

(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2006-514532

(P2006-514532A)

(43) 公表日 平成18年5月11日(2006.5.11)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	2 G O 4 5
A O 1 K 67/027 (2006.01)	A O 1 K 67/027	4 B O 2 4
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 D	4 B O 5 0
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 N	4 B O 6 3
A 6 1 P 1/04 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	4 B O 6 4

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 111 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2002-592451 (P2002-592451)	(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5月17日 (2002.5.17)	(74) 代理人	100089266 弁理士 大島 陽一
(85) 翻訳文提出日	平成15年11月12日 (2003.11.12)	(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
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/015688		
(87) 国際公開番号	W02002/094988		
(87) 国際公開日	平成14年11月28日 (2002.11.28)		
(31) 優先権主張番号	60/292, 242		
(32) 優先日	平成13年5月18日 (2001.5.18)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	60/293, 726		
(32) 優先日	平成13年5月25日 (2001.5.25)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	60/295, 346		
(32) 優先日	平成13年6月1日 (2001.6.1)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 脂質関連分子

(57) 【要約】

本発明は、ヒトの脂質関連分子 (LIPAM) 群および、LIPAMを同一しコードするポリヌクレオチド群を提供する。本発明はまた、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。本発明はまた、LIPAMの異常発現に関連する種々の障害を、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(f)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:1-10(配列番号1乃至10)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, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5-10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有するポリペプチド

(c) SEQ ID NO:2のアミノ酸配列に対して少なくとも99%が同一であるような天然アミノ酸配列を有するポリペプチド

(d) SEQ ID NO:4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有するポリペプチド

(e) SEQ ID NO:1-10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

(f) SEQ ID NO:1-10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

10

【請求項2】

SEQ ID NO:1-10からなる群から選択したアミノ酸配列を有する、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。

20

【請求項4】

請求項2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5】

SEQ ID NO:11-20からなる群から選択したポリヌクレオチド配列を有する、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へ機能的に連結したプロモーター配列を有する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。

30

【請求項8】

請求項6に記載の組換えポリヌクレオチドを有する遺伝形質転換生物。

【請求項9】

請求項1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或るポリヌクレオチドへ機能的に連結されたプロモーター配列を持つ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、とからなることを特徴とする方法。

40

【請求項10】

前記ポリペプチドが、SEQ ID NO:1-10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。

【請求項11】

請求項1に記載のポリペプチドと特異結合するような単離された抗体。

【請求項12】

以下の(a)乃至(e)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:11-20からなる群から選択した或るポリヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチド

(b) SEQ ID NO:11-20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9

50

0%が同一であるような天然ポリヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチド

(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

(e) (a) ~ (d)のRNA等価物

【請求項13】

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持つ、単離されたポリヌクレオチド。

【請求項14】

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、

10

(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或る配列を有する少なくとも20の連続したヌクレオチド群を持つ或るプローブと前記サンプルとをハイブリダイズし、該プローブが、或るハイブリダイゼーション複合体が前記プローブと前記標的ポリヌクレオチドまたはその断片群との間に形成される条件下で、前記標的ポリヌクレオチドへ特異的にハイブリダイズする過程と、

(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15】

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。

20

【請求項16】

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、

(b) 前記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、とを含むことを特徴とする方法。

【請求項17】

請求項1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ことを特徴とする組成物。

30

【請求項18】

前記ポリペプチドが、SEQ ID NO:1-10からなる群から選択したアミノ酸配列を含むことを特徴とする請求項17の組成物。

【請求項19】

機能的LIPAMの発現低下に関連する疾患又は病状を治療する方法であって、そのような治療を必要とする患者に対して請求項17に記載の組成物を投与する過程を含むことを特徴とする方法。

【請求項20】

請求項1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、

40

(a) 請求項1のポリペプチドを有する或るサンプルを或る化合物に曝す過程と、

(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、とを含むことを特徴とするスクリーニング方法。

【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。

【請求項22】

機能的LIPAM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、そのような治療を要する患者への請求項21の組成物の投与を含む治療方法。

50

【請求項 23】

請求項 1 の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 のポリペプチドを有する或るサンプルを或る化合物に曝す過程と、

(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スクリーニング方法。

【請求項 24】

請求項 23 の方法で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有する組成物。

【請求項 25】

機能的 LIPAM 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、そのような治療を要する患者への請求項 24 の組成物の投与を含む治療方法。

10

【請求項 26】

請求項 1 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諸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、

(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 に記載のポリペプチドに特異結合する化合物を同定する過程、とを含むことを特徴とする方法。

【請求項 27】

請求項 1 のポリペプチドの活性をモジュレート（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た諸条件下で、請求項 1 に記載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とを含み、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。

20

【請求項 28】

請求項 5 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諸条件下で、前記標的ポリヌクレオチドを有する或るサンプルを或る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、改変された発現を検出する過程と、

(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) 核酸群を有する或る生体サンプルを前記試験化合物で処理する過程と、

(b) 処理した前記生体サンプルの核酸群と、請求項 12 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群を有する或る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が、前記プローブと前記生体サンプルの或る標的ポリヌクレオチドとの間で或る特異的なハイブリダイゼーション複合体が形成される諸条件下で行われ、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のポリヌクレオチド配列またはその断片を有する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) 前記処理された生体サンプル中の前記ハイブリダイゼーション複合体の量を、或る処理されていない生体サンプル中の前記ハイブリダイゼーション複合体の量と比較する過程とを含み、前記処理された生体サンプル中の前記ハイブリダイゼーション複合体の量

40

50

の差が、前記試験化合物の毒性を標示することを特徴とする方法。

【請求項30】

LIPAMの生体サンプル中での発現に関連する症状または疾患に対する診断試験法であって、

- (a) 請求項11に記載の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が形成されるのに適した諸条件下で、前記生体サンプルを該抗体と混合する過程と、
- (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、前記生体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。

【請求項31】

請求項11の抗体であって、

- (a) キメラ抗体
- (b) 一本鎖抗体
- (c) Fab断片
- (d) F(ab')₂断片
- (e) ヒト化抗体、のいずれかであることを特徴とする抗体。

10

【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有する組成物。

【請求項33】

LIPAMの被検者中での発現に関連する症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。

20

【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】

LIPAMの被検者中での発現に関連する症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の抗体の特異性を持つポリクローナル抗体を調製する方法であって、

- (a) 抗体応答を誘発する諸条件下で、SEQ ID NO:1-10からなる群から選択した或るアミノ酸配列またはその免疫原性断片を有する或るポリペプチドを用いて或る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該ポリペプチドでスクリーニングし、それによって、SEQ ID NO:1-10からなる群から選択した或るアミノ酸配列を有する或るポリペプチドに特異結合するようなポリクローナル抗体を同定する過程、とを含むことを特徴とする方法。

30

【請求項37】

請求項36の方法で産生したポリクローナル抗体。

【請求項38】

請求項37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) 抗体応答を誘発する諸条件下で、SEQ ID NO:1-10からなる群から選択した或るアミノ酸配列またはその免疫原性断片を有する或るポリペプチドを用いて或る動物を免疫化する過程と、
- (b) 前記動物から、抗体を産出する細胞を単離する過程と、
- (c) 不死化した細胞と前記抗体産出細胞とを融合し、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:1-10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。

40

50

【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有する組成物。

【請求項42】

Fab発現ライブラリのスクリーニングによって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。

【請求項43】

組換え免疫グロブリン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44】

SEQ ID NO:1-10 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サンプル中に検出する方法であって、

(a) 前記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、或るサンプルと共に請求項11に記載の抗体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:1-10 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。

【請求項45】

SEQ ID NO:1-10 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) 前記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、或るサンプルと共に請求項11に記載の抗体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:1-10からなる群から選択した或るアミノ酸配列を有する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。

【請求項47】

ポリヌクレオチド群を有する或る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) 該サンプルの該ポリヌクレオチド群を標識する過程と、

(b) ハイブリダイゼーション複合体の形成に適した諸条件下で請求項46のマイクロアレイのエレメント群をサンプルの標識されたポリヌクレオチド群と接触させる過程と、

(c) 該サンプル中の該ポリヌクレオチド群の発現を定量化する過程、とを含むことを特徴とする方法。

【請求項48】

或る固体基板上的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オチドまたはポリヌクレオチド配列を含み、前記の標的ポリヌクレオチドが請求項12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49】

請求項48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50】

請求項48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。

【請求項51】

10

20

30

40

50

請求項48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52】

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53】

請求項48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有することを特徴とするアレイ。

【請求項54】

請求項48に記載のアレイで、或るリンカーが少なくとも1つの前記のヌクレオチド分子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。

10

【請求項55】

請求項48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56】

SEQ ID NO:1のアミノ酸配列を有する請求項1に記載のポリペプチド。

【請求項57】

20

SEQ ID NO:2のアミノ酸配列を有する請求項1に記載のポリペプチド。

【請求項58】

SEQ ID NO:3のアミノ酸配列を有する請求項1に記載のポリペプチド。

【請求項59】

SEQ ID NO:4のアミノ酸配列を有する請求項1に記載のポリペプチド。

【請求項60】

SEQ ID NO:5のアミノ酸配列を有する請求項1に記載のポリペプチド。

【請求項61】

SEQ ID NO:6のアミノ酸配列を有する請求項1に記載のポリペプチド。

【請求項62】

30

SEQ ID NO:7のアミノ酸配列を有する請求項1に記載のポリペプチド。

【請求項63】

SEQ ID NO:8のアミノ酸配列を有する請求項1に記載のポリペプチド。

【請求項64】

SEQ ID NO:9のアミノ酸配列を有する請求項1に記載のポリペプチド。

【請求項65】

SEQ ID NO:10のアミノ酸配列を有する請求項1に記載のポリペプチド。

【請求項66】

SEQ ID NO:11のポリヌクレオチド配列を有する請求項12に記載のポリヌクレオチド。

【請求項67】

40

SEQ ID NO:12のポリヌクレオチド配列を有する請求項12に記載のポリヌクレオチド。

【請求項68】

SEQ ID NO:13のポリヌクレオチド配列を有する請求項12に記載のポリヌクレオチド。

【請求項69】

SEQ ID NO:14のポリヌクレオチド配列を有する請求項12に記載のポリヌクレオチド。

【請求項70】

SEQ ID NO:15のポリヌクレオチド配列を有する請求項12に記載のポリヌクレオチド。

【請求項71】

SEQ ID NO:16のポリヌクレオチド配列を有する請求項12に記載のポリヌクレオチド。

【請求項72】

50

SEQ ID NO:17のポリヌクレオチド配列を有する請求項12に記載のポリヌクレオチド。

【請求項73】

SEQ ID NO:18のポリヌクレオチド配列を有する請求項12に記載のポリヌクレオチド。

【請求項74】

SEQ ID NO:19のポリヌクレオチド配列を有する請求項12に記載のポリヌクレオチド。

【請求項75】

SEQ ID NO:20のポリヌクレオチド配列を有する請求項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、脂質関連分子の核酸配列およびアミノ酸配列に関する。本発明はまた、これらの配列を利用した、癌、神経疾患、自己免疫/炎症疾患、胃腸障害、心血管障害、および脂質代謝障害の、診断・治療・予防に関する。本発明は更に、脂質関連分子の、核酸配列およびアミノ酸配列の発現における外来化合物の効果についての評価に関する。

【背景技術】

【0002】

脂質は、クロロホルムやエーテルなど無極性溶媒に溶性の、非水溶性で油性又は脂肪性の物質である。中性脂肪(トリアシルグリセロール類)は、主要な燃料源とエネルギー貯蔵の役割を果たす。脂肪酸は、1つのカルボキシル基と1つの長い無極性の炭化水素の尾をもった、長鎖の有機酸である。長鎖脂肪酸は、生物膜の構成単位である、糖脂質、磷脂質、及びコレステロールの重要な成分であり、生物学的な燃料分子であるトリグリセリド類の重要な成分でもある。磷脂質、スフィンゴ脂質、糖脂質、コレステロールなど脂質は、重要な、細胞膜の構造要素である。脂質とタンパク質とは、さまざまな形で会合する。糖脂質は、細胞内でタンパク質を運ぶ小胞と、細胞膜とを形成する。脂質と蛋白質との相互作用は、特定の膜および細胞内位置への細胞シグナル伝達および細胞増殖など、種々のプロセスに関わる蛋白質と糖脂質とのターゲティングにおいて機能する。種々のタンパク質が、脂質の生合成、輸送、および取り込みに関わる。また、シグナル伝達と蛋白質ターゲティングとに関わる主要なタンパク類は、翻訳後に付加される脂質由来基(lipid-derived groups)を持つ(Stryer, L. (1995) Biochemistry, W.H. Freeman and Co., New York NY, 264-267, 934ページ; Lehninger, A. (1982) Principles of Biochemistry, Worth Publishers, Inc. New York NY;およびExpASY "Biochemical Pathways"インデックス(Boehringer Mannheimウェブサイト "<http://www.expasy.ch/cgi-bin/search-biochem-index>" 内))。

【0003】

リン脂質

リン脂質の主要な1クラスとして、グリセロールのバックボーン、2つの脂肪酸鎖、及び1つのリン酸化したアルコールからなる、ホスホグリセリド類がある。ホスホグリセリドは細胞膜の成分である。主要なホスホグリセリドとしては、ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルイノシトール、ジホスファチジルグリセロールがある。ホスホグリセリド合成に参与する多くの酵素は膜に結合している(Meyers, R.A. (1995) Molecular Biology and Biotechnology, VCH Publishers Inc., New York NY, 494-501ページ)。ホスファチジン酸は、ホスファチジン酸シチジル転移酵素(ExpASY ENZYME EC 2.7.7.41)によってCDPジアシルグリセロールへ変換される。ジアシルグリセロール基の、CDPジアシルグリセロールからセリンへの転移によってホスファチジルセリンを生じ、また、イノシトールへの転移によってホスファチジルイノシトールを生じる。これらの転移は、それぞれCDPジアシルグリセロールセリンO-ホスファチジル転移酵素、及びCDPジアシルグリセロールイノシトール3ホスファチジル転移酵素(ExpASY ENZYME EC 2.7.8.8、ExpASY ENZYME EC 2.7.8.11)によって触媒される。ホスファチジルセリン デカルボキシラーゼは、ピルビン酸の補助因子を用いて、ホスファチジルセリンからホスファチジルエタノールアミンへの変換を触媒する(Voelker, D.R. (1997) Biochim. Biophys. Acta 1348:236-244)。ホスファチジルコリンは、食物に由来

10

20

30

40

50

するコリンを用いて、ジアシルグリセロール コリンホスホトランスフェラーゼ (ExPASy ENZYME 2.7.8.2) が触媒する、CDPコリンと1,2ジアシルグリセロールとの反応によって形成される。

【0004】

別のホスホグリセリド類は、小胞輸送プロセスに関わることが示されている。ホスファチジルイノシトール転移タンパク (PITP) は遍在性サイトソル蛋白であり、小胞体内およびゴルジ内の合成部位から他の細胞膜への燐脂質の輸送に関わると思われる。最近、PITPはポリホスホイノシチド合成機構の必須成分であり、したがって上皮成長因子と f-Met-Leu-Phe とによる正しいシグナル伝達と、エキソサイトーシスとに必要であることが示された。ポリホスホイノシチド合成でのPITPの役割は、細胞内小胞輸送へのPITPの関与をも説明しうる (Liscovitch, M. 他 (1995) *Cell* 81:659-662)。

10

【0005】

copine類はリン脂質結合タンパクであり、膜輸送において機能すると思われる。copine類は、脂質小胞凝集を促進する。copine類は膜活性に関わる1つのC2ドメインと、内在性タンパクと細胞外タンパクの間の相互作用を媒介しカルシウム結合とカルシウム調節とに関わる或るアネキシン型ドメインとを有する (Creutz, C.E. (1998) *J. Biol. Chem.* 273:1393-1402)。別のC2含有タンパクとしては、小胞輸送に関わる蛋白ファミリーであるシナプトタグミン類を含む。脳脊髄液中のシナプトタグミン濃度は、早期発症アルツハイマー病での低下が知られている (Gottfries, C.G. 他 (1998) *J. Neural Transm.* 105:773-786)。

20

【0006】

ホスファチジルイノシトール転移タンパク Sec14 は *in vitro* で膜二重層間のホスファチジルイノシトールとホスファチジルコリンとの交換を触媒する。Sec14は、ゴルジ体からの小胞出芽に必須である。Sec14は、燐脂質結合ドメインを示す疎水性ポケットを形成するカルボキシ末端ドメインを持つ (Sha, B. 他 (1998) *Nature* 391:506-510)。Sec14は、細胞性レチナルデヒド結合タンパク (CRAL)/三重機能ドメイン (TRIO) ファミリーのメンバーである (InterPro Entry IPR001251, <http://www.ebi.ac.uk/interpro>)。

【0007】

スフィンゴ脂質

スフィンゴ脂質は、長鎖アミノアルコールであるスフィンゴシンを持つ膜脂質の重要な1クラスである。スフィンゴ脂質は、1つの長鎖脂肪酸、1つの極性ヘッドグループのアルコール、及びスフィンゴシン又はスフィンゴシン誘導体から成る。スフィンゴ脂質の3つのクラスには、スフィンゴミエリン、セレブロシド、及びガングリオシドがある。ヘッドグループとしてホスホコリン又はホスホエタノールアミンを持つスフィンゴミエリン類は、神経細胞を取り巻くミエリン鞘に豊富に存在する。グルコース又はガラクトースのヘッドグループを持つガラクトセレブロシド類は、脳に特徴的である。他のセレブロシドは非神経組織に見られる。ヘッドグループが多数の糖ユニットを含むガングリオシドは脳に豊富に存在するが、非神経組織にも見られる。

30

【0008】

糖脂質

糖脂質もまた、動物細胞原形質膜の重要成分である。最も単純な糖脂質であるセレブロシドは、脂質成分に加え、1つのグルコース糖残基またはガラクトース糖残基のみからなる。ガングリオシドはグリコスフィンゴ脂質形質膜成分であり、脊椎動物の神経系に豊富である。ガングリオシドは最も複雑な糖脂質であり、少なくとも1つの酸性糖残基 (シアル酸、すなわち N-acetylneuraminate: アセチルノイラミン酸または N-glycolylneuraminate: グリコリルノイラミン酸) を有するオリゴ糖部分に付着したセラミド (アシル化したスフィンゴシン) を持つ。糖残基は、UDPグルコース、UDPガラクトース、Nアセチルガラクトサミン、および CMP-Nアセチルノイラミン酸の供与体によって逐次的にセラミドへ付加される。15種以上のガングリオシドが同定されており、 G_{M1} と G_{M2} とが最もよく特徴付けられている (Stryer, L (1988) *Biochemistry*, W.H Freeman and Co., Inc. New York. 552-

40

50

554ページ)。

【0009】

ガングリオシドは、細胞表面相互作用、細胞分化、神経突起生成、膜貫通シグナル伝達の誘起と調整、mediatiosynaptic(媒介シナプス)機能、神経修復、神経突起伸展、および神経細胞死において重要な役割を果たすと思われる(Hasegawa, T.他(2000) J. Biol. Chem. 275:8007-8015)。形質膜内のガングリオシドの存在がこれらのイベントを調和させるのに重要である一方、シアリダーゼによる続いた糖質基の除去(脱シアリル化)も、神経分化の調節に重要なようである。

【0010】

特異的な可溶性Nエチルマレイミド感受性因子付着タンパク(SNAP)受容体(SNARE)タンパク類が、種々の膜輸送ステップに必要である。線維芽細胞株内でSNAREタンパクVti1aはゴルジマーカークラスと共存しており、Vti1bはゴルジおよびトランスゴルジ網マーカークラスまたはエンドソームマーカークラスと共存している。Vti1aの或る脳特異的スプライス変異体は、神経終末から単離したシナプス小胞内およびクラスリン被覆小胞内に豊富である。Vti1a- とシナプトブレピンとは、ライフサイクル全体にわたりシナプス小胞の不可欠部分である。Vti1a- は、シナプス小胞のリサイクルまたは生合成の間、SNARE複合体の形で機能する(Antonin, W. 他(2000) J. Neurosci. 20:5724-5732)。

10

【0011】

シアリダーゼは、グリコフィンゴ脂質分解の第一段階を、ガングリオシドから糖質部分を除去して触媒する。シアリダーゼ酵素は、サイトゾル、リソソームマトリクス、リソソーム膜、および形質膜に存在する(Hasegawa, T. 他(2000) J. Biol. Chem. 275:8007-8015)。シアリダーゼの顕著な特徴としては、1つの膜貫通ドメイン、1つのArg-Ile-Proドメイン、および3つのAspボックス配列を含む(Wada, T. (1999) Biochem. Biophys. Res. Commun. 261:21-27)。

20

【0012】

正常な神経発生時に、大脳皮質の錐体ニューロンは、皮質外套への神経細胞移動直後の樹状突起出芽のシングルバーストに関わる。樹状突起発生(dendritogenesis)下の細胞は、 G_{M2} ガングリオシド発現増加で特徴付けられる。この発現は樹状突起成熟後に低下する。このイニシャルバーストの後、新たな一次樹状突起(primary dendrite)の惹起は無い事を示唆する証拠がある。

30

【0013】

コレステロール

1個のアルコールが一端に付いた、4個の融合した環状炭化水素から成るコレステロールは、コレステロールが組込まれた膜の流動性を弱める。更にコレステロールは、コルチゾール、プロゲステロン、エストロゲン、及びテストステロンなど、ステロイドホルモンの合成に使用される。コレステロールから誘導される胆汁酸塩は、脂質の消化を促進する。皮膚内のコレステロールは、身体から過剰に水が蒸発するのを防ぐ障壁を形成する。コレステロール生合成の中間生成物群に由来する、ファルネシル基とゲラニルゲラニル基は、Rasなどシグナル伝達タンパク質、及びタンパク質ターゲティング蛋白質(Rabなど)に、翻訳後に付加される。これらの修飾は、これらのタンパク質の活性に重要である(Guyton, A .C. (1991) Textbook of Medical Physiology, W.B. Saunders Company, Philadelphia P A, 760-763ページ; Stryer, 前出, 279-280, 691-702, 934の各ページ)。

40

【0014】

哺乳類は、de novo生合成と食物の両方に由来するコレステロールを得る。肝臓は、哺乳類におけるコレステロール生合成の主要な部位である。生合成を達成するには、メバロン酸経路として知られる一連の酵素的ステップを経由する。律速段階は、ヒドロキシメチルグルタリル補酵素A(HMG-CoA)からメバロン酸への、HMG-CoAレダクターゼによる転換である。ロバスタチン(lovastatin)剤はHMG-CoAレダクターゼの強力な阻害剤であり、患者への投与が、血清コレステロール値を下げるために成される。de novo生合成または食物に由来するコレステロールは、体液中を、リポ蛋白質粒子の形で輸送される。これらのリ

50

ポ蛋白質粒子はまた、トリアシルグリセロール類をも輸送する。粒子は、極性脂質群とアポリポ蛋白質群との殻によって囲まれた疎水性脂質群のコアを持つ。そのタンパク質の各成分が疎水性脂質に溶解性を提供し、また細胞標的化シグナル群を有する。リポ蛋白質には、乳状脂粒、乳状脂粒残滓粒子、超低密度リポ蛋白(VLDL)、中間密度リポ蛋白(IDL)、低密度リポ蛋白(LDL)、及び高密度リポ蛋白(HDL)が含まれる(Meyers, 前出; Stryer, 前出, 691-702ページ)。血漿HDLレベルと早発性冠動脈心疾患の危険性には、強い逆相関関係がある。ApoLは、膵臓内で発現される1種のHDLアポリポ蛋白質である(Duchateau, P.N. 他(1997) *J. Biol. Chem.* 272:25576-25582)。

【0015】

肝臓および腸以外の殆どの細胞は、コレステロールを血中から取り込み、細胞自体では合成しない。細胞表面LDL受容体にLDL粒子が結合し、LDLは次にエンドサイトーシスによって取り込まれる(Meyers, 前出)。LDL受容体の欠除は、家族性高コレステロール血症を生じ、血漿コレステロールレベルを増加させ、最終的にはアテローム性硬化をもたらす(Stryer, 前出, 691-702ページ)。

【0016】

コレステロールの取り込みと生合成とに関与するタンパク質類は、細胞内コレステロール値に応じて厳密に調節される。ステロール調節エレメント結合タンパク質(SREBP)は、1種のステロール応答性転写因子である。正常なコレステロール条件下でSREBPは、小胞体膜内に残留する。コレステロール値が下がると、SREBPの調節された切断が起こり、この切断は、このタンパク質の細胞外ドメインを放出する。この切断されたドメインは次に核へ輸送され、核内でLDL受容体遺伝子の転写を活性化し、またコレステロール合成の酵素群をコードする遺伝子群の転写をも活性化する。これらの活性化は、これらの遺伝子上流にあるステロール調節エレメント(SRE)に結合して行う(Yang, J. 他(1995) *J. Biol. Chem.* 270:12152-12161)。コレステロールの取り込みと生合成との調節はまた、オキシステロール結合タンパク質(OSBP)を介しても生じる。オキシステロールはコレステロール異化時に形成される酸化産物であり、ステロイド生合成の調節に関わる。OSBPは高親和性細胞内受容体であり、多様なオキシステロールを受容する。オキシステロールはコレステロール合成を下方調節し、コレステロールのエステル化を刺激する(Lagace, T.A. 他(1997) *Biochem. J.* 326:205-213)。

【0017】

上清タンパク因子(supernatant protein factor: SPF)は、スクアレンエポキシ化と、スクアレンからラノステロールへの変換とを刺激する。SPFはサイトゾル性スクアレン転移タンパクであり、コレステロール生合成を増強する。スクアレンエポキシダーゼは膜結合酵素であってスクアレンをスクアレン2,3-オキシドに変換し、コレステロール恒常性の維持に重要な役割を果たす。SPFはサイトゾル脂質結合/転移タンパク(例えば トコフェロール転移タンパク、細胞性レチナル結合タンパク、酵母ホスファチジルイノシトール転移タンパク(Sec14p)、およびイカのレチナル結合タンパク)のファミリーに属する(Shibata, N. 他(2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98:2244-2249)。

【0018】

脂質代謝酵素

長鎖脂肪酸は、エイコサノイド生産の基質ともなり、数種の複雑な糖質やタンパク質の機能的な修飾にも重要である。炭素数が16及び18の脂肪酸が最も一般的である。脂肪酸の合成は細胞質内で起こる。第一ステップでは、アセチル補酵素A(CoA)カルボキシラーゼ(ACC)が、アセチルCoAと重炭酸からマロニルCoAを合成する。残りの各反応を触媒する酵素群は、多機能酵素、脂肪酸合成酵素(FAS)と呼ばれる単一ポリペプチド鎖に共有結合している。FASは、アセチルCoAとマロニルCoAとからのパルミチン酸の合成を触媒する。FASは、アセチルトランスフェラーゼ、マロニルトランスフェラーゼ、ケトアセチルシンターゼ、アシルキャリア蛋白質、ケトアシル還元酵素、脱水酵素、エノイルレダクターゼ、及びチオエステラーゼの活性を持つ。FAS反応の最終産物は、炭素数16の脂肪酸であるパルミチン酸である。小胞体(ER)の付属酵素群による、パルミチン酸の更なる伸長と不飽和

化によって、個々の細胞に必要な様々の長鎖脂肪酸を生じる。この付属酵素としては、NADHチトクロムb₅還元酵素、チトクロムb₅、及び不飽和化酵素が含まれる。

【0019】

細胞内で、脂肪酸は細胞質内の脂肪酸結合タンパク質類によって輸送される(Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) *134650 Fatty Acid-Binding Protein 1, Liver; FABP1)。エンドゼピンとしても、またアシルCoA結合タンパク質としても知られるジアゼパム結合阻害物質(DBI)は、内因性のアミノ酪酸(GABA)受容体リガンドであり、GABAの効果を下方向調節すると考えられる。DBIは長鎖及び中鎖をもつアシルCoAエステルと非常に強い親和性で結合し、これはアシルCoAエステルの細胞内キャリアとして機能している可能性がある(OMIM *125950 Diazepam Binding Inhibitor; DBI; PROSITE PDOC00686 Acyl-Co A-binding protein signature)。

10

【0020】

肝臓に貯蔵された脂肪と、脂肪トリグリセリド(adipose triglyceride)類とは、加水分解されて血液中に放出され、運ばれ得る。遊離脂肪酸は、アルブミンによって血液中を運ばれる。トリグリセリドとも中性脂肪とも呼ばれるトリアシルグリセロール類は、動物内の主要なエネルギー貯蔵体である。トリアシルグリセロールは、3つの脂肪酸鎖の付いたグリセロールのエステルである。グリセロール3リン酸は、グリセロールリン酸脱水素酵素によってジヒドロキシアセトンリン酸から、又はグリセロールキナーゼによってグリセロールから生成される。脂肪酸CoA類は、脂肪アシルCoA合成酵素によって脂肪酸から生成される。グリセロール3リン酸は、グリセロールリン酸アシルトランスフェラーゼによ

20

【0021】

ミトコンドリアとペルオキシソームとの酸化酵素は、CoA活性化された脂肪酸から2個の炭素のユニットを次々に除くことによって、飽和脂肪酸と不飽和脂肪酸を分解する。主要な酸化経路は飽和脂肪酸と不飽和脂肪酸の両方を分解し、補助経路は不飽和脂肪酸の分解に必要な付加的ステップを行う。ミトコンドリアとペルオキシソームの酸化経路は同様の酵素を使用するが、異なる基質特異性と機能をもつ。ミトコンドリアは、短鎖、中鎖、長鎖の脂肪酸を酸化し、細胞のためのエネルギーを産生する。ミトコンドリア酸化は、心筋と骨格筋の主要なエネルギー源となっている。飢餓、持久運動、及び糖尿病の場合のようにグルコースレベルが低くなった時は、肝臓での酸化がケトン体を末梢循環へ提供する(Eaton, S. 他(1996) Biochem. J. 320:345-357)。ペルオキシソームは、中鎖、長鎖、超長鎖の脂肪酸、ジカルボン脂肪酸、分岐脂肪酸、プロスタグランジン、生体異物、胆汁酸中間物を酸化する。ペルオキシソーム酸化の主な役割は、毒性の脂肪親和性カルボン酸を短くしてそれらの排泄を促進させ、ミトコンドリア酸化の前に超長鎖脂肪酸を短くすることにある(Mannaerts, G.P.及びP.P. Van Veldhoven (1993) Biochimie 75:1

30

40

【0022】

3つのクラスの脂質代謝酵素をさらに詳細に考察する。その3つのクラスとは、リパーゼ、ホスホリパーゼ、及びリポキシゲナーゼである。

【0023】

リパーゼ

トリグリセリドは、リパーゼによって脂肪酸とグリセロールへ加水分解される。脂肪細

50

胞は、貯蔵されたトリアシルグリセロールを分解するリパーゼを持ち、脂肪酸を燃料として必要とする他の組織へ輸送するために、脂肪酸を放出する。リパーゼは、動物、植物、及び原核生物に広範囲に分布する。トリアシルグリセロールリパーゼともトリブチラーゼとも知られる、トリグリセリドリパーゼ(ExPASy ENZYME EC 3.1.1.3)は、トリグリセリドのエステル結合を加水分解する。高等脊椎動物には、胃、肝臓、膵臓の各リパーゼを含む、少なくとも3種類の組織特異的アイソザイムが存在する。これらの3タイプのリパーゼは、構造的に互いに密接に関連しており、リポ蛋白リパーゼにも構造的に密接に関連している。胃、肝臓、膵臓の各リパーゼで最も保存された部分は、1つのセリン残基を中心とした辺りにあり、そのセリン残基は原核生物起源のリパーゼ類にも存在する。このセリン残基での突然変異は、これらリパーゼを不活性にする。胃、肝臓、膵臓の各リパーゼは、リポ蛋白トリグリセリドとリン脂質を加水分解する。腸内の胃リパーゼは、食物脂肪の消化と吸収を助ける。肝臓リパーゼは、肝臓組織の内皮表面に結合して、そこで作用する。肝臓リパーゼはまた、血漿脂質の調整にも主要な役割を果たす。効率的な食物脂質の加水分解のために、膵臓リパーゼにはコリパーゼと呼ばれる小さいタンパク質補助因子が必要である。コリパーゼはリパーゼのC末端の非触媒ドメインに結合し、それによって活性型コンフォメーションを安定化し、全体的な疎水性結合部位を相当に増大させる。これらの酵素の欠損がヒトで同定されており、全ては病的レベルの循環リポ蛋白粒子に関連している(Gargouri, Y. 他(1989) *Biochim. Biophys. Acta* 1006:255-271; Connelly, P.W. (1999) *Clin. Chim. Acta* 286:243-255; van Tilbeurgh, H. 他(1999) *Biochim Biophys Acta* 1441:173-184)。

