブ 233
 (72)発明者 エマーリング、ブルック・エム
 アメリカ合衆国カリフォルニア州94303・パロアルト・#71・ウッドランドアベニュー 1
 735
 (72)発明者 ダガン、ブレンダン・エム
 アメリカ合衆国カリフォルニア州94086・サニーバイル・#306・ブエナビスタアベニュー
 243
 (72)発明者 リチャードソン、トマス・ダブリュ

アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 4 0 6 2 ・ レッドウッドシティ ・ # 1 0 7 ・ キャニオンロード
6 1 6

(72)発明者 リー、ソー・ユーン

アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 4 0 1 5 ・ デイリーシティ ・ ウェストデールアベニュー 4 0

(72)発明者 ランクマール、ジャヤラクシミ

アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 4 5 5 5 ・ フレモント ・ メイバードサークル 3 4 3 5 9

(72)発明者 ベチャ、シャニア・ディー

アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 4 5 4 6 ・ カストロバレー ・ # 1 1 7 ・ ゲイリードライブ 2
1 0 6 2

(72)発明者 レーア・メイソン、パトリア・エム

アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 5 0 3 7 ・ モーガンヒル ・ クラークレーン 3 6 0

(72)発明者 スウォーナカール、アニータ

アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 4 1 2 2 ・ サンフランシスコ ・ # 5 ディー ・ ロックスリーアベ
ニュー 8

(72)発明者 トラン、ユエン・ケイ

アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 5 1 3 3 ・ サンノゼ ・ メイブリースクエア 2 6 3 8

(72)発明者 ケーブル、エイミー・イー

アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 4 1 0 9 ・ サンフランシスコ ・ # 4 ・ ポークストリート 2 3
4 5

(72)発明者 ハファリア、エープリル・ジェイ・エイ

アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 5 0 5 4 ・ サンタクララ ・ コーレデプリマベータ 2 2 2 7

(72)発明者 カーレ、リーナ

アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 5 0 7 0 ・ サラトガ ・ オレラコート 1 2 6 5 0

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 AA19 BA01 BA07 BA21 BA80 CA04 DA02 DA05

DA06 DA11 DA12 EA04 GA11 HA12 HA17

4B029 AA07 AA23 BB20 CC03 FA15

4B063 QA01 QA18 QA19 QQ08 QQ43 QR08 QR42 QR56 QS25 QS34

QS39 QX02

4B064 AG01 AG27 CA02 CA05 CA06 CA10 CA19 CC24 DA01 DA13

4B065 AA01X AA57X AA72X AA90X AA93Y AB01 BA02 CA24 CA25 CA44

CA46

4C084 AA01 AA17 DC50 NA14 ZA011 ZA361 ZA661 ZA811 ZA891 ZB081

ZB111 ZB261 ZB351 ZC021 ZC031 ZC081 ZC211

4C085 AA13 BB11 CC02 CC04 DD23

4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 CA40 DA75 EA20 EA50 FA72

FA74

專利名稱(譯)	蛋白質修飾和維持分子		
公開(公告)号	JP2005526484A	公開(公告)日	2005-09-08
申請号	JP2003529905	申請日	2002-09-13
[標]申請(專利權)人(譯)	洞察Genomics公司		
申請(專利權)人(譯)	洞察基因组公司		
[標]發明人	スプレイグウィリアムダブリュ チョーラナリンダーケイ ワレンブリジットエイ タングワイトム エリオットビッキーエス マーキスジョセフピー リージョアナエックス グリフィンジェニファーエイ ギーツエンキンバリージェイ ヤングジュンミング リュデュングアイナエム エマーリングブルックエム ダガンプレンダンエム リチャードソントマスダブリュ リーソーユーン ランクマールジャヤラクシミ ベチャシャニアディー レーアメイソンパトリシアエム スウォーナカールアニータ トランユエンケイ ケーブルエイミーイー ハファリアエープリルジェイエイ カーレリーナ		
發明人	スプレイグ、ウィリアム・ダブリュ チョーラ、ナリンダー・ケイ ワレン、ブリジット・エイ タング、ワイトム エリオット、ビッキー・エス マーキス、ジョセフ・ピー リー、ジョアナ・エックス グリフィン、ジェニファー・エイ ギーツエン、キンバリー・ジェイ ヤング、ジュンミング リュ、デュング・アイナ・エム エマーリング、ブルック・エム ダガン、プレندان・エム リチャードソン、トマス・ダブリュ リー、ソー・ユーン ランクマール、ジャヤラクシミ ベチャ、シャニア・ディー レーア・メイソン、パトリシア・エム スウォーナカール、アニータ トラン、ユエン・ケイ ケーブル、エイミー・イー		

