

(51)Int.Cl ⁷	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 15/09	ZNA		A 6 1 K 31/711	
A 6 1 K 31/711			39/395	D
38/00			45/00	
39/395			48/00	
45/00			A 6 1 P 3/04	
審査請求 未請求 請求項の数 76 O L（全140数） 最終頁に続く				

(21)出願番号	特願2000－301496(P2000－301496)	(71)出願人	591197334
(62)分割の表示	特願平10－49889の分割		ザ ロックフェラー ユニバーシティ
(22)出願日	平成7年8月17日(1995.8.17)		アメリカ合衆国 ニューヨーク州 10021－6
			399ニューヨーク ヨーク アヴェニュー
			1230
(31)優先権主張番号	08/347,563	(72)発明者	ジェフリー エム. フリードマン
(32)優先日	平成6年11月30日(1994.11.30)		アメリカ合衆国 ニューヨーク 10021,
(33)優先権主張国	米国(US)		ニューヨーク, イースト 63アールディ
(31)優先権主張番号	08/438,431		ストリート 500, アpartment 17ビ
(32)優先日	平成7年5月10日(1995.5.10)		ー
(33)優先権主張国	米国(US)	(74)代理人	100078282
(31)優先権主張番号	08/483,211		弁理士 山本 秀策
(32)優先日	平成7年6月7日(1995.6.7)		
(33)優先権主張国	米国(US)		
		最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 体重のモジュレーター、対応する核酸およびタンパク質、ならびにそれらの診断および治療用途

(57)【要約】

【課題】 哺乳動物の脂肪蓄積および脂肪含量の制御を可能にする体重のモジュレーターをコードするDNA分子にハイブリダイズし得る核酸を提供すること。

【解決手段】 本発明は、OBポリペプチドをコードするDNA分子にハイブリダイズし得る検出可能な標識をされた核酸分子およびアンチセンス核酸分子、OB核酸の非コード領域にハイブリダイズし得る核酸、ならびにOBポリペプチドをコードするヒトゲノムDNAを増幅するためのオリゴヌクレオチドプライマーを提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 動物において体重を調整し得る、約145～約167アミノ酸を有する肥満症（OB）ポリペプチド、あるいはフラグメントを包含する、同じ生物学的活性を有するそれらの対立遺伝子変異体またはアナログ。

【請求項2】 配列番号2、4、5、または6のアミノ酸配列を含む請求項1に記載のOBポリペプチド、あるいはフラグメントを包含する、それらの対立遺伝子変異体またはアナログ。

【請求項3】 請求項1または2に記載のOBポリペプチドの免疫原性フラグメント。

【請求項4】 以下の配列からなる群より選択されるOBポリペプチドの免疫原性フラグメント：

Val-Pro-Ile-Gln-Lys-Val-Gln-Asp-Asp-Thr-Lys-Thr-Leu-Ile-Lys-Thr（配列番号18）；

Leu-His-Pro-Ile-Leu-Ser-Leu-Ser-Lys-Met-Asp-Gln-Thr-Leu-Ala（配列番号19）；

Ser-Lys-Ser-Cys-Ser-Leu-Pro-Gln-Thr-Ser-Gly-Leu-Gln-Lys-Pro-Glu-Ser-Leu-Asp（配列番号20）；および

Ser-Arg-Leu-Gln-Gly-Ser-Leu-Gln-Asp-Ile-Leu-Gln-Gln-Leu-Asp-Val-Ser-Pro-Glu-Cys（配列番号21）。

【請求項5】 アミノ酸53、56、71、85、89、92、95、98、110、118、121、122、126、127、128、129、132、139、157、159、163、および166（配列番号4の番号付けに従う）からなる群から選択される1つまたはより多くのアミノ酸が別のアミノ酸と置換されている、請求項2に記載のヒトOBポリペプチドアナログ。

【請求項6】 前記置換が、配列番号2に記載のマウスOBポリペプチドの分岐アミノ酸とで行われる、請求項5に記載のヒトOBポリペプチドアナログ。

【請求項7】 前記置換が、アラニンとで行われる、請求項5に記載のヒトOBポリペプチドアナログ。

【請求項8】 以下のポリペプチドからなる群から選択される、請求項5に記載のヒトOBポリペプチドアナログ：

(a) 53位のセリン残基がグリシン、アラニン、バリン、システイン、メチオニン、またはトレオニンと置換される；

(b) 98位のセリン残基がグリシン、アラニン、バリン、システイン、メチオニン、またはトレオニンと置換される；および

(c) 92位のアルギニン残基がアスパラギン、リジ

ン、ヒスチジン、グルタミン、グルタミン酸、アスパラギン酸、セリン、トレオニン、メチオニン、またはシステインと置換される。

【請求項9】 配列番号2、4、5、または6に記載のヒトOBポリペプチドアミノ酸配列と、83%以上のアミノ酸配列相同性を有する、請求項2に記載のOBポリペプチドアナログ。

【請求項10】 以下のポリペプチドからなる群から選択される、請求項2に記載のヒトOBポリペプチドアナログ：

(a) 1つまたはより多くのアスパラギン酸残基がグルタミン酸と置換される；

(b) 1つまたはより多くのイソロイシン残基がロイシンと置換される；

(c) 1つまたはより多くのグリシンまたはバリン残基がアラニンと置換される；

(d) 1つまたはより多くのアルギニン残基がヒスチジンと置換される；

(e) 1つまたはより多くのチロシンまたはフェニルアラニン残基がトリプトファンと置換される；

(f) 121位から128位（配列番号4の番号付けに従う）の1つまたはより多くの残基がグリシンまたはアラニンと置換される；および

(g) 54位から60位または118位から166位（配列番号4の番号付けに従う）の1つまたはより多くの残基がリジン、グルタミン酸、システイン、またはプロリンと置換される。

【請求項11】 以下のポリペプチドからなる群から選択される、請求項1、2、3、5、6、または9のいずれかに記載のOBポリペプチド：

(a) 1位から21位の残基が欠失されている；および

(b) 21位でメチオニン、または18位から21位でグリシン-セリン-ヒスチジン-メチオニン配列（配列番号38）、または1位から21位でメチオニン-グリシン-セリン-セリン-ヒスチジン-ヒスチジン-ヒスチジン-ヒスチジン-ロイシン-バリン-プロリン-アルギニン-グリシン-セリン-ヒスチジン-メチオニン配列（配列番号98）を有するサブパート（a）のポリペプチド。

【請求項12】 以下のポリペプチドからなる群から選択される、請求項1、2、3、5、6、または9のいずれかに記載のOBポリペプチド：

(a) 1位から21位の残基が欠失されている；および

(b) 14位から21位でロイシン-グルタミン酸-リジン-アルギニン-グルタミン酸-アラニン-グルタミン酸-アラニン配列（配列番号26）、または18位から21位でグルタミン酸-アラニン-グルタミン酸-アラニン配列（配列番号27）、または18位から21位でロイシン-グルタミン酸-リジン-アルギニン配列

(配列番号28)、または2位から21位でメチオニン-グリシン-セリン-セリン-ヒスチジン-ヒスチジン-ヒスチジン-ヒスチジン-ヒスチジン-セリン-セリン-グリシン-ロイシン-バリン-プロリン-アルギニン-グリシン-セリン-プロリン配列(配列番号99)、または18位から21位でグリシン-セリン-プロリン配列を有するサブパート(a)のポリペプチド。

【請求項13】 以下のポリペプチドからなる群から選択される、請求項7、8、9、または10のいずれかに記載のOBポリペプチド：

(a) 1位から21位の残基が欠失されている；および
(b) 21位でメチオニン、または18位から21位でグリシン-セリン-ヒスチジン-メチオニン配列(配列番号38)、または1位から21位でメチオニン-グリシン-セリン-セリン-ヒスチジン-ヒスチジン-ヒスチジン-ヒスチジン-ヒスチジン-セリン-セリン-グリシン-ロイシン-バリン-プロリン-アルギニン-グリシン-セリン-ヒスチジン-メチオニン配列(配列番号98)、または14位から21位でロイシン-グルタミン酸-リジン-アルギニン-グルタミン酸-アラニン-グルタミン酸-アラニン配列(配列番号26)、または18位から21位でグルタミン酸-アラニン-グルタミン酸-アラニン配列(配列番号27)、または18位から21位でロイシン-グルタミン酸-リジン-アルギニン配列(配列番号28)、または2位から21位でメチオニン-グリシン-セリン-セリン-ヒスチジン-ヒスチジン-ヒスチジン-ヒスチジン-ヒスチジン-セリン-セリン-グリシン-ロイシン-バリン-プロリン-アルギニン-グリシン-セリン-プロリン配列(配列番号99)、または18位から21位でグリシン-セリン-プロリン配列を有するサブパート(a)のポリペプチド。

【請求項14】 以下のポリペプチドからなる群(配列番号4の番号付けに従う)から選択される、請求項2に記載のヒトOBポリペプチド短縮型アナログ：

(a) 121位から128位の1つまたはより多くの残基が欠失される；
(b) 1～116位の残基が欠失される；
(c) 1～21位および54～167位の残基が欠失される；
(d) 1～60位および117～167位の残基が欠失される；
(e) 1～60位の残基が欠失される；
(f) 1～53位の残基が欠失される；
(g) 1～21位の残基が欠失されるサブパート(a)のアナログ；および
(h) 以下からなる群から選択されるN末端アミノ酸またはアミノ酸配列を有するサブパート(a)から(g)のアナログ：

(1) メチオニン、(2) グリシン-セリン-ヒスチジン-メチオニン配列(配列番号38)、(3) メチオニン-グリシン-セリン-セリン-ヒスチジン-ヒスチジン-ヒスチジン-ヒスチジン-ヒスチジン-セリン-セリン-グリシン-ロイシン-バリン-プロリン-アルギニン-グリシン-セリン-ヒスチジン-メチオニン配列(配列番号98)、(4) ロイシン-グルタミン酸-リジン-アルギニン-グルタミン酸-アラニン-グルタミン酸-アラニン配列(配列番号26)、(5) グルタミン酸-アラニン-グルタミン酸-アラニン配列(配列番号27)、(6) ロイシン-グルタミン酸-リジン-アルギニン配列(配列番号28)、(7) メチオニン-グリシン-セリン-セリン-ヒスチジン-ヒスチジン-ヒスチジン-ヒスチジン-ヒスチジン-セリン-セリン-グリシン-ロイシン-バリン-プロリン-アルギニン-グリシン-セリン-プロリン配列(配列番号99)、および(8) グリシン-セリン-プロリン配列。

【請求項15】 請求項1から14のいずれかに記載の組換えOBポリペプチド。

【請求項16】 請求項1から14のいずれかに記載の化学合成OBポリペプチド。

【請求項17】 1つまたはそれより多くの化学部分が結合している、請求項1から16のいずれかに記載のOBポリペプチドの誘導体。

【請求項18】 前記化学部分が水溶性ポリマーである、請求項17に記載の誘導体。

【請求項19】 前記水溶性ポリマーがポリエチレングリコールである、請求項18に記載の誘導体。

【請求項20】 モノPEG化、ジPEG化、トリPEG化、またはテトラPEG化されている、請求項19に記載の誘導体。

【請求項21】 N末端がモノPEG化されている、請求項20に記載の誘導体。

【請求項22】 配列番号4の22位から167位のアミノ酸残基または配列番号6の22位から166位の残基を含むOBポリペプチドである、請求項21に記載の誘導体。

【請求項23】 配列番号4の22位から167位のアミノ酸残基または配列番号6の22位から166位の残基を含み、そして21位にメチオニンを有するOBポリペプチドである、請求項21に記載の誘導体。