10

20

【0024】

清澄化因子(clearing factor)リパーゼ、ジグリセリドリパーゼ、又はジアシルグリセロールリパーゼとも知られる、リポ蛋白リパーゼ(ExPASy ENZYME EC 3.1.1.34)は、循環血漿中のリポ蛋白中に存在する、トリグリセリドとリン脂質を加水分解する。そのリポ蛋白としては、乳状脂粒、超低密度と中間密度のリポ蛋白質、及び高密度リポ蛋白質(HDL)が含まれる。リポ蛋白リパーゼ(LPL)は、膵臓リパーゼと肝臓リパーゼと共に、高度の一次配列相同性を共有している。リポ蛋白リパーゼと肝臓リパーゼは、どちらもグリコサミノグリカンを介して毛細血管の内皮細胞につながり留められており、静脈注射によるヘパリン投与によって放出され得る。LPLは主に、脂肪細胞、筋細胞、マクロファージによって合成される。LPLの触媒作用はアポリポ蛋白質C-IIによって活性化され、1 M塩化ナトリウムのような高イオン強度条件下で抑制される。ヒトのLPL欠損は、代謝病(例えばトリグリセリド過剰血、HDL2欠損症、及び肥満など)の一因となる(Jackson, R. L. (1983), *The Enzymes* (Boyer, P.D. 編集) Vol. XVI, 141-186ページ, Academic Press, New York NY; Eckel, R.H. (1989) *New Engl. J. Med.* 320:1060-1068)。

30

【0025】

ホスホリパーゼ

膜リン脂質の加水分解を触媒する酵素グループであるホスホリパーゼは、リン脂質中の切断される結合によって分類される。ホスホリパーゼはPLA1、PLA2、PLB、PLC、及びPLDのファミリーに分類される。ホスホリパーゼは、エイコサノイド生合成に利用されるアラキドン酸を作ることによって、多くの炎症反応に関与する。詳細には、アラキドン酸は、リソ血小板活性化因子(lyso-platelet-activating factor)やエイコサノイドのような、炎症の、生物活性を持つ脂質媒介物へプロセスされる。膜リン脂質からのアラキドン酸合成は、エイコサノイドの主要な4クラス(プロスタグランジン、プロスタサイクリン、トロンボキサン、ロイコトリエン)の生合成の律速段階である。これらのエイコサノイドは20炭素分子であり、脂肪酸に由来する。エイコサノイドはシグナル分子で、痛覚、発熱及び炎症に関与している。全てのエイコサノイドの前駆体はアラキドン酸で、アラキドン酸はホスホリパーゼA₂によってリン脂質から、また、ジアシルグリセロールリパーゼによってジアシルグリセロール類から生成される。ロイコトリエン類は、リポキシゲナーゼの作用によってアラキドン酸から産出される(Kaiser, E. 他(1990) *Clin. Biochem.* 23:349-370)。更に、ロイコトリエンB₄は或るフィードバックループにおいて機能することが

40

50

知られており、そのループが更にPLA2活性を増加させる(Wijkander, J.他(1995) J. Biol. Chem. 270:26543-26549)。

【0026】

分泌性のホスホリパーゼA₂(PLA₂)スーパーファミリーは、多数の異種の酵素より成っており、その共通の特徴はホスホグリセリドのsn-2脂肪酸アシルエステル結合を加水分解することである。グリセロリン脂質の加水分解によって、遊離脂肪酸とリゾリン脂質が放出される。PLA₂活性は、生物活性を持つ脂質、ヒドロキシ脂肪酸、及び血小板活性化因子の、生合成の前駆体を産生する。PLA₂は蛇毒の成分として記述されたのを始めとして、後には多くの種で特徴づけられている。PLA₂は従来、アミノ酸配列、2価陽イオン要求性、及びジスルフィド結合の位置を基に、いくつかの主要なグループとサブグループに分類されてきた。グループI、II、及びIIIのPLA₂は、低分子量をもつ分泌型Ca²⁺依存性タンパク質から構成されている。グループIVのPLA₂は主に、85キロダルトンのCa²⁺依存性細胞質ホスホリパーゼである。最後に、多数のCa²⁺非依存性のPLA₂が記述されており、それらがグループVを構成する(Davidson, F.F. 及び E.A. Dennis (1990) J. Mol. Evol. 31:228-238; Dennis, E.F. (1994) J. Biol Chem. 269:13057-13060)。

10

【0027】

非常に良く特徴付けられた、当初のPLA₂は、蛇毒と蜂毒において見られるグループI、II、IIIのPLA₂であった。これらの毒PLA₂は、共通の触媒機序、同じCa²⁺要求性、及び保存された1次構造と3次構造を含め多くの特徴を哺乳類PLA₂と共有する。獲物の消化の役割に加え、毒PLA₂は、哺乳動物組織で、神経毒性、筋毒性、抗凝血性、及び炎症誘発性の効果を示す。この多様な病態生理学的効果は、様々な細胞および組織上の、これらの酵素への特異的で高親和性の受容体群の存在による(Lambeau, G. 他(1995) J. Biol. Chem. 270:5534-5540)。

20

【0028】

グループI、IIA、IIC、及びVからのPLA₂は哺乳類と鳥類の細胞で記述されており、当初は組織分布によって分類されたが、その区別はもはや絶対的ではない。グループIのPLA₂は膵臓で発見され、グループIIAとIICは炎症に関連する組織(例えば滑膜)に、またグループVは心臓組織に由来した。膵臓PLA₂は食物脂質の消化機能を果たす。また、細胞増殖、平滑筋収縮、及び急性肺損傷で、役割を果たすと提起されている。グループIIの炎症PLA₂は、炎症過程の強力な媒介物であり、炎症障害をもつ患者の血清と滑液に高発現されている。グループIIの炎症PLA₂は、アッセイされたほとんどのヒト細胞タイプで見つかっており、敗血症ショック、腸癌、リウマチ様関節炎、上皮過形成など広範囲の病理過程で発現される。グループVのPLA₂は脳組織からクローンされており、心臓組織で強度に発現される。或るヒトPLA₂が胎児肺から最近クローンされ、その構造的特性に基づくと、グループXと呼ばれる、哺乳類PLA₂の新しいグループの最初のメンバーとなる様である。他のPLA₂群が種々のヒト組織と細胞株からクローンされており、PLA₂の広い多様性を示唆している(Chen, J. 他(1994) J. Biol. Chem. 269:2365-2368; Kennedy, B.P. 他(1995) J. Biol. Chem. 270:22378-22385; Komada, M. 他(1990) Biochem. Biophys. Res. Commun. 168:1059-1065; Cupillard, L. 他(1997) J. Biol. Chem. 272:15745-15752;およびNalefski, E.A. 他(1994) J. Biol. Chem. 269:18239-18249)。

30

40

【0029】

リゾホスホリパーゼ、レシチナーゼB、又はリゾレシチナーゼとも知られる、ホスホリパーゼB(PLB)(Expasy ENZYME EC 3.1.1.5)は、細胞内の脂質を代謝し、広範囲に分布する酵素であり、多くのアイソフォームがある。約15~30kDの小さいアイソフォームは加水分解酵素として機能し、60kDを超える大きなアイソフォームは加水分解酵素とアシル基転移酵素の両方の機能をする。PLBの特別の基質であるリゾホスファチジルコリンは、形成された時又は細胞内に輸送された時に、細胞膜の溶解を起こさせる。PLBは、アシルカルニチン、アラキドン酸、及びホスファチジン酸など、脂質因子によって調節される。これらの脂質因子は、炎症応答を含む多くの経路での重要なシグナル伝達分子である(Anderson, R. 他(1994) Toxicol. Appl. Pharmacol. 125:176-183; Selle, H. 他(1993); Eur. J.

50

Biochem. 212:411-416)。

【0030】

ホスホリパーゼC(PLC)(ExpASY ENZYME EC 3.1.4.10)は、膜貫通シグナル伝達に重要な役割を果たしている。ホルモン、成長因子、神経伝達物質、及び免疫グロブリンなど、多くの細胞外シグナル分子は、それぞれに対応する細胞表面受容体に結合し、PLCを活性化する。或る活性化したPLCの役割は、形質膜の少量の成分であるホスファチジルイノシトール-4,5-2リン酸(PIP2)の加水分解を触媒し、ジアシルグリセロールとイノシトール1,4,5-3リン酸(IP3)を産生することである。IP3とジアシルグリセロールは、それぞれの生化学的経路でセカンドメッセンジャーとして働き、一続きの細胞内反応を誘発する。IP3は内的細胞貯蔵からCa²⁺を放出させ、ジアシルグリセロールはタンパク質キナーゼC(PKC)を活性化させる。両経路は、分泌、神経作用、代謝、及び増殖など、細胞過程を調節する膜貫通シグナル伝達メカニズムの一部である。

10

【0031】

いくつかの異なるPLCのアイソフォームが同定されており、PLC- 、PLC- 、PLC- と分類されている。サブタイプは、PLC- - 1のようにギリシャ文字の後にアラビア数字を加えることによって名付けられる。PLCは62~68kDaの分子量をもち、そのアミノ酸配列は2つの領域で相当の類似性を示す。Xと名づけられた、この最初の領域には約170アミノ酸を有し、第2のY領域は約260アミノ酸を含む。

【0032】

PLCの3つのアイソフォームの触媒作用は、Ca²⁺に依存する。PLC中のCa²⁺の結合部位は、2カ所の保存領域の1つであるY領域に位置すると考えられている。ホスファチジルイノシトール(PI)、ホスファチジルイノシトール4-1リン酸(PIP)、及びホスファチジルイノシトール4,5-2リン酸(PIP2)など、共通にイノシトールを含有するリン脂質の、これらのアイソフォームのいずれかによる加水分解は、環状及び非環状のイノシトールリン酸を生じる(Rhee, S.G.及び Y.S. Bae (1997) J. Biol. Chem. 272:15045-15048)。

20

【0033】

全ての哺乳類PLCには、約100アミノ酸の長さで、両親媒性ヘリックスに隣接する2枚の逆平行のシートから成る、プレクストリン(pleckstrin)相同性(PH)ドメインがある。PHドメインは、Gタンパク質の / サブユニット又はPIP2のいずれかと相互作用して、PLCを膜の表面に導く(PROSITE PDOC50003)。

30

【0034】

レシチナーゼD、リポホスホジエステラーゼII、及びコリンホスファターゼとも知られる、ホスホリパーゼD(PLD)(ExpASY ENZYME EC 3.1.4.4)は、ホスファチジルコリン他のリン脂質の加水分解を触媒してホスファチジン酸を産生する。PLDは、膜小胞の輸送、細胞骨格ダイナミクス、及び膜貫通シグナル伝達に重要な役割を果たしている。更に、PLDの活性化は、細胞分化及び成長に関与する(Liscovitch, M. (2000) Biochem. J. 345:401-415の概説を参照)。

【0035】

PLDは、哺乳類細胞内で、ホルモン、神経伝達物質、成長因子、サイトカイン、タンパク質キナーゼCの活性因子、及び、Gタンパク質共役受容体へのアゴニスト結合など、多様な刺激に応じ活性化される。少なくとも2種類の哺乳類PLD、PLD1とPLD2が同定されている。PLD1はタンパク質キナーゼC によって、また、共に低分子GTPaseであるARFとRhoAとによって活性化される(Houle, M.G.およびS. Bourgoin (1999) Biochim. Biophys. Acta 1439:135-149)。PLD2は、オレイン酸など不飽和脂肪酸によって選択的に活性化され得る(Kim, J.H. (1999) FEBS Lett. 454:42-46)。

40

【0036】

リボキシゲナーゼ

リボキシゲナーゼ(ExpASY ENZYME EC 1.13.11.12)は非ヘム鉄を含有する酵素で、リポ蛋白など数種の多価不飽和脂肪酸の二原子酸素添加を触媒する。リボキシゲナーゼは、植物、真菌、及び動物に広範囲に見られる。いくつかの異なるリボキシゲナーゼが知られて

50

おり、それぞれが特徴のある酸化作用をもっている。動物では、炭素-3、5、8、11、12、15の位置でアラキドン酸の二原子酸素添加を触媒する特異的なリポキシゲナーゼ群がある。これらの酵素は、これらが二原子酸素添加するアラキドン酸の位置によって名前がついている。動物のリポキシゲナーゼは、約75~80 kDaの分子量をもつ一本鎖のポリペプチド鎖をもつ。リポキシゲナーゼはN末端バレルドメインと非ヘム鉄の一原子を含んだ大きな触媒ドメインをもつ。この鉄を含んだ酵素(ferric enzyme)が酸化されて活性状態になることが、触媒に必要である(Yamamoto, S. (1992) *Biochim. Biophys. Acta* 1128:117-131; Brash, A.R. (1999) *J. Biol. Chem.* 274:23679-23682)。様々のリポキシゲナーゼ阻害剤が存在し、阻害メカニズムによって5種類の主要カテゴリに分類される。これらのカテゴリには、抗酸化剤、鉄キレート剤、基質類似体、リポキシゲナーゼ活性化タンパク質阻害剤、そして最後に上皮成長因子受容体阻害剤が含まれる。

10

【0037】

e-LOX-3又はAloxe3とも知られる3-リポキシゲナーゼが最近、マウス表皮からクローンされた。Aloxe3はマウスの11番染色体にあり、Aloxe3の推定アミノ酸配列は12-リポキシゲナーゼの配列群と54%同一である(Kinzig, A. (1999) *Genomics* 58:158-164)。

【0038】

アラキドン酸：酸素5-オキシドレダクターゼとしても知られる5-リポキシゲナーゼ(5-LOX、ExpASY ENZYME: EC 1.13.11.34)は、主に白血球、マクロファージ、肥満細胞に見られる。5-LOXはアラキドン酸を、まず5-ヒドロペルオキシエイコサテトラエン酸(5-HPETE)へ、次にロイコトリエン(LTA4 (5,6-オキシド-7,9,11,14-エイコサテトラエン酸))に変換する。ロイコトリエンA4ヒドロラーゼによる、ロイコトリエンA4の続いた変換により、強力な好中球化学誘引物質ロイコトリエンB4が産生される。または、ロイコトリエンC4シンターゼによるLTA4のグルタチオン抱合と下流代謝によって、特に喘息の、気道反応性と粘液分泌に影響するシステインルロイコトリエンに至る。多くのリポキシゲナーゼは、活性のために他の補助因子またはタンパク質を必要としない。対照的に哺乳類5-LOXは、カルシウムとATPを必要とし、また5-LOX活性化タンパク質(FLAP)の存在下で活性化される。FLAP自体がアラキドン酸に結合する。また、5-LOXに基質を供給する(Lewis, R.A. 他(1990) *New Engl. J. Med.* 323:645-655)。5-LOXとFLAPの発現レベルは、多因性(原発性)肺高血圧症患者の肺で増加することが発見された(Wright, L.他(1998) *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 157:219-229)。

20

30

【0039】

12-リポキシゲナーゼ(12-LOX、ExpASY ENZYME: EC 1.13.11.31)はアラキドン酸に酸素添加して、12-ヒドロペルオキシエイコサテトラエン酸(12-HPETE)を形成する。哺乳類12-リポキシゲナーゼは、その発現の原型の組織をとって命名される(従って、白血球タイプ、血小板タイプ、または表皮タイプ)。血小板タイプの12-LOXは表皮標本と類表皮細胞中で最も多いアイソフォームであることが発見されている。白血球12-LOXは最初にブタの白血球で非常に良く特徴付けられ、免疫化学アッセイで哺乳類の組織に、かなり広範囲な分布を示すことが発見された。組織分布に加え、白血球12-LOXは、アラキドン酸基質から12-HPETEに加え15-HPETEを形成する能力で、血小板型12-LOXと区別できる。白血球12-LOXは15リポキシゲナーゼ(15-LOX)に高度に近縁である。その両者は二重特異性リポキシゲナーゼであり、高等哺乳類では、その1次構造が約85%一致している。白血球12-LOXは、気管上皮、白血球、およびマクロファージに見られる(Conrad, D.J. (1999) *Clin. Rev. Allergy Immunol.* 17:71-89)。

40

【0040】

15-リポキシゲナーゼ(15-LOX、ExpASY ENZYME: EC 1.13.11.33)は、ヒトの網赤血球、気道上皮、及び好酸球に見られる。15-LOXは、哺乳類、特にウサギとヒトのアテローム動脈硬化病変部に検知されている。リポ蛋白の酸化修飾の他に、この酵素はアテローム動脈硬化病変部での炎症反応に重要である。15-LOXはサイトカインIL-4によってヒト単球内で誘導されることが示されており、このIL-4は炎症過程に関与することが知られている(Kuhn, H. および S. Borngraber (1999) *Adv. Exp. Med. Biol.* 447:5-28)。

50

【 0 0 4 1 】

GDSL様モチーフを活性部位の一部として持つ、種々の脂肪分解酵素が同定されている。このファミリーのメンバーとしては、リパーゼ/アシルヒドロラーゼ、易熱性ヘモリシン、およびウサギホスホリパーゼ(AdRab-B)(Interpro entry IPR001087, <http://www.sanger.ac.uk>)を含む。AdRab-Bの相同体であるモルモット腸ホスホリパーゼBはカルシウム非依存性ホスホリパーゼであり、グリセロ燐脂質のアシルエステル結合を逐次加水分解することにより、エクソ酵素として脂質消化に寄与する。ホスホリパーゼBはまた、男性生殖の役割を持つ(Delagebeaudeuf, C. 他(1998) J. Biol. Chem. 273:13407-13414)。

【 0 0 4 2 】

脂質関連分子と疾患

脂質と脂質関連タンパク質とは、ヒトの複数の疾患と障害とにおいて役割を持つ。長鎖脂肪酸合成の増加は、乳腺、前立腺、卵巣、結腸、および子宮内膜などの新生物内で起こる。

10

【 0 0 4 3 】

動脈疾患であるアテローム性硬化では、動脈壁の内側に脂肪性病変が形成される。これらの病変は、動脈柔軟性喪失や、血塊形成を助長する(Guyton、前出)。血漿HDLレベルと早発性冠動脈心疾患の危険性には、強い逆相関関係がある。LDL受容体の欠除は、家族性高コレステロール血症を生じ、血漿コレステロールレベルを増加させ、最終的にはアテローム性硬化をもたらす(Stryer, 前出、691-702ページ)。オキシステロールはヒトのアテローム斑に存在し、斑の発症において活性な役割を果たすと思われる(Brown, A.J. (1999) *Atherosclerosis* 142:1-28)。リパーゼ、ホスホリパーゼ、及びリポキシゲナーゼは、アテローム性動脈硬化、肥満、関節炎、喘息、及び癌など、複雑な疾患に、またウォルマン病やタイプ1高リポ蛋白血症など、単一遺伝子欠損に寄与していると考えられる。

20

【 0 0 4 4 】

脂肪変性または脂肪肝の特徴は肝臓内のトリグリセリド蓄積であり、アルコール症、糖尿、肥満、および長期非経口栄養を含む種々の条件に伴って起こりうる。脂肪変性は、肝線維症や肝硬変をもたらす。

【 0 0 4 5 】

ニーマンピック病のAタイプとBタイプでは、スフィンゴミエリン分解酵素の欠陥により、スフィンゴミエリン(ある種のスフィンゴ脂質)と他の脂質群が中枢神経系に蓄積し、神経変性と肺病を起こさせる。ニーマンピック病のCタイプは、コレステロールの輸送の欠陥から起こり、スフィンゴミエリンとコレステロールとをリソソームに蓄積させ、スフィンゴミエリン分解酵素の活性を二次的に減少させる。大発作、失調症、以前に学んだ発語能力の損失等の神経症状が生後1~2年で現れる。推定上の或るコレステロール感知ドメインを持つNPCタンパク質での或る突然変異が、ニーマンピック病タイプCの1マウスモデルで見つかった(Fauci, 前出 2175ページ; Loftus, S.K. 他(1997) *Science* 277:232-235)。

30

【 0 0 4 6 】

テイ-サックス病は常染色体劣性進行性神経変性障害であり、ヘキササミニダーゼA酵素の欠損により、 G_{M2} ガングリオシドが脳に蓄積(Igdoura, S.A. 他(1999) *Hum. Mol. Gene* 8:1111-6)して起こる。テイ-サックス病の特徴は、発達遅滞の発症、その後の麻痺、痴呆、失明、および通常は生後2, 3年内の死亡である。テイ-サックス病の確証は、剖検で、中枢神経系の、膨張したニューロンを同定して得られる(Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) Johns Hopkins University, Baltimore, MD. MIM Number:272800, 8/4/2000, WWW URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>)。テイ-サックス病の場合、皮質錐体ニューロンでは2度目の樹状突起発生がある(Walkley, S.U. 他(1998) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 845:188-99)。

40

【 0 0 4 7 】

他の複数の疾患はまた、シアリダーゼ活性の欠損を伴う。 G_{M1} ガングリオシド蓄積症とモルキオ(Morquio)病B型とは表現型が異なるが、共にガラクトシダーゼ欠損症から生じ

50

る。シアリドーシスはノイラミニダーゼ欠損から生じるが、症状はガングリオシド蓄積症に類似する。各シアリダーゼ欠損症の表現型が重複する理由として考えられることは、これらの酵素が、リソソーム内に複合体として存在することである(Callahan, J.W. (1999) Biochim. Biophys. Acta. 1455:85-103)。

【0048】

PLA類は、様々な疾患過程に関与すると考えられる。例えばPLAは、膵臓、心臓組織、炎症関連組織に見られる。膵臓PLAは食物脂質の消化機能を果たす。また、細胞増殖、平滑筋収縮、及び急性肺損傷で、ある種の役割を果たすと提起されている。炎症PLAは、炎症過程の強力な媒介物であり、炎症障害をもつ患者の血清と滑液に高度なレベルで発現される。炎症PLAは、ほとんどのヒト細胞タイプで見られ、敗血ショック、腸癌、リウマチ様関節炎、上皮過形成など広範囲の病理過程で発現される。

10

【0049】

ヒトの組織でのPLBの役割が様々な研究で調べられてきた。PLB類によるリゾホスファチジルコリンの加水分解は、赤血球膜における溶解を起こす(Selle、前出)。同様に、Ender sen, M.J.他(1993; Scand. J. Clin. Invest. 53:733-739)は、子かん前症の複数の女性で、PLBによるリゾホスファチジルコリンの増加した加水分解が、遊離脂肪酸を血清中に放出させることを報告した。腎臓の研究では、PLBが Na^+ , K^+ - ATPaseを、シクロスポリンAの細胞毒性効果と細胞融解効果とから保護することが示された(Anderson、前出)。

【0050】

リパーゼ、ホスホリパーゼ、及びリポキシゲナーゼは、アテローム性動脈硬化、肥満、関節炎、喘息、及び癌など、複雑な疾患に、またウォルマン病やタイプ1高リポ蛋白血症など、単一遺伝子欠損に寄与していると考えられる。

20

【0051】

発現プロファイル作成

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。

30

【0052】

新規の脂質関連分子、およびそれらをコードするポリヌクレオチド群の発見により、新規の組成物を提供することで当分野の要望に応えることができる。これらの新規の組成物は、癌、神経疾患、自己免疫/炎症疾患、胃腸障害、心血管障害、および脂質代謝障害の、診断・予防・治療において有用であり、また、脂質関連分子の核酸配列及びアミノ酸配列の発現における外来化合物の影響についての評価にも有用である。

【発明の開示】

【発明の効果】

40

【0053】

本発明は、総称して「LIPAM」、個別にはそれぞれ「LIPAM-1」、「LIPAM-2」、「LIPAM-3」、「LIPAM-4」、「LIPAM-5」、「LIPAM-6」、「LIPAM-7」、「LIPAM-8」、「LIPAM-9」、「LIPAM-10」と呼ぶ、脂質関連分子である精製されたポリペプチドを提供する。或る態様において本発明は、(a)SEQ ID NO:1-10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:1-10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%の同一性を持つ天然アミノ酸配列を有するポリペプチド、(c)SEQ ID NO:1-10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、および(d)SEQ ID NO:1-10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免疫原性断片、からなる群から選択した、単離されたポリペプチドを提供する。一実施

50

例で本発明は、SEQ ID NO:1-10のアミノ酸配列を持つ、単離されたポリペプチドを提供する。

【0054】

また、本発明は(a)SEQ ID NO:1-10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:1-10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:1-10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:1-10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:1-10

10

【0055】

本発明は更に、(a)SEQ ID NO:1-10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:1-10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%の同一性を有する或る天然アミノ酸配列を持つポリペプチド、(c)SEQ ID NO:1-10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生物学的活性断片、および(d)SEQ ID NO:1-10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持つ組換えポリヌクレオチドを提供する。一実施態様で本発明は、この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。別の実施態様で本発明は、この組換えポリヌクレオチドを持つ遺伝形質転換生物体を提供する。

20

【0056】

更に本発明は、(a)SEQ ID NO:1-10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と、(b)SEQ ID NO:1-10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%以上の同一性を有する或る天然アミノ酸配列を持つポリペプチドと、(c)SEQ ID NO:1-10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と、(d)SEQ ID NO:1-10からなる群から選択したアミノ酸配列を持つポリペプチドの免疫原性断片、とからなる群から選択したポリペプチドを製造する一方法を提供する。製造方法は、(a)或る細胞を該ポリペプチドの発現に適した条件下で培養し、この細胞を組換えポリヌクレオチドを用いて形質転換する過程と、(b)そのように発現したポリペプチドを回収する過程からなる。この組換えポリヌクレオチドは、該ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに対し機能的に連結したプロモーター配列を持つ。

30

【0057】

本発明は更に、(a)SEQ ID NO:1-10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:1-10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%の同一性を有する或る天然アミノ酸配列を持つポリペプチド、(c)SEQ ID NO:1-10からなる群から選択したアミノ酸配列を持つポリペプチドの生物学的活性断片、および(d)SEQ ID NO:1-10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に特異結合する、単離された抗体を提供する。

40

【0058】

本発明は更に、(a)SEQ ID NO:11-20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:11-20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。一実施態様で該ポリヌクレオチドは、少なくとも60の連続したヌクレオチド群からなる。

50

【0059】

本発明は更に、サンプル中の標的ポリヌクレオチドを検出する一方法を提供する。ここで、標的ポリヌクレオチドは、(a)SEQ ID NO:11-20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、(b)SEQ ID NO:11-20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)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した、或るポリヌクレオチドの配列を持つ。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し、複合体が存在すればオプションでその量を検出する過程からなる。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。一実施態様では、プローブは少なくとも60の連続したヌクレオチド群からなる。

10

【0060】

本発明はまた、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:11-20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:11-20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%の相同性を有す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た配列のポリヌクレオチドを有する。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ればオプションでその量を検出する過程からなる。

20

【0061】

本発明は更に、或る有効量のポリペプチドと薬物として許容し得る或る賦形剤とからなる、或る組成物を提供する。有効量のポリペプチドは、(a)SEQ ID NO:1-10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:1-10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:1-10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の生物学的活性断片、および(d)SEQ ID NO:1-10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免疫原性断片、からなる群から選択される。一実施態様で該組成物は、SEQ ID NO:1-10からなる一群から選択された或るアミノ酸配列を持つ。更に本発明は、この組成物を機能的LIPAMの発現低下に関連した疾患や症状の治療を必要とする患者に投与方法を提供する。

30

【0062】

本発明はまた、(a)SEQ ID NO:1-10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:1-10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%の同一性を有する天然アミノ酸配列を持つポリペプチド、(c)SEQ ID NO:1-10からなる群から選択したアミノ酸配列を持つポリペプチドの生物学的活性断片、および(d)SEQ ID NO:1-10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)該ポリペプチドを有する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。別法では、本発明は、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とを有する、或る組成物を提供する。更なる別法では、本発明は、機能的LIPAMの発現の低下に関連した疾患や症状の治療を必要とする患者への、この組成物の投与方法を提供する。

40

50

【0063】

本発明は更に、(a)SEQ ID NO:1-10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:1-10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%の同一性を有する天然アミノ酸配列を持つポリペプチド、(c)SEQ ID NO:1-10からなる群から選択したアミノ酸配列を持つポリペプチドの生物学的活性断片、および(d)SEQ ID NO:1-10からなる群から選択したアミノ酸配列を持つ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につき、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。或いは本発明は、この方法で同定したアンタゴニスト化合物と薬物として許容し得る賦形剤とを有する組成物を提供する。更なる別法では、本発明は、この組成物の、機能的LIPAMの過剰発現に関連した疾患や症状の治療を必要とする患者への投与方法を提供する。

10

【0064】

本発明は更に、(a)SEQ ID NO:1-10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:1-10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%の同一性を有する或る天然アミノ酸配列を持つポリペプチド、(c)SEQ ID NO:1-10からなる群から選択した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:1-10からなる群から選択したアミノ酸配列を持つ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に特異結合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)該ポリペプチドを適切な条件下で少なくとも1つの試験化合物に混合させる過程と、(b)この試験化合物と該ポリペプチドとの結合を検出し、それにより該ポリペプチドに特異結合する化合物を同定する過程からなる。

20

【0065】

本発明は更に、(a)SEQ ID NO:1-10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:1-10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%の同一性を有する或る天然アミノ酸配列を持つポリペプチド、(c)SEQ ID NO:1-10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、および(d)SEQ ID NO:1-10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にとり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。

30

【0066】

更に本発明は、SEQ ID NO:11-20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有する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。

40

【0067】

本発明は更に、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)核酸群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群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:11-20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:11-20からなる群から選択した或るポリヌクレオチド配列と

50

の少なくとも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)に相補的な配列を持つポリヌクレオチド、(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した或るポリヌクレオチドの少なくとも20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:11-20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:11-20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。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。

10

【発明を実施するための最良の形態】

【0068】

(本発明の記載について)

20

本発明のタンパク質、ヌクレオチド配列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、材料および方法に本発明が限定されるものではなく、修正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態様を説明する目的で用いたものに過ぎず、特許請求の範囲にのみ限定される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。

【0069】

請求の範囲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。

30

【0070】

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に関係して用い得る、細胞、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。

40

【0071】

(定義)

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

【0072】

用語「アゴニスト」は、LIPAMの生物学的活性を強めたり、模倣する分子を指す。アゴニストの例としては、タンパク質、核酸、糖質、小分子その他の任意の化合物や組成物の内、LIPAMと直接に相互作用することによって、或いはLIPAMが関与する生物学的経路の種々の構成成分に作用することによってLIPAMの活性を調節するものを含む。

50

【0073】

用語「対立遺伝子変異配列」は、LIPAMをコードする、別の形の遺伝子を指す。対立遺伝子変異体群は、核酸配列における少なくとも1つの突然変異から生じ得る他、変容したmRNA群を生じ得る。また、生じ得るポリペプチド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、付加または置換による。これら各種の変化は、単独であるいは他の変化と共に、或る配列内で1回以上、生じ得る。