ハファリア、エープリル・ジェイ・エイ
カーレ、リーナ

IPC分类号	G01N33/53 A61K38/00 A61K39/395 A61K45/00 A61K49/00 A61P1/00 A61P1/18 A61P3/00 A61P5/00 A61P5/24 A61P5/38 A61P9/00 A61P15/00 A61P17/00 A61P25/00 A61P29/00 A61P31/04 A61P35/00 A61P37/06 C07K14/47 C07K16/18 C12M1/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N9/64 C12N15/02 C12N15/09 C12N15/12 C12P21/02 C12P21/08 C12Q1/68 G01N33/566 G01N33/577 G01N37/00
CPC分类号	A01K2217/05 A61K38/00 A61P1/00 A61P1/18 A61P3/00 A61P15/00 A61P17/00 A61P25/00 A61P29/00 C07K14/47 C12N9/6421
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K39/395.D A61K39/395.N A61K45/00 A61K49/00.Z A61P1/00 A61P1/18 A61P3/00 A61P5/00 A61P5/24 A61P5/38 A61P9/00 A61P15/00 A61P17/00 A61P25/00 A61P29/00 A61P31/04 A61P35/00 A61P37/06 C07K14/47 C07K16/18 C12M1/00.A C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02.C C12P21/08 C12Q1/68.A G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566 G01N33/577.B G01N37/00.102 C12N5/00.A C12N15/00.F C12N15/00.C A61K37/02
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/AA19 4B024/BA01 4B024/BA07 4B024/BA21 4B024/BA80 4B024/CA04 4B024/DA02 4B024/DA05 4B024/DA06 4B024/DA11 4B024/DA12 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA12 4B024/HA17 4B029/AA07 4B029/AA23 4B029/BB20 4B029/CC03 4B029/FA15 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ08 4B063/QQ43 4B063/QR08 4B063/QR42 4B063/QR56 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QS39 4B063/QX02 4B064/AG01 4B064/AG27 4B064/CA02 4B064/CA05 4B064/CA06 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA01X 4B065/AA57X 4B065/AA72X 4B065/AA90X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA01 4C084/AA17 4C084/DC50 4C084/NA14 4C084/ZA011 4C084/ZA361 4C084/ZA661 4C084/ZA811 4C084/ZA891 4C084/ZB081 4C084/ZB111 4C084/ZB261 4C084/ZB351 4C084/ZC021 4C084/ZC031 4C084/ZC081 4C084/ZC211 4C085/AA13 4C085/BB11 4C085/CC02 4C085/CC04 4C085/DD23 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/FA74
優先権	60/322196 2001-09-14 US 60/324134 2001-09-21 US 60/327233 2001-10-05 US 60/346198 2001-10-26 US 60/343980 2001-11-02 US 60/348887 2001-11-09 US 60/332423 2001-11-16 US 60/334145 2001-11-28 US 60/334229 2001-11-28 US 60/337451 2001-12-06 US 60/351928 2002-01-25 US 60/366837 2002-03-21 US
外部リンク	Espacenet

摘要(译)

本発明の各種実施方案提供了鉴定和编码PMMMの人蛋白质修饰和维持分子 (PMMM) 和多核苷酸。 本発明の実施方案还提供表达载体， 宿主细胞， 抗体， 激动剂和拮抗剂。 其他实施方提供了用于诊断， 治疗或预防与PMMM.a异常表达有关的疾病的方法。

5を参照)。

接頭コード	解析タイププログラムの例
GNN GFG ENST	例えば、GENSCAN (Stanford University, CA, USA) または FGENES (Computer Genomics Group, The Sanger Centre, Cambridge, UK)を用いた、ゲノム配列群からのエクソン予測
GBI	手動で編集された、ゲノム配列群の解析
FL	ステイッチまたはストレッチゲノム配列(実施例5参照)
INCY	EST配列群の、ゲノムへのマッピングからの、完全長転写物と エクソンとの予想。エクソン群と生じる転写物とを予測するた めに、ゲノム位置とEST構成とのデータが組み合わせられる。