【請求項24】 請求項1から6、9、または11のいずれかに記載のOBポリペプチドをコードする単離された核酸分子。

【請求項25】 請求項7、8、10、12、13、または14のいずれかに記載のOBポリペプチドをコードする単離された核酸分子。

【請求項26】 哺乳動物の体重を調整する生物学的活性を有するOBポリペプチドの発現を得るために用いら

れるDNA分子であって、以下からなる群から選択される、DNA分子：

(a) 配列番号1および3に記載のDNA分子またはそれらのフラグメント；

(b) (a) に定義したDNA分子とハイブリダイズするDNA分子またはそれらのハイブリダイズし得るフラグメント；および

(c) 該DNA分子のいずれかによりコードされるアミノ酸配列の発現をコードするDNA分子。

【請求項27】 配列番号22および24のヒトゲノムDNA分子である、請求項26に記載のDNA分子。

【請求項28】 以下に記載されるアミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする、請求項24に記載のDNA分子：

(a) 配列番号2；

(b) 配列番号2の22位から167位のアミノ酸；

(c) 配列番号4；

(d) 配列番号4の22位から167位のアミノ酸；

(e) 配列番号5；

(f) 配列番号5の22位から166位のアミノ酸；

(g) 配列番号6；

(h) 配列番号6の22位から166位のアミノ酸；

(i) 以下からなる群から選択されるN末端アミノ酸またはアミノ酸配列を有するサブパート (b)、(d)、(f)、または(h) のアミノ酸配列：

(1) メチオニン、(2) グリシンーセリンーヒスチジンーメチオニン配列 (配列番号38)、(3) メチオニンーグリシンーセリンーセリンーヒスチジンーヒスチジンーヒスチジンーヒスチジンーセリンーセリンーグリシンーロイシンーバリンープロリンーアルギニンーグリシンーセリンーヒスチジンーメチオニン配列 (配列番号98)。

【請求項29】 以下からなる群から選択されるN末端アミノ酸配列を有する (b)、(d)、(f)、または(h) のアミノ酸配列をコードする、請求項28に記載のDNA分子：

(1) ロイシンーグルタミン酸ーリジンーアルギニンーグルタミン酸ーアラニンーグルタミン酸ーアラニン配列 (配列番号26)、(2) グルタミン酸ーアラニンーグルタミン酸ーアラニン配列 (配列番号27)、(3) ロイシンーグルタミン酸ーリジンーアルギニン配列 (配列番号28)、(4) メチオニンーグリシンーセリンーセリンーヒスチジンーヒスチジンーヒスチジンーヒスチジンーヒスチジンーセリンーセリンーグリシンーロイシンーバリンープロリンーアルギニンーグリシンーセリンープロリン配列 (配列番号99)、および(5) グリシンーセリンープロリン配列。

【請求項30】 配列番号3のタンパク質コード配列として記載される配列を含む、請求項24に記載のDNA分子。

【請求項31】 配列番号3の22位から167位のアミノ酸をコードする配列として記載される配列を含む、請求項24に記載のDNA分子。

【請求項32】 請求項24から31のいずれかに記載のDNA分子にハイブリダイズし得る検出可能な標識をされた核酸分子。

【請求項33】 OB核酸の非コード領域にハイブリダイズし得る核酸であって、該非コード領域がイントロン、5'非コード領域、および3'非コード領域からなる群から選択される、核酸。

【請求項34】 OBポリペプチドをコードするヒトゲノムDNAを増幅するためのオリゴヌクレオチドプライマー。

【請求項35】 以下からなる群から選択される、請求項32に記載のオリゴヌクレオチド：

HOB 1gF 5'-CCCAAGAAGCCATCCTG-3' (配列番号29)；

HOB 1gR 5'-GACTATCTGGTCCAGTGCC-3' (配列番号30)；

HOB 2gF 5'-CCACATGCTGAGCACTTGTT-3' (配列番号31)；および

HOB 2gR 5'-CTTCAATCCTGGAGATACCTGG-3' (配列番号32)。

【請求項36】 請求項24から31のいずれかに記載のDNA分子を含むベクター。

【請求項37】 発現制御配列と作動可能に関連された、請求項24、26、30、または31に記載のDNA分子を含む発現ベクター。

【請求項38】 発現制御配列と作動可能に関連された、請求項27または29に記載のDNA分子を含む発現ベクター。

【請求項39】 発現制御配列と作動可能に関連された、請求項25に記載のDNA分子を含む発現ベクター。

【請求項40】 請求項24または25に記載のDNA分子または請求項36から39のいずれかに記載の発現ベクターでトランスフォームまたはトランスフェクトされた単細胞宿主。

【請求項41】 前記単細胞宿主が細菌、酵母、哺乳動物細胞、植物細胞、昆虫細胞、および組織培養におけるヒト細胞からなる群から選択される、請求項40に記載の単細胞宿主。

【請求項42】 前記単細胞宿主が、E. coli、Pseudomonas、Bacillus、Streptomyces、酵母、CHO、R1. 1、B-W、LM、COS1、COS7、BSC1、BSC40、BM T10、およびSf9細胞からなる群から選択される、請求項40に記載の単細胞宿主。

【請求項43】 前記単細胞宿主が、Saccharomyces、Pichia、Candida、Hansenula、およびTorulopsisからなる群か

ら選択される酵母宿主である、請求項40に記載の単細胞宿主。

【請求項44】 OBポリペプチドをコードするDNA配列を含み、そして該OBポリペプチドをコードする配列に対して機能的に近接した位置に発現調節配列を挿入することからなる相同的組換え事象によって、OBポリペプチドの高発現を可能にするようにインビトロで改変された、哺乳動物細胞。

【請求項45】 前記発現調節配列がOBポリペプチド発現調節配列であり、そして前記相同的組換え事象が変異OBポリペプチド発現制御配列を置き換える、請求項44に記載の細胞。

【請求項46】 前記発現制御配列挿入部がOBポリペプチド制御配列ではない、請求項45に記載の細胞。

【請求項47】 以下の工程を包含する、OBポリペプチドを調製する方法：

(a) 請求項40から46のいずれかに記載の細胞をOBポリペプチドの発現を提供する条件下で培養する工程；および

(b) 該発現されたOBポリペプチドを回収する工程。

【請求項48】 前記細胞が細菌または酵母である、請求項47に記載の方法。

【請求項49】 以下の工程をさらに包含する、請求項47または48に記載の方法：

(c) 前記OBポリペプチドをNiキレートカラムでのクロマトグラフィーにかける工程；および

(d) 前記OBポリペプチドをゲル濾過により精製する工程。

【請求項50】 工程(c)後かつ工程(d)前に、前記OBポリペプチドを強陽イオン交換カラムでのクロマトグラフィーにかける工程をさらに包含する、請求項49に記載の方法。

【請求項51】 請求項1から16のいずれかに記載のOBポリペプチドまたは請求項47から50に記載の方法により生産されるOBポリペプチドに対して特異的な抗体。

【請求項52】 モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体である、請求項51に記載の抗体。

【請求項53】 検出可能な標識で標識された、請求項52に記載の抗体。

【請求項54】 請求項52に記載のモノクローナル抗体を生産する不死化細胞系。

【請求項55】 以下の工程を包含する、OBポリペプチドに対して特異的な抗体を調製する方法：

(a) 請求項1から16のいずれかに記載のOBポリペプチドまたは請求項47から50に記載の方法により生産されたOBポリペプチドを、キャリアタンパク質に複合体化させる工程；

(b) アジュバントと混合させた工程(a)のOBポリペプチドフラグメントーキャリアタンパク質複合体で宿

主動物を免疫する工程；および

(c) 該免疫宿主動物から抗体を得る工程。

【請求項56】 以下の工程を包含する、試料においてOBポリペプチドの存在を測定する方法：

(a) OBポリペプチドを含有すると思われる試料を、該OBポリペプチドに特異的に結合する抗体と、該抗体および該OBポリペプチドを含む反応複合体の形成を可能にする条件下で接触させる工程；および

(b) 該抗体および該試料中の該OBポリペプチドを含む反応複合体の形成を検出する工程であって、ここで該反応複合体の形成の検出が該試料におけるOBポリペプチドの存在を示す、工程。

【請求項57】 前記抗体が固相支持体に結合される、請求項56に記載の方法。

【請求項58】 以下の工程を包含する、生物学的試料におけるOBポリペプチドレベルを評価するインビトロ方法：

(a) 請求項56または57に記載の方法に従って、生物学的試料における反応複合体の形成を検出する工程；

および

(b) 形成された反応複合体の量を評価する工程であって、ここで該反応複合体の量は、該生物学的試料におけるOBポリペプチドレベルに対応する、工程。

【請求項59】 以下の工程を包含する、哺乳動物被験体におけるOBポリペプチドレベルの上昇または低下に関連した疾患の存在を検出または診断するインビトロ方法：

(a) 請求項58に記載の哺乳動物被験体由来の生物学的試料におけるOBポリペプチドレベルを評価する工程；および(b) 工程(a)において検出されたレベルと、正常被験体または初期の該被験体に存在するOBポリペプチドレベルとを比較する工程であって、ここで、正常レベルに比較した該OBポリペプチドレベルの上昇はOBポリペプチドレベルの上昇に関連した疾患を示し、そして正常レベルに比較した該OBポリペプチドレベルの低下はOBポリペプチドレベルの低下に関連した疾患を示す、工程。

【請求項60】 哺乳動物被験体におけるOBポリペプチドのレベルの上昇または低下に関連した疾患の治療処置をモニターするインビトロ方法であって、請求項58に記載の方法に従って、OBポリペプチドレベルの上昇または低下に関連した疾患について治療処置を受ける哺乳動物被験体から異なる時点で得られた一連の生物学的試料におけるOBポリペプチドレベルを評価する工程を包含する、方法。

【請求項61】 請求項1から16のいずれかに記載のOBポリペプチドまたは請求項47から50に記載の方法により生産されたOBポリペプチドと、薬学的に受容可能なキャリアとを含む薬学的組成物。

【請求項62】 動物の体重を減少させるための、請求

項61に記載の薬学的組成物。

【請求項63】 請求項1から16のいずれかに記載のOBポリペプチドまたは請求項47から50に記載の方法により生産されるOBポリペプチドのアンタゴニストと、薬学的に受容可能なキャリアとを含む、動物の体重を増大させるための薬学的組成物。

【請求項64】 前記アンタゴニストが、前記OBポリペプチドに結合しそしてその活性を中和する抗体、該OBポリペプチドのレセプターに結合するがこれを活性化しない該OBポリペプチドのフラグメント、および該OBポリペプチドの小分子アンタゴニストからなる群から選択される、請求項63に記載の薬学的組成物。