【0074】

LIPAMをコードする「変容した/改変された」核酸配列には、様々なヌクレオチドの欠失、挿入、あるいは置換がありながら、LIPAMと同じポリペプチド、あるいはLIPAMの機能特性の少なくとも1つを備えるポリペプチドをもたらす配列もある。この定義には、LIPAMをコードするポリヌクレオチド配列にとり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群への不適当或いは予期しないハイブリダイゼーションを含み、また、LIPAMをコードするポリヌクレオチドの或る特定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。コードされるタンパク質も「変容する/改変される」ことがあり、また、サイレント変化を生じて機能的には等価なLIPAMと成るような、アミノ酸残基の欠失、挿入、あるいは置換を持ち得る。意図的なアミノ酸置換は、生物学的或いは免疫学的にLIPAM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には、アスパラギンとグルタミン、セリンとトレオニンがある。親水性値が近似した非荷電側鎖を持つアミノ酸には、ロイシンとイソロイシンとバリン、グリシンとアラニン、フェニルアラニンとチロシンがある。

10

20

【0075】

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を指す。「アミノ酸配列」が或る天然タンパク質分子の配列を指す場合、「アミノ酸配列」および類似の用語は、記載したそのタンパク質分子に関連する完全で元のままのアミノ酸配列に限定するものではない。

30

【0076】

「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。増幅には通常、当業者に公知のポリメラーゼ連鎖反応(PCR)技術を用いる。

【0077】

用語「アンタゴニスト」は、LIPAMの生物学的活性を阻害或いは減弱する分子を指す。アンタゴニストとしては、LIPAMと直接に相互作用するか或いはLIPAMが関与する生物学的経路の諸成分に作用してLIPAMの活性を調節する、抗体などのタンパク質、核酸、糖質、小分子、任意の他の化合物や組成物を含み得る。

【0078】

用語「抗体」は、エピトープの決定基と結合できる、無傷の免疫グロブリン分子やそれらの断片、例えばFab、F(ab')₂、およびFv断片を指す。LIPAMポリペプチドと結合する抗体類は、免疫抗原として、無傷のポリペプチド群を用いて、または、当該の小ペプチド群を持つ断片群を用いて作製可能である。マウス、ラット、ウサギなどの動物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の由来は、RNAの翻訳の場合や、または化学合成があり得る。また、それらは所望により、キャリアタンパク質に抱合し得る。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キャリアの例は、ウシ血清アルブミン、サイログロブリン、および、スカシガイのヘモシアニン(KLH)などがある。結合したこのペプチドは、前記動物を免疫化するために用いる。

40

【0079】

50

用語「抗原決定基」は、特定の抗体と接触する、分子の領域(すなわちエピトープ)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。或る抗原決定基は、或る抗体への結合について、無傷抗原(すなわち免疫応答を引き出すために用いられる免疫原)と競合し得る。

【0080】

用語「アプタマー(aptamer)」は、核酸またはオリゴヌクレオチド分子であって、特定の分子ターゲットに結合する分子を指す。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、ヌクレオチド誘導体または他のヌクレオチド様分子を含み得る。アプタマーの各ヌクレオチド成分は修飾された糖基を持つことがあり(例えば、リボヌクレオチドの2'-OH基は2'-Fまたは2'-NH₂によって置換され得る)、これは、ヌクレアーゼへの抵抗性または血中でのより長い寿命など、所望の特性を向上し得る。アプタマーを他の分子(例えば高分子量のキャリア)と抱合させることにより、循環系からのこのアプタマーのクリアランスを遅らせ得る。アプタマー類は、例えば或る架橋剤の光活性化によって、それらの同種リガンド群と特異的に架橋させ得る(例えば、Brody, E.N.およびL. Gold(2000)J. Biotechnol. 74:5-13を参照)。

10

【0081】

用語「イントラマー(intramer)」は、*in vivo*で発現されるアプタマーを指す。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. US A 96:3606-3610)。

20

【0082】

用語「スピーゲルマー(spiegelmer)」は、アプタマーの内、L-DNA、L-RNAなどの左旋性ヌクレオチド誘導体または左旋性ヌクレオチド様分子などを指す。左旋性のヌクレオチド群を持つアプタマー類は、右旋性ヌクレオチド群を持つ基質に通常は作用する、天然酵素類による分解に対して耐性がある。

【0083】

用語「アンチセンス」は、或る特定の核酸配列の「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、或る参考DNA分子のアンチセンス鎖を指すことがあり、「正」または「プラス」という表現は或る参考DNA分子のセンス鎖を意味し得る。

30

40

【0084】

用語「生物学的に活性」は、或る天然分子の構造的、調節的、あるいは生化学的な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LIPAM、合成のLIPAM、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。

【0085】

「相補」は、塩基対合によってアニールする2つの一本鎖核酸配列間の関係を指す。例えば、「5'-AGT-3'」は、その相補配列「3'-TCA-5'」との対を形成する。

50

【 0 0 8 6 】

「～のポリヌクレオチド配列を含む(持つ)組成物」または「～のアミノ酸配列を含む(持つ)組成物」は、広い意味で、指定のポリヌクレオチド配列若しくはアミノ酸配列を持つ、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。LIPAMをコード若しくはLIPAMの断片をコードするポリヌクレオチド配列を持つ組成物は、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)および他の成分(例えばデンハート液、粉乳、サケ精子DNAなど)を有する水溶液中に、プローブを分散させ得る。

10

【 0 0 8 7 】

「コンセンサス配列」は、不要な塩基を除くためにDNA配列解析を繰り返し行い、XL-PCRキット(Applied Biosystems, Foster City CA)を用いて5'および/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 フラグメント結合システム(GCG, Madison, WI)またはPhrap(University of Washington, Seattle WA)などのフラグメント結合用コンピュータプログラムを用い1つ以上のオーバーラップする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。伸長とアセンブリの両方によりコンセンサス配列を産生する配列もある。

【 0 0 8 8 】

用語「保存的なアミノ酸置換」は、元のタンパク質の特性を殆ど変えないと予測される置換を指す。すなわち、そのタンパク質の構造、特にその機能が保存され、置換によって大きくは変わらない。下表は、タンパク質内で元のアミノ酸と置換され得るアミノ酸であり、保存的なアミノ酸置換と認められるアミノ酸を示す。

20

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
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
Val	Ile, Leu, Thr

30

40

【 0 0 8 9 】

保存的な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、および/または(c)側鎖の大部分、を保持する。

【 0 0 9 0 】

50

「欠失」は、1個以上のアミノ酸残基が欠如するアミノ酸配列内の变化または1個以上のヌクレオチドが欠如するヌクレオチド配列内の变化を指す。

【0091】

用語「誘導体」は、化学修飾されたポリヌクレオチドまたはポリペプチドを指す。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、次のようなプロセスによって修飾されたポリペプチドである。すなわち、グリコシル化、ポリエチレングリコール化(pegylation)、あるいは任意の同様なプロセスであって、誘導元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である。

【0092】

「検出可能な標識」は、測定可能な信号を発生し得る、ポリヌクレオチドやポリペプチドに共有結合あるいは非共有結合するレポーター分子や酵素を指す。

【0093】

「差次的発現」は、少なくとも2例のサンプルを比較して判定する、増加(上方調節)、あるいは減少(下方調節)、または欠損した、遺伝子またはタンパク質の発現を指す。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。

【0094】

「エキソンシャッフリング」は、異なるコード領域(エキソン)群の組換えを意味する。或るエキソンは、コードするタンパク質の1つの構造的または機能的ドメインを代表し得るため、安定したサブストラクチャー群の新たな組合せによって新規のタンパク質群をアセンブリすることが可能であり、新たなタンパク質機能の進化を促進できる。

【0095】

「断片」は、LIPAMの、またはLIPAM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、5~1000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、あるいはその他の目的のために用いられる或る断片は、少なくとも長さ5、10、15、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あるいはアミノ酸残基であり得る。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。

【0096】

SEQ ID NO:11-20の或る断片は、或る固有のポリヌクレオチド配列領域を持つ。この領域は、SEQ ID NO:11-20を特異的に同定するものであり、例えばこの断片を得たゲノム中の他のいかなる配列とも異なる。SEQ ID NO:11-20の或る断片は、例えば、ハイブリダイゼーションや増幅技術に、またはSEQ ID NO:11-20を関連ポリヌクレオチド配列から区別する類似の方法に有用である。SEQ ID NO:11-20の或る断片の正確な長さは、また、その断片が対応するSEQ ID NO:11-20の領域は、その断片に意図した目的に基づき当業者が慣例的に決定し得る。

【0097】

SEQ ID NO:1-10の或る断片は、SEQ ID NO:11-20の或る断片によってコードされる。SEQ ID NO:1-10の或る断片は、SEQ ID NO:1-10を特異的に同定する固有のアミノ酸配列の領域を持つ。例えば、SEQ ID NO:1-10の或る断片は、SEQ ID NO:1-10を特異的に認識する抗

10

20

30

40

50

体の開発における免疫原性ペプチドとして有用である。SEQ ID NO:1-10の或る断片の正確な長さは、また、この断片に対応するSEQ ID NO:1-10の領域は、その断片に意図する目的に基づき、当業者が慣例的に判定し得る。

【0098】

「完全長」ポリヌクレオチド配列とは、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。

【0099】

「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、互換性、または配列同一性を意味する。 10

【0100】

ポリヌクレオチド配列に適用される「一致率」および「~%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、2つ以上のポリヌクレオチド配列間で一致する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。

【0101】

ポリヌクレオチド配列間の一致率を判定するには、MEGALIGN version 3.12e配列アラインメントプログラムなどに組込まれているCLUSTAL Vアルゴリズムの、デフォルトのパラメータ群を用い得る。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)(DNASTAR, Madison WI)の一部である。このCLUSTAL Vは、Higgins, D.G.およびP.M. Sharp(1989)CABIOS 5:151-153、Higgins, D.G. 他(1992)CABIOS 8:189-191に記載されている。ポリヌクレオ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=2、gap penalty=5、window=4、「diagonals saved」=4と設定される。「weighted」残基重み付け表がデフォルトで選択される。CLUSTAL Vによる一致率の報告は、アラインメントされたポリヌクレオチド配列間の「percent similarity(類似性パーセント)」としてなされる。 20

【0102】

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。このBLASTソフトウェア一式には、既知のポリヌクレオチド配列と、様々なデータベースの別のポリヌクレオチド配列とのアラインメントに用いる「blastn」を含む、様々な配列分析プログラムが含まれる。「BLAST 2 Sequences」と呼ばれるツールも入手可能であり、これは2つのヌクレオチド配列を直接のペアワイズで比較するために用いられる。「BLAST 2 Sequences」は、<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/bl2.html>にアクセスして、対話形式で利用できる。「BLAST 2 Sequences」ツールは、blastn および blastp(以下に記載)の両方に用い得る。BLASTプログラムは、一般的には、ギャップ(gap)などのパラメータをデフォルト設定にセットして用いる。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。 30 40

【0103】

Matrix: BLOSUM62
 Reward for match: 1
 Penalty for mismatch: -2
 Open Gap: 5 及び Extension Gap: 2 penalties
 Gap x drop-off: 50

Expect: 10
 Word Size: 11
 Filter: on

【0104】

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。あるいは、より短い長さ、例えば、定義された、より大きな配列から得た断片(例えば少なくとも20、30、40、50、70、100または少なくとも200の連続したヌクレオチドの断片)の長さの一致率も測定し得る。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。

10

【0105】

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。

【0106】

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。

20

【0107】

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群を用いて判定できる(参照先と共に上述)。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。ポリヌクレオチドのアラインメントと同様に、アラインメントされたポリペプチド配列の対の一致率は、CLUSTAL Vによって「percent similarity(類似性パーセント)」として報告される。

30

【0108】

あるいは、NCBI BLASTソフトウェア一式を用い得る。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。

【0109】

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

40

【0110】

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。あるいは、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た断片(例えば少なくとも15、20、30、40、50、70、または少なくとも150の連続した残基の断片)の長さの一致率も測定し得る。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

50

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。

【0111】

「ヒト人工染色体(HAC)」は直鎖状の微小染色体であり、約6 kb ~ 10 MbのサイズのDNA配列を持ち得る。また、染色体の複製、分離および維持に必要な、全てのエレメントを持つ。

【0112】

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を改変した抗体分子を指す。

【0113】

「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、或る一本鎖ポリヌクレオチドが或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関する許容条件は、当業者が慣例的に決定できる。アニール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得るが、洗浄条件は、所望のストリンジェンシー、したがってハイブリダイゼーション特異性を得るように、実験ごとに変更し得る。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100µg/mlのせん断して変性したサケ精子DNAが含まれる。

【0114】

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、所定のイオン強度およびpHにおける特定配列の融点(T_m)より約5~20℃低くなるように選択する。このT_mは、所定のイオン強度およびpHの条件下で、完全一致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. 他(1989)Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第2版, 1-3巻, Cold Spring Harbor Press, Plainview NYに記載されており、特に2巻の9章を参照されたい。

【0115】

本発明のポリヌクレオチド間の高ストリンジェンシー条件のハイブリダイゼーションには、約0.2×SSCおよび約0.1%のSDSの存在下、68℃で1時間の洗浄条件を含む。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の範囲で変更し得る。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100~200µg/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。

【0116】

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、一方の核酸配列が溶解状態で存在し、もう一方の核酸配列が固体支持体(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)

10

20

30

40

50

に固定されているような2つの核酸配列間に形成され得る。

【0117】

用語「挿入」あるいは「付加」は、1個以上のアミノ酸残基あるいはヌクレオチドがそれぞれ追加される、アミノ酸配列あるいは核酸配列における変化を指す。

【0118】

「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などに関連する症状を指し得る。これらの症状は、細胞およ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得る。

【0119】

「免疫原性断片」は、例えば哺乳類など生物に導入すると免疫応答を引き起こし得る、LIPAMのポリペプチド断片またはオリゴペプチド断片を指す。用語「免疫原性断片」はまた、本明細書で開示するまたは当分野で周知のあらゆる抗体生産方法に有用な、LIPAMの任意のポリペプチド断片またはオリゴペプチド断片をも指す。

10

【0120】

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

【0121】

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

20

【0122】

用語「モジュレート」または「活性を調節」は、LIPAMの活性を変化させることを指す。例えば、モジュレートによって、LIPAMのタンパク質活性の増減が、或いは結合特性の、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き得る。

【0123】

「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。

30

【0124】

「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。

【0125】

「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持つ、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させる。ポリエチレングリコール化することにより、細胞におけるPNAの寿命を延長し得る。

40

【0126】

LIPAMの「翻訳後修飾」としては、脂質化、グリコシル化、リン酸化、アセチル化、ラセミ化、蛋白分解的切断、及びその他の当分野で既知の修飾を含み得る。これらのプロセスは、合成的或いは生化学的に生じ得る。生化学的修飾は、LIPAMの酵素環境に依存し、細胞の種類によって異なることとなる。

【0127】

「プローブ」とは、核酸配列の内、LIPAMやそれらの相補配列、またはそれらの断片をコードし、同一配列や対立遺伝子核酸配列、または関連する核酸配列の検出に用いる配列

50

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」とは、相補的な塩基対を形成して標的ポリヌクレオチドにアニーリング可能な、通常はDNAオリゴヌクレオチドである短い核酸である。プライマーは次に、DNAポリメラーゼ酵素により、標的DNA鎖に沿って伸長され得る。プライマー対は、例えばポリメラーゼ連鎖反応(PCR)による、核酸配列の増幅(および同定)に用い得る。

【0128】

本発明に用いるプローブおよ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群からなる。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。

【0129】

プローブおよびプライマーの調製および使用方法については、Sambrook, J. 他(1989)Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第2版, 1-3巻, Cold Spring Harbor Press, Plainview NY、Ausubel, F.M. 他(1987)Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publ. Assoc. & Wiley-Intersciences, New York NY、Innis, M. 他(1990)PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications, Academic Press, San Diego CAなどを参照されたい。PCRプライマー対を既知の配列から得るには例えば、そ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)を用い得る。

【0130】

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)を用いれば、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。したがって、このプログラムは、独自のものであれ保存されたものであれ、オリゴヌクレオチドとポリヌクレオチド断片と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

い。

【0131】

「組換え核酸」は、天然の配列ではなく、配列の、2つ以上の離れたセグメントを人工的に組合せた配列である。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の文献(前出)に記載されているような遺伝子工学的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。

【0132】

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。

【0133】

「調節エレメント」は、或る遺伝子の非翻訳領域に通常は由来する核酸配列であり、エンハンサー、プロモーター、イントロンおよび5'および3'の非翻訳領域(UTR)を含む。調節エレメントは、転写、翻訳またはRNA安定性を制御する宿主蛋白質またはウイルス蛋白質と相互作用する。

【0134】

「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る、化学的または生化学的成分である。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。

【0135】

或るDNA配列に対する「RNA等価物」は、基準となるDNA配列と同じ直鎖のヌクレオチド配列からなるが、生じる全ての窒素性塩基のチミンがウラシルに置換され、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。

【0136】

用語「サンプル」は、その最も広い意味で用いられている。LIPAM、LIPAMをコードする核酸群、またはその断片群を含むと推定されるサンプルとしては、体液と、細胞や細胞から単離した染色体や細胞内小器官(オルガネラ)や膜からの抽出物と、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、組織プリントなどがあり得る。

【0137】

用語「特異結合」および「特異的に結合する」は、タンパク質若しくはペプチドの、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(例えば抗原決定基すなわちエピトープ)であって結合分子が認識する構造の有無に依存する。例えば、或る抗体がエピトープ「A」に対して特異的である場合、結合していない標識した「A」と抗体とを含む或る反応の中に、エピトープAを持つポリペプチドが、あるいは結合していない無標識の「A」が存在すると、抗体と結合する標識Aの量が減少する。

【0138】

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、単離あるいは分離された核酸配列ある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60%除去されたものであり、好ましくは75%以上除去、最も好ましくは90%以上除去されたものを指す。

【0139】

「置換」とは、1つ以上のアミノ酸残基またはヌクレオチドを、それぞれ別のアミノ酸残基またはヌクレオチドに置き換えることである。

【0140】

10

20

30

40

50

用語「基板」は、任意の好適な固体あるいは半固体の支持物を指し、膜およびフィルタ、チップ、スライド、ウェハ、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。

【0141】

「転写イメージ(transcript image)」または「発現プロファイル」は、所定条件下での所定時間における、或る特定の細胞タイプまたは組織による、遺伝子発現の集合的パターンを指す。

【0142】

「形質転換(transformation)」とは、外因性DNAが、或る受容細胞に導入されるプロセスを言う。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、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あるいは宿主染色体の一部として複製可能である、安定的に形質転換された細胞が含まれる。更に、限られた期間に一過的に導入DNA若しくは導入RNAを発現する細胞も含まれる。

【0143】

ここで用いる「遺伝形質転換生物(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、ヒトの介入によって、例えば本技術分野で公知のトランスジェニック技術によって導入された異種核酸を有するものである。細胞への核酸の導入は、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行う。これは、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あるいは組換えウイルスの導入によって行う。或いは核酸の導入は、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 他(1989)などの参考文献に記載されている。

【0144】

特定の核酸配列の「変異体」とは、核酸配列1本の或る長さ全体について、該特定核酸配列に対し少なくとも40%の配列同一性を有する核酸配列として決定された配列である。決定には、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%またはそれ以上の配列同一性を示し得る。変異体は、例えば、「対立遺伝子」変異体(上述)または「スプライス」変異体、「種」変異体、「多型」変異体と記述され得る。スプライス変異体は参照分子との顕著な同一性を有し得るが、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通常、より多数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配列である。結果的に生じるポリペプチドは通常、相互に有意のアミノ酸同一性を持つ。多型性変異体は、或る種の個体間における、或る特定遺伝子のポリヌクレオチド配列内での変異である。多型変異体には、ポリヌクレオチド配列の1ヌクレオチド塩基が異なる「1塩基多型

10

20

30

40

50

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。

【0145】

特定のポリペプチド配列の「変異体」とは、ポリペプチド配列1本の或る長さ全体について、該特定ポリペプチド配列に対し少なくとも40%の配列同一性を有するポリペプチド配列として決定された配列である。決定には、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%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれ以上の配列同一性を示し得る。

10

【0146】

(発明)

本発明は、新規のヒトの脂質関連分子(LIPAM)群と、LIPAMをコードするポリヌクレオチド群との発見および、これらの組成を、癌、神経疾患、自己免疫/炎症疾患、胃腸障害、心血管障害、及び脂質代謝障害の、診断、治療並びに予防に利用する方法の発見に基づく。

【0147】

表1は、本発明の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。

20

【0148】

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、最も近いGenBank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:)とを示す。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、該当箇所には妥当な引用を示すと共にGenBankおよびPROTEOMEデータベース相同体の注釈(annotation)を示し、これら全ては特に引用を以って本明細書の一部とする。

30

【0149】

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のポリペプチド配列識別番号(SEQ ID NO:)およびそれに対応する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(Genetics Computer Group, Madison WI)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を示す。

40

【0150】

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脂質関連分子であることを確立している。例えばSEQ ID NO:1は、残基M1から残基T1455までが、アナウサギ(*Oryctolagus cuniculus*)のホスホリパーゼ(GenBank ID g1690)に対し77%同一であると、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であり、これは観

50

察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:1はまた、1つのGDSL様モチーフ含有リパーゼ/アシルヒドロラーゼドメインを有するが、これは、隠れマルコフモデル(HMM)を基にした保存されたタンパク質ファミリードメイン群の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及びMOTIFS解析よりのデータは、SEQ ID NO:1がホスホリパーゼであることの更なる確証を提供する。別の例においてSEQ ID NO:2は、残基M20から残基I780まで、ヒトのミトコンドリア型セラミダーゼ(GenBank ID g9246993)に100%同一であると、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であり、これは観察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(表3参照)。MOTIFS解析よりのデータは、SEQ ID NO:2がセラミダーゼである、更なる確証を提供する。別の例でSEQ ID NO:6は、残基L235から残基E564まで、ラットの上清蛋白因子(GenBank ID g13241652)に36%同一であると、Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)で判定された(表2参照)。BLAST確率スコアは7.5e-48であり、これは観察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:6はまた、1つのCRAL/TRIOドメインを有するが、これは、隠れマルコフモデル(HMM)を基にした保存されたタンパク質ファミリードメイン群の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解析およびMOTIFS解析よりのデータは、SEQ ID NO:6が膜脂質会合タンパク質である、更なる確証を提供する。別の例でSEQ ID NO:7は、残基S21から残基S772まで、マウスのオキシステロール結合タンパク質(GenBank ID g12583596)に60%同一であると、Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)で判定された(表2参照)。BLAST確率スコアは4.1e-252であり、これは観察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:7はまた、1つのオキシステロール結合蛋白ドメインを持ち、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判定された(表3参照)。BLIMPSおよびMOTIFS解析からのデータは、SEQ ID NO:7がオキシステロール結合タンパク質である、更なる確証を提供する。別の例でSEQ ID NO:8は、残基M285から残基W1146まで、ヒトのOSBP関連タンパク質7(GenBank ID g12382789)に92%同一であると、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であり、これは観察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:8はまた、1つのオキシステロール結合蛋白ドメインを持つが、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判定された(表3参照)。BLIMPS解析およびMOTIFS解析、並びにPRODOM、DOMO両データベースのBLAST解析からのデータは、SEQ ID NO:8がオキシステロール結合タンパク質である、更なる確証を提供する。別の例でSEQ ID NO:10は、残基I68から残基W824まで、ヒトのOSBP関連タンパク質-7(GenBank ID g12382789)に100%同一であると、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であり、これは観察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:10はまた、プレクストリン(plekstrin)相同性を有するタンパク質類への相同性を持つ(これらのタンパク質は、タンパク間相互作用とタンパク-脂質相互作用とを媒介する、オキシステロール関連結合タンパク質である)。これは、BLAST解析にPROTEOMEデータベースを用いて判定された。SEQ ID NO:10はまた、1つのオキシステロール結合蛋白ドメインを持つが、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判定された(表3参照)。BLIMPS、MOTIFS、および更なるBLAST解析からのデータは、SEQ ID NO:10がオキシステロール結合タンパク質である、更なる確証を提供する。SEQ ID NO:3-5 および SEQ ID NO:9は、同様の方法で解析し、注釈を付けた。SEQ ID NO:1-10の解析用のアルゴリズム及びパラメータを表7に記載した。

【0151】

表4に示すように、本発明の完全長ポリヌクレオチド配列は、cDNA配列またはゲノムDN

10

20

30

40

50

A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合せてアセンブリした。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)、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、本発明の全長ポリヌクレオチド配列をアセンブリするために使われたcDNA配列および/またはゲノム配列のヌクレオチド開始位置(5')と終了位置(3')を示し、またSEQ ID NO: 11-20を同定するための、またはSEQ ID NO: 11-20と関連するポリヌクレオチド配列とを区別するための技術(例えば、ハイブリダイゼーション技術または増幅技術)で有用なポリヌクレオチド配列の断片のヌクレオチド開始位置(5')と終了位置(3')を示す。

【0152】

表4の列2に記載したポリヌクレオチド断片は、特に例えば組織特異的cDNAライブラリ群やプールしたcDNAライブラリ群に由来するIncyte cDNA群を指す場合もある。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配列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。更に、列2に記載したポリヌクレオチド断片は、ENSEMBL(The Sanger Centre、英国ケンブリッジ)データベースに由来する配列を同定する場合もある(すなわち「ENST」の命名を含む配列)。あるいは、列2に記載したポリヌクレオチド断片は、NCBI RefSeq Nucleotide Sequence Records データベースに由来する場合もあり(すなわち「NM」または「NT」の命名を含む配列)、またNCBI RefSeq Protein Sequence Recordsに由来する場合もある(すなわち「NP」の命名を含む配列)。または列2に記したポリヌクレオチド断片は、「エキソンスティック(exon-stitching)」アルゴリズムにより結び合わせたcDNAおよびGenscan予測エキソン群の両方からなるアセンブリ体を指す場合がある。例えば、ポリヌクレオチド配列の内、FL_XXXXXX_N₁_N₂_YYYYY_N₃_N₄として同定される配列は「スティッチされた」配列であり、その内、XXXXXXは該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であり、YYYYYは該アルゴリズムが作成する予測の数であり、N_{1,2,3...}がある場合には、解析中に手動で編集された特定のエキソン群を表す(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(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、ポリヌクレオチド配列の内、FLXXXXX_gAAAAA_gBBBBB_1_Nとして同定される配列は「ストレッチ」配列の識別番号である。ここでXXXXXXはIncyteプロジェクト識別番号、gAAAAAは「エキソンストレッチ」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、Nは特定のエキソンを指す(実施例5を参照)。或るRefSeq配列が「エキソンストレッチ」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では、「NM」、「NP」、または「NT」によって表されるRefSeq識別子が、GenBank識別子(すなわち、gBBBBB)の代わりに使用され得る。

【0153】

あるいは、接頭コードは、手動で編集された構成配列、ゲノムDNA配列から予測された構成配列、または組み合わされた配列解析方法に由来す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配列分析方法の例を列記する(実施例4と5を参照)。

10

20

30

40

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	ゲノムへのEST配列群のマッピングからの、完全長転写物とエキソンとの予測。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構成のデータが組み合わされる。

10

【0154】

場合によっては、最終コンセンサスポリヌクレオチド配列を確認するために、表4に示すような配列カバレッジと重複するIncyte cDNAカバレッジが得られたが、該当するIncyte cDNA識別番号は示さなかった。

20

【0155】

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配列のための代表的な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、これらは、上記のポリヌクレオチド配列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。

【0156】

本発明には、また、LIPAMの変異配列群をも含む。好適なLIPAM変異配列は、LIPAMの機能的或いは構造的特徴の少なくとも1つを有し、かつ該LIPAM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配列である。

30

【0157】

本発明には、また、LIPAMをコードするポリヌクレオチド群も含まれる。特定の実施態様で本発明は、LIPAMをコードする、SEQ ID NO:11-20 からなる群から選択した1配列を持つポリヌクレオチド配列を提供する。SEQ ID NO:11-20のポリヌクレオチド配列は、配列表に示されているように等価RNA配列をも含むが、そこでは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てリボースから構成されている。

【0158】

本発明は、また、LIPAMをコードするポリヌクレオチド配列の変異配列をも含む。詳細には、このような変異体ポリヌクレオチド配列は、LIPAMをコードするポリヌクレオチド配列との少なくとも約70%のポリヌクレオチド配列同一性、或いは少なくとも約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。本発明の特定の態様では、SEQ ID NO:11-20 からなる一群から選択された1核酸配列との少なくとも約70%のポリヌクレオチド配列同一性、または少なくとも約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有する、SEQ ID NO:11-20 からなる群から選択された1配列を持つポリヌクレオチド配列の変異配列を提供する。上記したポリヌクレオチド変異配列は何れも、LIPAMの機能的或いは構造的特徴の少なくとも1つを有するアミノ酸配列をコードし

40

50

得る。

【0159】

更に別の例では、本発明の或るポリヌクレオチド変異配列は、LIPAMをコードするポリヌクレオチド配列のスプライス変異配列である。或るスプライス変異配列はLIPAMをコードするポリヌクレオチド配列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配列には、約70%未満、または約60%未満、あるいは約50%未満のポリヌクレオチド配列同一性が、LIPAMをコードするポリヌクレオチド配列との間で全長に渡って見られるが、このスプライス変異配列のいくつかの部分には、LIPAMをコードするポリヌクレオチド配列の各部との、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:19の配列からなるポリヌクレオチドは、SEQ ID NO:11の配列からなるポリヌクレオチドのスプライス変異体である。別の例でSEQ ID NO:20の配列からなるポリヌクレオチドはSEQ ID NO:18の配列からなるポリヌクレオチドのスプライス変異体である。上記したスプライス変異配列は何れも、LIPAMの機能的或いは構造的特徴の少なくとも1つを有する或るアミノ酸配列をコードし得る。

【0160】

遺伝暗号の縮重により、LIPAMをコードする種々のポリヌクレオチド配列が作り出され、中には、既知のいかなる天然遺伝子のポリヌクレオチド配列群とも最小の類似性しか有しない配列もあることは、当業者には理解されよう。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。これらの組合せは、天然LIPAMのポリヌクレオチド配列に適用されるような標準トリプレット遺伝暗号を基に作られるものであり、このような変異は全て明確に開示されているものと考えられたい。

【0161】

LIPAMとその変異配列とをコードするヌクレオチド配列は一般に、好適に選択されたストリンジェンシー条件下で天然LIPAMのヌクレオチド配列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、LIPAM或いはその誘導体をコードするヌクレオチド配列を作り出すことは、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。コードされるアミノ酸配列を改変せずに、LIPAM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改変する別の理由には、天然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転写物を作ることもある。

【0162】

本発明にはまた、LIPAMとLIPAM誘導体とをコードする、DNA配列またはそれらの断片を、完全に合成化学によって作製する過程をも含む。作製後、当分野で公知の試薬類を用いて、この合成配列を任意の多くの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、LIPAMまたはその任意の断片をコードする配列に突然変異を誘発し得る。

【0163】

更に本発明には、種々のストリンジェンシー条件下で、請求項に記載されたポリヌクレオチド配列、特に、SEQ ID NO:11-20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配列群が含まれる(例えば、Wahl, G.M.およびS.L. Berger(1987)Methods Enzymol.152:399-407、Kimmel, A.R.(1987)Methods Enzymol.152:507-511.) アニール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。

【0164】

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得る。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)、MEGABACE 1000 DNAシーケンシングシステム(Amersham Biosciences)または当分野で既知の他のシステムを用いてシーケンシングを行う。結果として得た配列を、当分野で周知の種々のアルゴリズムを用いて分析する(例えば、Ausubel, F.M. (1997) Short Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York NY, 7.7ユニット、Meyers, R.A. (1995) Molecular Biology and Biotechnology, Wiley VCH, New York NY, 856-853ページを参照)。