【請求項65】 請求項1から16のいずれかに記載のOBポリペプチドまたは請求項47から50に記載の方法により生産されたOBポリペプチドと、薬学的に受容可能なキャリアとを含む、個体の体重を減少させるための体型改善美容組成物。

【請求項66】 請求項1から16のいずれかに記載のOBポリペプチドまたは請求項47から50に記載の方法により生産されたOBポリペプチドのアンタゴニストと、薬学的に受容可能なキャリアとを含む、個体の体重を増大させるための体型改善美容組成物。

【請求項67】 前記アンタゴニストが、前記OBポリペプチドに結合しそしてその活性を中和する抗体、該OBポリペプチドのレセプターに結合するがこれを活性化しない該OBポリペプチドのフラグメント、および該OBポリペプチドの小分子アンタゴニストからなる群から選択される、請求項66に記載の美容組成物。

【請求項68】 個体の体型を改善するための美容方法であって、請求項65から67のいずれかに記載の美容組成物が、個体に、該個体の体重を所望のレベルに調整するに十分な用量で投与される、方法。

【請求項69】 哺乳動物の体重を調整するための医薬品の製造のための、請求項1から4、または9のいずれかに記載のOBポリペプチドをコードする核酸にハイブリダイズし得るアンチセンス核酸分子の使用。

【請求項70】 動物の体重を改変するための遺伝子治療医薬品の製造のための、請求項1から16のいずれかに記載のOBポリペプチドまたは請求項47から50に記載の方法により生産されたOBポリペプチドをコードする核酸分子の使用。

【請求項71】 動物の体重を改変するための医薬品の製造のための、請求項1から16のいずれかに記載のOBポリペプチドまたは請求項47から50に記載の方法により生産されたOBポリペプチドの使用。

【請求項72】 糖尿病、高血圧、および高コレステロール症からなる群から選択される障害の処置における哺乳動物の体重を調整するための医薬品の製造のための、請求項1から16のいずれかに記載のOBポリペプチドまたは請求項47から50に記載の方法により生産され

*たOBポリペプチドの使用。

【請求項73】 糖尿病、高血圧、および高コレステロール症の処置のための医薬品と組み合わせて用いられる哺乳動物の体重を調整するための医薬品の製造のための、請求項1から16のいずれかに記載のOBポリペプチドまたは請求項47から50に記載の方法により生産されたOBポリペプチドの使用。

【請求項74】 動物の体重を増大させるための医薬品の製造のための、請求項1から16のいずれかに記載のOBポリペプチドまたは請求項47から50に記載の方法により生産されたOBポリペプチドのアンタゴニストの使用。

【請求項75】 前記アンタゴニストが、前記OBポリペプチドに結合しそしてその活性を中和する抗体、該OBレセプターに結合するがこれを活性化しない該OBポリペプチドのフラグメント、および該OBポリペプチドの小分子アンタゴニストからなる群から選択される、請求項74に記載の使用。

【請求項76】 静脈内送達、動脈内送達、腹腔内送達、筋内送達、皮下送達、鼻内送達、経口送達、または肺送達のための医薬品の製造のための、請求項71から75のいずれかに記載の使用。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、一般に、哺乳動物（動物およびヒトを包含する）の体重の制御に関する。そしてより詳細には、本発明は、体重のモジュレーターとして本明細書中に同定された物質、およびこのようなモジュレーターが適用され得る診断および治療用途に関する。

【0002】

【従来の技術】肥満症（瘦身体重に対する体脂肪過剰と定義される）は、重要な心理的および医学的な病的状態に関連している。後者は、高血圧、血中脂肪の上昇、およびII型または非インスリン依存性真性糖尿病(NIDDM)を包含する。米国では600万から1000万人がNIDDMにかかっており、この中には65歳年齢群の18%を含む [Harrisら, Int. J. Obes., 11:275-283(1987)]。NIDDMにかかっている男性の約45%および女性の約70%が肥満症であり、そして彼らの糖尿病は、体重を減少させることにより実質的に改善されるか、または取り除かれる [Harrisら, Diabetes Care, 14(3):639-648(1991)]。以下に記載されるように、肥満症およびNIDDMは両方とも遺伝性が強いが、素因となる遺伝子は未だ同定されていない。これらの代謝関連障害の分子遺伝学的基礎は、重要であるがあまり理解されていない問題である。

【0003】栄養エネルギーの同化、蓄積、および利用は、後生動物の生存の中心にある複雑な恒常性系を構成している。陸上生活哺乳動物の間では、トリグリセリドとしての大量の代謝燃料の脂肪組織中の蓄積が、食物が

渇渴したときの生存期間にとってきわめて重要である。生物体の大きさおよび形状に連続的な変化を生じさせることなく固定レベルのエネルギー貯蔵を維持しようとする要求には、エネルギー摂取および消費間の平衡の達成が必要とされる。しかし、エネルギー平衡を調節する分子機構はまだ解明されていない。栄養情報を変換してエネルギー平衡の制御を行う分子の単離が、健康および疾患状態の体重の調節の理解にとって重要である。

【0004】脂肪蓄積の個体レベルは、大部分は遺伝的に決定される。一卵性および二卵性の双生児または養子とその生物学的親との間の体重および脂肪蓄積の一致率の試験は、肥満症の遺伝性(0.4~0.8)が、実質的遺伝成分を有すると一般に考えられている特性(例えば、精神分裂症、アルコール依存症、およびアテローム性動脈硬化症)の遺伝性より高いことを示唆した[Stunkardら、N. Engl. J. Med., 322:1483-1487(1990)]。エネルギー消費率の家族制の類似もまた報告されている[Bogardusら、Diabetes, 35:1-5(1986)]。地理的に限定した集団内の遺伝学的解析は比較的少数の遺伝子が身体組成の変動の30~50%の原因となり得ることを示唆する[Mo11ら、Am. J. Hum. Genet., 49:1243-1255(1991)]。しかし、一般集団における肥満症の原因となる遺伝子はひとつも明確な染色体上の位置に対して遺伝学的にマッピングされていない。

【0005】肥満症の齧歯類モデルは7つの見かけ上単一遺伝子の変異を包含する。最も集中的に研究されているマウス肥満症変異はob(肥満)遺伝子およびdb(糖尿病)遺伝子である。同一の遺伝系統背景上に存在する場合、obおよびdbは識別し得ない代謝および行動表現型を生じ、このことは、これらの遺伝子が同一の生理学的経路において機能し得ることを示唆する[Colemanら、Diabetologia, 14:141-148(1978)]。いずれかの変異に対して同型接合性のマウスは過食および代謝低下性であり、1カ月齢で顕著である肥満表現型となる。これらの動物の体重は60~70gで安定する傾向にある(比較してコントロールマウスでは30~35gである)。obおよびdb動物は非常に多くの他のホルモンおよび代謝の変化を発現し、これにより変異に寄与し得る一次欠損を同定することが困難になる[Brayら、Am. J. Clin. Nutr., 50:891-902(1989)]。

【0006】各齧歯類肥満症モデルには、ヒトのII型糖尿病に類似する炭水化物代謝の変化が伴う。ある場合では、糖尿病の重篤度は背景マウス系統に部分的に依存する[Leiter, Endocrinology, 124:912-922(1989)]。obおよびdbの両方に対して、類遺伝子性(congenic) C57BL/Kマウスは、極度のβ細胞壊死および小島萎縮を有する重度の糖尿病を発症し、相対的インスリン不足(relative insulinopenia)を生じる。逆に、類遺伝子性C57BL/6J obおよびdbマウスは、β細胞肥大により最終的に補償される一時的インスリン抵抗性糖尿病を発症し、こ

れはヒトII型糖尿病に類似する。

【0007】obおよびdbマウスの表現型は、糖尿病の進行以外の点でヒト肥満症に類似する一変異マウスは、痩身型コントロールより食餌量が多くエネルギー消費量が少ない(肥満者と同様)。この表現型はまた視床下部腹内側部の病巣を有する動物で見られる表現型とかなり類似しており、このことは、両変異が適切に中枢神経系内で栄養情報を統合するかまたはこれに応答する能力を妨害し得ることを示唆する。この仮説の支持は並体癒合実験の結果から生じる[Colemanら、Diabetologia, 9:294-298(1973)]。この実験結果は、obマウスは循環飽食因子が欠損しており、そしてdbマウスはob因子の影響に対して抵抗性である(おそらくobレセプター欠損のためと思われる)ことを示唆する。これらの実験は、これらの変異マウスの肥満症が、身体組成を制御する仮定のフィードバック機構の輸入ループ(afferent loop)および/または統合中枢における異なる欠陥から生じ得るという結論を導いた。

【0008】分子マーカーおよび従来の遺伝子マーカーを用いて、ob遺伝子およびdb遺伝子はそれぞれ、近位の第6染色体および第4染色体中央部にマッピングされた[Baharyら、Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 87:8642-8646(1990); Friedmanら、Genomics, 11:1054-1062(1991)]。両場合とも、変異は、ヒトとシンテニー(synteny)であるマウスゲノム領域にマッピングされるので、これにより、obおよびdbのヒトホモログが存在すれば、それらはそれぞれ、ヒト染色体7qおよび1pにマッピングされると思われることが示唆される。db遺伝子の欠損により、他の哺乳動物種で肥満症が生じ得る: Zucker fa/faラットおよびBrown Norway +/+ラット間の遺伝子交雑において、fa変異(ラット第5染色体)はマウスのdbに隣接する同じ遺伝子座により隣接される[Truettら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:7806-7809(1991)]。

【0009】体重に影響を及ぼすと思われる非常に多くの因子のために、どの因子が、そしてより詳細にはどの恒常性機構が体重の主要な決定因子となるのか推定することができなかった。従って、本発明の基となる主要な問題は、哺乳動物の脂肪蓄積および脂肪含量の制御を可能にする体重のモジュレーターを提供することである。

【0010】

【発明が解決しようとする課題】従って、本発明の基となる主要な問題は、哺乳動物の脂肪蓄積および脂肪含量の制御を可能にする体重のモジュレーターをコードするDNA分子にハイブリダイズし得る検出可能な標識をされた核酸分子およびアンチセンス核酸分子、非コード領域にハイブリダイズし得る核酸、ならびにコードするヒトゲノムDNAを増幅するためのオリゴヌクレオチドプライマーを提供することである。

【0011】

【課題を解決するための手段】本発明は、一般に、哺乳動物（動物およびヒトを包含する）の体重の制御に関する。そしてより詳細には、本発明は、体重のモジュレーターとして本明細書中に同定された物質、およびこのようなモジュレーターが適用され得る診断および治療用途に関する。その最も広い局面では、本発明は、ヌクレオチド配列の解明および発見、およびこのようなヌクレオチドまたはそれらの変質性変異体により発現されると推定されるタンパク質に関し、それらは哺乳動物の体重の制御に関与する能力を示す。目的のヌクレオチド配列は、マウスおよびヒトのOB遺伝子に相当する遺伝子を表し、これが体重および脂肪蓄積の調節に重要な役割を果たすと仮定されている。本明細書中に示した予備的なデータは、目的の遺伝子のポリペプチド産物がホルモンとして機能することを示唆している。本発明はさらに、分子プローブまたはポリメラーゼ連鎖反応（PCR）増幅のプライマーとして有用な核酸分子、すなわち合成または天然のオリゴヌクレオチドを提供する。さらなる局面では、本発明は、本発明の核酸を含むクローニングベクター；および本発明の核酸を、発現制御配列と作動可能に関連させて含む細菌発現ベクター、昆虫発現ベクター、または哺乳動物発現ベクターを提供する。従って、本発明はさらに、適切な発現ベクターでトランスフェクトまたはトランスフォームされた細菌細胞または哺乳動物細胞、および対応して本発明のモジュレーターの調製における上記構築物の使用に関する。OBポリペプチドに対する抗体もまた提供される。さらに、哺乳動物の体重を調整する方法が提供される。特定の実施例では、マウスおよびヒトのOBポリペプチドの2つのイソ型をコードする遺伝子が提供される。

【0012】本発明によれば、動物において体重を調整し得る、約145～約167アミノ酸を有する肥満症（OB）ポリペプチド、あるいはフラグメントを包含する、同じ生物学的活性を有するそれらの対立遺伝子変異体またはアナログが提供される。

【0013】1つの実施態様によれば、前記OBポリペプチド、あるいはフラグメントを包含する、それらの対立遺伝子変異体またはアナログは、配列番号2、4、5、または6のアミノ酸配列を含む。

【0014】本発明によれば、前記OBポリペプチドの免疫原性フラグメントが提供される。

【0015】本発明によれば、以下の配列からなる群より選択されるOBポリペプチドの免疫原性フラグメントが提供される：

Val-Pro-Ile-Gln-Lys-Val-Gln-Asp-Asp-Thr-Lys-Thr-Leu-Ile-Lys-Thr（配列番号18）；

Leu-His-Pro-Ile-Leu-Ser-Leu-Ser-Lys-Met-Asp-Gln-Thr-Leu-Ala（配列番号19）；

Ser-Lys-Ser-Cys-Ser-Leu-Pro-Gln-Thr-Ser-Gly-Leu-Gln-Lys-Pro-Glu-Ser-Leu-Asp（配列番号20）；および

Ser-Arg-Leu-Gln-Gly-Ser-Leu-Gln-Asp-Ile-Leu-Gln-Gln-Leu-Asp-Val-Ser-Pro-Glu-Cys（配列番号21）。

【0016】1つの実施態様によれば、前記ヒトOBポリペプチドアナログはアミノ酸53、56、71、85、89、92、95、98、110、118、121、122、126、127、128、129、132、139、157、159、163、および166（配列番号4の番号付けに従う）からなる群から選択される1つまたはより多くのアミノ酸が別のアミノ酸と置換されている。

【0017】1つの実施態様によれば、前記ヒトOBポリペプチドアナログは、前記置換が、配列番号2に記載のマウスOBポリペプチドの分岐アミノ酸とで行われる。

【0018】1つの実施態様によれば、前記ヒトOBポリペプチドアナログは、前記置換が、アラニンとで行われる。

【0019】1つの実施態様によれば、前記ヒトOBポリペプチドアナログは以下のポリペプチドからなる群から選択される：

（a）53位のセリン残基がグリシン、アラニン、バリン、システイン、メチオニン、またはトレオニンと置換される；

（b）98位のセリン残基がグリシン、アラニン、バリン、システイン、メチオニン、またはトレオニンと置換される；および

（c）92位のアルギニン残基がアスパラギン、リジン、ヒスチジン、グルタミン、グルタミン酸、アスパラギン酸、セリン、トレオニン、メチオニン、またはシステインと置換される。

【0020】1つの実施態様によれば、前記OBポリペプチドアナログは、配列番号2、4、5、または6に記載のヒトOBポリペプチドアミノ酸配列と、83%以上のアミノ酸配列相同性を有する。

【0021】1つの実施態様によれば、前記ヒトOBポリペプチドアナログは、以下のポリペプチドからなる群から選択される：

（a）1つまたはより多くのアスパラギン酸残基がグルタミン酸と置換される；

（b）1つまたはより多くのイソロイシン残基がロイシンと置換される；

（c）1つまたはより多くのグリシンまたはバリン残基がアラニンと置換される；

（d）1つまたはより多くのアルギニン残基がヒスチジンと置換される；

（e）1つまたはより多くのチロシンまたはフェニルアラニン残基がトリプトファンと置換される；

（f）121位から128位（配列番号4の番号付けに従う）の1つまたはより多くの残基がグリシンまたはアラニンと置換される；および

（g）54位から60位または118位から166位（配列番号4の番号付けに従う）の1つまたはより多くの残基がリジン、グルタミン酸、システイン、またはプロリンと置換

される。

【0022】1つの実施態様によれば、前記0Bポリペプチドは、以下のポリペプチドからなる群から選択される：

- (a) 1位から21位の残基が欠失されている；および
- (b) 21位でメチオニン、または18位から21位でグリシン-セリン-ヒスチジン-メチオニン配列（配列番号38）、または1位から21位でメチオニン-グリシン-セリン-セリン-ヒスチジン-ヒスチジン-ヒスチジン-ヒスチジン-ヒスチジン-ヒスチジン-セリン-セリン-グリシン-ロイシン-バリン-プロリン-アルギニン-グリシン-セリン-ヒスチジン-メチオニン配列（配列番号98）を有するサブパート（a）のポリペプチド。

【0023】1つの実施態様によれば、前記0Bポリペプチドは、以下のポリペプチドからなる群から選択される：

- (a) 1位から21位の残基が欠失されている；および
- (b) 14位から21位でロイシン-グルタミン酸-リジン-アルギニン-グルタミン酸-アラニン-グルタミン酸-アラニン配列（配列番号26）、または18位から21位でグルタミン酸-アラニン-グルタミン酸-アラニン配列（配列番号27）、または18位から21位でロイシン-グルタミン酸-リジン-アルギニン配列（配列番号28）、または2位から21位でメチオニン-グリシン-セリン-セリン-ヒスチジン-ヒスチジン-ヒスチジン-ヒスチジン-ヒスチジン-ヒスチジン-ヒスチジン-セリン-セリン-グリシン-ロイシン-バリン-プロリン-アルギニン-グリシン-セリン-プロリン配列（配列番号99）、または18位から21位でグリシン-セリン-プロリン配列を有するサブパート（a）のポリペプチド。

【0024】1つの実施態様によれば、前記0Bポリペプチドは、以下のポリペプチドからなる群から選択される：

- (a) 1位から21位の残基が欠失されている；および
- (b) 21位でメチオニン、または18位から21位でグリシン-セリン-ヒスチジン-メチオニン配列（配列番号38）、または1位から21位でメチオニン-グリシン-セリン-セリン-ヒスチジン-ヒスチジン-ヒスチジン-ヒスチジン-ヒスチジン-ヒスチジン-ヒスチジン-セリン-セリン-グリシン-ロイシン-バリン-プロリン-アルギニン-グリシン-セリン-ヒスチジン-メチオニン配列（配列番号98）、または14位から21位でロイシン-グルタミン酸-リジン-アルギニン-グルタミン酸-アラニン-グルタミン酸-アラニン配列（配列番号26）、または18位から21位でグルタミン酸-アラニン-グルタミン酸-アラニン配列（配列番号27）、または18位から21位でロイシン-グルタミン酸-リジン-アルギニン配列（配列番号28）、または2位から21位でメチオニン-グリシン-セリン-セリン-ヒスチジン-ヒスチジン-

ヒスチジン-ヒスチジン-ヒスチジン-ヒスチジン-セリン-セリン-グリシン-ロイシン-バリン-プロリン-アルギニン-グリシン-セリン-プロリン配列（配列番号99）、または18位から21位でグリシン-セリン-プロリン配列を有するサブパート（a）のポリペプチド。

【0025】1つの実施態様によれば、前記ヒト0Bポリペプチド短縮型アナログは、以下のポリペプチドからなる群（配列番号4の番号付けに従う）から選択される：

- (a) 121位から128位の1つまたはより多くの残基が欠失される；
- (b) 1～116位の残基が欠失される；
- (c) 1～21位および54～167位の残基が欠失される；
- (d) 1～60位および117～167位の残基が欠失される；
- (e) 1～60位の残基が欠失される；
- (f) 1～53位の残基が欠失される；
- (g) 1～21位の残基が欠失されるサブパート（a）のアナログ；および
- (h) 以下からなる群から選択されるN末端アミノ酸またはアミノ酸配列を有するサブパート（a）から（g）のアナログ：

- (1) メチオニン、(2) グリシン-セリン-ヒスチジン-メチオニン配列（配列番号38）、(3) メチオニン-グリシン-セリン-セリン-ヒスチジン-ヒスチジン-ヒスチジン-ヒスチジン-ヒスチジン-ヒスチジン-ヒスチジン-ヒスチジン-ヒスチジン-セリン-セリン-グリシン-ロイシン-バリン-プロリン-アルギニン-グリシン-セリン-ヒスチジン-メチオニン配列（配列番号98）、(4) ロイシン-グルタミン酸-リジン-アルギニン-グルタミン酸-アラニン-グルタミン酸-アラニン配列（配列番号26）、(5) グルタミン酸-アラニン-グルタミン酸-アラニン配列（配列番号27）、(6) ロイシン-グルタミン酸-リジン-アルギニン配列（配列番号28）、(7) メチオニン-グリシン-セリン-セリン-ヒスチジン-ヒスチジン-ヒスチジン-ヒスチジン-ヒスチジン-ヒスチジン-ヒスチジン-ヒスチジン-ヒスチジン-ヒスチジン-セリン-セリン-グリシン-ロイシン-バリン-プロリン-アルギニン-グリシン-セリン-プロリン配列（配列番号99）、および(8) グリシン-セリン-プロリン配列。

【0026】本発明によれば、組換え0Bポリペプチドが提供される。

【0027】本発明によれば、化学合成0Bポリペプチドが提供される。

【0028】本発明によれば、1つまたはそれより多くの化学部分が結合している、前記0Bポリペプチドの誘導体が提供される。

【0029】1つの実施態様によれば、前記化学部分は水溶性ポリマーである。

【0030】1つの実施態様によれば、前記水溶性ポリマーはポリエチレングリコールである。

【0031】1つの実施態様によれば、前記誘導体は、モノPEG化、ジPEG化、トリPEG化、またはテトラPEG化されている。

【0032】1つの実施態様によれば、前記誘導体は、N末端がモノPEG化されている。

【0033】1つの実施態様によれば、前記誘導体は、配列番号4の22位から167位のアミノ酸残基または配列番号6の22位から166位の残基を含むOBポリペプチドである。

【0034】1つの実施態様によれば、前記誘導体は、配列番号4の22位から167位のアミノ酸残基または配列番号6の22位から166位の残基を含み、そして21位にメチオニンを有するOBポリペプチドである。

【0035】本発明によれば、前記のOBポリペプチドをコードする単離された核酸分子が提供される。

【0036】本発明によれば、哺乳動物の体重を調整する生物学的活性を有するOBポリペプチドの発現を得るために用いられるDNA分子であって、以下からなる群から選択される、DNA分子：

(a) 配列番号1および3に記載のDNA分子またはそれらのフラグメント；

(b) (a) に定義したDNA分子とハイブリダイズするDNA分子またはそれらのハイブリダイズし得るフラグメント；および

(c) 該DNA分子のいずれかによりコードされるアミノ酸配列の発現をコードするDNA分子、が提供される。

【0037】1つの実施態様によれば、前記DNA分子は、配列番号22および24のヒトゲノムDNA分子である。

【0038】1つの実施態様によれば、前記DNA分子は以下に記載されるアミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする：