10

【0165】

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、LIPAMをコードする核酸配列を伸長し、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およ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からの未知の配列を増幅する方法である(例えばSarkar, G. (1993) PCR Methods Applic. 2:318-322を参照)。別の方法にインバースPCR法があり、これは多岐の方向に伸長するプライマー群を用いて、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(例えばTriglia, T. 他(1988) Nucleic Acids Res. 16:8186を参照)。第3の方法としてキャプチャPCR法があり、これにはヒトおよび酵母人工染色体DNAの既知の配列群に隣接するDNA断片群をPCR増幅する方法を含む(例えばLagerstrom, M. 他(1991) PCR Methods A pplic 1:111-119を参照)。この方法では、PCRを行う前に、複数の制限酵素の消化とライゲーション反応とを用い、未知の配列領域内に組換え二本鎖配列を挿入し得る。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(例えばParker, J.D.他(1991) Nucleic Acids Res. 19:3055-3060を参照)。更に、PCR、ネステッドプライマー類、およびPROMOTERFINDERライブラリ類(Clontech, Palo Alto CA)を用いて、ゲノムDNAをウォーキングし得る。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、長さ約22~30ヌクレオチド、GC含有率が約50%以上、温度約68~72で鋳型に対してアニーリングするよう、プライマー群を設計し得る。

20

30

【0166】

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群は、しばしば遺伝子群の5'領域を有する配列を含み、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。

40

【0167】

市販のキャピラリー電気泳動システム群を用いて、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し得る。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、レーザーで活性化される蛍光色素と、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など)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および電子データ表示までの全プロセスがコンピ

50

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。

【0168】

本発明の別の実施態様では、LIPAMをコードするポリヌクレオチド配列群またはその断片群を組換えDNA分子類にクローニングして、適切な宿主細胞内に、LIPAM、その断片群または機能的等価物を発現させ得る。遺伝暗号固有の縮重により、実質的に同じ或いは機能的に等価の或るアミノ酸配列をコードする別のDNA配列群を産生し、これらの配列をLIPAMの発現に利用し得る。

【0169】

LIPAMをコードする配列を種々の目的で改変するため、当分野で一般的に既知の方法を用いて、本発明のヌクレオチド配列を組換えることができる。この目的には、遺伝子産物のクローン化、プロセッシングおよび/または発現の調節が含まれるが、これらに限定されるものではない。遺伝子断片と合成オリゴヌクレオチドとの、ランダムなフラグメンテーションおよび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換え得る。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改変、コドン優先の変更、スプライス変異体の生成などを起こす突然変異を導入し得る。

10

【0170】

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、LIPAM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、PCRを介する遺伝子断片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。かくして、「人工的な」育種および急速な分子の進化によって、多様な遺伝子が作られる。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。あるいは、所定の遺伝子の断片群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の断片と組換え、それによって天然に存在する複数の遺伝子の遺伝多様性を、方向付けした制御可能な方法で最大化させることができる。

20

30

【0171】

別の実施態様によれば、LIPAMをコードする配列は、当分野で周知の化学的方法を用いて、全体或いは一部を合成可能である(例えば、Caruthers, M.H. 他(1980) Nucleic Acids Symp. Ser. 7:215-223; および Horn, T. 他(1980) Nucleic Acids Symp. Ser. 7:225-232を参照)。別法として、化学的方法を用いてLIPAM自体またはその断片を合成することが可能である。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(例えばCreighton, T. (1984) Proteins, Structures and Molecular Properties, WH Freeman, New York NY, 55-60ページ; および Roberge, J.Y. 他(1995) Science 269:202-204を参照)。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、LIPAMのアミノ酸配列または任意のその一部を、直接合成の際に改変することにより、および/または他のタンパク質からの配列群または任意のその一部と組み合わせることにより、或る天然ポリペプチドの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し得る。

40

【0172】

このペプチドは、分取用高速液体クロマトグラフィーを用いて実質的に精製し得る(例えばChiez, R.M. および F.Z. Regnier (1990) Methods Enzymol. 182:392-421を参照)。この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できる(例

50

えば前出のCreighton, 28-53ページを参照)。

【0173】

生物学的に活性なLIPAMを発現させるために、LIPAMをコードするヌクレオチド配列またはそれらの誘導体を好適な発現ベクターに挿入することができる。好適な発現ベクターとは、好適な宿主に挿入されたコーディング配列の転写と翻訳との制御に必要なエレメント群を持つベクターである。必要なエレメントの例には、該ベクターに、またLIPAMをコードするポリヌクレオチド配列群における調節配列(エンハンサー、構成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類によって、LIPAMをコードする配列の、より効果的な翻訳を達成することも可能である。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含まれる。LIPAMをコードする配列、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場合もある。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。外因性の翻訳エレメント群および開始コドン群は、様々な天然物およ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(例えばScharf, D. 他(1994) *Results Probl. Cell Differ.* 20:125-162を参照)。

10

【0174】

当業者に周知の方法を用いて、LIPAMをコードする配列と、好適な転写および翻訳制御エレメントとを持つ発現ベクターを作製することが可能である。これらの方法としては、*in vitro*組換えDNA技術、合成技術、および*in vivo*遺伝子組換え技術がある(例えばSambrook, J.他(1989) Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Plainview NY, 4, 8, および 16-17章; Ausubel, F.M.他(1995) Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York NY, 9, 13, および 16章を参照)。

20

【0175】

種々の発現ベクター/宿主系を利用して、LIPAMをコードする配列を保持および発現し得る。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微生物や、ウイルス発現ベクター(例えばバキキュロウイルス)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プラスミドまたはpBR322プラスミド)で形質転換させた植物細胞系、動物細胞系がある(例えば前出Sambrook; 前出Ausubel; Van Heeke, G. および S.M. Schuster (1989) *J. Biol. Chem.* 264:5503-5509; 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; および Harrington, J.J. 他(1997) *Nat. Genet.* 15:345-355を参照)。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、ヌクレオチド配列を標的器官、組織または細胞集団へ送達することができる(例えばDi Nicola, M.他(1998) *Cancer Gen. Ther.* 5(6):350-356; Yu, M.他(1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90(13):6340-6344; Buller, R.M.他(1985) *Nature* 317(6040):813-815; McGregor, D.P.他(1994) *Mol. Immunol.* 31(3):219-226; 並びにVerma, I.M.およびN. Somia (1997) *Nature* 389:239-242を参照)。本発明は使用される宿主細胞によって限定されるものではない。

30

40

【0176】

細菌系では、LIPAMをコードするポリヌクレオチド配列の使用目的に応じて多数のクローニングベクターおよび発現ベクターを選択し得る。例えばLIPAMをコードするポリヌク

50

レオチド配列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。LIPAMをコードする配列をベクターのマルチクローニング部位にライゲーションするとlacZ遺伝子が破壊され、組換え分子を持つ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、入れ子欠失の生成にも有用であろう(例えば、Van Heeke, G.およびS.M. Schuster(1989)J. Biol. Chem. 264:5503-5509を参照)。例えば、抗体の産生のためなどに多量のLIPAMが必要な場合は、LIPAM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持つベクターが使用できる。

10

【0177】

LIPAMの産生に酵母発現系を用い得る。因子、アルコールオキシダーゼ、PGHプロモーターなど、構成型あるいは誘導型のプロモーターを持つ多数のベクターが、出芽酵母菌(*Saccharomyces cerevisiae*)またはピキア酵母(*Pichia pastoris*)内で使用可能である。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配列群を組込むことを可能にする(例えば前出のAusubel, 1995; Bitter, G.A. 他(1987) *Methods Enzymol.* 153:516-544; および Scorer, C.A.他(1994) *Bio/Technology* 12:181-184を参照)。

【0178】

LIPAMの発現に植物系も使用可能である。LIPAMをコードする配列の転写は、ウイルスプロモーター、例えば単独或いはTMV(Takamatsu, N. (1987) *EMBO J* 6:307-311)由来のオメガリーダー配列と組合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駆動し得る。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(例えば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.* 17:85-105を参照)。これらの作製物は、直接DNA形質転換により、または病原体を媒介とする形質移入により、植物細胞内に導入し得る(例えば『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ページを参照)。

20

30

【0179】

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。アデノウイルスを発現ベクターとして用いる場合、後期プロモーターと3連リーダー配列とを持つアデノウイルス転写/翻訳複合体に、LIPAMをコードする配列を結合し得る。アデノウイルスゲノムの非必須E1またはE3領域へ挿入することにより、宿主細胞内でLIPAMを発現する感染ウイルスを得ることができる(例えばLogan, J.およびT. Shenk(1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:3655-3659を参照)。更に、ラウス肉腫ウイルス(RSV)エンハンサーなどの転写エンハンサーを用いて、哺乳類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。

【0180】

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(例えばHarrington, J.J.他(1997) *Nat. Genet.* 15:345-355を参照)。

40

【0181】

哺乳類系内の組換えタンパク質の長期にわたる産生のためには、細胞株におけるLIPAMの安定した発現が望ましい。例えば、LIPAMをコードする配列を細胞株に形質転換するために、発現ベクター類と、同じ或いは別のベクター上の選択可能マーカー遺伝子とを用い得る。用いる発現ベクターは、複製のウイルス起源、および/または内因性の発現エレメ

50

ント群を持ち得る。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可能である。

【0182】

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^{-} 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^{-} 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(例えばWigler, M.他(1977) *Cell* 11:223-232; Lowy, I.他(1980) *Cell* 22:817-823を参照)。また、選択の基礎として代謝拮抗物質、抗生物質あるい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(例えばWigler, M.他(1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:3567-3570; Colbere-Garapin, F.他(1981) *J. Mol. Biol.* 150:1-14を参照)。この他の選択可能な遺伝子(例えばtrpBおよびhisD、これらは代謝物のための、細胞の必要条件を改変)も、文献に記載がある(例えばHartman, S.C.およびR.C. Mulligan (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:8047-8051を参照)。可視マーカー類、例えばアントシアニンや、緑色蛍光タンパク質(GFP; Clontech)、グルクロニダーゼおよびその基質であるグルクロニド、またはルシフェラーゼおよびその基質であるルシフェリンを用い得る。これらのマーカーを用いて、トランスフォーマント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あるいは安定したタンパク質発現を定量し得る(例えばRhodes, C.A. (1995) *Methods Mol. Biol.* 55:121-131を参照)。

10

20

【0183】

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、LIPAM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、LIPAMをコードする配列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、単一プロモーターの制御下で、或るマーカー遺伝子が、LIPAMをコードする1配列とタンデムに配置されることも可能である。誘導または選択に応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。

30

【0184】

一般に、LIPAMをコードする核酸配列を含み且つLIPAMを発現する宿主細胞は、当業者によく知られている種々の方法を用いて同定することが可能である。限定するものではないが当業者によく知られている方法には、DNA-DNA或いはDNA-RNAハイブリダイゼーションと、PCR増幅とがあり、また、核酸配列或いはタンパク質配列の検出、定量、或いはその両方を行うための、膜系、溶液ベース或いはチップベースの技術を含む、タンパク質の生物学的検定法または免疫学的検定法もある。

【0185】

特異的ポリクローナル抗体または特異的モノクローナル抗体を用いてLIPAMの発現の検出と計測とを行うための免疫学的方法は、当分野で既知である。このような技術の例としては、酵素結合イムノソルベントアッセイ(ELISA)、ラジオイムノアッセイ(RIA)、蛍光活性化細胞選別(FACS)などが挙げられる。LIPAM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群を用いた、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、競合結合試験を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(例えば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; および Pound, J.D. (1998) *Immunochemical Protocols*

40

50

, Humana Press, Totowa NJを参照)。

【0186】

多岐にわたる標識方法およ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。LIPAM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、エンドラベリング(末端標識化)、または、標識したヌクレオチドを用いるPCR増幅が含まれる。別法として、LIPAMをコードする配列、またはその任意の断片を、mRNAプローブを生成するためのベクターにクローニングすることも可能である。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。

10

20

30

40

50

【0187】

LIPAMをコードするヌクレオチド配列で形質転換された宿主細胞は、細胞培地でのこのタンパク質の発現および回収に好適な条件下で培養される。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、又はその両者に依存する。LIPAMをコードするポリヌクレオチドを持つ発現ベクターは原核細胞膜または真核細胞膜を通してのLIPAMの分泌を誘導するシグナル配列群を持つように設計できることは、当業者には理解されよう。

【0188】

更に、宿主細胞株の選択は、挿入した配列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、および/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。

【0189】

本発明の別の実施例では、LIPAMをコードする、天然の核酸配列、修飾された核酸配列、または組換えの核酸配列を、或る異種配列に結合させることができ、この結果、上記した任意の宿主系の、或る融合タンパク質の翻訳を生じる。例えば、市販されている抗体を用いて認識可能な異種部分を含むキメラLIPAMタンパク質は、LIPAM活性阻害剤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はフェニルアルシンオキシド上で、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、LIPAMをコードする配列と異種タンパク質配列との間にタンパク質分解切断部位を融合タンパク質が持つように遺伝子操作すると、LIPAM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(1995)10章に記載されている。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。

【0190】

本発明の別の実施例では、TNTウサギ網状赤血球可溶化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LIPAMの合成が可能である。これらの系は、T7、T3またはSP6プロモーターに機能的に連結したタンパク質コード配列群の、転写と翻訳とを共役させる。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。

【0191】

本発明のLIPAMまたはその断片を用いて、LIPAM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。少なくとも1つまたは複数の試験化合物を用いて、LIPAM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。試験化合物の例として、抗体、オリゴヌクレオチド、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。或る実施態様では、このように同定された化合物は、LIPAMの天然リガンドに密接に関連し、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(例えばColigan, J.E.他(1991) *Current Protocols in Immunology* 1(2):5章を参照)。別の実施態様では、このように同定した化合物は、受容体LIPAMの天然リガンドである(例えばHoward, A.D.他(2001) *Trends Pharmacol. Sci.* 22:132-140; Wise, A. 他(2002) *Drug Discovery Today* 7:235-246を参照)。

【0192】

別の実施態様で該化合物は、LIPAMが結合する天然受容体に、或いは少なくとも該受容体の或る断片に、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LIPAM受容体の場合や、シグナルを伝播できないLIPAM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、ヒトの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)。

【0193】

一実施態様では、LIPAM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LIPAM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、哺乳類、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る。LIPAMを発現する細胞、またはLIPAMを含有する細胞膜分画を試験化合物と接触させて、結合や、LIPAMまたは該化合物のどちらかの、刺激または活性の阻害を分析する。

【0194】

或るアッセイは、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、フルオロフォア、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LIPAMと混合するステップと、LIPAM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。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。

【0195】

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

10

20

30

40

50

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(例えばMatthews, D.J. および J.A. Wells. (1994) Chem. Biol. 1:25-30を参照)。別の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(リガンドなど)に導入され、その天然受容体に結合する能力を向上または改変しうる(例えば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を参照)。

【0196】

本発明のLIPAMまたはその断片を用いて、LIPAMの活性をモジュレートする化合物をスクリーニングすることが可能である。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。一実施態様では、LIPAMが少なくとも1つの試験化合物と結合する、LIPAMの活性が許容される条件下でアッセイを実施し、試験化合物の存在下でのLIPAMの活性を、試験化合物不在下でのLIPAMの活性と比較する。試験化合物の存在下でのLIPAMの活性の変化は、LIPAMの活性をモジュレートする化合物の存在を示唆する。別法では、試験化合物を、LIPAMの活性に適した条件下で、LIPAMを有する *in vitro*系すなわち無細胞系と混合してアッセイを実施する。これらアッセイの何れにおいても、LIPAMの活性をモジュレートする試験化合物は間接的にモジュレートする場合があります、その際は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。

10

【0197】

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、LIPAMまたはその哺乳類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号および第5,767,337号などを参照)。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する。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の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を、潜在的な治療薬や毒性薬物で試験しうる。

20

30

【0198】

LIPAM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も可能である。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)。

40

【0199】

LIPAM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「ロックイン」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)を作製することも可能である。ロックイン技術を用いて、LIPAM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、潜在的医薬品で処理し、ヒト疾患の治療に関する情報を得る。別法で例えばLIPAMを乳汁中に分泌するなどLIPAMを過剰発現する哺乳類近交系は、このタンパク質の簡便な源泉となり得る(Janne, J. 他(1998) Biotechnol. Annu. Rev. 4:55-74)。

50

【0200】

(治療)

LIPAMの領域と脂質関連分子類との間には、例えば配列およびモチーフに関する、化学的および構造的類似性が存在する。またLIPAMを発現する組織の数例は、表6と実施例1_1とを見られたい。このようにLIPAMは、癌、神経疾患、自己免疫/炎症性疾患、胃腸障害、心血管障害、脂質代謝障害において或る役割を果たすと考えられる。LIPAMの発現または活性の増大に関連する疾患の治療においては、LIPAMの発現または活性を低下させることが望ましい。LIPAM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、LIPAMの発現または活性を増大させることが望ましい。

【0201】

したがって、一実施態様において、LIPAM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、被験者にLIPAMまたはその断片や誘導体を投与し得る。限定するものではないがこのような疾患の例としては、癌(例えば腺癌、白血病、リンパ腫、黒色腫、骨髄腫、肉腫、奇形癌など、詳細には副腎、膀胱、骨、骨髄、脳、乳房、頸部、胆嚢、神経節、胃腸管、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、子宮の癌)が含まれ、また心血管障害も含まれ、その中には動脈瘤、アテローム性動脈硬化症、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、冠動脈バイパス移植、うっ血性心不全、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、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、全身性紅斑性狼瘡の心内膜炎、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、心臓移植の合併症、先天性肺異常、肺拡張不全、肺うっ血および肺水腫、肺動脈塞栓症、肺出血、肺梗塞、肺高血圧症、血管硬化症、閉塞性肺疾患、拘束性肺疾患、慢性閉塞性肺疾患、肺気腫、慢性気管支炎、気管支喘息、気管支拡張症、細菌性肺炎、ウイルス性肺炎およびマイコプラズマ肺炎、肺膿瘍、肺結核、びまん性間質性疾患、塵肺症、サルコイド症、特発性肺線維症、剥離性間質性肺炎、過敏性肺炎、肺好酸球増加、閉塞性細気管支炎 器質化肺炎(bronchiolitis obliterans-organizing pneumonia)、びまん性肺出血症候群、グッドパスチャー症候群、特発性肺血鉄症、膠原血管病併発性肺疾患、肺胞タンパク症、肺腫瘍、炎症性および非炎症性胸水、気胸症、胸膜腫瘍、薬物性肺疾患、放射線による肺疾患、および肺移植の合併症などが含まれる。神経障害として、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、パーキンソン病その他の錐体外路障害、筋萎縮性側索硬化その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、多発性硬化症その他の脱髄疾患、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、クールー、クロイツフェルト ヤコブ病およびゲルストマン シュトロイスラー シャインカー症候群を含むプリオン病と、致死性家族性不眠症、神経系の栄養病および代謝病、神経線維腫症、結節硬化症、小脳網膜性血管腫症(cerebelloretinal hemangioblastomatosis)、脳3叉神経血管症候群、精神遅滞、ダウン症候群を含むその他の中枢神経系発達障害、脳性麻痺、神経骨格異常、自律神経系障害、脳神経障害、脊髄病、筋ジストロフィーその他の神経筋疾患、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、周期性四肢麻痺と、気分障害、不安障害および統合失調症(精神分裂病)を含む精神障害と、季節的感情障害(SAD)と、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、トゥレット病、進行性核上麻痺、皮質基底核変性症、家族性前頭側頭痴呆が含まれ、また自己免疫/炎症疾患も含まれ、その中には後天性免疫不全症候群(AIDS)、アジソン病、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症、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

10

20

30

40

50

ジダ性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 (episodic lymphopenia with lymphocytotoxins)、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、心筋または心膜の炎症、骨関節炎、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、全身性紅斑性狼瘡、全身性強皮症 (systemic sclerosis)、血小板減少性紫斑病、潰瘍性大腸炎、ブドウ膜炎、ウェルナー症候群、癌の合併症、血液透析、体外循環、ウイルス感染症、細菌性感染症、真菌性感染症、寄生虫感染症、原虫感染症、蠕虫の感染症および外傷が含まれ、また胃腸障害も含まれ、その中には嚥下障害、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、感染性大腸炎、潰瘍性大腸炎、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、結腸癌、結腸閉塞、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、 γ 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、癌腫を含む肝癌が含まれ、脂質代謝障害として、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、ミオアデニル酸デアミナーゼ欠損症、高トリグリセリド血症と、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、異染性白質ジストロフィー、副腎白質ジストロフィー、GM₂ ガングリオシド蓄積症、セロイドリポフスチン症、無リポ蛋白血症、タンジアー病、高リポ蛋白血症、糖尿病、脂肪異栄養症、脂肪腫症、急性皮下脂肪組織炎、播種性脂肪壊死、有痛脂肪症、リポイド副腎過形成、微小変化型ネフローゼ、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、原発性低リポ蛋白血症、甲状腺機能低下症、腎疾患、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損症、脳腱黄色腫症、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、高脂質血症、脂質筋障害、肥満症が含まれる。

【0202】

別の実施態様では、限定するものではないが上に列記した疾患を含む、LIPAM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、LIPAMまたはその断片や誘導体を発現し得るベクターを被験者に投与し得る。

【0203】

更に別の実施態様では、限定するものではないが上記した疾患を含む、LIPAM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LIPAMを有する組成物を好適な医薬用キャリアと共に被験者に投与し得る。

【0204】

更に別の実施態様では、限定するものではないが上に列記した疾患を含む、LIPAM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、LIPAMの活性を調節するアゴニストを被験者に投与し得る。

【0205】

更なる実施例では、LIPAM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、被験者にLIPAMのアンタゴニストを投与し得る。限定するものではないが、こうした疾患の例には、上記した癌、神経疾患、自己免疫/炎症疾患、胃腸障害、心血管障害、および脂質代謝障害が含まれる。一実施態様では、LIPAM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LIPAMを発現する細胞または組織に薬剤を運ぶターゲテ

10

20

30

40

50

イング機構或いは送達機構として間接的に用いられ得る。

【0206】

別の実施例では、LIPAMをコードするポリヌクレオチドの相補配列を発現するベクターを被験者に投与して、限定するものではないが上記した疾患を含む、LIPAM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を成し得る。

【0207】

別の実施態様では、本発明の任意のタンパク質、アンタゴニスト、抗体、アゴニスト、相補配列、またはベクターを、別の好適な治療薬と組合せて投与することもできる。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し得る。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。

10

【0208】

LIPAMのアンタゴニストは、本技術分野で一般的に知られている方法を用いて製造し得る。具体的には、精製されたLIPAMを用いて抗体を作るか、治療薬のライブラリをスクリーニングして、LIPAMと特異結合するものを同定することが可能である。LIPAMへの抗体も、本技術分野で公知の方法を用いて製造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、一本鎖抗体、Fab断片、およびFab発現ライブラリによって作られた断片が含まれ得る。中和抗体(すなわち二量体の形成を阻害する抗体)は通常、治療用に好適である。一本鎖抗体(例えば由来はラクダまたはラマ)は強力な酵素阻害剤である可能性があり、ペプチド擬態物質の設計において利点を持つようであり、免疫吸着剤とバイオセンサーとの開発においても利点を持つようである(Muyldermans, S. (2001) J. Biotechnol. 74:277-302)。

20

【0209】

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、ヒトなどを含む種々の宿主が、LIPAM、若しくは免疫原性の特性を備えるその任意の断片または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。

30

【0210】

LIPAMに対する抗体を誘導するために用いるオリゴペプチド、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るアミノ酸配列を持つものが好ましく、一般的には約10個以上のアミノ酸からなるものとなる。これらのオリゴペプチド、ペプチドまたは断片は、天然タンパク質のアミノ酸配列の一部と同一であることが望ましい。LIPAMアミノ酸類の短いストレッチ群は、KLHなど他のタンパク質の配列と融合され、このキメラ分子に対する抗体群が産生され得る。

40

【0211】

LIPAM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できる。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(例えば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; および Cole, S.P.他(1984) Mol. Cell Biol. 62:109-120を参照)。

【0212】

更に、「キメラ抗体」作製のために発達した、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備える分子を得

50

るために用いられる(例えばMorrison, S.L.他(1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:68 51-6855; Neuberger, M.S. 他(1984) Nature 312:604-608; および Takeda, S.他(1985) Nature 314:452-454を参照)。別法では、当分野で周知の方法を用い、一本鎖抗体の産生のための記載された技術を適用して、LIPAM特異的一本鎖抗体を生成する。関連した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ブラリ類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(例えばBurton D.R.(1991)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:10134-10137を参照)。

【0213】

抗体類の産生は、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類またはパネル類のスクリーニングによっても行い得る(例えばOrlandi, R.他(1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:3833-3837; Winter, G.他(1991) Nature 349:293-299を参照)。

10

【0214】

LIPAMに対し特異的な結合部位を持つ抗体断片をも産生し得る。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(例えばHuse, W.D.他(1989) Science 246:1275-1281を参照)。

【0215】

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免疫放射定量測定法または競合結合試験に対する数々のプロトコルは、本技術分野において公知である。このようなイムノアッセイは通常、LIPAMとその特異抗体との間の複合体形成の計測を含む。2つの非干渉性LIPAMエピトープに対して反応性を持つモノクローナル抗体群を用いる、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、競合結合試験も利用できる(Pound、前出)。

20

【0216】

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、LIPAMに対する抗体の親和性を評価し得る。親和性を結合定数Kaで表すが、このKaは、平衡状態下でのLIPAM-抗体複合体のモル濃度を遊離抗体と遊離抗原とのモル濃度で除して得られる値である。ポリクローナル抗体類は多様なLIPAMエピトープに対する親和性が不均一であり、或るポリクローナル抗体製剤に関して判定したKaは、LIPAM抗体群の平均の親和性または結合活性を表す。特定LIPAMエピトープに対してモノクローナル抗体は単一特異的であり、モノクローナル抗体の或る製剤について判定したKaは、親和性の真の測定値を表す。LIPAM-抗体複合体が激しい操作に耐えなければならないイムノアッセイには、Ka値が $10^9 \sim 10^{12}$ liter/molの高親和性抗体製剤を用いるのが好ましい。LIPAMが抗体から最終的に(好ましくは活性化状態で)解離する必要がある免疫精製(immunopurification)および類似の処理には、Ka値が $10^6 \sim 10^7$ liter/molの低親和性抗体製剤を用いるのが好ましい(Catty, D.(1988)Antibodies, Volume I: 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)。

30

40

【0217】

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製剤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製剤は一般に、LIPAM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(例えば前出のCatty、同Coligan 他を参照)。

50

【0218】

本発明の別の実施例では、LIPAM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を、治療目的で使用することができる。ある実施態様では、LIPAM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、または修飾したオリゴヌクレオチド)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、アンチセンスオリゴヌクレオチドまたはより大きな断片を、LIPAM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(例えばAgrawal, S., 編集(1996) Antisense Therapeutics, Humana Press Inc., Totawa NJを参照)。

【0219】

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(例えばSlater, J.E. 他(1998) *J. Allergy Clin. Immunol.* 102(3):469-475; およびScanlon, K.J. 他(1995) 9(13):1288-1296を参照)。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随伴ウイルスベクターなど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(例えばMiller, A.D.(1990) *Blood* 76:271、前出のAusubel、Uckert, W. およびW. Walther(1994) *Pharmacol. Ther.* 63(3):323-347を参照)。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(例えばRossi, J.J.(1995) *Br. Med. Bull.* 51(1):217-225; Boado, R.J. 他(1998) *J. Pharm. Sci.* 87(11):1308-1315、Morris, M.C. 他(1997) *Nucleic Acids Res.* 25(14):2730-2736を参照)。

【0220】

本発明の別の実施例では、LIPAM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)、嚢胞性繊維症(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(thalassamia)、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ム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。LIPAM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LIPAM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。

【0221】

本発明の更なる実施例では、LIPAMの欠損による疾患や異常症を、LIPAMをコードする哺乳類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LIPAM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. Bio*

10

20

30

40

50

technol. 9:445-450)。

【0222】

LIPAMの発現に影響を及ぼし得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)、PCMV-SCRIPT、PCMV-TAG、PEGSH/PERV (Stratagene, La Jolla CA)、PTET-OFF、PTET-ON、PTRE2、PTRE2-LUC、PTK-HYG (Clontech, Palo Alto CA)が含まれる。LIPAMを発現させるために、(i)構成的に活性なプロモーター(例えば、サイトメガロウイルス(CMV)、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 - アクチンの遺伝子など)、(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. および 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. および 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および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. および H.M. Blau, 前出)、または(iii)正常な個体に由来する、LIPAMをコードする内因性遺伝子の天然プロモーター若しくは組織特異的プロモーターを用い得る。

【0223】

市販のリボ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、当業者は実験の各パラメータを最適化する努力をさほど要さず、ポリヌクレオチド群を、培養中の標的細胞群に送達し得る。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)によって、形質転換が実施される。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。

【0224】

本発明の別の実施態様では、LIPAMの発現に関連する遺伝子欠損によって起こる疾患や障害は、(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調節の下でLIPAM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ド配列を伴う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PFBNEO)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ップ遺伝子を、またはVSVgなど汎親和性エンベロッ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群を得る方法が開示されており、引用を以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、遺伝子治療の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)。

【0225】

別法では、アデノウイルス系遺伝子治療の或る送達系を用いて、LIPAMの発現に関連する1つ以上の遺伝子異常を有する細胞群に、LIPAMをコードするポリヌクレオチド群を送

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)。潜在的に有用なアデノウイルスベクター類は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、引用することを以て本明細書の一部とする。アデノウイルスベクター類については、Antinozzi, P.A. 他(1999) *Annu. Rev. Nutr.* 19:511-544 並びに、Verma, I.M. および N. Somia (1997) *Nature* 18:389:239-242も参照されたい。両文献は、引用を以て本明細書の一部とする。

【0226】

別法では、ヘルペス系遺伝子治療の送達系を用いて、LIPAM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、LIPAMをコードするポリヌクレオチドを送達する。単純ヘルペスウイルス(HSV)系類は、HSVが親和性を持つ中枢神経細胞にLIPAMを導入する際に、特に有益に思える。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.* 169:385-395)。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」)に詳細に開示されており、該特許の引用を以て本明細書の一部とする。米国特許第5,804,413号は、ヒト遺伝子治療などの目的で、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つの外来遺伝子を有するゲノムを持つ、組換えHSV d92の利用について記載する。上記特許はまた、ICP4、ICP27、およびICP22を欠失した組換えHSV系統の、作製およ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.* 73:519-532 および Xu, H. 他(1994) *Dev. Biol.* 163:152-161も参照されたい。両文献は、引用を以て本明細書の一部とする。クローン化したヘルペスウイルス配列群の操作、大ヘルペスウイルスゲノム(large herpesvirus genomes)の様々なセグメントを持つ複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および増殖、並びに細胞群へのヘルペスウイルスの感染は、当業者に公知の技術である。

【0227】

別法では、或る ウイルス(正の一本鎖RNAウイルス)ベクターを用いて、LIPAMをコードするポリヌクレオチド群を標的細胞群に送達する。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(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類は、SFVゲノムに基づく(Garoff, H. および K.-J. Li (1998) *Curr. Opin. Biotechnol.* 9:464-469)。 ウイルスRNAの複製中に、ウイルスのカプシドタンパク質群を通常はコードする、サブゲノムRNAが産生される。このサブゲノムRNAは、完全長ゲノムRNAよりも高レベルに複製するので、酵素活性(例えばプロテアーゼおよびポリメラーゼ)を持つウイルスタンパク質に比べてカプシドタンパク質群が過剰産生される。同様に、LIPAMをコードする配列を ウイルスゲノムのキャ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LIPAMをコードするRNAが産生され、高いレベルでLIPAM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)。広い宿主域を持つ ウイルスにより、様々なタイプの細胞にLIPAMを導入できる。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。

【0228】

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)が

10

20

30

40

50

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の結合のために十分に開く、二重らせんの能力を阻害するので有用である。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(例えば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ページを参照)。また、相補配列またはアンチセンス分子を設計し、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の翻訳をブロックし得る。

【0229】

リボザイム類は、酵素的RNA分子である。RNAの特異的切断を触媒するためにリボザイムを用い得る。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、その後起こる内ヌクレオチド鎖切断に参与している。例えば、人工的に作製されたハンマーヘッド型リボザイム分子が、LIPAMをコードする配列の内ヌクレオチド鎖切断を特異的且つ効果的に触媒する可能性がある。

【0230】

任意の潜在的RNA標的内の特異的リボザイム切断部位を先ず同定するため、GUA、GUU、GUC配列などリボザイム切断部位に対して標的分子をスキャンする。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。