(a) 配列番号2；

(b) 配列番号2の22位から167位のアミノ酸；

(c) 配列番号4；

(d) 配列番号4の22位から167位のアミノ酸；

(e) 配列番号5；

(f) 配列番号5の22位から166位のアミノ酸；

(g) 配列番号6；

(h) 配列番号6の22位から166位のアミノ酸；

(i) 以下からなる群から選択されるN末端アミノ酸またはアミノ酸配列を有するサブパート (b)、(d)、(f)、または(h) のアミノ酸配列：

(1) メチオニン、(2) グリシン-セリン-ヒスチジン-メチオニン配列 (配列番号38)、(3) メチオニン-グリシン-セリン-セリン-ヒスチジン-ヒスチジン-ヒスチジン-ヒスチジン-ヒスチジン-セリン-セリン-グリシン-ロイシン-バリン-プロリン-アルギニン-グリシン-セリン-ヒスチジン-メチオニン配列 (配列番号98)。

【0039】1つの実施態様によれば、前記DNA分子は、以下からなる群から選択されるN末端アミノ酸配列を有する (b)、(d)、(f)、または(h) のアミノ酸配列をコードする：

(1) ロイシン-グルタミン酸-リジン-アルギニン-グルタミン酸-アラニン-グルタミン酸-アラニン配列 (配列番号26)、(2) グルタミン酸-アラニン-グルタミン酸-アラニン配列 (配列番号27)、(3) ロイシン-グルタミン酸-リジン-アルギニン配列 (配列番号28)、(4) メチオニン-グリシン-セリン-セリン-ヒスチジン-ヒスチジン-ヒスチジン-ヒスチジン-ヒスチジン-ヒスチジン-セリン-セリン-グリシン-ロイシン-バリン-プロリン-アルギニン-グリシン-セリン-プロリン配列 (配列番号99)、および (5) グリシン-セリン-プロリン配列。

【0040】1つの実施態様によれば、前記DNA分子は、配列番号3のタンパク質コード配列として記載される配列を含む。

【0041】1つの実施態様によれば、前記DNA分子は、配列番号3の22位から167位のアミノ酸をコードする配列として記載される配列を含む。

【0042】本発明によれば、前記のDNA分子にハイブリダイズし得る検出可能な標識をされた核酸分子が提供される。

【0043】本発明によれば、OB核酸の非コード領域にハイブリダイズし得る核酸であって、該非コード領域がイントロン、5'非コード領域、および3'非コード領域からなる群から選択される、核酸が提供される。

【0044】本発明によれば、OBポリペプチドをコードするヒトゲノムDNAを増幅するためのオリゴヌクレオチドプライマーが提供される。

【0045】1つの実施態様によれば、前記オリゴヌクレオチドは、以下からなる群から選択される：

HOB 1gF 5'-CCCAAGAAGCCCATCTG-3' (配列番号29)；

HOB 1gR 5'-GACTATCTGGGTCCAGTGCC-3' (配列番号30)；

HOB 2gF 5'-CCACATGCTGAGCACTTGT-3' (配列番号31)；

および

HOB 2gR 5'-CTTCAATCCTGGAGATACCTGG-3' (配列番号32)

本発明によれば、前記のDNA分子を含むベクターが提供される。

【0046】本発明によれば、発現制御配列と作動可能に関連された、前記のDNA分子を含む発現ベクターが提供される。

【0047】本発明によれば、前記のDNA分子または発現ベクターでトランスフォームまたはトランスフェクトされた単細胞宿主が提供される。

【0048】1つの実施態様によれば、前記単細胞宿主は細菌、酵母、哺乳動物細胞、植物細胞、昆虫細胞、および組織培養におけるヒト細胞からなる群から選択される。

【0049】1つの実施態様によれば、前記単細胞宿主は、E. coli、Pseudomonas、Bacillus、Streptomyces、酵母、CHO、R1.1、B-W、LM、COS1、COS7、BSC1、BSC40、BMT10、およびSf9細胞からなる群から選択される。

【0050】1つの実施態様によれば、前記単細胞宿主は、Saccharomyces、Pichia、Candida、Hansenula、およびTorulopsisからなる群から選択される酵母宿主である。

【0051】本発明によれば、OBポリペプチドをコードするDNA配列を含み、そしてこのOBポリペプチドをコードする配列に対して機能的に近接した位置に発現調節配列を挿入することからなる相同的組換え事象によって、OBポリペプチドの高発現を可能にするようにインビトロで改変された、哺乳動物細胞が提供される。

【0052】1つの実施態様によれば、前記細胞においては、前記発現調節配列がOBポリペプチド発現調節配列であり、そして前記相同的組換え事象が変異OBポリペプチド発現制御配列を置き換える。

【0053】1つの実施態様によれば、前記細胞においては、前記発現制御配列挿入部がOBポリペプチド制御配列ではない。

【0054】本発明によれば、以下の工程を包含する、OBポリペプチドを調製する方法が提供される：

(a) 前記の細胞をOBポリペプチドの発現を提供する条件下で培養する工程；および

(b) この発現されたOBポリペプチドを回収する工程。

【0055】1つの実施態様によれば、前記方法においては、前記細胞が細菌または酵母である。

【0056】1つの実施態様によれば、前記方法は、以下の工程をさらに包含する：

(c) 前記OBポリペプチドをNiキレートカラムでのクロマトグラフィーにかける工程；および

(d) 前記OBポリペプチドをゲル濾過により精製する工程。

【0057】1つの実施態様によれば、前記方法は、工程(c)後かつ工程(d)前に、前記OBポリペプチドを強陽イオン交換カラムでのクロマトグラフィーにかける工程をさらに包含する。

【0058】本発明によれば、前記のOBポリペプチドまたは前記の方法により生産されるOBポリペプチドに対して特異的な抗体が提供される。

【0059】1つの実施態様によれば、前記抗体は、モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体である。

【0060】1つの実施態様によれば、前記抗体は、検出可能な標識で標識されている。

【0061】本発明によれば、前記のモノクローナル抗体を生産する不死化細胞系が提供される。

【0062】本発明によれば、以下の工程を包含する、OBポリペプチドに対して特異的な抗体を調製する方法が提供される：

(a) 前記のOBポリペプチドまたは前記の方法により生産されたOBポリペプチドを、キャリアタンパク質に複合体化させる工程；

(b) アジュバントと混合させた工程(a)のOBポリペプチドフラグメント-キャリアタンパク質複合体で宿主動物を免疫する工程；および

(c) この免疫宿主動物から抗体を得る工程。

【0063】本発明によれば、以下の工程を包含する、試料においてOBポリペプチドの存在を測定する方法が提供される：

(a) OBポリペプチドを含有すると思われる試料を、該OBポリペプチドに特異的に結合する抗体と、この抗体およびこのOBポリペプチドを含む反応複合体の形成を可能にする条件下で接触させる工程；および(b) この抗体およびこの試料中のOBポリペプチドを含む反応複合体の形成を検出する工程であって、ここでこの反応複合体の形成の検出がこの試料におけるOBポリペプチドの存在を示す、工程。

【0064】1つの実施態様によれば、前記方法において、方法前記抗体が固相支持体に結合される。

【0065】本発明によれば、以下の工程を包含する、生物学的試料におけるOBポリペプチドレベルを評価するインビトロ方法が提供される：

(a) 前記の方法に従って、生物学的試料における反応複合体の形成を検出する工程；および(b) 形成された反応複合体の量を評価する工程であって、ここでこの反応複合体の量は、この生物学的試料におけるOBポリペプチドレベルに対応する、工程。

【0066】本発明によれば、以下の工程を包含する、哺乳動物被験体におけるOBポリペプチドレベルの上昇または低下に関連した疾患の存在を検出または診断するインビトロ方法が提供される：

(a) 前記の哺乳動物被験体由来の生物学的試料におけるOBポリペプチドレベルを評価する工程；および(b) 工程(a)において検出されたレベルと、正常被験体または初期の被験体に存在するOBポリペプチドレベルとを比較する工程であって、ここで、正常レベルに比較したこのOBポリペプチドレベルの上昇はOBポリペプチドレベルの上昇に関連した疾患を示し、そして正常レベルに比較したこのOBポリペプチドレベルの低下はOBポリペプチドレベルの低下に関連した疾患を示す、工程。

【0067】本発明によれば、哺乳動物被験体におけるOBポリペプチドのレベルの上昇または低下に関連した疾患の治療処置をモニターするインビトロ方法であって、前記の方法に従って、OBポリペプチドレベルの上昇または低下に関連した疾患について治療処置を受ける哺乳動物被験体から異なる時点で得られた一連の生物学的試料におけるOBポリペプチドレベルを評価する工程を包含する、方法が提供される。

【0068】本発明によれば、前記のOBポリペプチドま

たは前記の方法により生産されたOBポリペプチドと、薬学的に受容可能なキャリアとを含む薬学的組成物が提供される。

【0069】1つの実施態様によれば、前記薬学的組成物は、動物の体重を減少させるためのものである。

【0070】本発明によれば、前記のOBポリペプチドまたは前記の方法により生産されるOBポリペプチドのアンタゴニストと、薬学的に受容可能なキャリアとを含む、動物の体重を増大させるための薬学的組成物が提供される。

【0071】1つの実施態様によれば、前記薬学的組成物において、前記アンタゴニストが、前記OBポリペプチドに結合しそしてその活性を中和する抗体、このOBポリペプチドのレセプターに結合するがこれを活性化しないこのOBポリペプチドのフラグメント、およびこのOBポリペプチドの小分子アンタゴニストからなる群から選択される。

【0072】本発明によれば、前記のOBポリペプチドまたは前記の方法により生産されたOBポリペプチドと、薬学的に受容可能なキャリアとを含む、個体の体重を減少させるための体型改善美容組成物が提供される。

【0073】本発明によれば、前記のOBポリペプチドまたは前記の方法により生産されたOBポリペプチドのアンタゴニストと、薬学的に受容可能なキャリアとを含む、個体の体重を増大させるための体型改善美容組成物が提供される。

【0074】1つの実施態様によれば、前記美容組成物において、前記アンタゴニストは、前記OBポリペプチドに結合しそしてその活性を中和する抗体、このOBポリペプチドのレセプターに結合するがこれを活性化しないこのOBポリペプチドのフラグメント、およびこのOBポリペプチドの小分子アンタゴニストからなる群から選択される。

【0075】本発明によれば、個体の体型を改善するための美容方法であって、前記の美容組成物が、個体に、この個体の体重を所望のレベルに調整するに十分な用量で投与される、方法が提供される。

【0076】本発明によれば、哺乳動物の体重を調整するための医薬品の製造のための、前記のOBポリペプチドをコードする核酸にハイブリダイズし得るアンチセンス核酸分子の使用が提供される。

【0077】本発明によれば、動物の体重を改変するための遺伝子治療医薬品の製造のための、前記のOBポリペプチドまたは前記の方法により生産されたOBポリペプチドをコードする核酸分子の使用が提供される。