【0231】

本発明の相補リボ核酸分子およびリボザイムは、核酸分子合成のために当分野でよく知られている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、LIPAMをコードするDNA配列の*in vitro*および*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込むことが可能である。あるいは、相補的RNAを構成的あるいは誘導的に合成するこれらのcDNA構成物を、細胞株、細胞または組織内に導入することができる。

【0232】

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)、ワイプトシン(wybutosine)を加える。

【0233】

本発明の更なる実施例には、LIPAMをコードするポリヌクレオチドの発現の改変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改変を起こすのに有効であり得る化合物には、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や、転写因子などのポリペプチド転写制御因子、および、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。このように、LIPAM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、LIPAM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、LIPAM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、LIPAM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が治療上有用であり得る。

【0234】

或る特定ポリヌクレオチドの発現を改変する際の有効性について、少なくとも1個、または複数個の試験化合物をスクリーニングし得る。試験化合物を得るには、当分野で公知の任意の方法を用い得る。取得方法としては、以下の場合に有効な既知化合物の化学修飾がある。ポリヌクレオチドの発現を改変する場合と、既存の、市販のまたは私的な、天然または非天然の化合物の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および/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とである。LIPAMをコードするポリヌクレオチドを含むサンプルを、このようにして得た試験化合物の少なくとも1つに曝露する。サンプルは例えば、無傷細胞、透過化処理した細胞、*in vitro*無細胞系すなわち再構成生化学系があり得る。LIPAMをコードするポリヌクレオチドの発現における改変は、当分野で周知の任意の方法でアッセイする。通常は、LIPAM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、特定の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することにより、1つ以上の試験化合物に曝露される、または曝露されないポリヌクレオチドの発現の比較のための基礎を形成し得る。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す。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)、またはヒト細胞株たとえばHeLa細胞 (Clarke, M.L. 他 (2000) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 268:8-13) を用い得る。本発明の或る特定の実施態様は、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

【0235】

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* および *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、当分野でよく知られている方法を用いて実行することができる (例えば Goldman, C.K. 他 (1997) *Nat. Biotechnol.* 15:462-466 を参照)。

30

【0236】

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。

【0237】

本発明の或る更なる実施態様は、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。このような組成物には、LIPAM、LIPAMの抗体、擬態物質、アゴニスト、アンタゴニスト、またはインヒビターなどを含み得る。

40

【0238】

本発明に用いる組成物は、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。

【0239】

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点で優れており、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。

【0240】

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

【0241】

LIPAMまたはその断片を含む高分子を直接細胞内に輸送するべく、特殊な種々の形状の組成物が調製され得る。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、LIPAM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)。

【0242】

任意の化合物に対して、先ず細胞培養アッセイ、例えば新生物性細胞の細胞培養アッセイにおいて、あるいは、動物モデル、例えばマウス、ラット、ウサギ、イヌ、サルまたはブタなどにおいて、治療有効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

【0243】

治療有効量とは、症状や容態を回復させる、たとえばLIPAMまたはその断片、LIPAMの抗体、アゴニストまたはアンタゴニスト、インヒビターなど活性処方成分の量を指す。治療有効性および毒性は、細胞培養または動物実験における標準的な薬学手法によって、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)統計を計算するなどして判定できる。毒性効果の、治療効果に対する用量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。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、投与量はこの範囲内で様々に変わる。

30

【0244】

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、患者の一般的な健康状態、患者の年齢、体重および性別(ジェンダー)、投与の時間および頻度、薬物の配合、反応感受性および治療に対する応答などを考慮し得る。作用期間が長い組成物は、特定の製剤の半減期およ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、あるいは2週間に1度の間隔で投与し得る。

40

【0245】

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ドラ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

50

的なものとなる。

【0246】

(診断)

別の実施例では、LIPAMに特異的に結合する抗体を、LIPAMの発現によって特徴付けられる障害の診断に、または、LIPAMやLIPAM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得る。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調合される。LIPAMの診断アッセイには、ヒトの体液から、あるいは細胞や組織の抽出物から、抗体および標識を用いてLIPAMを検出する方法が含まれる。この抗体は、修飾して、または修飾せずに使用される。また、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。

10

【0247】

LIPAMを測定するためのELISA, RIA, およびFACSなど、種々のプロトコルは、当分野では周知であり、変化した或いは異常なレベルのLIPAMの発現を診断するための基礎を提供する。正常あるいは標準的なLIPAMの発現の値は、複合体の形成に適した条件下で、正常な哺乳類、例えばヒトなどの被験者から採取した体液または細胞抽出物と、LIPAMに対する抗体とを混合することによって確定する。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、対照、および、生検組織からの疾患サンプルでの、LIPAMの発現の量を標準値と比較する。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

【0248】

本発明の別の実施態様によれば、LIPAMをコードするポリヌクレオチドを診断のために用いることもできる。用い得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およびDNA分子、そしてPNAが含まれる。これらのポリヌクレオチドを用いて、LIPAMの発現が疾患と相関し得る生検組織における遺伝子発現を検出し定量し得る。この診断アッセイを用いて、LIPAMの存在の有無、更には過剰な発現を判定し、治療時のLIPAMレベルの調節を監視する。

【0249】

或る実施形態では、LIPAMまたは近縁の分子をコードする、ゲノム配列などポリヌクレオチド配列を検出可能なPCRプローブ類とのハイブリダイゼーションを、LIPAMをコードする核酸配列を同定するために用いることができる。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という、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シーとによって、プローブがLIPAMをコードする天然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同定するかどうかが決まることとなる。

30

【0250】

プローブはまた、関連する配列の検出に利用でき、また、LIPAMをコードする任意の配列との少なくとも50%の配列同一性を有し得る。本発明のハイブリダイゼーションプローブとしてはDNAまたはRNAが可能であり、SEQ ID NO:11-20の配列に、あるいはLIPAM遺伝子のプロモーター、エンハンサー、イントロンなど、ゲノム配列に由来し得る。

40

【0251】

LIPAMをコードするDNA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、LIPAMをコードまたはLIPAM誘導体をコードするポリヌクレオチド配列を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プローブ作製用ベクター類は、当業者に知られており、市販されており、好適なRNAポリメラーゼと好適な標識されたヌクレオチドと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得る。ハイブリダイゼーションプローブ類は、種々のレポーターの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、³²Pまたは³⁵Sなどの放射性核種が、あるいはアビジ

50

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など酵素標識が挙げられる。

【0252】

LIPAMをコードするポリヌクレオチド配列を、LIPAMの発現に関係する疾患の診断に用い得る。限定するものではないがこのような疾患の例としては、癌(例えば腺癌、白血病、リンパ腫、黒色腫、骨髄腫、肉腫、奇形癌など、詳細には副腎、膀胱、骨、骨髄、脳、乳房、頸部、胆嚢、神経節、胃腸管、心臓、腎臓、肝臓、肺、筋肉、卵巣、脾臓、副甲状腺、陰茎、前立腺、唾液腺、皮膚、脾臓、精巣、胸腺、甲状腺、子宮の癌)が含まれ、また心血管障害も含まれ、その中には動静脈瘤、アテローム性動脈硬化症、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、冠動脈バイパス移植、うっ血性心不全、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、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、全身性紅斑性狼瘡の心内膜炎、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、心臓移植の合併症、先天性肺異常、肺拡張不全、肺うっ血および肺水腫、肺動脈塞栓症、肺出血、肺梗塞、肺高血圧症、血管硬化症、閉塞性肺疾患、拘束性肺疾患、慢性閉塞性肺疾患、肺気腫、慢性気管支炎、気管支喘息、気管支拡張症、細菌性肺炎、ウイルス性肺炎およびマイコプラズマ肺炎、肺膿瘍、肺結核、びまん性間質性疾患、塵肺症、サルコイド症、特発性肺線維症、剥離性間質性肺炎、過敏性肺炎、肺好酸球増加、閉塞性細気管支炎 器質化肺炎(bronchiolitis obliterans-organizing pneumonia)、びまん性肺出血症候群、グッドパスチャー症候群、特発性肺血鉄症、膠原血管病併発性肺疾患、肺胞タンパク症、肺腫瘍、炎症性および非炎症性胸水、気胸症、胸膜腫瘍、薬物性肺疾患、放射線による肺疾患、および肺移植の合併症などが含まれる。神経障害として、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、パーキンソン病その他の錐体外路障害、筋萎縮性側索硬化その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、多発性硬化症その他の脱髄疾患、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、クールー、クロイツフェルト ヤコブ病およびゲルストマン シュトロイスラー シャインカー症候群を含むプリオン病と、致死性家族性不眠症、神経系の栄養病および代謝病、神経線維腫症、結節硬化症、小脳網膜性血管腫症(cerebelloretinal hemangioblastomatosis)、脳3叉神経血管症候群、精神遅滞、ダウン症候群を含むその他の中枢神経系発達障害、脳性麻痺、神経骨格異常、自律神経系障害、脳神経障害、脊髄病、筋ジストロフィーその他の神経筋疾患、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、周期性四肢麻痺と、気分障害、不安障害および統合失調症(精神分裂病)を含む精神障害と、季節性感情障害(SAD)と、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、トゥレット病、進行性核上麻痺、皮質基底核変性症、家族性前頭側頭痴呆が含まれ、また自己免疫/炎症疾患も含まれ、その中には後天性免疫不全症候群(AIDS)、アジソン病、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症、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性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(episodic lymphopenia with lymphocytotoxins)、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、心筋または心膜の炎症、骨関節炎、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、全身性紅斑性狼瘡、全身性強皮症(systemic sclerosis)、血小板減少性紫斑病、潰瘍

性大腸炎、ブドウ膜炎、ウェルナー症候群、癌の合併症、血液透析、体外循環、ウイルス性感染症、細菌性感染症、真菌性感染症、寄生虫感染症、原虫感染症、蠕虫の感染症および外傷が含まれ、また胃腸障害も含まれ、その中には嚥下障害、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、腹部アンギナ、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、感染性大腸炎、潰瘍性大腸炎、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、結腸癌、結腸閉塞、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、癌腫を含む肝癌が含まれ、脂質代謝障害として、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、ミオアデニル酸デアミナーゼ欠損症、高トリグリセリド血症と、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、異染性白質ジストロフィー、副腎白質ジストロフィー、GM₂ ガングリオシド蓄積症、セロイドリポフスチン症、無 リポ蛋白血症、タンジアー病、高リポ蛋白血症、糖尿病、脂肪異栄養症、脂肪腫症、急性皮下脂肪組織炎、播種性脂肪壊死、有痛脂肪症、リポイド副腎過形成、微小変化型ネフローゼ、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 リポ蛋白血症、甲状腺機能低下症、腎疾患、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損症、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、高脂質血症、脂質筋障害、肥満症が含まれる。LIPAMをコードするポリヌクレオチド配列は、変容したLIPAM発現を検出するために患者から採取した体液或いは組織を利用する、サザン法やノーザン法、ドットプロット法、或いはその他の膜系の技術、PCR法や、ディップスティック(dipstick)、ピン(pin)、およびマルチフォーマットのELISA式アッセイ、およびマイクロアレイに使用可能である。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。

10

20

【0253】

30

或る特定の形態では、関連する疾患、特に上記した疾患を検出するアッセイにおいて、LIPAMをコードするヌクレオチド配列が有用であり得る。LIPAMをコードするヌクレオチド配列を、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、対照サンプルと較べて著しく改変された場合は、サンプル内のLIPAMをコードするヌクレオチド配列の変異レベルにより、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。

【0254】

40

LIPAMの発現に関連する疾患の診断の基準を提供するために、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あるいは増幅に好適な条件下、動物あるいはヒトのいずれかの正常な被験者から抽出された体液あるいは細胞と、LIPAMをコードする配列あるいはその断片とを混合す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。

【0255】

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

50

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。

【0256】

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。

【0257】

LIPAM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LIPAMをコードするポリヌクレオチドの断片を、或いはLIPAMをコードするポリヌクレオチドに対し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あるいはRNA配列の検出、定量、あるいはその両方のため用いることが可能である。

【0258】

或る特定の態様においては、LIPAMをコードするポリヌクレオチド配列群に由来のオリゴヌクレオチドプライマー類を用いて一塩基多型(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、挿入および欠失である。限定するものではないがSNPの検出方法には、SSCP(single-stranded conformation polymorphism)および蛍光SSCP(fSSCP)がある。SSCPでは、LIPAMをコードするポリヌクレオチド配列群に由来のオリゴヌクレオチドプライマー類とポリメラーゼ連鎖反応法(PCR)とを用いた、DNAの増幅を行う。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は、一本鎖形のPCR生成物の2次および3次構造に差異を生じさせる。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、共通の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断片群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、または統計モデルとDNA配列クロマトグラムの自動分析とを用いたシーケンシングのエラーに起因する配列変異を、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。

【0259】

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種の一般的SNPが、インスリン非依存型糖尿病と関連している。SNPはまた、単一遺伝子病における疾病転帰における相違を試験するにも有用である。単一遺伝子病としては、嚢胞性線維症、鎌状赤血球貧血、または慢性肉芽腫症がある。例えばマンノース結合レクチンであるMBL2における変異体群は、嚢胞性線維症における有害な肺の転帰との相関が示されている。SNPはまた、薬理ゲノム学においても有用性を持つ。薬理ゲノム学は、患者の薬物への応答(例えば命を脅かす毒性)に影響する遺伝的変異体の同定を行う。例えばNアセチル転移酵素における或る変異は、抗結核薬であるイソニアジドに反応しての末梢ニューロパシーの高い発症率と関連する。一方、ALOX5遺伝子のコアプロモータにおける或る変異の結果、5-リポキシゲナーゼ経路を標的とする或る抗喘息薬での治療に対する臨床応答が低下する。異なる集団群におけるSNPの分布の分析は、遺伝的浮動、突然変異、遺伝子組換え、遺伝子選択の調査に有用であり、集団の起源とその移動との追跡にも有用である(Taylor, J.G. 他(2001) Trends Mol. Med. 7:507-512; Kwok, P.-Y. および Z. Gu (1999) Mol. Med. 50

10

20

30

40

50

Today 5:538-543; Nowotny, P. 他(2001) Curr. Opin. Neurobiol. 11:637-641).

【0260】

LIPAM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、対照核酸の共増幅(coamplification)、および標準曲線から得た結果の補間もある(例えばMelby, P.C.他(1993) J. Immunol. Methods 159:235-244; Duplaa, C.他(1993) Anal. Biochem. 212:229-236を参照)。複数サンプルの定量速度を加速するには、目的のオリゴマーまたはポリヌクレオチドを種々の希釈液中に置き、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でのアッセイを行い得る。

【0261】

更に別の実施例では、本明細書に記載した任意のポリヌクレオチド配列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。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を殆ど示さない治療薬を選択することができる。

【0262】

別の実施態様では、LIPAM、LIPAMの断片群、またはLIPAMに特異的な抗体類を、或るマイクロアレイ上のエレメント群として用い得る。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。

【0263】

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(2000)米国特許第5,840,484号「Comparative Gene Transcript Analysis」を参照。該特許は特に引用することを以って本明細書の一部となす)。したがって、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れらの相補体をハイブリダイズすることにより、転写イメージを作製し得る。或る実施態様では、本発明のポリヌクレオチドまたはそれらの相補体が1マイクロアレイ上に複数エレメントの1サブセットを持つ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。

【0264】

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。

【0265】

本発明のポリヌクレオチドの発現のプロファイルを作製する転写イメージはまた、*in vitro* モデル系および薬物の前臨床評価に、あるいは工業的または天然の環境化合物の毒性試験に関連して使用し得る。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、該文献は特に引用を以って本明細書の一部となす)。試験化合物が、既知毒性を有する化合物のシグネチャと同一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ことに使用できるため、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。或る毒性シグネチャのエLEMENT群に遺伝子機能を割り当てることは毒性機序の解釈に役立つが、毒性の予測につながる、シグネチャ群の統計的マッチングには、遺伝子機能の知識は必要でない(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。

10

【0266】

或る実施態様では、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。処理した生体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。両サンプルの転写レベルの差は、処理済サンプル中で試験化合物が引き起こす毒性反応を標示する。

20

【0267】

別の実施態様は、本発明の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、個々に更なる分析の対象とすることができる。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クエンシングする。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、本発明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。

30

40

【0268】

プロテオームのプロファイルは、LIPAMに特異的な抗体を用いてLIPAM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ELEMENT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ELEMENT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; Mendozze, 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ELEMENTにおける蛍光結合の量を検出し得る。

50

【0269】

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、転写物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変更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し得、情報価値があり得る。

【0270】

別の実施例では、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、未処理生体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の量の差は、処理サンプル中の試験化合物に対する毒性反応を標示する。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。

【0271】

別の実施例では、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。処理された生体サンプル中のタンパク質の量を、未処理生体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の量の差は、処理サンプル中の試験化合物に対する毒性反応を標示する。

【0272】

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、Shalon, 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号を参照)。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、DNA Microarrays: A Practical Approach, M. Schena, 編集 (1999) Oxford University Press, Londonに記載がある。該文献は、特に引用を以って本明細書の一部となす。

【0273】

本発明の別の実施態様ではまた、LIPAMをコードする核酸配列群を用いて、天然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群を作製し得る。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、いくつかの例では、コード配列より非コード配列が好ましい。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。配列は、或る特定の染色体に、または或る染色体の或る特定領域に、または人為形成の染色体、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、あるいは単一染色体cDNAライブラリ群に対してマッピングされる(例えばHarrington, J.J.他(1997)Nat. Genet. 15:345-355; Price, C.M.(1993)Blood Rev. 7:127-134; Trask, B.J.(1991)Trends Genet. 7:149-154を参照)。一度マッピングすると、本発明の核酸配列群を用いて、例えば或る病状の遺伝を特定染色体領域の遺伝とまたは制限酵素断片長多型(RFLP)と関連させるような遺伝子連鎖地図を開発し得る(例えば、Lander, E.S.およびD. Botstein(1986)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:7353-7357を参照)。

【0274】

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関連し

10

20

30

40

50

得る(例えばHeinz-Ulrich,他(1995) in Meyers, 前出、965-968ページを参照)。遺伝地図データの例は、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られる。物理的染色体地図上の、LIPAM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、ポジショナルクローニングの作業を促進し得る。

【0275】

確定した染色体マーカー類を用いた連鎖分析などの物理的マッピング技術、および染色体標本の原位置ハイブリッド形成法を用いて、遺伝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などの遺伝子発見技術を用いて疾患遺伝子を探る研究者にとって価値がある。いったん疾患または症候群に關与する遺伝子(群)が、血管拡張性失調症の11q22-23領域など、特定のゲノム領域への遺伝的連鎖によって、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(例えばGatti, R.A. 他(1988) Nature 336:577-580を参照)。転座、反転などに起因する、健常者、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。

【0276】

本発明の別の実施態様では、LIPAM、その触媒作用断片あるいは免疫原性断片またはそのオリゴペプチド群を、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群のスクリーニングに用い得る。薬物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、細胞内に位置することができる。LIPAMと試験する薬剤との結合による複合体の形成を測定し得る。

【0277】

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(例えばGeysen, 他(1984)PCT出願第W084/03564号を参照)。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、LIPAM、或いはその断片と反応してから洗浄される。結合したLIPAMを次に、当分野で周知の種々の方法で検出する。精製したLIPAMはまた、上記した薬物スクリーニング技術に用いるプレート上に直接コーティングもできる。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。

【0278】

別の実施態様では、LIPAMに特異結合可能な中和抗体類がLIPAMとの結合について或る試験化合物と競合する、競合的薬物スクリーニングアッセイを用い得る。この方法では、抗体を用いて、1つ以上の抗原決定基をLIPAMと共有するどのペプチドの存在をも検出できる。

【0279】

別の実施態様では、LIPAMをコードするヌクレオチド配列群を、将来に開発される分子生物学技術であり、現在知られているヌクレオチド配列群の諸特性(限定はされないが、トリプレット遺伝コード、特異的な塩基対相互作用等を含む)に依存するあらゆる新技術に用い得る。

【0280】

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。

【0281】

上述および後述の全ての特許、特許出願および刊行物の開示は、米国特許出願第60/293,726号、第60/292,242号、第60/295,346号、第60/303,404号、第60/314,754号、第60/368

10

20

30

40

50

,799号および第60/351,262号を含め、引用を以て特に本明細書の一部となす。

【実施例】

【0282】

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ライブラリ群であり、表4の列3に列記した。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、クロロホルムで抽出した。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、あるいは別の慣例的方法で、溶解物からRNAを沈殿させた。

10

【0283】

RNAの純度を高めるため、フェノールによるRNAの抽出および沈殿を、必要な回数繰り返した。場合によっては、DNアーゼで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。

【0284】

場合によってはStratagene社にRNAを提供し、同社が、対応するcDNAライブラリ群を作製した。そうでない場合は、UNIZAPベクターシステム(Stratagene)またはSUPERSCRIPTプラスミドシステム(Invitrogen)を用いて本技術分野で既知の推奨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, 1997, 5.1-6.6ユニットなどを参照)。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て、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は好適なプ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。好適なプラスミドは、例えばPBLUESCRIPTプラスミド(Stratagene)、PSPORT1プラスミド(Invitrogen) PCDNA2.1プラスミド(Invitrogen, Carlsbad CA)、PBK-CMVプラスミド(Stratagene)、PCR2-TOPOTAプラスミド(Invitrogen)、PCMV-ICISプラスミド(Stratagene)、pIGEN(Incyte Genomics, Palo Alto CA)、pRARE(Incyte Genomics)、またはpINCY(Incyte Genomics)、またはこれらの誘導體である。組換えプラスミドは、Stratagene社のXL1-Blue、XL1-BlueMR F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。

20

30

【0285】

2 cDNAクローンの単離

実施例1のようにして得たプラスミドの、宿主細胞からの回収は、UNIZAPベクターシステム(Stratagene)を用いた*in vivo*切除によって、あるいは細胞溶解によって行った。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。

40

【0286】

別法では、高処理フォーマットで直接結合PCR法を用い、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

50

サイクリング過程は、単一反応混合液中で行った。サンプルを加工し、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)およびFLUOROSKAN II蛍光スキャナ(Labsystems Oy, Helsinki, Finland)を用いて蛍光分析的に定量した。

【0287】

3 シークエンシングおよび分析

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と、標識したポリヌクレオチドの検出とは、MEGABACE 1000 DNAシークエンシングシステム(Amersham Biosciences)か、標準ABIプロトコルと塩基呼び出しソフトウェアとを用いるABI PRISM 373または377シークエンシングシステム(Applied Biosystems)か、ある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, 1997, 7.7ユニットに概説)を用いて同定した。いくつかのcDNA配列を選択し、実施例8に開示する技術で配列を伸長させた。

【0288】

Incyte cDNAに由来するポリヌクレオチド配列は、ベクター、リンカーおよびポリ(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と、動的プログラミングと、隣接ジヌクレオチド頻度分析とに基づく、アルゴリズムとプログラムとを用いた。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); およびHMMベースの蛋白ドメインデータベース例えばSMART (Schultz他(1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:5857-5864; Letunic, I.他(2002) *Nucleic Acids Res.* 30:242-244)である(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。例えば、Eddy, S.R. (1996) *Curr. Opin. Struct. Biol.* 6:361-365を参照)。問合せは、BLAST、FASTA、BLIMPS、およびHMMERに基づくプログラムを用いて行った。Incyte cDNA配列をアセンブリし、完全長のポリヌクレオチド配列を産出した。あるいは、GenBank cDNA群、GenBank EST群、ステッチされた配列群、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の構築物を、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引き出した。あるいは、本発明のポリペプチドは、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Prosite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HMM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

10

20

30

40

50

フトウェア(日立ソフトウェアエンジニアリング, South San Francisco CA)およびLASERGENEソフトウェア(DNASTAR)を用いて分析する。ポリヌクレオチドとポリペプチドとの配列アラインメントは、MEGALIGNマルチシーケンスアラインメントプログラム(DNASTAR)に組み込まれたCLUSTALアルゴリズムが指定する、デフォルトパラメータを用いて作製する。これは、アラインメントした配列間の一致率も計算する。

【0289】

表7は、Incyte cDNAと完全長配列との分析とアセンブリとに利用したツールとプログラムとアルゴリズムとの概略と、適用可能な説明、参照文献、閾値パラメータを示す。用いたツール、プログラムおよ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、全ての文献は引用を以って全文を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、確率値など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配列間の同一性が高い)。

10

【0290】

完全長ポリヌクレオチド配列群とポリペプチド配列群とのアセンブリと分析とに用いた上記プログラム群は、SEQ ID NO:11-20のポリヌクレオチド配列断片群の同定にも利用した。ハイブリダイゼーション技術と増幅技術とに有用な約20~約4000ヌクレオチドの断片群を、表4の列2に示した。

【0291】

4 ゲノムDNAからのコード配列の同定および編集

20

推定上の脂質関連分子類の同定には、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は汎用遺伝子同定プログラムであり、様々な生物からのゲノムDNA配列を分析する(Burge, C. および S. Karlin(1997)J. Mol. Biol. 268:78-94, Burge, C. および S. Karlin(1998)Curr. Opin. Struct. Biol. 8:346-354参照)。このプログラムは予測されたエキソン群を連結し、メチオニンから終止コドンに及ぶ、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、30kbに設定した。これらのGenscan予測cDNA配列の内、どの配列が脂質関連分子をコードするかを決定するために、コードされるポリペプチドを、PFAMモデル群に対し脂質関連分子について問合せて分析した。潜在的な脂質関連分子はまた、既に脂質関連分子として注釈が付けられたIncyte cDNA配列群に対する相同性により、同定した。これら選択したGenscan予測配列を、次にBLAST分析により、公共データベースgenpeptおよび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。あるいは、完全長ポリヌクレオチド配列は、編集後または非編集のGenscan予測コード配列に、完全に由来する。

30

40

【0292】

5 ゲノム配列データのcDNA配列データとのアセンブリ

ステッチ配列(Stitched Sequence)

部分cDNA配列群を伸長させるため、実施例4に記載のGenscan遺伝子同定プログラムが予測したエキソン群を用いた。実施例3に記載したようにアセンブリした部分cDNA群を、ゲノムDNAにマッピングし、また、関連するcDNA群と、1つ以上のゲノム配列からGenscan予測されたエキソン群とを有するクラスター群に分解した。cDNAとゲノムとの情報を統合すべく、グラフ理論および動的プログラミングに基づく或るアルゴリズムを用いて各クラスターを分析し、潜在的スプライス変異体群を生成した。配列群を続いて確認、編集また

50

は伸長し、完全長配列を創出した。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、或る区間が、1つのcDNAと2つのゲノム配列とに在る場合、3つの区間は全て等しいと考えた。このプロセスにより、無関係だが連続したゲノム配列群を、cDNA配列で結び合わせて架橋し得る。このようにして同定した区間を、それらの親配列(parent sequences)に沿って現われる順にスティッチアルゴリズムで「縫い合わせ」、可能な限り最長の配列と配列変異体群とを生成した。1種類の親配列に沿って続く区間間の連鎖(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)より優先した。結果として得たスティッチ配列群を翻訳し、BLAST分析で公共データベースg enpept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

10

【0293】

ストレッチ配列(Stretched Sequence)

部分DNA配列群を、BLAST分析に基づく1アルゴリズムにより完全長まで伸長した。まず、BLASTプログラムを用いて、GenBankの霊長類、げっ歯類、哺乳類、脊椎動物およ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に記載され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

20

【0294】

6 LIPAM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:11-20をアセンブリするために用いた配列群を、BLAST他のSmith-Watermanアルゴリズムの実装群を用いて、Incyte LIFESEQデータベースおよび公共ドメインデータベース群の配列と比較した。SEQ ID NO:11-20と一致するこれらのデータベースの配列を、P hrapなどのアセンブリアルゴリズム(表7)を使用して、連続しオーバーラップする配列のクラスター群にアセンブリした。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、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

30

【0295】

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。或る区間の地図上の位置(センチモルガン単位)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DNAの1メガベース(Mb)にほぼ等しい。尤も、この値は、組換えのホットスポットおよびコールドスポットに起因し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/>)など一般個人が入手可能なヒトゲノム地図などの資源を用いて、既に同定された疾患遺伝子類が、上記の区間内若しくは近傍にマップされているかを判定できる。

40

【0296】

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の検出に用いる実験技術であり、特定の細胞種または組織からのRNAが結合している膜への、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に参与する(例えば前出のSambrook, 7章、同Ausubel (1995) 4章および16章を参照)。

【0297】

類似の、BLASTを応用したコンピュータ技術を用いて、GenBankやLIFESEQ(Incyte Genomics)などのcDNA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、いくつか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。

10

【0298】

【数1】

(BLASTスコア×配列一致率)

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

【0299】

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。

20

【0300】

或いは、LIPAMをコードするポリヌクレオチド配列を、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つへ分類される。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、すなわち癌、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、LIPAMをコードするcDNAの、組織特異的発現および疾患特異的発現を反映する。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。

30

40

【0301】

8 LIPAM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配列はまた、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群を用いて該断片を伸長させて産生した。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。開始プライマー群の設計にはOLIGO 4.06ソフトウェア(National Biosciences)

50

ces) 或いは別の適切なプログラムを用い、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 ~ 約 72 の温度で標的配列にアニーリングするようにした。ヘアピン構造およびプライマー-プライマー二量体を生ずるようなヌクレオチド群の伸長は、全て回避した。

【0302】

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。

【0303】

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穴プレート内で行った。反応混液は、鋳型DNAを有し、また、200 nmol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とを含有する反応バッファート、Taq DNAポリメラーゼ(Amersham Biosciences)と、ELONGASE酵素(Invitrogen)と、Pfu DNAポリメラーゼ(Stratagene)とを含有する。プライマー対であるPCI AとPCI Bとに対し、以下のパラメータで増幅した。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: 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。

10

【0304】

各ウェルのDNA濃度は、1 × TEおよび0.5 μlの希釈していないPCR産物に溶解した100 μl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、DNAが試薬と結合できるようにして判定した。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 ~ 10 μl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。

20

【0305】

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。伸長させたクローンをT4リガーゼ(New England Biolabs, Beverly MA)を用いて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を満たし、適格な大腸菌細胞に形質移入した。形質移入した細胞群の選択を、抗生物質を含む培地で行い、それぞれのコロニーを採取し、LB/2Xカルベニシリン培養液中の384ウェルプレート群に37 で一晩培養した。

30

【0306】

細胞を溶解し、Taq DNAポリメラーゼ(Amersham Biosciences)およびPfu DNAポリメラーゼ(Stratagene)を用いて以下のパラメータで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。DNAの定量化には、上記したようにPICOGREEN試薬(Molecular Probes)を用いた。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エネルギー移動シーケンシングプライマー、およびDYENAMIC DIRECT kit(Amersham Biosciences)またはABI PRISM BIGDY Eターミネーターサイクルシーケンシングレディ反応キット(Terminator cycle sequencing ready reaction kit)(Applied Biosystems)を用いてシーケンシングした。

40

【0307】

同様に、上記手順を用いて完全長ポリヌクレオチド配列を検証した。あるいは、完全長

50

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。

【0308】

9 LIPAMをコードするポリヌクレオチドにおける1塩基多型の同定

1塩基多型(SNP)として知られる一般的なDNA配列変異体が、SEQ ID NO:11-20において、LIFESEQデータベース(Incyte Genomics)を用いて同定された。同じ遺伝子からの配列群は共にクラスター化され、実施例3に述べたようにアセンブリされて、その遺伝子における全ての配列変異体の同定を可能にした。一連のフィルタ群を有する或るアルゴリズムを用いて、SNPを他の配列変異体から区別した。前段フィルタ群(preliminary filters)が過半の塩基呼び出し(basecall)エラーの除去を、最少Phred質スコア15を要求することによって行い、また、配列アラインメントエラーと、ベクター配列、キメラ、およびスプライス変異体の不適切なトリミングの結果であるエラーとをも除去した。先進の染色体分析の自動化された手順によって、推定上のSNPの近傍にある、オリジナルのクロマトグラムファイル群を分析した。クローンエラーフィルタ群は、統計的に発生させたアルゴリズムを用いて、実験室でのプロセス中に生じたエラーを同定した。エラーとしては、逆転写酵素、ポリメラーゼ、または常染色体突然変異によって起きたエラーがある。クラスター化エラーフィルタ群は、統計的に発生させたアルゴリズムを用いて、近縁の相同体群または偽遺伝子群のクラスター化の結果であるエラーや、非ヒト配列による汚染が原因のエラーを同定した。最終セットのフィルタ群は、免疫グロブリンまたはT細胞受容体において見られる重複(duplicates)とSNPとを除去した。

10

20

【0309】

幾つかのSNPは、更なる特徴付けの為に選択された。選択は高処理MASSARRAYシステム(Sequenom, Inc.)を用いた質量分析によって行い、4群の異なるヒト集団におけるSNP部位での対立遺伝子頻度を分析した。白人集団は92個体(46名の男子、46名の女子)からなり、83名はユタ出身、4名はフランス人、3名はベネズエラ人、2名はアーミッシュの人々である。アフリカ集団は194個体(97名の男子、97名の女子)からなり、全員がアフリカ系アメリカ人である。ヒスパニック集団は324個体(162名の男子、162名の女子)からなり、全員がメキシコのヒスパニックである。アジア集団は126個体(64名の男子、62名の女子)からなり、報告された親の内訳は43%が中国人、31%が日本人、13%がコリアン、5%がベトナム人、8%が他のアジア人である。対立遺伝子頻度の分析は先ず白人集団においてなされ、幾つかの場合、SNPの内、対立遺伝子変異をこの集団において示さなかったSNPは、更に他の3集団においてテストされることは無かった。

30

【0310】

1.0 個々のハイブリダイゼーションプローブの標識化および使用

SEQ ID NO:11-20由来の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 Biosciences)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 NEN, 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、SEPHADEX 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、Xba I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。

40

【0311】

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

50

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。

【0312】

1.1 マイクロアレイ

或るマイクロアレイ上でのアレイエレメント群の接続または合成は、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Balteschweilerなどを参照)、機械的マイクロスポッティング技術およびこれらから派生した技術を用いて達成し得る。上記各技術において基板は、均一な、無孔の表面を持つ固体とすべきである(Schena(1999)前出)。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ェハがある。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(例えば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)。

10

【0313】

完全長cDNA、発現配列タグ(EST)、またはそれら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。

20

【0314】

組織または細胞サンプルの調製

全RNAを組織サンプル群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を精製するためオリゴ(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ため、MMLV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 第一鎖バッファー、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、200ngのポリ(A)⁺RNAを含有する体積25mlで行う。特異的対照ポリ(A)⁺RNA群は、非コード酵母ゲノムDNAからin vitro転写により合成する。37 $^{\circ}$ C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 $^{\circ}$ C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。サンプル群の精製には、2つの連続するCHROMA SPIN 30ゲル濾過スピカラム(CLONTECH Laboratories, Inc. (CLONTECH), Palo Alto CA)を用いる。混合後、2つの反応サンプルのエタノール沈殿を、1mlのグリコーゲン(1mg/ml)、60mlの酢酸ナトリウム、および300mlの100%エタノールで行う。サンプルは次に、SpeedVAC(Savant Instruments Inc., Holbrook NY)を用いて完全に乾燥させ、14 μ lの5 \times SSC/0.2%SDS中で再懸濁する。

30

40

【0315】

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

50

ン化したcDNAインサート群と、ベクター群とを含有する細菌細胞群から増幅する。PCR増幅は、cDNAインサートに隣接するベクター配列群に相補的なプライマー類を用いる。30サイクルのPCRによって、1~2 ngの初期量から5 µgを超える最終量まで、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。

【0316】

精製済アレイエレメントは、ポリマー被覆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 °Cのオーブンで硬化させる。

10

【0317】

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100 ng/µlのアレイエレメントDNA 1 µl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5 nlのアレイエレメントサンプルを置く。

【0318】

マイクロアレイをUV架橋するため、STRATALINKER UV架橋剤(Stratagene)を用いる。マイクロアレイの洗浄を、室温において、0.2% SDSで1回、蒸留水で3回行う。非特異結合部位をブロックするため、マイクロアレイのインキュベートを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 °Cで30分間行った後、前に行ったように0.2% SDSおよび蒸留水で洗浄する。

20

【0319】

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 µl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 µgを、5 × 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 °Cまで5分間加熱し、マイクロアレイ表面上へ等分して1.8 cm²のカバーガラスで覆う。アレイを、顕微鏡用スライドよりわずかに大きい空洞を有する防水チェンバーに移す。チェンバー内を湿度100%に保つため、140 µlの5 × SSCをチェンバーの1コーナーに加える。アレイを入れたチェンバーは、60 °C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 × SSC, 0.1% SDS)において45 °Cで10分間洗浄し、第2洗浄緩衝液中(0.1 × SSC)において45 °Cで10分間ずつ3回洗浄し、乾燥させる。

30

【0320】

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488 nm、Cy5の励起のために632 nmでスペクトル線を発生し得る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1.8 cm × 1.8 cmのアレイは、解像度20 µmでスキャンする。

40

【0321】

異なる2回のスキャンで、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

50

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。装置は両方のフルオロフォア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を用いて、フルオロフォア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。

【0322】

通常、各スキャンの感度を較正するため、cDNA対照種を或る既知濃度でサンプル混合体に添加し、対照種が発生するシグナル強度を用いる。アレイ上の或る特定の位置には或る相補的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ゼーション種の重量比1:100,000で相関させる。異なる源泉(例えば代表的な試験細胞および対照細胞など)からの2つのサンプルを、各々異なるフルオロフォアで標識し、異なる発現をする遺伝子群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、較正するcDNAのサンプルを2種のフルオロフォアで標識し、ハイブリダイゼーション混合液に各々等量を加えることによって較正を行う。

【0323】

光電子増倍管の出力をデジタル化するため、IBMコンパチブルPCコンピュータにインストールした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に起因する)を補正される。

【0324】

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)である。少なくとも約2倍の発現変化、2.5以上のSB比、および少なくとも40%のエレメントスポットサイズを示したアレイエレメントが、差次的発現を示したとしてGEMTOOLSプログラム(Incyte Genomics)で同定された。

【0325】

発現

例えばマイクロアレイ分析を用いて、SEQ ID NO:17およびSEQ ID NO:18の発現をリンパ芽球細胞株内でモニターしうる。これらの配列は、それぞれSEQ ID NO:7およびSEQ ID NO:8のポリペプチドをコードする。この方法で、1名のホジキン病患者に由来するBリンパ芽細胞(すなわちRPMI 6666)と、1名のパーキットリンパ腫患者に由来する細胞(すなわちRaji)とを、1 μ g/mlリポ多糖(LPS)で処理しまたは無処理にした。細胞を0.5, 1, 2, 4および8時間で収集し、マイクロアレイ分析を上記のように実施した。リンパ芽細胞は、LPS処理細胞では無処理細胞に対して、SEQ ID NO:17 mRNAレベルの2倍超の低下を主に8時間の時点で示し、SEQ ID NO:18 mRNAレベルの2倍超の低下を主に4および8時間の時点で示した。これらの成績は、刺激された細胞が、より多くのステロール中間体をコレステロール合成へ導き形質膜合成増加を支えるにつれて、オキシステロール結合タンパク所要量が低下することと整合する。オキシステロール誘導体は通常は、蓄積したステロール誘導体の自己酸化、または特異的なチトクロムP450媒介酸化の結果として生じるが、前者の誘導体のレベルは低下する。このようにSEQ ID NO:17とSEQ ID NO:18とは個々に、疾患検出と発現プロファイル作成とを目的とした、Bリンパ芽球由来細胞の、LPSで誘導した刺激の後のオキシステロール結合蛋白レベルのモニタリングに有用である。

【0326】

1.2 相補的ポリヌクレオチド

LIPAMをコードする配列群或いはその任意の部分に対する相補配列群を用いることにより、天然LIPAMの発現が検出、低減、または阻害される。約15~30塩基対を含むオリゴヌ

10

20

30

40

50

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。適切なオリゴヌクレオチド群を設計するため、Oligo 4.06ソフトウェア(National Biosciences)および、LIPAMのコーディング配列を用いる。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することにより、リボソームが、LIPAMをコードする転写物に結合するのを防ぐ。

【0327】

1.3 LIPAMの発現

LIPAMの発現および精製は、細菌若しくはウイルスを基にした発現系を用いて達成される。細菌内でLIPAMを発現させるには、cDNAを好適なベクターにサブクローニングする。ベクターは、抗生物質耐性遺伝子と、cDNA転写レベルを高める誘導型プロモーターとを持つものを用いる。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。抗生物質耐性細菌にLIPAMを発現させるには、イソプロピル-Dチオガラクトピラノシド(IPTG)で誘発する。真核細胞でのLIPAMの発現は、昆虫細胞株または哺乳類細胞株に、一般にバキュロウイルスとして知られるAutographa 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LIPAMをコードするcDNAと置換するには、相同組換えを行うか、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を行う。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、多くの場合は夜蛾の1種Spodoptera frugiperda(Sf9)昆虫細胞への感染に用いるが、ヒト肝細胞への感染に用いることもある。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を参照)。

10

20

【0328】

殆どの発現系では、LIPAMが、例えばグルタチオンSトランスフェラーゼ(GST)と、またはFLAGや6-Hisなどのペプチドエピトープ標識と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を、迅速に1ステップで行い得る。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)。精製後、GST部分を、特異的に操作した部位においてLIPAMからタンパク質的に切断できる。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、前出のAusubel(1995)10章、16章に記載されている。LIPAMをこれらの方法で精製し直接用いて、以下の実施例1.7および1.8の、適用可能なアッセイを行える。

30

40

【0329】

1.4 機能的アッセイ

LIPAMの機能は、哺乳類細胞培養系において生理的に高められたレベルでの、LIPAMをコードする配列の発現によって算定する。cDNAを高いレベルで発現する強いプロモーターを持つ哺乳類発現ベクターに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プラスミド(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。リボ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

50

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、組換えベクターからのcDNA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、レーザー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、それら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ある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顆粒性の変化、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および細胞内におけるタンパク質の発現の変容、および、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。

10

20

30

40

50

【0330】

遺伝子発現におけるLIPAMの影響は、LIPAM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。形質移入された細胞と形質移入されない細胞とは、ヒトIgGがCD64に対する抗体かのどちらかで被覆された磁気ビーズを用いて効率的に分離することができる(DYNAL, Lake Success NY)。mRNAは、当業者に周知の方法で細胞から精製することができる。LIPAMと、目的とする他の遺伝子とをコードする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。

【0331】

1.5 LIPAM特異抗体の産生

実質的に精製されたLIPAM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。

【0332】

別法では、LIPAMアミノ酸配列をLASERGENEソフトウェア(DNASTAR)を用いて解析して免疫原性の高い領域を判定し、対応するオリゴペプチドを合成してこれを用いて当業者に周知の方法で抗体を生産する。C末端付近の或いは親水性領域内のエピトープなどの適切なエピトープの選択方法については、当分野に記述が多い(例えば、前出のAusubel, 1995, 11章を参照)。

【0333】

通常は、長さ約15残基のオリゴペプチドを、FMOCケミストリを用いる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(例えば前出のAusubel, 1995を参照)。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および抗LIPAM活性を検査するには例えば、ペプチドまたはLIPAM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、放射性ヨウ素標識したヤギ抗ウサギIgGと反応させる。

【0334】

1.6 特異抗体を用いる天然LIPAMの精製

天然LIPAMあるいは組換えLIPAMを実質的に精製するため、LIPAMに特異的な抗体類を用いるイムノアフィニティー(免疫親和性)クロマトグラフィを行う。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用レジンと抗LIPAM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。

【0335】

LIPAMを有する培養液をイムノアフィニティーカラムに通し、LIPAM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LIPAMとの結合を切るような条件で(例えば、pH 2~3のバッファー、或いは高濃度の尿素またはチオシアン酸イオンのようなカオトロップで)溶出させ、LIPAMを収集する。

【0336】

1.7 LIPAMと相互作用する分子の同定

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

10

【0337】

別法では、LIPAMと相互作用する分子を、Fields, S.および O. Song(1989, Nature 340:245-246)に記載の酵母2-ハイブリッドシステム(yeast two-hybrid system)や、MATCHMAKERシステム(Clontech)などの、2-ハイブリッドシステムに基づく市販のキットを用いて分析する。

20

【0338】

LIPAM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使用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相互作用を判定できる(Nandabalan, K. 他(2000) 米国特許第6,057,101号)。

【0339】

1.8 LIPAM活性の実証

選択した候補脂質分子、例えばC4ステロール、オキシステロール、アポリポ蛋白E、および燐脂質を、マルチウェルプレートのウェルに配置する。LIPAMまたは生物学的に活性なLIPAM断片を、¹²⁵Iボルトンハンター試薬で標識する(例えば Bolton A.E.及びW.M. Hunter (1973) Biochem. J. 133:529-539を参照)。選択した候補脂質分子を、標識したLIPAMと共にインキュベートし洗浄する。標識されたLIPAM複合体を有する各ウェルをアッセイする。様々なLIPAM濃度で得たデータを用いて、候補分子と結合したLIPAMの数および親和性、会合についての値を計算する。LIPAMの、候補脂質分子との有意な結合が、LIPAM活性を示す。

30

【0340】

LIPAM活性は或いは、継続的蛍光転移アッセイに、基質として1-パルミトイル-2-ピレニルデカノイル・ホスファチジルイノシトール(Phy(10)PI)を用いて判定する。本アッセイは、ピレニルアシル(Pyr(x))標識した燐脂質の、消光した供与体小胞から消光しない受容体小胞への転移の結果としての、ピレン単量体蛍光強度の増加を測定する(Van Paridon 他(1988) Biochemistry 27:6208-6214)。供与体小胞は、Pyr(x)ホスファチジルイノシトール(Pyr(x)PI)、2,4,6-トリニトロフェニルホスファチジエタノールアミン(TNP-PE)、および卵黄ホスファチジルコリン(PC)(モル%比10:10:80)からなる(2 nmolの総燐脂質)。受容体小胞は、ホスファチジン酸(PA)および卵黄PC(モル%比5:95)からなる(総燐脂質の25倍の過剰)。反応は、2 mlの20 mM Tris-HCl (pH 7.4)、5 mM EDTA, 200 mM NaCl中に0.1 mgのBSAを含有し37 °Cで行う。反応は、10~50 μlのLIPAMを添加して開始する。測定には自動調温キュベットホルダーと攪拌装置とを備えた蛍光計を用いる。プログレス曲線の初期勾配を、転移活性の任意単位(arbitrary unit)とする(van Tiel, C.M. 他(2000) J. Biol. Chem. 275:21532-21538; Westerman, J. 他(1995) J. Biol. Chem. 270:14263-14266)。

40

50

【0341】

LIPAM活性は或いは、放射性脂肪酸前駆体の、脂肪アシルCoAへの取り込み速度を測定して判定される。最終反応液は、総量0.5 ml中に200 mM Tris-HCl(pH 7.5)、2.5 mM ATP、8 mM MgCl₂、2mM EDTA、20 mM NaF、0.1% Triton X-100、10 mM [³H]オレイン酸、[³H]ミリスチン酸、または[¹⁴C]デカン酸、0.5 mM補酵素A、およびLIPAMを有する。反応は補酵素Aを加えて開始し、インキュベートを35 °Cで10分間おこない、終了するには2.5 mlの混合液(イソプロピルアルコール、n-ヘプタン、1 M H₂ SO₄ (40:10:1の比))を加える。放射性脂肪酸を、n-ヘプタンを用い有機抽出で除去する。反応時に形成された脂肪アシルCoAが水性画分に残り、これをシンチレーションカウンタで定量する(Black, P.N. 他(1997) J. Biol. Chem. 272:4896-4904)。

10

【0342】

LIPAM活性は或いは、スフィンゴ脂質であるグルコシルセラミドの分解を測定して判定する。25~50マイクロ単位のグルコセレブロシダーゼのインキュベートを、可変濃度のLIPAMを含む40 μl反応液中に、37 °Cで20分間おこなう。最終反応液には50mMクエン酸ナトリウム(pH 4.5)、20 ngヒト血清アルブミンおよび、3.125 mMの脂質を、次の比率で脂質を有するリポソームの形で含む。[¹⁴C]グルコシルセラミド(3 mol %, 2.4 Ci/mol)、コレステロール(23 mol %)、ホスファチジン酸(20 mol %)、ホスファチジルコリン(54 mol %)。反応を停止するには160 μl クロロホルム/メタノール(2:1)と20 μlの0.1%グルコースを加え、振盪する。4000 rpmで遠心分離した後、酵素的に放出された水相中[¹⁴C]グルコースをシンチレーションカウンタで測定する。LIPAM活性は、グルコセレブロシダーゼによるグルコシルセラミド加水分解の速度増加へのその効果によって判定する(Wilkening, G. 他 J. Biol. Chem. (1998) 273:30271-30278)。

20

【0343】

LIPAM活性を別法で実証するには、或る *in vitro*加水分解アッセイを用い得る。このアッセイには、1-パルミトイル-2-[1-¹⁴C]オレオイル ホスファチジルコリン(Sigma-Aldrich)を含有するベシクル群を用いる。LIPAMトリグリセリド リパーゼ活性およびホスホリパーゼA₂ 活性を実証するには、この加水分解反応混合液から単離した切断産物群の分析を行う。

【0344】

1-パルミトイル-2-[1-¹⁴C]オレオイル ホスファチジルコリン(Amersham Pharmacia Biotech.)含有ベシクルを調製するには、2.0 μCi の放射標識したリン脂質と、12.5 mgの標識しない1-パルミトイル-2-オレオイル ホスファチジルコリンとを混合し、この混合物を窒素(N₂)下で乾燥させる。2.5 mlの150 mM Tris-HCl(pH 7.5)を添加し、この混合物を超音波処理して遠心分離する。この上澄みは4 °Cで貯蔵できる。最終反応混合物には、0.25 mlのHanks緩衝食塩水(pH 7.4)に、2.0 mMタウロケノデオキシコール酸(taurochenodeoxycholate)、1.0%ウシ血清アルブミン、1.0 mMのCaCl₂、150 μgの1-パルミトイル-2-[1-¹⁴C]オレオイル ホスファチジルコリンのベシクル、様々な量のLIPAM(PBS中で希釈)を含む。インキュベートを30分間37 °Cで行った後、各20 μgのリゾホスファチジルコリンとオレイン酸とをキャリアとして加え、各サンプルの総脂質を抽出する。脂質類を分離するため薄層クロマトグラフィーを実施し、これには2溶媒系を使用する。すなわち先ずクロロホルム:メタノール:酢酸:水(65:35:8:4)を用い、溶媒先端がプレートの半ばに至るまで行う。このプロセスには続いてヘキサン:エーテル:酢酸(86:16:1)を用い、溶媒先端がプレートの上端に至るまで行う。脂質を含有する各領域をヨウ素蒸気で可視化し、スポット群をすりしがして、その放射能をシンチレーション計数で判定する。より多量のLIPAMがアッセイ混合液に加えられると脂肪酸として放出される放射エネルギーが増加し、一方、リゾホスファチジルコリンとして放出される放射エネルギーは低いままになる。これは、ホスホリパーゼA₂ 活性の特徴として、LIPAMがsn-1位ではなくsn-2位を切断することを実証する。

30

40

【0345】

LIPAMのホスホリパーゼ活性を或いは、ホスファチジルセリンのsn-1位での、脂肪アシル残基の加水分解で測定する。LIPAMを、好適なバッファー中で、三重水素[³H]標識した

50

基質ホスファチジルセリンと、化学量論的な量で混合する。適切なインキュベーション時間の後、クロマトグラフィー法によって加水分解反応生成物が基質から分離される。生成されたアシルグリセロホスホセリンの量を、シンチレーションカウンタを使って、トリチウム化された生成物をカウントして測定する。バックグラウンドノイズと組込まれなかった基質とを明らかにするために、種々の対照グループが設定される。最終的なカウントは、トリチウム化酵素生成物である $[^3\text{H}]$ アシルグリセロホスホセリンを表している。 $[^3\text{H}]$ アシルグリセロホスホセリンは、生体サンプル内のLIPAM活性に正比例する。

【0346】

LIPAMのリポキシゲナーゼ活性はクロマトグラフィー法で測定できる。抽出されたLIPAMリポキシゲナーゼ蛋白質を $100\mu\text{M}$ の $[1-^{14}\text{C}]$ アラキドン酸、又は他の無標識脂肪酸と30分間37 でインキュベーションする。インキュベーション後、停止溶液(アセトニトリル：メタノール：水、350:150:1)を加える。サンプル群を抽出し、メタノール/水/酢酸(85:15:0.01)(体積/体積)の溶媒システムを1 ml/分の流速で使って、逆相HPLCで分析する。流出液を235 nmでモニターし、主なアラキドン酸代謝物(12-HPETE(12-LOXによって触媒)など)の有無を分析する。各画分もまた液体シンチレーション計数にかけられる。最終的なカウントは、生物サンプル中のLIPAM活性に正比例する生成物を表す。立体化学的分析のために、アラキドン酸の代謝物は、更にキラル相HPLC及び質量分析で分析される(Sun, D. 他(1998) J. Biol. Chem. 273:33540-33547)。

10

【0347】

LIPAMのシアリダーゼ活性のアッセイには、限定するものではないが以下を含む種々の基質を用いる。すなわち2'-(4-メチルウンベリフェリル)-D-N-アセチルノイラミン酸、2'-0-(o-ニトロフェニル)-D-N-アセチルノイラミン酸、2'-0-(p-ニトロフェニル)-D-N-アセチルノイラミン酸、並びに(2-3)-および(2-6)-シアリルラクトース(sialyllactose)である。反応混液には30 nmolの基質、0.2 mgウシ血清アルブミン、 $10\mu\text{mol}$ 酢酸ナトリウム(pH 4.6)、0.2 mg Triton X-100、および精製LIPAM(またはLIPAM含有サンプル)を含む。インキュベートを37 で10~30分間おこなった後、遊離したシアル酸の定量をチオバルビツール酸法で行う(Aminoff, D. (1961) Biochem. J. 81:384-392)。1単位のシアリダーゼ活性の定義は、1 nmolシアル酸の、基質からの1時間あたりの遊離を触媒する、LIPAMの量である(Hasegawa, T. 他(2000) J. Biol. Chem. 275:8007-8015)。

20

【0348】

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、記載した本発明の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。分子生物学または関連分野の専門家には明らかな、本明細書に記載する本発明の実施方法の様々な修正は、明確に特許請求の範囲内にあるものとする。

30

【0349】

(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配列およびポリペプチド配列の命名法の概略を示す。

40

【0350】

表2は、本発明のポリペプチド群の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。また、各ポリペプチドとその相同体(1つ以上)が一致する確率スコアも併せて示す。

【0351】

表3は、予測されるモチーフおよびドメインなど、本発明のポリヌクレオチド配列の構造的特徴を、ポリペプチドの分析に用いる方法、アルゴリズムおよび検索可能なデータベースと共に示す。

【0352】

50

表 4 は、本発明のポリヌクレオチド配列をアセンブリするために用いた cDNA 断片やゲノム DNA 断片を、ポリヌクレオチド配列の選択した断片と共に示す。

【 0 3 5 3 】

表 5 は、本発明のポリヌクレオチドの代表的な cDNA ライブラリを示す。

【 0 3 5 4 】

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

【 0 3 5 5 】

表 7 は、本発明の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、参照文献および閾値パラメータと共に示す。

【 0 3 5 6 】

【表 1】

表 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
2440624	1	2440624CD1	11	2440624CB1
5436263	2	5436263CD1	12	5436263CB1
5778744	3	5778744CD1	13	5778744CB1
2715421	4	2715421CD1	14	2715421CB1
3096490	5	3096490CD1	15	3096490CB1
6768783	6	6768783CD1	16	6768783CB1
2483245	7	2483245CD1	17	2483245CB1
4934451	8	4934451CD1	18	4934451CB1
7504684	9	7504684CD1	19	7504684CB1
7506236	10	7506236CD1	20	7506236CB1

10

20

30

40

【表 2 - 1】

表 2 - 1

ホリペプチド SEQ ID NO:	Incyte ホリ ペプチド ID	GenBank ID NO:または PROTEOME ID NO:	確率スコア	注釈
1	2440624CD1	g1690	0.0E+00	[アナウサギ(Oryctolagus cuniculus)]ホスホリパーゼ(Boll,W. 他 (1993) J. Biol. Chem. 268 (17), 12901-12911)
2	5436263CD1	g9246993	0.0E+00	[ヒト]ミトコンドリア型セラミダーゼ(EI Bawab,S. 他 (2000) J. Biol. Chem. 275 (28), 21508-21513)
3	5778744CD1	g5081824	1.5E-40	[マウス]酸性セラミダーゼ (Li,C.M. 他 (1998) Genomics 50 (2), 267-274)
4	2715421CD1	g9719420	1.1E-103	[ラット]SNARE Vti1a 蛋白質(Antonin,W. 他 (2000) J. Neurosci. 20 (15), 5724-5732)
6	6768783CD1	g13241652	7.5E-48	[ラット]上清タンパク因子(Shibata,N. 他 (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 98 (5), 2244-2249)
7	2483245CD1	g12583596	4.1E-252	[イエネズミ (Mus musculus domesticus)]オキシステロール結合タンパク (Engemann,S. 他 (2000) Hum. Mol. Genet. 9 (18), 2691-2706)
8	4934451CD1	g12382789	0.0E+00	[ヒト]OSBP 関連タンパク質 7; ORP7 (Lehto,M. 他 (2001) J. Lipid Res. 42 (8), 1203-1213)
9	7504684CD1	g1690	0.0E+00	[アナウサギ(Oryctolagus cuniculus)]ホスホリパーゼ(Boll,W. 他 (1993) J. Biol. Chem. 268 (17), 12901-12911)
9	331260 Rn.108 66		0	[ラット][加水分解酵素]腸ホスホリパーゼ B/リパーゼ、広範な脂 肪分解活性を示す。ホスホリパーゼ A2、リソホスホリパーゼ、お よびトリアシルグリセロールリパーゼの特性を持つ。肝臓不全ラ ットで降脂脂肪分解酵素の枯渇を補償する。 Takemori, H. 他 (1998) J Biol Chem 273:2222-2231.
		734804 W02B1 2.1	1.3E-63	[線虫 (Caenorhabditis elegans)] [ヒドロラーゼ] ホスホリパー ゼ蛋白質ファミリーのメンバー Chervitz, S. A. 他 (1998) Science 282:2022-2028.

【 0 3 5 8 】

【表 2 - 2】

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
10	7506236CD1	g12382789	0.0E+00	[ヒト]OSBP 関連タンパク質 7; ORP7 (Lehto,M. 他 (2001) J. Lipid Res. 42 (8), 1203-1213)
10	7506236CD1	599228 FLJ1202 60	1.9E-251	[ヒト]プレクストリン相同(PH)ドメイン含有タンパク質、蛋白質 およびタンパク-脂質相互作用を媒介、オキシステロール結合タ ンパクの領域に低度の類似性を持つ。
10	7506236CD1	373310 SPBC2 F12.05c	1.6E-77	[分裂酵母 (Schizosaccharomyces pombe)][低分子結合蛋白]ステロ ールの生合成とおそらく調節とに関わるオキシステロール結合蛋 白(OSBP)ファミリーのメンバー、1つのプレクストリン相同(PH) ドメインと3つのアンキリン(Ank)リピート群とを有する。エルゴ ステロール生合成に関わると思われる出芽酵母 (S. cerevisiae) の Osh1p に中等度の類似性を持つ。

10

20

30

【 0 3 5 9 】

【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	2440624CD1	1458	S26 S30 S64 S256 S267 S271 S324 S343 S450 S614 S657 S756 S954 S961 S1025 S1121 S1158 S1284 S1351 S1452 T31 T40 T96 T128 T245 T458 T554 T596 T619 T680 T703 T933 T966 T1042 T1050 T1312 T1375 T1398	N173 N240 N493 N529 N590 N690 N783 N797 N809 N1055 N1113 N1114 N1275 N1378	Signal_Cleavage: M1-G19	SFSCAN
					シグナルペプチド: M1-P21, M1-Q22, M1-I23, M1-P27	HMMER
					GDSL 様モチーフ含有リパーゼ/アシルヒド ロラーゼ V740-D868, V393-D521, V1096- N1219	HMMER_PFAM
					膜貫通ドメイン: V1415-R1442 N-末端はサ イトゾル内にはない	TMAP
					脂肪分解酵素"G-D-S-L"ファミリー、セリン 蛋白質 BL01098: V741-G751, D999-N1004	BLIMPS_BLOCKS

10

20

30

40

【 0 3 6 0 】

【表 3 - 2】

表 3 - 2

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
					ホスホリパーゼ B ADRAB 前駆体 加水分解酵素 リピートシグナル 膜貫通 PD024730: I23-V199, F1071-L1224, K355-C519 PD003965: Q528-S707, E1218-R1403, F877-S1054, D194-S347 PD152478: NI055-V1096	BLAST_PRODUM
					ホスホリパーゼ ADRAB 前駆体 PD134752 に類似: D358-L538, D1070-N1219, S729-F877	BLAST_PRODUM
					do ADRAB-B; ホスホリパーゼ; DM03287 Q05017 13-1063; T713-I1064 Q05017 360-711; L360-G712 Q05017 1065-1411; E1065-E1410 Q05017 41-358; L41-K359	BLAST_DOMO
					細胞接着配列: R1335-D1337	MOTIFS
					脂分解酵素"G-D-S-L"ファミリ、セリン活性部位: I394-G404, V741-G751	MOTIFS
2	5436263CD1780		S7 S150 S164 S268 S275 S545 S644 T277 T447 T474 T482 T581 T582 T654	N98 N151 N217 N308 N373 N440 N468 N564 N624 N687 N730	Signal_cleavage: M1-G36	SFSCAN
					シグナルペプチド: M19-T37, M19-I38	HMMER
					膜貫通ドメイン: N8-G36, P519-R547 N 末端はサイトゾル内にはない	TMAP

10

20

30

40

【表 3 - 3】

表 3 - 3

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
3	5778744CD1323		S42 S109 S192 S225 S254 S303 T156 T223 T286	N37 N107 N309 N315	Signal_cleavage: M1-A28 シグナルペプチド: M8-S29, G11-P30, E7-P30, M1-P30, E7-P30 膜貫通ドメイン: R9-N37 N末端はサイトソル内 タンパク質 K11D2.2 推定上の心臓 F27E5.1 染色体 II PD024148: G101-F322	SFSCAN HMMER TMAP BLAST_PRODUM
4	2715421CD1217		S3 S71 S76 S128 S129 S177 S213 T20 T122 Y136	N109 N152	膜貫通ドメイン: L185-S213; N-末端はサイトソル内 タンパク質 小胞 VSNARE 輸送 VTI1 膜貫通 Y57G11C.4 A ゴルジ SNARE PD013486: E6-R192	TMAP BLAST_PRODUM
5	3096490CD1518		S29 S52 S76 S214 S261 S266 S267 S283 S301 S331 S379 S400 S447 S463 S482 T16 T26 T61 T121 T213 T260 T300 T367 T454 T466 Y24	N81 N354 N378 N461	CRAL/TRIO ドメイン(細胞性レチンアルデヒド結合タンパク(CRAL)/三重機能ドメイン(TRIO)): T146-T234, Q70-E82	HMMER_PFAM