【0078】本発明によれば、動物の体重を改変するための医薬品の製造のための、前記のOBポリペプチドまたは前記の方法により生産されたOBポリペプチドの使用が提供される。

【0079】本発明によれば、糖尿病、高血圧、および

高コレステロール症からなる群から選択される障害の処置における哺乳動物の体重を調整するための医薬品の製造のための、前記のOBポリペプチドまたは前記の方法により生産されたOBポリペプチドの使用が提供される。

【0080】本発明によれば、糖尿病、高血圧、および高コレステロール症の処置のための医薬品と組み合わせて用いられる哺乳動物の体重を調整するための医薬品の製造のための、前記のOBポリペプチドまたは前記の方法により生産されたOBポリペプチドの使用が提供される。

10 【0081】本発明によれば、動物の体重を増大させるための医薬品の製造のための、前記のOBポリペプチドまたは前記の方法により生産されたOBポリペプチドのアンタゴニストの使用が提供される。

【0082】1つの実施態様において、前記使用において、前記アンタゴニストが、前記OBポリペプチドに結合しそしてその活性を中和する抗体、このOBレセプターに結合するがこれを活性化しないこのOBポリペプチドのフラグメント、およびこのOBポリペプチドの小分子アンタゴニストからなる群から選択される。

20 【0083】1つの実施態様において、前記使用は、静脈内送達、動脈内送達、腹腔内送達、筋内送達、皮下送達、鼻内送達、経口送達、または肺送達のための医薬品の製造のためのものである。

【0084】本発明に従えば、動物、特に哺乳動物の脂肪蓄積および脂肪含量の制御の問題は、本明細書中に開示されている肥満症（OB）ポリペプチドおよびこれらのポリペプチドをコードする核酸分子の提供を通して解決された。本発明は、初めて、体重および脂肪蓄積の調整（すなわち制御および調節）に有用な単離されたポリペプチド、ならびにOBポリペプチドの組換え生産を可能にするだけでなくそれ自身体重の調整に有用である、このようなポリペプチドをコードする核酸配列を提供する。

【0085】本発明の肥満症（OB）ポリペプチドは、約145～約167アミノ酸を有し、動物（特に哺乳動物）において体重を調整し得、そして同じ生物学的活性を有するそれらの対立遺伝子変異体またはアナログ（フラグメントを包含する）を包含する。このポリペプチドは、組換え方法または化学合成方法によって調製され得る。本発明の好ましいOBポリペプチドは、配列番号2、4、5、または6のアミノ酸配列を有するOBポリペプチド、あるいはそれらの対立遺伝子変異体またはアナログ（フラグメントを包含する）を包含する。

【0086】本発明のOBポリペプチドの免疫原性フラグメントは、以下を包含する：Val-Pro-Ile-Gln-Lys-Val-Gln-Asp-Asp-Thr-Lys-Thr-Leu-Ile-Lys-Thr（配列番号18）；Leu-His-Pro-Ile-Leu-Ser-Leu-Ser-Lys-Met-Asp-Gln-Thr-Leu-Ala（配列番号19）；Ser-Lys-Ser-Cys-Ser-Leu-Pro-Gln-Thr-Ser-Gly-Leu-Gln-Lys-Pro-Glu-Ser-Leu-Asp（配列番号20）；およびSer-Arg-Leu-Gln-Gly-Ser-Leu-Gln-Asp-Ile-Leu-Gln-Gln-Leu-Asp-Val-Se

r-Pro-Glu-Cys（配列番号21）。

【0087】ヒトOBポリペプチドアナログは、配列番号4および6のヒトアミノ酸配列を有するOBポリペプチドアナログを含み、ここでアミノ酸53、56、71、85、89、92、95、98、110、118、121、122、126、127、128、129、132、139、157、159、163、および166（配列番号4の番号付けに従う）からなる群から選択される1つまたはより多くのアミノ酸が別のアミノ酸、例えば、配列番号2に記載の Maus OBポリペプチドの分岐 (divergent) アミノ酸またはアラニンと置換されている。このよ

うなアナログはまた、以下のようなアナログを包含する：(a) 53位のセリン残基がグリシン、アラニン、バリン、システイン、メチオニン、またはトレオニンと置換される；(b) 98位のセリン残基がグリシン、アラニン、バリン、システイン、メチオニン、またはトレオニンと置換される；および(c) 92位のアルギニン残基がアスパラギン、リジン、ヒスチジン、グルタミン、グルタミン酸、アスパラギン酸、セリン、トレオニン、メチオニン、またはシステインと置換される。本発明のOBポリペプチドアナログは、好ましくは、配列番号2、4、5、または6に記載のヒトOBポリペプチドアミノ酸配列と、83%以上のアミノ酸配列相同性を有する。

【0088】本発明の別のヒトOBポリペプチドアナログは、配列番号4および6のアミノ酸配列を有し、そして以下を有する：(a) 1つまたはより多くのアスパラギン酸残基がグルタミン酸と置換される；(b) 1つまたはより多くのイソロイシン残基がロイシンと置換される；(c) 1つまたはより多くのグリシンまたはバリン残基がアラニンと置換される；(d) 1つまたはより多くのアルギニン残基がヒスチジンと置換される；(e) 1つまたはより多くのチロシンまたはフェニルアラニン残基がトリプトファンと置換される；(f) 121位から128位（配列番号4の番号付けに従う）の1つまたはより多くの残基がグリシンまたはアラニンと置換される；および(g) 54位から60位または118位から166位（配列番号4の番号付けに従う）の1つまたはより多くの残基がリジン、グルタミン酸、システイン、またはプロリンと置換される。

【0089】本発明の好ましいヒトOBポリペプチド短縮型 (truncated) アナログは、以下であることを包含する（配列番号4の番号付けに従う）：(a) 121位から128位の1つまたはより多くの残基が欠失される；(b) 1～116位の残基が欠失される；(c) 1～21位および54～167位の残基が欠失される；(d) 1～60位および117～167位の残基が欠失される；(e) 1～60位の残基が欠失される；(f) 1～53位の残基が欠失される；および(g) 1～21位の残基が欠失されるサブパート (subpart) (a) のアナログ。21アミノ酸「シグナル」配列（例えば配列番号4の1～21位のアミノ酸）を欠く本発明のOBポリペプチドおよびOBポリペプチドアナログは、

以下のようなN末端アミノ酸またはアミノ酸配列を有する：(1) メチオニン、(2) グリシン-セリン-ヒスチジン-メチオニン配列（配列番号38）、(3) メチオニン-グリシン-セリン-セリン-ヒスチジン-ヒスチジン-ヒスチジン-ヒスチジン-ヒスチジン-セリン-セリン-グリシン-ロイシン-バリン-プロリン-アルギニン-グリシン-セリン-ヒスチジン-メチオニン配列（配列番号98）、(4) ロイシン-グルタミン酸-リジン-アルギニン-グルタミン酸-アラニン-グルタミン酸-アラニン配列（配列番号26）、(5) グルタミン酸-アラニン-グルタミン酸-アラニン配列（配列番号27）、(6) ロイシン-グルタミン酸-リジン-アルギニン配列（配列番号28）、(7) メチオニン-グリシン-セリン-セリン-ヒスチジン-ヒスチジン-ヒスチジン-ヒスチジン-ヒスチジン-ヒスチジン-セリン-セリン-グリシン-ロイシン-バリン-プロリン-アルギニン-グリシン-セリン-プロリン配列（配列番号99）、および(8) グリシン-セリン-プロリン配列。

【0090】本発明のOBポリペプチドの誘導体は、そこに結合している1つまたはそれより多くの化学部分を有し、この化学部分は、水溶性ポリマー（例えばポリエチレングリコール）を包含する。ポリエチレングリコール誘導体は、モノPEG化、ジPEG化、トリPEG化、またはテトラPEG化であり得、例えばN末端モノPEG化であり得る。本発明のOBポリペプチドの好ましいN末端モノPEG化誘導体は、配列番号4の22位から167位のアミノ酸残基または配列番号6の22位から166位の残基を含み、必要に応じて21位に（PEG化）メチオニンを有するOBポリペプチドである。

【0091】本発明により提供される単離された核酸分子は、上記のようなOBポリペプチド、対立遺伝子変異体、またはアナログ（それらのフラグメントを包含する）をコードする。哺乳動物の体重を調整する生物学的活性を有するOBポリペプチドの発現を得るために用いられるDNA分子であって、以下からなる群から選択される、DNA分子が特に提供される：(a) 配列番号1および3に記載のDNA分子またはそれらのフラグメント；(b) (a) に定義したDNA分子とハイブリダイズするDNA分子またはそれらのハイブリダイズし得るフラグメント；および(c) 該DNA分子のいずれかによりコードされるアミノ酸配列の発現をコードするDNA分子。このような分子の例示は、配列番号22および24のヒトゲノムDNA分子である。

【0092】本発明の好ましいDNA分子は、以下に記載されるアミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする：(a) 配列番号2；(b) 配列番号2の22位から167位のアミノ酸；(c) 配列番号4；(d) 配列番号4の22位から167位のアミノ酸；(e) 配列番号5；(f) 配列番号5の22

位から166位のアミノ酸；および（g）配列番号6；および（h）配列番号6の22位から166位のアミノ酸、ならびに既に記載したようなN末端アミノ酸またはアミノ酸配列を有するポリペプチド。例示的には、好ましいDNA分子は、配列番号3のタンパク質コード配列として記載される配列、および特に配列番号3の22位から167位のアミノ酸をコードする配列として記載される配列を有する。

【0093】本発明のDNA分子にハイブリダイズし得る検出可能な標識をされた核酸分子もまた提供され、そしてOB核酸の非コード領域にハイブリダイズし得る核酸分子（非コード領域はイントロン、5'非コード領域、および3'非コード領域からなる群から選択される）を包含する。本発明はまた、OBポリペプチドをコードするヒトゲノムDNAを増幅するためのオリゴヌクレオチドプライマーを提供し、このようなオリゴヌクレオチドは、配列番号29から32に記載される。

【0094】本発明により提供されるベクターは、上記の本発明のDNA分子を含み、そして好ましくは、発現制御配列と作動可能に関連されたDNA分子を含む発現ベクターの形態を有する。本発明の単細胞宿主細胞は、本発明のDNA分子または上記のベクターでトランスフォームまたはトランスフェクトされる。好ましい宿主細胞は、細菌、酵母、哺乳動物細胞、植物細胞、昆虫細胞、および組織培養におけるヒト細胞を包含する。例示的には、このような宿主細胞は、E. coli、Pseudomonas、Bacillus、Streptomyces、酵母、CHO、R1.1、B-W、L-M、COS1、COS7、BSC1、BSC40、BMT10、およびSf9細胞からなる群から選択される。本発明に好ましい酵母細胞は、Saccharomyces、Pichia、Candida、Hansenula、およびTorulopsisを包含する。OBポリペプチドをコードするDNA配列を含み、そして該OBポリペプチドをコードする配列に対して機能的に近接した位置に発現調節配列を挿入することからなる相同組換え事象によって、OBポリペプチドの高発現を可能にするようにインビトロで改変された哺乳動物細胞もまた提供される。この発現調節配列は、OBポリペプチド発現調節配列またはそれ以外であり得、そして細胞内で変異OBポリペプチド制御配列と置き換え得る。