【 0 3 6 2 】

10

20

30

40

【表 3 - 4】

表 3 - 4

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
					MSP (主要精子タンパク質)ドメイン: P332-S415	HMMER_PFAM
					膜貫通ドメイン: V145-V173, L179-F195, Q489-Y517 N-末端はサイトソル内にはない	TMAP
					仮説的 59.3 KD タンパク質 B0336.11 染色体 III 内 膜貫通 PD132363: L151-L352, S29-L107	BLAST_PRODOM
					細胞性レチンアルデヒド結合タンパク質 DM00869 Q10138 85-343: D36-P242 S51467 70-331: D36-G233	BLAST_DOMO
6	6768783CD1696	S58 S201 S290 S356 S368 S585 S664 T124 T256 T443 T495		N99	CRAL/TRIO ドメイン: S290-E477	HMMER_PFAM
					膜貫通ドメイン: V422-F447 N-末端はサイトソル内	TMAP
					細胞性レチンアルデヒド結合タンパク質シグネチャ PR00180: H266-S288, K399-L420, W432-S451	BLIMPS_PRINTS
					CRAL/TRIO ドメイン蛋白質 PF00650: V407-N440, R233-L253, H257-L271, E312-D324	BLIMPS_PFAM
					タンパク質 SEC14 様 T23G5.2 染色体 III PD038871: W578-L676, G485-E564	BLAST_PRODOM
					タンパク質 MSF1 ミトコンドリア F15D3.6 類似 PX19 SEC14 様 T23G5.2 染色体 III PD007507: V11-L170	BLAST_PRODOM

10

20

30

40

【表 3 - 5】

表 3 - 5

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
					タンパク質還元酵素イソフラボン輸送転移 NADP オキシドレダクターゼ SEC14 サイトゾル因子 PD002025; D322-G476	BLAST_PRODOM
					細胞性レチンアルデヒド結合タンパク質 DM00869 Q03606 270-531; R233-Y493 P49193 1-208; S290-Y493 P24280 23-301; G236-L487 Q10137 19-286; G236-G485	BLAST_DOMO
					細胞接着配列: R544-DS46	MOTIFS
7	2483245CD1847		S2, S53, S63, S70, S78, S161, S207, S272, S286, S289, S300, S311, S316, S322, S341, S352, S392, S482, S580, S641, S686, S756, S766, S772, S776, S790, S794, T74, T94, T100, T118, T139, T336, T356, T449, T604, T630, T680, T777, T798, Y60, Y402	N61, N270, N361, N550	オキシステロール結合タンパク質: K333-K743	HMMER-PFAM
					PH (プレクストリン相同) ドメイン: I107-K223	HMMER-PFAM

10

20

30

40

【 0 3 6 4 】

【表 3 - 6】

表 3 - 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
					オキシテロール結合タンパク質ファミリー 一蛋白: BL01013: G375-A410, K440-F450, I466-P475, E642-W685 タンパク質 ステロール 生合成 遺伝子間領域 オキシステロール結合 染色体 HES1 KES1 C32F10.1: PD003744: E359-W685	BLIMPS-BLOCKS BLAST-PRODOM
					オキシステロール結合タンパク質ファミリー 一: DM01394 P38755 27-408: E359-F690 DM01394 Q02201 27-408: T354-F690 DM01394 P35844 i-390: P384-E691 DM01394 P35843 i-390: P384-E691	BLAST-DOMO
					オキシステロール結合タンパク質ファミリー 一: シグネチャ: E468-A478	MOTIFS
8	4934451CD11146		S105 S301 S515 S644 S658 S704 S708 S723 S725 S730 S743 S822 S998 S1117 T25 T231 T257 T505 T514 T623 T627 T1114 Y140 Y820 Y1014 Y1071 Y1137	N193 N541 N926 N1125	オキシステロール結合タンパク質: T742-E1134	HMMER_PFAM

10

20

30

40

【表 3 - 7】

表 3 - 7

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
					オキシステロール結合タンパク質ファミリー蛋白質 BL01013: G792-A827, K858-Y868, I880-P889, D1062-H1105 タンパク質 ステロール 生合成 遺伝子間領域 オキシステロール結合 染色体 HES1 KES1 C32F10.1 PD003744: S743-D934, E835-Y1014, F1024-R1132, L703-E734	BLIMPS_BLOCKS BLAST_PRODOM
					オキシステロール結合タンパク質ファミリー DM01394 S52500 875-1282:V781-Y1014, G1016-E1134 DM01394 S47536 778-1189:V781-Y1014, N926-E1134, Y982-R1132 DM01394 P35845 447-858 :V781-Y1014, N926-E1134, Y982-R1132 DM01394 P22059 396-806:P777-E1099	BLAST_DOMO
					オキシステロール結合タンパク質ファミリー シグネチャ : E882-A892	MOTIFS
					ロイシンジッパーパターン: L200-L221, L460-L481	MOTIFS
9	7504684CD1969		S26 S30 S64 S256 S267 S271 S324 S343 S450 S614 S657 S756 S948 T31 T40 T96 T128 T245 T458 T554 T596 T619 T680 T703	N173 N240 N493 N529 N590 N690 N783 N797 N809	signal_cleavage: M1-G19	SPSCAN

10

20

30

40

【 0 3 6 6 】

【表 3 - 8】

表 3 - 8

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
					シグナルペプチド: M1-G19, M1-P21, M1-Q22, M1-T25	HMMER
					GDSL 様モチーフ含有リパーゼ/アシルヒドrolラーゼ V740-D868, V393-D521	HMMER_PFAM
					ホスホリパーゼ B ADRAB-B 前駆体 加水分解酵素リピートシグナル膜貫通 PD024730: I23-V199, K355-C519	BLAST_PRODOM
					ホスホリパーゼ B ADRAB-B 前駆体タンパク質 加水分解酵素リピートシグナル膜貫通 F09C8.1 PD003965: D194-S347, Q528-S707	BLAST_PRODOM
					ホスホリパーゼ ADRAB-B 前駆体 PD134752 に類似: D358-L538, S729-F877	BLAST_PRODOM
					ホスホリパーゼ B ADRAB-B 前駆体 加水分解酵素リピートシグナル膜貫通 PD152479: T351-V393	BLAST_PRODOM

10

20

30

40

【 0 3 6 7 】

【表 3 - 9】

表 3 - 9

SEQ ID NO:	Incyte 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
					ADRAB-B; ホスホリパーゼ; DM03287 Q05017 360-711: E39-V121, M104-F284, L360-G712, G712-P920 Q05017 41-358: L41-K359, I434-F631, F604-Q709, V819-D901, C370-S450 Q05017 713-1063: T713-A924, C370-S707, M107-S301, L196-Y349, P47-N78 Q05017 1065-1411: S44-H292, G365-S707, P727-L903	BLAST_DOMO
10	7506236CDI	824	S17 S231 S377 S381 S396 S398 S403 S416 S500 S676 S795 T221 T230 T339 T343 T792 Y498 Y692 Y749 Y815	N257 N604 N803	脂肪分解酵素"G-D-S-L"ファミリー、セリン活性部位: I394-G404, V741-G751 オキシステロール結合タンパク質: M421-E812	MOTIFS HMMER_PFAM
					オキシステロール結合タンパク質ファミリー 一蛋白質 BL01013: D740-H783, G470-A505, K536-Y546, I558-P567	BLIMPS_BLOCKS
					タンパク質 ステロール生成 遺伝子間領域 オキシステロール結合 染色体 HES1 KES1 C32F10.1 PD003744: P444-D612, E513-Y692, I702-R810, L376-E407	BLAST_PRODOM

【 0 3 6 8 】

10

20

30

40

表 4 - 1

ポリヌクレオチド SEQ ID NO/ Incyte ID/配 列長	配列断片
11/2440624CB1/ 4607	1-96, 1-412, 270-662, 477-563, 477-602, 564-1036, 564-1077, 564-1203, 564-1211, 564-1216, 564-1218, 564-1234, 564-1249, 564-1251, 564-1258, 564-1277, 564-1294, 564-1298, 620-785, 620-962, 620-1067, 620-1145, 620-1151, 620-1170, 620-1173, 620-1191, 620-1212, 620-1216, 620-1235, 620-1291, 620-1313, 620-1318, 620-1322, 620-1325, 620-1340, 620-1348, 620-1414, 620-1424, 620-1430, 621-1430, 622-1102, 622-1245, 622-1253, 622-1264, 622-1288, 622-1333, 622-1340, 627-1216, 627-1300, 627-1337, 627-1358, 631-1294, 631-1302, 631-1318, 669-1155, 675-1421, 695-1418, 703-1421, 710-1419, 721-1421, 729-1421, 738-1421, 742-1421, 745-1421, 762-1421, 765-1421, 768-1430, 770-1421, 771-1430, 773-1421, 777-1421, 778-1430, 791-1421, 799-1421, 821-1411, 826-1245, 827-1421, 828-1421, 832-1421, 833-1430, 845-1405, 853-1421, 854-1421, 867-1430, 906-1421, 924-1430, 962-1430, 1006-1430, 1289-1421, 1289-1422, 1289-1428, 1289-1430, 1289-1577, 1390-1663, 1442-2196, 1824-2206, 1824-2255, 1843-2255, 1860-2255, 1908-2255, 1930-2255, 1944-2255, 2040-2255, 2050-2329, 2147-2255, 2162-2893, 2163-2694, 2163-2834, 2163-2942, 2163-2981, 2165-2924, 2194-3033, 2312-3037, 2325-4373, 2389-3021, 2488-3345, 2614-2782, 2633-3237, 2636-2782, 2646-2782, 2660-3490, 2738-3334, 2839-3508, 2852-3422, 2970-3396, 2970-3499, 2973-3750, 3042-3840, 3055-3678, 3077-3716, 3077-3768, 3083-3563, 3102-3617, 3126-3818, 3161-3749, 3176-3702, 3176-3738, 3188-3464, 3188-3648, 3188-3664, 3188-3668, 3188-3701, 3188-3706, 3188-3740, 3188-3803, 3188-3846, 3188-3877, 3192-3873, 3194-4086, 3231-3768, 3235-3991, 3236-3932, 3240-3820, 3240-4050, 3254-3917, 3266-4046, 3280-3883, 3305-3874, 3319-4036, 3323-3933, 3325-3901, 3336-3864, 3337-3864, 3337-3960, 3337-4064, 3337-4121, 3344-4098, 3345-3892, 3352-4082, 3353-4106, 3358-3930, 3364-4106, 3382-3997, 3387-4107, 3415-4072, 3427-4105, 3429-3885, 3437-4095, 3442-4074, 3449-4106, 3459-3906, 3467-4139, 3471-4106, 3484-3981, 3487-4035, 3495-4106, 3496-3957, 3512-3965, 3529-4037, 3547-4367, 3554-3812, 3590-3675, 3632-4061, 3711-4151, 3717-4393, 3725-4428, 3906-4333, 3906-4335, 3906-4337, 3906-4345, 3906-4458, 3909-4106, 3962-4072, 4074-4607, 4082-4607, 4092-4129
12/5436263CB1/ 2875	1-192, 1-251, 1-374, 1-378, 1-450, 17-622, 38-372, 196-2484, 627-887, 627-1110, 668-883, 974-1234, 1288-2026, 1434-2026, 1925-2403, 1978-2237, 2031-2639, 2062-2669, 2098-2554, 2110-2362, 2159-2657, 2261-2708, 2261-2875, 2281-2557, 2453-2870, 2575-2756
13/5778744CB1/ 1422	1-149, 1-292, 1-404, 4-300, 16-219, 73-238, 73-250, 153-363, 207-393, 207-716, 253-1131, 275-552, 298-414, 357-649, 406-607, 439-651, 439-689, 488-687, 506-742, 513-784, 547-814, 547-855, 551-807, 554-853, 604-855, 607-850, 666-925, 673-955, 699-984, 700-942, 743-1062, 744-997, 744-1028, 755-959, 759-984, 769-970, 862-1111, 869-983, 885-1140, 890-1007, 1008-1076, 1008-1140, 1008-1422

【表 4 - 2】

表 4 - 2

ポリヌクレオチド SEQ ID NO/ Incyte ID/配 列長	配列断片
14/2715421CBI/ 1048	1-302, 170-293, 173-419, 185-774, 188-438, 190-386, 190-471, 198-486, 212-334, 212-494, 212-518, 212-536, 212-683, 212-707, 214-519, 222-567, 233-481, 239-627, 252-591, 297-434, 301-816, 478-750, 564-909, 582-714, 639-669, 642-1048, 668-1032, 700-1028, 808-1046, 859-1047, 880-1048, 938-1048
15/3096490CBI/ 4119	1-780, 1-786, 15-296, 21-511, 24-274, 30-667, 46-682, 76-1625, 86-766, 886-1156, 946-1109, 1030-1303, 1058-1304, 1087-1363, 1226-1466, 1226-1777, 1366-1635, 1488-1765, 1488-2057, 1546-1802, 1619-1863, 1647-1890, 1718-1978, 1725-1882, 1725-2128, 1770-2319, 1770-2370, 1790-2033, 1847-2098, 1847-2104, 1847-2327, 1856-2108, 1893-2243, 1909-2297, 2026-2669, 2068-2685, 2081-2341, 2104-2370, 2123-2707, 2137-2707, 2188-2426, 2188-2569, 2188-2701, 2248-2707, 2267-2532, 2274-2754, 2286-2701, 2288-2586, 2296-2622, 2322-2579, 2322-2825, 2371-2640, 2415-2712, 2436-2726, 2470-2727, 2539-2824, 2603-2846, 2603-2868, 2603-3139, 2655-2964, 2689-2935, 2689-3146, 2729-2992, 2738-3029, 2793-2991, 2828-3092, 2837-3099, 2919-3101, 2919-3213, 2919-3420, 2945-3221, 2999-3255, 3018-3166, 3057-3242, 3057-3662, 3185-3424, 3204-3463, 3299-3935, 3375-3940, 3509-3935, 3558-4064, 3560-4118, 3564-4119, 3568-4050, 3596-3834, 3596-3993, 3596-4041, 3659-4118, 3683-4118, 3759-4079, 3866-4118, 3923-4079
16/6768783CBI/ 2443	1-592, 1-716, 274-486, 274-836, 274-921, 284-337, 336-430, 337-486, 337-618, 487-618, 487-747, 535-1050, 619-747, 619-834, 669-2443, 748-834, 930-952, 943-1053, 943-1243, 943-2361, 943-2364, 949-1050, 964-1240, 1054-1243, 1054-1332, 1238-1345, 1244-1332, 1244-1403, 1333-1403, 1333-1575, 1401-1784, 1401-2055, 1404-1575, 1404-1710, 1534-1705, 1534-2046, 1576-1710, 1589-1846, 1711-1845, 1711-2073, 1723-2073, 1726-2073, 1846-2073, 1846-2252, 1874-2251, 2074-2252, 2074-2361, 2074-2364, 2253-2361, 2253-2364
17/2483245CBI/ 6824	1-427, 1-458, 1-460, 1-470, 1-479, 1-654, 33-481, 33-484, 64-489, 357-923, 403-712, 578-1163, 608-1061, 648-1296, 698-1148, 704-1317, 729-1021, 864-1170, 864-1176, 1219-1784, 1227-1576, 1357-1915, 1398-2010, 1678-2171, 1682-1933, 1682-2236, 1728-2345, 1751-2470, 1776-2062, 1877-2442, 1911-2241, 1912-2310, 1957-2207, 2019-2595, 2075-2893, 2102-2400, 2102-2625, 2102-2633, 2244-2875, 2359-2963, 2384-3015, 2488-2967, 2521-2718, 2694-3036, 2707-3405, 2732-2978, 2763-3091, 2785-3029, 2794-3340, 2804-3157, 3000-3282, 3000-3586, 3025-3633, 3062-3270, 3109-3417, 3215-3653, 3264-4055, 3316-3528, 3321-3528, 3363-3907, 3381-3897, 3405-3960, 3410-3654, 3414-3656, 3414-3913, 3462-4053, 3551-3820, 3574-3818, 3688-4322, 3713-4293, 3734-3978, 3734-4057, 3745-3994, 3745-4272, 3780-3916, 3798-3962, 3844-4484, 3876-4135, 3882-4414, 3887-4276, 3909-4183, 3938-4702, 3947-4240, 3964-4210, 3964-4436, 3980-4291, 3983-4228, 3995-4658, 4102-4291, 4105-4739, 4118-4334, 4128-4375, 4128-4377, 4128-4609, 4138-4868, 4187-4439, 4195-4482, 4216-4716, 4256-4486, 4281-4581, 4308-4386, 4314-4585, 4379-4983, 4383-4654, 4383-4759, 4406-4694, 4410-

【 0 3 7 0 】

【表 4 - 3】

表 4 - 3

ポリヌクレオチド SEQ ID NO/ Incyte ID/配 列長	配列断片
	5003, 4417-4853, 4443-4700, 4443-5009, 4537-5149, 4541-5073, 4557-4790, 4561-4807, 4569-5233, 4583-5209, 4583-5210, 4608-5044, 4614-4860, 4615-5060, 4615-5067, 4618-4685, 4629- 5399, 4651-5420, 4658-4872, 4695-4926, 4709-5343, 4720-5296, 4721-5176, 4733-5023, 4733-5063, 4738-5294, 4756-4978, 4756-5365, 4757-5079, 4758-5417, 4788-5413, 4796-4924, 4811-5422, 4813- 5064, 4813-5080, 4813-5400, 4816-5448, 4822-5439, 4826-4958, 4826-5070, 4826-5089, 4826-5140, 4826-5334, 4826-5449, 4827-5100, 4833-5282, 4886-5156, 4893-5087, 4899-5449, 4904-5422, 4906- 5451, 4908-5303, 4908-5305, 4908-5371, 4908-5374, 4910-5161, 4917-5080, 4929-5422, 4929-5448, 4941-5427, 4949-5203, 4956-5419, 4958-5202, 4962-5435, 4967-5177, 4975-5296, 4978-5453, 4984- 5435, 5001-5435, 5002-5438, 5007-5262, 5008-5353, 5009-5435, 5010-5435, 5013-5435, 5014-5435, 5014-5437, 5018-5418, 5018-5435, 5019-5435, 5020-5433, 5021-5452, 5034-5269, 5035-5438, 5039- 5294, 5046-5451, 5048-5273, 5050-5429, 5056-5451, 5075-5708, 5086-5436, 5090-5373, 5092-5436, 5094-5383, 5096-5438, 5111-5361, 5119-5419, 5139-5433, 5140-5438, 5141-5428, 5146-5387, 5164- 5701, 5164-5717, 5172-5436, 5175-5435, 5188-5450, 5201-5441, 5201-5450, 5201-5689, 5203-5435, 5224-5497, 5229-5766, 5231-5487, 5233-5867, 5249-5435, 5252-5447, 5255-5654, 5270-5532, 5291- 5450, 5291-5524, 5291-5549, 5293-5671, 5315-5450, 5345-5807, 5346-5420, 5346-5623, 5346-5887, 5361-5668, 5370-5643, 5372-5766, 5462-5701, 5462-6005, 5465-6084, 5474-5670, 5481- 5713, 5491-5713, 5503-5678, 5511-5753, 5513-6084, 5518-5743, 5518-5821, 5518-6015, 5541-6084, 5560-6084, 5567-6084, 5575-6043, 5583-6103, 5588-5885, 5599-5885, 5606-5846, 5606-6002, 5606- 6130, 5606-6160, 5608-5881, 5612-6194, 5629-6186, 5641-5912, 5651-5924, 5689-5961, 5689-6084, 5694-5980, 5720-6125, 5720-6153, 5720-6156, 5720-6205, 5720-6206, 5720-6214, 5720-6255, 5720- 6258, 5720-6260, 5720-6272, 5720-6301, 5720-6402, 5751-5973, 5754-6039, 5767-6172, 5767-6211, 5767-6217, 5767-6218, 5767-6227, 5767-6240, 5767-6245, 5767-6263, 5767-6267, 5767-6278, 5767- 6282, 5767-6284, 5767-6290, 5767-6292, 5767-6316, 5767-6359, 5767-6372, 5767-6388, 5767-6405, 5768-6247, 5768-6448, 5769-6321, 5803-6096, 5808-6093, 5814-6104, 5821-5978, 5849-6042, 5850- 6360, 5870-6115, 5874-6142, 5878-6140, 5889-6133, 5916-6210, 5920-6159, 5948-6178, 5948-6183, 5952-6370, 6085-6620, 6085-6702, 6144-6298, 6146-6409, 6149-6590, 6153-6291, 6155-6437, 6176- 6299, 6179-6672, 6180-6593, 6279-6442, 6294-6394, 6356-6587, 6373-6644, 6375-6520, 6380-6618, 6380-6640, 6383-6650, 6386-6634, 6387-6662, 6389-6653, 6393-6824, 6469-6674 1-274, 1-449, 1-620, 2-275, 2-456, 2-496, 5-295, 5-283, 6-288, 6-294, 6-3446, 8-273, 8-279, 8-297, 8- 308, 8-598, 9-311, 9-393, 10-476, 12-267, 12-271, 12-272, 12-317, 12-480, 12-598, 13-483, 14-304, 20- 483, 20-575, 22-283, 22-311, 23-331, 23-496, 30-305, 33-303, 49-368, 57-414, 108-608, 117-749, 118- 749, 143-759, 180-459, 228-685, 276-560, 278-787, 285-787, 296-787, 315-598, 354-787, 362-787, 375- 787, 393-720, 397-787, 413-689, 449-787, 455-741, 467-787, 506-776, 518-787, 519-787, 523-780.
18/49344451CBI/ 4005	

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
19/7504684CBI/ 4424	2414-2713, 2909-3238, 3041-3560, 3129-3633, 3135-3699, 3148-3389, 3148-3659, 3156-3735, 3195-3768, 3201-3550, 3224-3493, 3266-3472, 3289-3807, 3351-3607, 3446-3720, 3579-4005, 3741-3975 1-238, 1-4417, 105-505, 270-662, 538-1036, 538-1077, 538-1203, 538-1211, 538-1218, 538-1234, 540-1213, 540-1216, 542-1211, 620-1067, 620-1088, 620-1173, 620-1191, 620-1212, 620-1216, 620-1235, 620-1291, 620-1300, 620-1307, 620-1311, 620-1414, 620-1430, 622-1245, 622-1253, 622-1337, 631-1212, 763-1430, 778-1430, 779-1430, 780-1430, 798-1430, 801-1430, 813-1430, 822-1430, 853-1421, 853-1430, 860-1430, 861-1430, 862-1430, 867-1430, 874-1430, 895-1430, 899-1430, 909-1430, 923-1430, 924-1430, 926-1430, 932-1430, 936-1430, 968-1430, 992-1430, 1002-1430, 1006-1430, 1023-1430, 1028-1430, 1042-1430, 1045-1430, 1390-1663, 2163-2694, 2625-3064, 2626-2894, 2626-3209, 2626-3312, 2631-3187, 2724-3321, 2784-3235, 2847-3175, 2874-3566, 2890-3529, 2896-3376, 2926-3537, 2939-3631, 2975-3701, 2989-3090, 2989-3285, 2989-3515, 2989-3551, 3001-3277, 3001-3398, 3001-3461, 3001-3477, 3001-3514, 3001-3519, 3001-3553, 3001-3616, 3001-3620, 3001-3652, 3005-3363, 3044-3581, 3067-3730, 3079-3859, 3082-3483, 3093-3696, 3118-3826, 3149-3677, 3158-3705, 3158-3819, 3165-3684, 3171-3743, 3189-4037, 3218-3896, 3228-3885, 3255-3887, 3271-3714, 3325-3778, 3367-3625, 3395-3652, 3395-3708, 3421-3999, 3422-3865, 3457-3927, 3459-4150, 3467-4146, 3489-3753, 3490-4095, 3490-4100, 3490-4112, 3490-4150, 3492-4146, 3498-4150, 3503-4141, 3507-4150, 3516-3823, 3521-3873, 3524-3789, 3524-3964, 3524-3965, 3524-4087, 3524-4198, 3526-3960, 3526-4112, 3529-4271, 3531-4150, 3538-4146, 3547-3736, 3557-4196, 3558-4083, 3558-4125, 3558-4141, 3558-4150, 3559-4147, 3566-4141, 3566-4150, 3575-4314, 3578-3801, 3578-3933, 3578-4198, 3578-4279, 3578-4308, 3578-4312, 3578-4316, 3578-4359, 3578-4373, 3584-4150, 3588-4178, 3588-4224, 3592-4150, 3602-4150, 3615-4174, 3623-3925, 3625-4271, 3636-4351, 3641-4356, 3674-4288, 3676-3919, 3679-3891, 3711-4002, 3724-4327, 3725-4306, 3752-4035, 3764-4150, 3790-3984, 3799-4421, 3805-4148, 3828-4150, 3843-4396, 3847-4120, 3861-4111, 3861-4113, 3868-4402, 3869-4408, 3870-4112, 3881-4416, 3885-4190, 3887-4418, 3890-4139, 3905-3942, 3908-4424, 3909-4150, 3915-4150, 3919-4153, 3923-4398, 3935-4094, 3935-4198, 3935-4401, 3938-4380, 3952-4225, 3961-4405, 3966-4143, 3966-4397, 3973-4238, 3982-4398, 3985-4402, 3995-4363, 4023-4424, 4043-4417, 4077-4417, 4081-4343, 4081-4352, 4216-4396

10

20

30

【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
20/7506236CB1/ 3607	1-285, 1-394, 1-397, 1-405, 1-3607, 37-367, 153-308, 155-308, 157-389, 405-953, 488-629, 553-710, 822-1447, 996-1438, 1106-1774, 1141-1626, 1179-1245, 1192-1762, 1330-1838, 1370-2039, 1503-2073, 1509-1778, 1509-2090, 1513-2051, 1586-2151, 1623-1896, 1646-1945, 1646-2161, 1655-1790, 1800-2439, 1840-2029, 1841-2332, 1856-2519, 1880-2536, 1909-2063, 1917-2063, 1928-2539, 1937-2181, 1937-2372, 1939-2548, 1954-2272, 1977-2569, 1978-2566, 2040-2391, 2044-2697, 2053-2319, 2053-2350, 2053-2435, 2059-2396, 2076-2705, 2104-2570, 2124-2393, 2137-2503, 2155-2404, 2155-2406, 2155-2462, 2206-2750, 2227-2813, 2273-2792, 2282-2877, 2307-2856, 2314-3001, 2325-2846, 2343-2913, 2361-2865, 2367-2931, 2380-2621, 2380-2891, 2388-2967, 2392-2926, 2392-2929, 2425-3064, 2433-2782, 2440-2960, 2459-3032, 2463-3098, 2497-3111, 2498-2704, 2515-3059, 2521-2744, 2521-3039, 2543-3435, 2562-3054, 2569-2837, 2576-2929, 2580-3239, 2581-2604, 2583-2839, 2612-2885, 2648-2908, 2669-3257, 2677-3219, 2678-2952, 2701-2977, 2704-3217, 2725-2841, 2730-2989, 2730-3261, 2731-2949, 2732-3243, 2738-3429, 2749-3431, 2773-3477, 2777-3254, 2788-3060, 2803-3437, 2811-3238, 2824-3084, 2824-3166, 2834-3097, 2870-3437, 2871-3558, 2875-3085, 2881-3268, 2890-3140, 2907-3180, 2925-3149, 2927-3309, 2939-3550, 2945-3206, 2952-3437, 2957-3594, 2981-3218, 2981-3231, 2981-3232, 2981-3235, 2981-3245, 2981-3251, 2981-3253, 2981-3542, 2985-3588, 2999-3117, 3002-3583, 3009-3593, 3019-3304, 3026-3579, 3030-3565, 3061-3518, 3067-3437, 3076-3568, 3083-3604, 3088-3509, 3097-3554, 3119-3408, 3146-3368, 3147-3375, 3150-3429, 3151-3431, 3152-3415, 3171-3445, 3175-3597, 3178-3596, 3178-3607, 3185-3600, 3186-3597, 3206-3594, 3247-3593, 3251-3600, 3252-3596, 3254-3480, 3254-3607, 3264-3533, 3278-3599, 3279-3530, 3289-3523, 3290-3560, 3152-3415, 3171-3445, 3175-3597, 3178-3596, 3178-3607, 3185-3600, 3186-3597, 3206-3594, 3247-3593, 3251-3600, 3252-3596, 3254-3480, 3254-3607, 3264-3533, 3278-3599, 3279-3530, 3289-3523, 3290-3560, 3328-3437, 3338-3597, 3352-3597, 3421-3595, 3499-3607, 3509-3607

【 0 3 7 3 】

【表 5】

表 5

ポリヌクレオチド SEQ ID NO:	Incyte プロジェクト ID:	代表的ライブラリ
11	2440624CB1	SINTMC01
12	5436263CB1	SINTUT03
13	5778744CB1	LUNGTUT08
14	2715421CB1	SYNWDIT01
15	3096490CB1	CORPNOT02
16	6768783CB1	BRAUTDR04
17	2483245CB1	BRSTNOT03
18	4934451CB1	LIVRTUE01
19	7504684CB1	PANCNOT08
20	7506236CB1	LIVRNON08

10

20

30

40

【 0 3 7 4 】

表 6 - 1

ライブラリ	ベクター	ライブラリの説明
BRAUTDR04	PCDNA2.1	このランダムプライムされたライブラリは、胆管癌で死亡した 55 才の白人女性から除去されプールされた、線状体、背側尾状核、背側被殻および腹側坐核組織から単離された RNA を用いて作製された。病理は、円蓋部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状体が散在し、内嗅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、術後パッド・キアーリ症候群、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、胆嚢切除および、肝臓の 85% の摘除がある。
BRSTNOT03	PSPORT1	ライブラリは、54 才の白人女性の両側性根治的乳房切除時に採取した罹患乳房組織から単離した RNA を用いて作製した。随伴する腫瘍組織の病理は、残存する浸潤性でグレード 3 の乳管腺癌を示した。患者の病歴には、腎感染および尖圭コンジローマがある。家族歴には、良性高血圧、高脂血症、および大腸の悪性新生物がある。
CORPNOT02	pINCY	ライブラリは、アルツハイマー病で死亡の 74 才の白人男性の脳から除去した罹患脳梁組織から単離した RNA を用いて作製した。
LIVRN08	pINCY	このノーマライズしたライブラリは、或るプールした肝臓組織ライブラリからの 570 万個の独立クローンから作製した。開始 RNA は、無酸素症で死亡した 4 才のヒスパニック系男子および、無脳症で妊娠 16 週後に死亡の 16 週女子胎児から摘出され、プールされた肝臓組織から作製した。血清検査は 4 才男子でサイトロメガロウイルス (cytomegalovirus) が陽性であった。4 才児患者の病歴は喘息がある。家族歴には、胎児の母に出産前ビタミンの日常的服用、および僧帽弁脱出がある。このライブラリは、極めて長時間 (48 時間 / 1 回) の再アニーリングによるハイブリダイゼーションを用いた他は、Soares 他, PNAS (1994) 91:9228 および Bonaldo 他, Genome Research 6 (1996):791 を適応した条件を用いて 2 回にわたりノーマライズした。

表 6 - 2

LIVRTUE01	PCDNA2.1	この5'に偏向しランダムプライムしたライブラリは、72才白人男性の部分肝切除時に摘出された肝腫瘍組織から単離したRNAを用いて作製した。病理は転移性でグレード2(4段階の内)の神経内分泌癌で、塊を形成していた。患者は転移性肝癌を有した。患者の病歴には、良性高血圧、I型糖尿病、前立腺肥大、前立腺癌、アルコールおよびタバコ濫用(共に寛解期)がある。過去の手術には、膵臓病変部除去、非観血的前立腺生検(closed prostatic biopsy)、経尿道的前立腺切除、両側精巣摘出、および脾臓全摘が含まれる。患者の使用薬剤は、Eulexin、Hytrin、Proscar、エコトリン、およびインスリンがある。家族歴は、母親にアテローム性冠動脈疾患と急性心筋梗塞、父親にアテローム性冠動脈疾患とII型糖尿病がある。
LUNGTUT08	pINCY	ライブラリは、右上肺葉切除(光ファイバー気管支鏡検査を併行)時に63才白人男性から除去した肺腫瘍組織から単離されたRNAを用いて作製された。病理はグレード3の腺癌を示した。家族歴には、アテローム性冠動脈疾患、急性心筋梗塞、結腸癌、無症候性腹部大動脈瘤、タバコ濫用、および不整脈がある。家族歴には、鬱血性心不全、胃癌、II型糖尿病、アテローム硬化型冠動脈疾患、および急性心筋梗塞がある。
PANCNOT08	pINCY	ライブラリは、65才の白人女性の根治的膵亜全摘時に採取した膵臓組織の単離RNAを使用して作製された。関連する腫瘍組織の病理は、浸潤性でグレード2の腺癌を示した。患者の病歴には、II型糖尿病、骨関節炎、心血管疾患、大腸良性腫瘍、および白内障がある。過去の手術としては、脾臓全摘出、胆嚢摘出、および腹式子宮摘出がある。家族歴には心血管疾患、II型糖尿病、および胃癌がある。