【0095】本発明は、以下の工程を包含するOBポリペプチドを調製する方法を提供する：

（a）上記の細胞をOBポリペプチドの発現を提供する条件下で培養する工程；および（b）発現されたOBポリペプチドを回収する工程。この手順はまた、以下による工程を伴い得る：（c）上記ポリペプチドをNiキレートカラムでのクロマトグラフィーにかける工程；および（d）上記ポリペプチドをゲル濾過により精製する工程。好ましい実施態様では、工程（c）後かつ工程（d）前に、この方法は、OBポリペプチドを強陽イオン交換カラムでのクロマトグラフィーにかける工程を包含

する。

【0096】本発明はまた、本発明のOBポリペプチドに特異的な標識および非標識モノクローナルおよびポリクローナル抗体ならびに本発明のモノクローナル抗体を生産する不死化細胞系を提供する。本発明の抗体調製は、以下の工程を包含する：（a）OBポリペプチドをキャリアタンパク質に複合体化（conjugate）させる工程；（b）アジュバントと混合させた工程（a）のOBポリペプチドフラグメント-キャリアタンパク質複合体で宿主動物を免疫する工程；および（c）免疫された宿主動物から抗体を得る工程。

【0097】本発明はまた、以下の工程を包含する、試料においてOBポリペプチドの存在を測定する方法を提供する：（a）OBポリペプチドを含有すると思われる試料を、該OBポリペプチドに特異的に結合する抗体と、抗体およびOBポリペプチドを含む反応複合体の形成を可能にする条件下で接触させる工程；および（b）抗体および試料中のOBポリペプチドを含む反応複合体の形成を検出する工程（ここで該反応複合体の形成の検出が該試料におけるOBポリペプチドの存在を示す）。以下の工程を包含する、生物学的試料におけるOBポリペプチドレベルを評価するインビトロ方法が、対応して提供される：

（a）上記の方法に従って、生物学的試料における反応複合体の形成を検出する工程；および（b）形成された反応複合体の量を評価する工程（ここで反応複合体の量は、生物学的試料におけるOBポリペプチドレベルに対応する）。本発明によりOBポリペプチドの上昇または低下に関連した疾患の存在を検出または診断する場合、上記の評価が行われ、そして検出されたレベルが、正常被験体または初期の被験体に存在するOBポリペプチドレベルと比較される。正常または以前のレベルに比較したOBポリペプチドレベルの上昇はOBポリペプチドレベルの上昇に関連した疾患を示し、そして正常レベルに比較したOBポリペプチドレベルの低下はOBポリペプチドレベルの低下に関連した疾患を示す。哺乳動物被験体におけるOBポリペプチドのレベルの上昇または低下と関連した疾患の治療処置をモニターするインビトロ方法が対応して提供され、これは、上記のようにしてOBポリペプチドの上昇または低下に関連した疾患について治療処置を受ける哺乳動物被験体から異なる時点で得られた一連の生物学的試料におけるOBポリペプチドレベルを評価する工程を包含する。

【0098】本発明の薬学的組成物は、薬学的に受容可能なキャリアと共に上記のOBポリペプチドを含み、動物の体重を減少させるための治療方法において有用である。動物の体重を増大させるための治療方法において有用な本発明の別の薬学的組成物は、OBポリペプチドのアンタゴニストを包含し、このアンタゴニストは、好ましくはOBポリペプチドに結合しそしてその活性を中和する抗体、該OBポリペプチドのレセプターに結合するがこれ

を活性化しないOBポリペプチドのフラグメント、および該OBポリペプチドの小分子アンタゴニストからなる群から選択される。本発明はまた、個体の体重を減少または増大させるための、対応する体型改善美容組成物を提供し、これは、個体の体型を改善するための美容方法において有用である。このような美容組成物は、個体に、個体の体重を所望のレベルに調整するに十分な用量で投与される。

【0099】動物の体重調整（例えば遺伝子治療）のための医薬品の製造のための、本発明の核酸分子ならびに本発明OBポリペプチドをコードする核酸にハイブリダイズし得るアンチセンス核酸分子の使用についても、本発明によって述べられている。動物の体重を改変するための医薬品の製造のための本発明のOBポリペプチドまたはアンタゴニストの使用もまた提供される。そのように開発された医薬品は、糖尿病、高血圧、および高コレステロール症からなる群から選択される障害の処置における、およびこのような障害の処置のための医薬品との組み合わせ療法の一部としての、哺乳動物の体重を改変するための医薬品の製造のために用いられ得る。このような医薬品は、静脈内送達系、動脈内送達系、腹腔内送達系、筋内送達系、皮下送達系、鼻内送達系、経口送達系、または肺送達系において用いられ得る。

【0100】本明細書で示したデータは、本発明のOBポリペプチドはそれら自身の形態で主として哺乳動物脂肪細胞（adipocyte）から分泌され、そしてこのポリペプチドはホルモンとして機能することを示す。

【0101】本明細書中の実施例は、OBポリペプチド（あるいは本明細書中で「レプチン(leptin)」と呼ばれる）がマウス、ラット、およびヒトの血漿中を循環することを示している。レプチンはob/obマウス由来の血漿には存在せず、db/dbマウス由来の血漿では10倍高い濃度で存在し、そしてfa/faラットでは20倍高い濃度で存在する。最も重要なことには、組換えレプチンの毎日の注射により、ob/obマウスの体重は劇的に減少し、野生型マウスの体重は大きな影響を及ぼされ、そしてdb/dbマウスは全く影響を受けない。

【0102】さらなる局面では、1つの種に由来するOBポリペプチドが他の種において生物学的に活性である。特に、ヒトOBポリペプチドはマウスにおいて活性である。

【0103】第1の場合では、本発明のモジュレーターは、本明細書中で定義されたようにそれ自身が体重制御のモジュレーターとして働くポリペプチド（このポリペプチドは、図1A～E（配列番号2）、図3（配列番号4）、図5（配列番号5）、および図6（配列番号6）に記載されるようなアミノ酸配列を有する）、またはそれらの保存的変異体またはフラグメント、特にシグナルペプチドを欠くフラグメント（あるいは本明細書中で成熟OBポリペプチドと呼ばれる）をコードする核酸分子を

含む。この核酸分子は、組換えDNA分子（例えばcDNA、またはcDNAまたは単離されたゲノムDNAを含有するベクター）またはクローン化遺伝子（すなわち単離されたゲノムDNA）、あるいはそれらの変質性（degenerate）変異体を包含する。特定の実施態様では、マウスおよびヒトのOBポリペプチドの2つの変異体に対するアミノ酸配列が提供される。両ポリペプチドは、49位のグルタミンが欠失した形態で見出される。これは、mRNAスプライシングの例外から生じ得る。種々の種に由来するOBポリペプチドは高度に相同性であり得る；図4に示されるように、マウスおよびヒトのOBポリペプチドは、80%以上相同である。

【0104】この核酸分子（組換えDNA分子またはクローン化遺伝子）は、図1A～E（配列番号1）および図2AおよびB（配列番号3）に示されるヌクレオチド配列を有し得るか、DNAコード配列に相補的であり得る。特に、このようなDNA分子は、cDNAまたは染色体から単離されたゲノムDNAであり得る。本発明の核酸分子はまた、DNAの5'および3'フランキンク配列ならびにイントロンDNA配列に相当し得る。従って、本発明はまた、本願において図1A～E（配列番号1）および図2AおよびB（配列番号3）に示される配列、および変質性変異体、対立遺伝子変異、ならびに同様の同族分子から選択されるヌクレオチド配列を有する核酸の同定に関する。

【0105】本発明の核酸分子は、DNAまたはRNAであり得、これはリン酸結合またはリン酸アナログ（例えばチオリン酸）結合を有する合成変異体を包含する。一本鎖および二本鎖の両配列が、本明細書中で意図される。

【0106】本発明はさらに、分子プローブまたはポリメラーゼ連鎖反応（PCR）増幅のプライマーとして用いられる核酸分子、すなわち図1A～E（配列番号1）、図2AおよびB（配列番号3）、および図20A～C（配列番号22および24）に示される配列；またはコード配列の5'および3'フランキンク配列；またはゲノムDNAのイントロン配列の一部分に相当する配列を有する合成または天然のオリゴヌクレオチド、を提供する。特に、本発明は、少なくとも約10ヌクレオチドを有する核酸分子を意図し、ここでこの核酸分子の配列は、図1A～E（配列番号1）、図2AおよびB（配列番号3）、および図20A～C（配列番号22）のヌクレオチド配列中の同じヌクレオチド数のヌクレオチド配列、またはそれに相補的な配列に相当する。より好ましくは、この分子の核酸配列は少なくとも15ヌクレオチドを有する。最も好ましくは、この核酸配列は少なくとも20ヌクレオチドを有する。オリゴヌクレオチドがプローブである本発明の実施態様では、オリゴヌクレオチドは、例えば放射性核種（例えば³²P）または酵素で検出可能に標識される。

【0107】さらなる局面では、本発明は、クローニン

グベクター（OBポリペプチドをコードする本発明の核酸を含む）；および細菌発現ベクター、昆虫発現ベクター、または哺乳動物発現ベクター（発現制御配列と作動可能に関連させて、OBポリペプチドをコードする本発明の核酸分子を含む）を提供する。従って、本発明はさらに、適切な発現ベクターでトランスフェクトまたはトランスフォームされた宿主細胞（例えば細菌細胞、酵母細胞、昆虫細胞、または哺乳動物細胞）、および対応して、本発明のモジュレーターの調製における上記構築物の使用に関する。

【0108】なおさらなる局面では、本発明は、OBポリペプチドに結合する抗体に関する。このような抗体は、完全長ポリペプチドまたはそれらの抗原性フラグメントに対して生成され得る。1つの局面では、このような抗体は、OBポリペプチドの機能的（すなわち体重および脂肪組成を調整する）活性を阻害する。別の局面では、抗体は、血漿または血清中の循環OBポリペプチドレベルを決定するために用いられ得る。なおさらなる局面では、領域特異的抗体（特にモノクローナル抗体）が、OBポリペプチド構造のプロープとして用いられ得る。

【0109】前述の全ての物質が、体重および脂肪組成のモジュレーターとして考慮されるべきであり、そしてこのような物質は種々の背景で用いられ得る。詳細には、本発明は、診断および治療の両適用、ならびに特定の農業適用、本明細書で定義されるモジュレーター（核酸分子およびペプチドを包含する）の使用の可能性のある全てを意図する。さらに、体重の調整は特定の治療含意および利益を有する。それは、肥満症または逆に悪液質が望ましくない身体状態を示すような状態が、本発明の1つまたはそれより多くのモジュレーターの投与によ

り治療され得る状態においてである。

【0110】従って、哺乳動物の体重を調整する方法が提案されており、これは、図1A～E（配列番号1）の配列、図2AおよびB（配列番号3）の配列およびそれらの変質性変異体および対立遺伝子変異体から選択されるヌクレオチド配列を有する核酸によりコードされるタンパク質の発現を制御する工程を包含する。このような制御は、遺伝子治療により目的のヌクレオチドを患者または宿主の脂肪細胞中に導入し、肥満症を制御または低減させることによりもたらされ得る。逆に、ヌクレオチドに対するアンタゴニスト（例えばアンチセンス分子）の調製および投与は、過度の体重損失を包含する状態（例えば神経性食欲不振、癌、またはAIDS）が存在しそしてその治療下にある場合においてその必要が示され、続行される。このような構築物は、ヌクレオチドの場合と同様に直接脂肪細胞に導入されて、このような変化を生じさせ得る。