表 6 - 3

SINITMC01	pINCY	<p>この大型分画ライブラリは、二人の供与者からのプールされたcDNAを用いて作製した。cDNAは30才白人女性(供与者A)の部分結腸切除、開腹肝生検、および永久的結腸薬造設時に切除した回腸組織および、70才白人女性(供与者B)の右半結腸切除、開腹肝生検、S状結腸鏡検査、結腸鏡検査および永久的結腸薬造設時に摘出された回腸組織からの単離 mRNAを用いて作製した。マッチする腫瘍組織の病理(供与者A)は、回腸末端部に生じたカルチノイド腫瘍(グレード1の神経内分泌腺癌)を示した。この腫瘍は回腸壁から腸間膜脂肪を貫通して、癒着した盲腸にまで広がっており、そこで腫瘍は腸壁を貫通して粘膜表面まで広がっていた。多数のリンパ節が腫瘍に陽性であった。さらに2個のリンパ節はまた、直接の腫瘍拡大を併発した。供与者Bの病理では、回腸の縁は非腫瘍性であった。マッチする腫瘍の病理(供与者B)は浸潤性でグレード2の腺癌を示し、腺癌は回盲弁遠位部に、潰瘍化した塊を形成していた。</p>
		<p>腫瘍の浸潤は固有筋層を通過して漿膜脂肪組織に及んだ。一つの所属リンパ節は、転移性腺癌のマイクrofオオカスに陽性であった。供与者Aは顔面紅潮を示し、非特定の上腹部/骨盤症状を示した。患者の病歴は子宮内膜症とタバコ濫用、アルコール濫用がある。供与者Bの病歴には、悪性乳房腫瘍、II型糖尿病、高脂血症、ウイルス性肝炎、非特定甲状腺疾患、骨関節炎、悪性皮膚腫瘍がある。供与者Bの使用薬剤にはタモキシフェンがある。</p>
SINITUT03	pINCY	<p>ライブラリは、49才白人女性の腹膜組織破襲、腹膜癒着解消、回腸切除、および永久的結腸薬造設時に採取した回腸腫瘍組織から単離したRNAを用いて作製した。病理はグレード4の腺癌を示した。患者の病歴には良性高血圧がある。過去の手術には、腹式子宮全摘出、両側卵管卵巣摘出、所属リンパ節切除、付随的虫垂切除、および掻爬がある。家族歴には、良性高血圧、脳血管疾患、高脂血症、アテローム硬化型冠動脈疾患、高脂血症、II型糖尿病、および胃癌がある。</p>
SYNWDIT01	pINCY	<p>ライブラリは、64才の白人女性の手関節背側から採取した罹患滑膜組織からの単離RNAを用いて作製した。患者の病歴には、リュウマチ様関節炎がある。</p>

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て、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	アミノ酸配列または核酸配列の比較、注釈に有用なファーストデータファインダ (Fast Data Finder)。	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	アミノ酸配列および核酸配列の配列類似性検索に有用なベシーシクローカルアラインメント検索ツール (Basic Local Alignment Search Tool)。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. 他 (1997) (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.	ESTs: 確率値=1.0E-8以下 完全長配列: 確率値=1.0E-10未満
FASTA	一群の同じタイプの配列と問合せ配列との間の類似性について検索するPearson およびLipman アルゴリズム。FASTAには最小5つの機能(fasta, tfasta, fastx, tfastx, 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; およびSmith, T.F. and M.S. Waterman (1981) Adv. Appl. Math. 2:482-489.	ESTs: fasta E値=1.0E-6 アセンブリしたESTs: fasta 同一性=95%以上 一致した長さ=200塩基以上 fastx E 値=1.0E-8 以下 完全長配列: 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リ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J.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
HMMER	問合せ配列をPFAMのような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に対して検索するアルゴリズム。	Krogh, A. 他. (1994) J. Mol. Biol. 235:1501-1531; Sonnhammer, E.L.L. 他 (1998) Nucleic Acids Res. 26:320-322; Durbin, R. 他. (1998) Our World View, in a Nutshell, Cambridge Univ. Press, 1-350 ページ。	PFAMヒット: 確率値=1.0E-3 以下 シングルレベルブチドヒット: スコア=0 以上

10

20

30

40

【表 7 - 2】

表 7 - 2

プログラム	説明	参照文献	パラメータ関連値
ProfileScan	Prosit 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) CABIOS 4:61-66, Gribskov, M. 他(1989) Methods Enzymol.183:146-159, Bairoch, A. 他.(1997) Nucleic Acids Res. 25:217-221.	ノーマライズされた質スコアと特定のPrositモチーフに対する GCG指定「HIGH」値。 通常、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) Genome Res. 8:175-185, Ewing, B及びP. Green (1998) Genome Res. 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) Adv. Appl. Math. 2:482-489; Smith, T.F. 及び M.S. Waterman (1981) J. Mol. Biol. 147:195-197; and Green, P., University of Washington, Seattle, WA.	スコア=120以上 一致した長さ=56以上
Consed	Phrap アセンブリ体の表示および編集用グラフィカルツール。	Gordon, D. 他(1998) Genome Res. 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) Protein Engineering 10:1-6; Claverie, J.M. 及び S. Audic (1997) CABIOS 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) J. Mol. Biol. 237:182-192; Persson, B. および P. Argos (1996) Protein Sci. 5:363-371.	
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 Press, Menlo Park, CA, 175-182ページ.	
Motifs	Prosit で定義されたものと一致する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,バージョン9, M01-59ページ, Genetics Computer Group, Madison, WI	

10

20

30

40

【配列表】

2006514532000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US02/15688		
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER				
IPC(7) : C12Q 1/68; G01N 33/53; A61K 38/17; C07K 14/47, 16/18 US CL : 435/6, 69.1, 252.3, 320.1, 325; 530/350, 388.1; 536/23.5 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. : 435/6, 69.1, 252.3, 320.1, 325; 530/350, 388.1; 536/23.5				
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) STN & WEST AND SEQUENCE DATA BASES FOR SEQ ID NO: 1 & 11.				
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT				
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.		
X --- A	BOLL et al. Messenger RNAs Expressed in Intestine of Adult but Not Baby Rabbits. Isolation of Cognate cDNAs and Characterization of a Novel Brush Border Protein with Esterase and Phospholipase activity. J. Biol. Chem. 15 June 1993, Vol. 268, No. 17, pages 12901-12911. Discloses a protein (Accession No. Q05017) which is 77% identical to Applicants SEQ ID NO: 1 [See the sequence alignment attached to the reference]. The encoding DNA is also disclosed. Reads on the fragment part of the claims.	1-4, 6-9, 17 ----- 5, 10, 12-13, 18, 56, 66		
A,E	WO 02/059328 A1 (LEXICON GENETICS INCORPORATED) 01 August 2002 (01.08.2002). Disclosed Accession No. AX492941 (DNA) which is 94.9% identical to Applicants' SEQ ID NO : 11; and also discloses Accession No. ABB09555 (protein) which is 99.9% identical to Applicants SEQ ID NO: 1 [Sequence alignments are attached to the cited reference].	1-10, 12-13, 17-18, 56, 66		
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.				
<table border="0" style="width: 100%;"> <tr> <td style="width: 50%; vertical-align: top;"> * Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "B" earlier application or patent published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed </td> <td style="width: 50%; vertical-align: top;"> *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family </td> </tr> </table>			* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "B" earlier application or patent published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "B" earlier application or patent published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family			
Date of the actual completion of the international search 15 July 2004 (15.07.2004)		Date of mailing of the international search report 09 AUG 2004		
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1430 Alexandria, Virginia 22313-1430 Facsimile No. (703) 305-3230		Authorized officer Tejchand (Saidha) Telephone No. (571) 272 1600		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US02/15688

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.: 1-10, 12-13, 17-18, 56 & 66 (all in-part, pertaining to SEQ ID NO : 1 & 11)

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US02/15688

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 searched, the appropriate additional search fees must be paid.

Group 1, claim(s) 1-10, 12-13, 17-18, 56 & 66, drawn to polypeptide of SEQ ID NO: 1, encoding DNA of SEQ ID NO : 11, host cells and method of making the polypeptide.

Groups 2-10, claim(s) 1-10, 12-13, 17-18, 57-65 & 67-75, drawn to polypeptide of SEQ ID NOS : 2-10, encoding DNA of SEQ ID NO : 12-20, host cells and method of making the polypeptide, respectively. [each of polypeptide sequences of SEQ ID NOS : 2-10 and the corresponding DNA sequences of SEQ ID NOS : 12-20 form the 9 groups which have been put together for convenience]

Group 11, claim(s) 11, 30-45, drawn to antibody against SEQ ID NO : 1.

Groups 12-20, each group corresponding to claim(s) 11, 30-45, drawn to antibody against each of the sequences of SEQ ID NOS : 2-10.

Group 21, claim(s) 14-16, drawn to method of detection of polynucleotide of SEQ ID NO : 11.

Groups 22-30, claim(s) 14-16, drawn to method of detection of polynucleotides for each of the sequences of SEQ ID NOS : 12-20, respectively.

Group 31, claim(s) 19, drawn to method of treatment using polypeptide of SEQ ID NO : 1.

Groups 32-40, claim(s) 19, drawn to method of treatment using polypeptides of each of the sequences of SEQ ID NOS : 2-10, respectively.

Group 40, claim(s) 20-25 & 27, drawn to a method of screening agonist/antagonist of the polypeptide of SEQ ID NO : 1.

Groups 41-50, claim(s) 20-25 & 27, drawn to a method of screening agonist/antagonist of the polypeptide of each of the sequences of SEQ ID NOS : 2-10, respectively.

Group 51, claim(s) 26, drawn to a method of screening a compound that specifically binds to polypeptide of SEQ ID NO : 1.

Groups 52-60, claim(s) 26, drawn to a method of screening a compound that specifically binds to each of the polypeptide of SEQ ID NOS : 2-36, respectively.

Group 61, claim(s) 28-29, drawn to a method of screening a compound for effectiveness in altering expression of the target nucleotide sequence of SEQ ID NO : 11.

Groups 62-70, claim(s) 28-29, drawn to a method of screening a compound for effectiveness in altering expression of the target nucleotide for each of the sequences of SEQ ID NOS : 12-20, respectively.

Group 71, claim(s) 46-55, drawn to a microarray and method of generating expression profile using nucleotide sequence of SEQ ID NO : 11.

Group 71-80, claim(s) 46-55, drawn to a microarray and method of generating expression profile using nucleotide sequences of SEQ ID NOS : 12-20, respectively.

The inventions listed as Groups 1-288 do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons: Group 1 has the special technical feature of the nucleotide sequence of SEQ ID NO : 11 and the encoded polypeptide of SEQ ID NO : 1, host cell and a method of

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US02/15688

making the polypeptide, which Groups 2-80 do not share. For the same reason, Group 2-10 has the special technical feature of the nucleotide sequences of SEQ ID NOS : 12-20 and the encoded polypeptides of SEQ ID NOS : 2-10, respectively, host cell and a method of making the polypeptide, which Groups 21-80 do not share. Each of the Groups 11-21 has a special technical feature in a distinct antibody pertaining to each of the polypeptide sequences of SEQ ID NOS : 1-10, which Groups 1-10 & 21-80 do not share. Each of the Groups 21-80, employ structurally distinct nucleotide sequences of SEQ ID NOS : 11-20 or the polypeptide sequences of SEQ ID NOS : 1-10 in distinct methods, however, in view of 37 CFR 1.475(b), when claims corresponding to different categories of inventions are present then only (3) and additional methods of use are deemed to lack unity. Thus the various groups discussed above show a lack of unity of invention.

フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)	
A 6 1 P	1/10	(2006.01)	A 6 1 P	1/04	4 B 0 6 5
A 6 1 P	1/12	(2006.01)	A 6 1 P	1/10	4 C 0 8 4
A 6 1 P	1/16	(2006.01)	A 6 1 P	1/12	4 C 0 8 5
A 6 1 P	1/18	(2006.01)	A 6 1 P	1/16	4 H 0 4 5
A 6 1 P	3/04	(2006.01)	A 6 1 P	1/18	
A 6 1 P	3/06	(2006.01)	A 6 1 P	3/04	
A 6 1 P	3/10	(2006.01)	A 6 1 P	3/06	
A 6 1 P	5/14	(2006.01)	A 6 1 P	3/10	
A 6 1 P	7/00	(2006.01)	A 6 1 P	5/14	
A 6 1 P	7/02	(2006.01)	A 6 1 P	7/00	
A 6 1 P	7/06	(2006.01)	A 6 1 P	7/02	
A 6 1 P	7/08	(2006.01)	A 6 1 P	7/06	
A 6 1 P	9/00	(2006.01)	A 6 1 P	7/08	
A 6 1 P	9/08	(2006.01)	A 6 1 P	9/00	
A 6 1 P	9/10	(2006.01)	A 6 1 P	9/08	
A 6 1 P	9/12	(2006.01)	A 6 1 P	9/10	
A 6 1 P	11/00	(2006.01)	A 6 1 P	9/12	
A 6 1 P	11/06	(2006.01)	A 6 1 P	11/00	
A 6 1 P	13/12	(2006.01)	A 6 1 P	11/06	
A 6 1 P	17/06	(2006.01)	A 6 1 P	13/12	
A 6 1 P	19/02	(2006.01)	A 6 1 P	17/06	
A 6 1 P	19/06	(2006.01)	A 6 1 P	19/02	
A 6 1 P	19/10	(2006.01)	A 6 1 P	19/06	
A 6 1 P	21/04	(2006.01)	A 6 1 P	19/10	
A 6 1 P	25/00	(2006.01)	A 6 1 P	21/04	
A 6 1 P	25/02	(2006.01)	A 6 1 P	25/00	
A 6 1 P	25/08	(2006.01)	A 6 1 P	25/02	
A 6 1 P	25/14	(2006.01)	A 6 1 P	25/02	1 0 3
A 6 1 P	25/16	(2006.01)	A 6 1 P	25/08	
A 6 1 P	25/18	(2006.01)	A 6 1 P	25/14	
A 6 1 P	25/22	(2006.01)	A 6 1 P	25/16	
A 6 1 P	25/28	(2006.01)	A 6 1 P	25/18	
A 6 1 P	27/02	(2006.01)	A 6 1 P	25/22	
A 6 1 P	29/00	(2006.01)	A 6 1 P	25/28	
A 6 1 P	31/04	(2006.01)	A 6 1 P	27/02	
A 6 1 P	31/12	(2006.01)	A 6 1 P	29/00	
A 6 1 P	31/18	(2006.01)	A 6 1 P	29/00	1 0 1
A 6 1 P	31/22	(2006.01)	A 6 1 P	31/04	
A 6 1 P	33/02	(2006.01)	A 6 1 P	31/12	
A 6 1 P	33/10	(2006.01)	A 6 1 P	31/18	
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	31/22	
A 6 1 P	35/02	(2006.01)	A 6 1 P	33/02	
A 6 1 P	37/06	(2006.01)	A 6 1 P	33/10	
A 6 1 P	37/08	(2006.01)	A 6 1 P	35/00	
C 0 7 K	14/47	(2006.01)	A 6 1 P	35/02	
C 0 7 K	16/18	(2006.01)	A 6 1 P	37/06	
C 0 7 K	16/40	(2006.01)	A 6 1 P	37/08	

C 0 7 K 16/46	(2006.01)	C 0 7 K 14/47	
C 1 2 N 1/15	(2006.01)	C 0 7 K 16/18	
C 1 2 N 1/19	(2006.01)	C 0 7 K 16/40	
C 1 2 N 1/21	(2006.01)	C 0 7 K 16/46	
C 1 2 N 9/02	(2006.01)	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 9/10	(2006.01)	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 9/14	(2006.01)	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 P 21/02	(2006.01)	C 1 2 N 9/02	
C 1 2 Q 1/02	(2006.01)	C 1 2 N 9/10	
C 1 2 Q 1/68	(2006.01)	C 1 2 N 9/14	
G 0 1 N 33/15	(2006.01)	C 1 2 P 21/02	C
G 0 1 N 33/50	(2006.01)	C 1 2 Q 1/02	
G 0 1 N 33/53	(2006.01)	C 1 2 Q 1/68	A
G 0 1 N 33/566	(2006.01)	G 0 1 N 33/15	Z
C 1 2 N 15/02	(2006.01)	G 0 1 N 33/50	Z
C 1 2 N 5/10	(2006.01)	G 0 1 N 33/53	D
A 6 1 K 38/00	(2006.01)	G 0 1 N 33/53	M
C 1 2 P 21/08	(2006.01)	G 0 1 N 33/566	
		C 1 2 N 15/00	C
		C 1 2 N 15/00	F
		C 1 2 N 5/00	A
		A 6 1 K 37/02	
		C 1 2 P 21/08	

- (31)優先権主張番号 60/303,404
 (32)優先日 平成13年7月6日(2001.7.6)
 (33)優先権主張国 米国(US)
- (31)優先権主張番号 60/314,754
 (32)優先日 平成13年8月24日(2001.8.24)
 (33)優先権主張国 米国(US)
- (31)優先権主張番号 60/351,262
 (32)優先日 平成14年1月22日(2002.1.22)
 (33)優先権主張国 米国(US)
- (31)優先権主張番号 60/368,799
 (32)優先日 平成14年3月29日(2002.3.29)
 (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, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, 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, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW

- (72)発明者 ユエ、ヘンリー
 アメリカ合衆国カリフォルニア州9 4 0 8 7・サニーベイル・ルイスアベニュー 8 2 6
- (72)発明者 アジムザイ、ヤルダ
 アメリカ合衆国カリフォルニア州9 4 5 5 2・カストロパレー・ボールダーキャニオンドライブ
 5 5 1 8
- (72)発明者 ボーグン、マライア・アール
 アメリカ合衆国カリフォルニア州9 4 5 7 7・サンレアンドロ・サンティアゴロード 1 4 2 4 4

- (72)発明者 バーフォード、ニール
アメリカ合衆国コネチカット州06422・ダラム・ワイルドウッドサークル 105
- (72)発明者 レディ、ルーパ
アメリカ合衆国カリフォルニア州94086・サニーベイル・#3・ウェストマッキンレーアベニュー 1233
- (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 33
- (72)発明者 ダス、デボプリヤ
アメリカ合衆国カリフォルニア州94087・サニーベイル・パーキントンアベニュー 1267
- (72)発明者 ニュエン、ダニエル・ビー
アメリカ合衆国カリフォルニア州95118・サンノゼ・リッジウッドドライブ 1403
- (72)発明者 ヤオ、モニック・ジー
アメリカ合衆国インディアナ州46033・カーメル・ウッドゲートドライブ 1189
- (72)発明者 アービズ、チャンドラ・エス
アメリカ合衆国カリフォルニア州95125・サンノゼ・モロッコドライブ 1706
- (72)発明者 リュ、ヤン
アメリカ合衆国カリフォルニア州94303・パロアルト・コリーナウェイ 3885
- (72)発明者 ガンディー、アミーナ・アール
アメリカ合衆国カリフォルニア州94118・サンフランシスコ・フィフスアベニュー 705
- (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 エリオット、ピッキー・エス
アメリカ合衆国カリフォルニア州95121・サンノゼ・ポルトンブレイスウェイ 3770
- (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94555・フレモント・メイバードサークル 34359
- (72)発明者 ラル、プリーティ・ジー
アメリカ合衆国カリフォルニア州95056・サンタクララ・ピーオーボックス 5142
- (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 リー、アーンステーション・エイ
アメリカ合衆国カリフォルニア州94552・カストロバレー・クロウクリークロード 20523
- (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94015・デイリーシティ・ウエストデールアベニュー 40
- (72)発明者 ユエ、ヒュイピン
アメリカ合衆国カリフォルニア州95014・クーペルティノー・サウスステリングロード 1170
- (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 トリボレー、キャサリン・エム
アメリカ合衆国カリフォルニア州94107・サンフランシスコ・#5・テネシーストリート 1121
- (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94109・サンフランシスコ・#4・ポークストリート 2345
- (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94122・サンフランシスコ・#5ディー・ロックスリーアベニュー 8

4B024 AA01 AA11 BA08 BA10 BA11 BA44 BA80 CA01 CA04 CA09
CA11 DA02 DA05 DA11 EA02 EA03 EA04 FA02 GA01 GA11
HA01 HA03 HA12 HA15

4B050 CC01 CC03 DD07 FF14 LL01 LL03

4B063 QA01 QA18 QQ05 QQ13 QQ22 QQ26 QQ30 QQ42 QQ52 QQ70
QR08 QR33 QR42 QR55 QR59 QR62 QR80 QR82 QS05 QS25
QS34 QS36 QX02

4B064 AG01 AG27 CA01 CA19 CA20 CC24 CE12 DA01 DA13

4B065 AA01X AA57X AA90X AA93Y AB01 AB02 BA01 BA08 BD14 CA24
CA25 CA28 CA29 CA31 CA44 CA46

4C084 AA02 AA03 AA06 AA07 AA17 BA01 BA08 BA22 BA23 CA18
MA13 MA16 MA43 MA52 MA56 MA57 MA59 MA60 MA63 MA66
NA14 ZA012 ZA022 ZA052 ZA062 ZA152 ZA162 ZA182 ZA202 ZA222
ZA242 ZA332 ZA362 ZA392 ZA402 ZA422 ZA452 ZA552 ZA592 ZA662
ZA682 ZA702 ZA722 ZA732 ZA752 ZA812 ZA892 ZA942 ZA962 ZA972
ZB082 ZB092 ZB112 ZB132 ZB152 ZB262 ZB272 ZB332 ZB352 ZB382
ZB392 ZC062 ZC312 ZC332 ZC352 ZC552

4C085 AA13 AA14 AA16 BB31 BB41 BB43 CC02 CC22 CC23 EE01
GG01 GG08 GG10

4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 CA40 DA00 DA76 DA89 EA20
EA50 FA72 FA74

專利名稱(譯)	脂質相關分子		
公開(公告)號	JP2006514532A	公開(公告)日	2006-05-11
申請號	JP2002592451	申請日	2002-05-17
[標]申請(專利權)人(譯)	洞察Genomics公司		
申請(專利權)人(譯)	洞察基因組公司		
[標]發明人	タングワイトム ユエヘンリー アジムザイヤルダ ボーグンマライアアール バーフォードニール レディルーパ チョーラナリンダーケイ ダスデポプリヤ ニュエンダニエルビー ヤオモニークジー アービズチャンドラエス リュヤン ガンディーアミーナアール グリフィンジェニファーエイ エリオットビッキーエス ランクマールジャヤラクシミ ラルプリーティジー リュデュングアイナエム リーアーンステイーンエイ リーソーユーン ユエヒュイピン ヤングジュンミン トリボレーキャサリンエム ケープルエイミーイー スウォーナカールアニータ		
發明人	タング、ワイ・トム ユエ、ヘンリー アジムザイ、ヤルダ ボーグン、マライア・アール バーフォード、ニール レディ、ルーパ チョーラ、ナリンダー・ケイ ダス、デポプリヤ ニュエン、ダニエル・ビー ヤオ、モニーク・ジー アービズ、チャンドラ・エス リュ、ヤン ガンディー、アミーナ・アール グリフィン、ジェニファー・エイ エリオット、ビッキー・エス ランクマール、ジャヤラクシミ ラル、プリーティ・ジー リュ、デュング・アイナ・エム リー、アーンステイーン・エイ		

リー、ソー・ユーン
ユエ、ヒュイビン
ヤング、ジュンミン
トリボレー、キャサリン・エム
ケーブル、エイミー・イー
スウォーナカール、アニー・タ

IPC分類号	C12N15/09 A01K67/027 A61K39/395 A61K45/00 A61P1/04 A61P1/10 A61P1/12 A61P1/16 A61P1/18 A61P3/04 A61P3/06 A61P3/10 A61P5/14 A61P7/00 A61P7/02 A61P7/06 A61P7/08 A61P9/00 A61P9/08 A61P9/10 A61P9/12 A61P11/00 A61P11/06 A61P13/12 A61P17/06 A61P19/02 A61P19/06 A61P19/10 A61P21/04 A61P25/00 A61P25/02 A61P25/08 A61P25/14 A61P25/16 A61P25/18 A61P25/22 A61P25/28 A61P27/02 A61P29/00 A61P31/04 A61P31/12 A61P31/18 A61P31/22 A61P33/02 A61P33/10 A61P35/00 A61P35/02 A61P37/06 A61P37/08 C07K14/47 C07K16/18 C07K16/40 C07K16/46 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N9/02 C12N9/10 C12N9/14 C12P21/02 C12Q1/02 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/566 C12N15/02 C12N5/10 A61K38/00 C12P21/08 C12N9/20
CPC分類号	A61K38/00 A61P1/04 A61P1/10 A61P1/12 A61P1/16 A61P1/18 A61P3/04 A61P3/06 A61P3/10 A61P5/14 A61P7/00 A61P7/02 A61P7/06 A61P7/08 A61P9/00 A61P9/08 A61P9/10 A61P9/12 A61P11/00 A61P11/06 A61P13/12 A61P17/06 A61P19/02 A61P19/06 A61P19/10 A61P21/04 A61P25/00 A61P25/02 A61P25/08 A61P25/14 A61P25/16 A61P25/18 A61P25/22 A61P25/28 A61P27/02 A61P29/00 A61P31/04 A61P31/12 A61P31/18 A61P31/22 A61P33/02 A61P33/10 A61P35/00 A61P35/02 A61P37/06 A61P37/08 C07K14/47 C12N9/20
FI分類号	C12N15/00.ZNA.A A01K67/027 A61K39/395.D A61K39/395.N A61K45/00 A61P1/04 A61P1/10 A61P1/12 A61P1/16 A61P1/18 A61P3/04 A61P3/06 A61P3/10 A61P5/14 A61P7/00 A61P7/02 A61P7/06 A61P7/08 A61P9/00 A61P9/08 A61P9/10 A61P9/12 A61P11/00 A61P11/06 A61P13/12 A61P17/06 A61P19/02 A61P19/06 A61P19/10 A61P21/04 A61P25/00 A61P25/02 A61P25/02.103 A61P25/08 A61P25/14 A61P25/16 A61P25/18 A61P25/22 A61P25/28 A61P27/02 A61P29/00 A61P29/00.101 A61P31/04 A61P31/12 A61P31/18 A61P31/22 A61P33/02 A61P33/10 A61P35/00 A61P35/02 A61P37/06 A61P37/08 C07K14/47 C07K16/18 C07K16/40 C07K16/46 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N9/02 C12N9/10 C12N9/14 C12P21/02.C C12Q1/02 C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566 C12N15/00.C C12N15/00.F C12N5/00.A A61K37/02 C12P21/08
F-TERM分類号	2G045/AA34 2G045/AA40 2G045/BA11 2G045/BB50 2G045/DA12 2G045/DA36 2G045/FB02 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA08 4B024/BA10 4B024/BA11 4B024/BA44 4B024/BA80 4B024/CA01 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/CA11 4B024/DA02 4B024/DA05 4B024/DA11 4B024/EA02 4B024/EA03 4B024/EA04 4B024/FA02 4B024/GA01 4B024/GA11 4B024/HA01 4B024/HA03 4B024/HA12 4B024/HA15 4B050/CC01 4B050/CC03 4B050/DD07 4B050/FF14 4B050/LL01 4B050/LL03 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QQ05 4B063/QQ13 4B063/QQ22 4B063/QQ26 4B063/QQ30 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QQ70 4B063/QR08 4B063/QR33 4B063/QR42 4B063/QR55 4B063/QR59 4B063/QR62 4B063/QR80 4B063/QR82 4B063/QS05 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QX02 4B064/AG01 4B064/AG27 4B064/CA01 4B064/CA19 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/CE12 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA01X 4B065/AA57X 4B065/AA90X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AB02 4B065/BA01 4B065/BA08 4B065/BD14 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA28 4B065/CA29 4B065/CA31 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA03 4C084/AA06 4C084/AA07 4C084/AA17 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA22 4C084/BA23 4C084/CA18 4C084/MA13 4C084/MA16 4C084/MA43 4C084/MA52 4C084/MA56 4C084/MA57 4C084/MA59 4C084/MA60 4C084/MA63 4C084/MA66 4C084/NA14 4C084/ZA012 4C084/ZA022 4C084/ZA052 4C084/ZA062 4C084/ZA152 4C084/ZA162 4C084/ZA182 4C084/ZA202 4C084/ZA222 4C084/ZA242 4C084/ZA332 4C084/ZA362 4C084/ZA392 4C084/ZA402 4C084/ZA422 4C084/ZA452 4C084/ZA552 4C084/ZA592 4C084/ZA662 4C084/ZA682 4C084/ZA702 4C084/ZA722 4C084/ZA732 4C084/ZA752 4C084/ZA812 4C084/ZA892 4C084/ZA942 4C084/ZA962 4C084/ZA972 4C084/ZB082 4C084/ZB092 4C084/ZB112 4C084/ZB132 4C084/ZB152 4C084/ZB262 4C084/ZB272 4C084/ZB332 4C084/ZB352 4C084/ZB382 4C084/ZB392 4C084/ZC062 4C084/ZC312 4C084/ZC332 4C084/ZC352 4C084/ZC552 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/AA16 4C085/BB31 4C085/BB41 4C085/BB43 4C085/CC02 4C085/CC22 4C085/CC23 4C085/EE01

4C085/GG01 4C085/GG08 4C085/GG10 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA00 4H045/DA76 4H045/DA89 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/FA74

優先権
 60/292242 2001-05-18 US
 60/293726 2001-05-25 US
 60/295346 2001-06-01 US
 60/303404 2001-07-06 US
 60/314754 2001-08-24 US
 60/351262 2002-01-22 US
 60/368799 2002-03-29 US

外部リンク Espacenet

摘要(译)

本发明提供鉴定和编码LIPAM的人脂质相关分子 (LIPAM) 和多核苷酸。 本发明还提供表达载体, 宿主细胞, 抗体, 激动剂和拮抗剂。 本发明还提供了用于诊断, 治疗或预防与LIPAM异常表达有关的疾病的方法。

		特表2006-5144 (P2006-51453)	
		(43) 公表日 平成18年5月11日 (2006.5.11)	
(51) Int. Cl.	F 1	テーマコード (参考)	
C 1 2 N 15/00 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	2 G 0 4 5	
A O 1 K 67/027 (2006.01)	A O 1 K 67/027	4 B 0 2 4	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 D	4 B 0 5 0	
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 N	4 B 0 8 3	
A 6 1 P 1/04 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	4 B 0 6 4	
		審査請求 未請求	予備審査請求 未請求 (全 111 頁) 最終頁に*
(21) 出願番号	特願2002-592451 (P2002-592451)	(71) 出願人	301005050
(86) (22) 出願日	平成14年5月17日 (2002.5.17)		インサイト・ゲノミックス・インコーポ イテッド
(85) 翻訳文提出日	平成15年11月12日 (2003.11.12)		アメリカ合衆国カリフォルニア州943 4・バロアルト・ポータードライブ 3 60
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/015688	(74) 代理人	100089266
(87) 国際公開番号	W02002/094988		弁理士 大島 陽一
(87) 国際公開日	平成14年11月28日 (2002.11.28)	(72) 発明者	タンク、ワイ・トム
(31) 優先権主張番号	60/292, 242		アメリカ合衆国カリフォルニア州951 8・サンノゼ・ランウィックコート 4 30
(32) 優先日	平成13年5月18日 (2001.5.18)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	60/293, 726		
(32) 優先日	平成13年5月25日 (2001.5.25)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	60/295, 346		
(32) 優先日	平成13年6月1日 (2001.6.1)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く