【0111】対応して、図1A～E、3、5、および6（配列番号1、配列番号4、配列番号5、および配列番号6）により定義されるタンパク質、それらの保存的変

異体、活性フラグメント、および同族小分子は、治療目的のために、直接投与用に処方され、過度の体脂肪または体重増加の減少または制御をもたらし得る。対応して、上述のタンパク質物質（例えばそれらのフラグメント）に対する抗体および他のアンタゴニストが調製され、そして同様に投与されて、逆の効果を達成し得る。従って、本発明は、好都合に、薬学的に受容可能なキャリアまたは賦形剤と混合して、本発明のOBポリペプチド、または別の場合はそのアンタゴニストを含む薬学的組成物に関する。

【0112】さらに、本発明のOBポリペプチドは、その美容効果、例えば脂肪蓄積を減少させることによる体型改善のために投与され得る。OBポリペプチドは、その美容効果のために、独立にまたは他の美容戦略（例えば手術）と併用して用いられ得る。

【0113】本発明のヌクレオチドおよび対応ペプチドの診断用途は、診断および治療の両適用に有用な活性ヌクレオチド物質のレパートリーを開発するために、その対立遺伝子変異体のさらなる変異を同定するためのその核酸の使用に及ぶ。特に、目的のヌクレオチドの同型接合変異および異型接合変異が同定され、それにより患者の状態をより正確に定量化すると仮定され、肥満症に対する個体の危険状態潜在性を決定し得る。詳細には、異型接合変異は現在、軽度から中度の肥満症に関連しているとみなされ、一方、同型接合変異はより顕著な重度の肥満状態に関連し得る。対応するDNA試験が、次いで上述の確定された物質を水準基準として用いて行われ、特定の体質に対する的確な長期予後を容易にし、食事習慣または他の個人的習慣の変更、あるいは直接治療介入を規定し得、このような状態を避け得る。

【0114】本発明の診断利用は、試験被験体から採取した細胞試料または生物学的抽出物（または試料）における本発明のモジュレーターの存在および量を測定する方法に及び、そこでこのような試験試料における核酸（ゲノムDNAまたはmRNA）および／またはタンパク質レベルが確定され得る。ヌクレオチドの活性増大およびその結果生じるタンパク質の存在が被験体の肥満症阻害能を反映するとした場合、肥満性被験体においてこのような結果を観察する医師は、本発明のヌクレオチドの存在および活性に関する機能不全以外の要因が肥満状態の原因であると決定し得る。逆に、ヌクレオチドおよび／または発現タンパク質のレベルの低下は、このような肥満状態を治療するためにはこのようなレベルが増大しなければならないことを示唆し、次いで適切な治療養生法が行われ得る。

【0115】さらに、見出されそして図1A～Eおよび2AおよびBにおいて示されたヌクレオチドは、上記で簡単に述べたように、対応するRNAの測定に有用であるcDNAを表す。同様に、図1A～Eおよび3のポリペプチドに相当する組換えタンパク質物質が調製され、そし

て、例えばOBタンパク質の脂肪および／または血漿レベルの測定、または組織（例えば視床下部）上のOBに対するレセプターの存在およびレベルの検出のための、例えばラジオイムノアッセイにおける使用のために適切に標識され得る。

【0116】さらに、本発明は、本明細書中に示されたヌクレオチドおよび対応するタンパク質の同定だけでなく、このような物質に対するレセプターの明示もまた意図する。このような背景において、図1A～E、3、5、および／または6のポリペプチドが調製され得、適切な発現ライブラリーをスクリーニングして活性なレセプターを単離するために利用され得る。このレセプターはその後クローン化され得、そしてその後レセプター単独で、またはリガンドと併用して、本明細書中のモジュレーターと同様の活性を有し得る小分子をスクリーニングするのに用いられ得る。

【0117】さらに、本発明は、本明細書において特定のモジュレーター、好ましくはそのような治療が適切である種々の投与様式の製剤形態において調製された、その配列が配列番号2、配列番号4、配列番号5、および配列番号6に示されるポリペプチド、それらの抗体、それらの対応する小分子アゴニストまたはアンタゴニスト、または活性フラグメントを含む薬学的組成物に関する。このような製剤形態は、薬学的に受容可能なキャリア、または必要に応じて他のアジュバントを含み、そして各場合において臨床医または医師により決定される有効用量範囲で調製され得る。

【0118】従って、本発明の主要な目的は、本明細書中で定義されるような精製形態の体重モジュレーターを提供することであり、このモジュレーターは、哺乳動物の脂肪蓄積および脂肪含量の制御および変動に関連した特定の特徴および活性を示す。

【0119】本発明のさらなる目的は、このようなモジュレーターのレベルの変動が特徴的な性質であるかまたはあり得る病理学的状態の有効な診断およびモニタリングの手段として、本明細書中に記載したような体重制御のモジュレーターの検出および測定方法を提供することである。

【0120】本発明の別のさらなる目的は、哺乳動物において本発明のモジュレーターの活性を模倣または阻害するに潜在的に有効な物質（例えば、薬剤、因子など）のスクリーニングのための方法および関連アッセイシステムを提供することである。

【0121】本発明の別のさらなる目的は、哺乳動物において体重および脂肪含量を制御し、そして／または体重の異常低下または異常上昇が特徴的な性質である特定の病理学的状態を治療するための哺乳動物の処置方法を提供することである。

【0122】本発明のさらなる目的は、遺伝子治療プロトコルにおいて用いられる遺伝子構築物、および／また

は1つまたはそれより多くのモジュレーター、結合パートナー、またはそれらの生産を制御し得るか、またはそれらの活性を模倣または拮抗し得る因子を含むか、またはこれに基づく、同等の治療方法のための薬学的組成物を調製することである。

【0123】他の目的および利点は、以下の例示の図面に関連して進行する続く記載を検討することにより、当業者には明らかである。

【0124】

【発明の実施の形態】本発明は、本明細書においてobポリペプチドまたはレプチン(leptin)と呼ばれるタンパク質、本タンパク質をコードする核酸(例えば、特定の発現系における発現のための最適コドンを取り込み、ここでタンパク質が哺乳動物の体重の制御に関与する能力を示す、その核酸の縮重変異体を含む)の解明および発見に関する。対象となる核酸は、マウスおよびヒトOBポリペプチドに対応するコード配列を示し、体重および脂肪蓄積の調節に重要な役割を果たすとされている。本明細書に示されたデータは、本発明の核酸のポリペプチド産物は、それを発現する細胞によって分泌されることを示し、そしてそのポリペプチドがホルモンとして機能することを示す。別の実験データは、OBポリペプチドが、ob遺伝子の変異を有するマウスの肥満症の治療において非常に有効であることを示す。さらに、OBポリペプチドの高用量の一回投与または中程度の継続用量は、正常(野生型)マウスの重量減少を起こす。

【0125】さらに、本明細書の実施例は、OBポリペプチド(あるいは本明細書において「レプチン」と呼ばれる)が、マウス、ラットおよびヒト血漿内を循環することを示す。レプチンはob/obマウス由来の血漿中には存在せず、db/dbマウス由来の血漿中には10倍高い濃度で存在し、そしてfa/faラット中には20倍高い濃度で存在した。最も有意に、組換えレプチンの連日注入は劇的にob/obマウスの体重を減少し、野生型マウスの体重に有意に影響し、そしてdb/dbマウスには影響を及ぼさない。

【0126】さらなる局面において、1つの種由来のOBポリペプチドは、別の種においても生物学的に活性である。特に、ヒトOBポリペプチドは、マウスにおいて活性である。

【0127】その主な局面において、本発明は、哺乳動物の体重のモジュレーターとして機能する物質の同定に関する。詳細には、本発明は、マウスおよびヒト両者におけるOB遺伝子およびそのコード領域に対応する特定の核酸ならびにこれらの核酸によって発現される対応ポリペプチドの単離、精製、および配列決定に関する。従って、本発明は、図11A-E(配列番号1)ならびに図2AおよびB(配列番号3)に記載のヌクレオチド配列を有する核酸、ならびに縮重変異体、対立遺伝子およびそのフラグメントの発見を含み、そのすべては体重および脂肪蓄積を調製する活性を有する。本核酸のOB遺伝子への対応

は、肥満症ならびに体重の異常が寄与因子となっている他の疾病および機能不全のような状態に重要な影響を与えることを予告する。本発明は、本発明の核酸によって発現されるタンパク質、詳細には図1A-E(配列番号2)、図3(配列番号4)、図5(配列番号5)、および図6(配列番号6)ならびに保存された変異体、活性フラグメント、および同族の小分子にまで拡張する。

【0128】前に記載の通り、重量制御モジュレーターペプチド、またはそれらの結合パートナー、あるいはそれらに対する模倣または拮抗あるいはそれらの生産の制御のいずれかを示す他のリガンドまたは薬剤は、適切なキャリアと共に、そして、体重の異常変動または脂肪蓄積(単独、またはガンまたはAIDSのような有害な医学的状态の一部として)を患う患者に対する種々の手段による投与に対して有効な強度で、その治療のために、薬学的組成物中に調製され得る。種々の投与技術が利用され得、それらの中には、経口投与、鼻および経粘膜投与の他の形態、皮下、静脈内注射および腹腔内注射のような非経口技術、ならびにカテーテル注入などがある。認識因子またはそれらのサブユニットの平均量は変化し得、とくに資格を有する医師または獣医の推奨または処方に基づくべきである。

【0129】上記に従って、体重モジュレーターの活性を模倣または拮抗するのに有効な潜在的薬物をスクリーニングするためのアッセイシステムを調製し得る。重量モジュレーターは、試験システムに導入され得、そして候補薬物も得られた細胞培養物に導入され得、培養物は細胞の活性における任意の変化を観察するためにその後試験され、それは候補薬物単独の添加、または既知重量モジュレーターの添加量の効果による。

【0130】上述の通り、本明細書に記載のOB遺伝子の分子クローニングにより、哺乳動物の体重を調整するために分子レベルで機能する物質のクラスの同定が行われた。本発明のモジュレーターの発見は、栄養疾患の診断および治療について重要な意味を有し、このような疾患には肥満症、ガン関連の重量の消失、および高血圧、心臓病、およびII型糖尿病のような肥満症に関連する疾患の治療が含まれるがこれらには限定されない。さらに、家畜の体重を調整しようとする場合の、その遺伝子産物に対する潜在的な農業上の用途がある。最後に、本発明の1つまたはそれ以上のモジュレーターが分泌された分子である限りは、それらのモジュレーターは、生物学的に使用され、発現クローニングの技術を用いてそれらのレセプターを単離し得る。特にOB遺伝子について以下に行われる考察には、本発明の一部を含有するモジュレーターのクラスへの一般的適応性が含まれ、従って解釈の程度および範囲などと一致される。

【0131】上記の通り、OBペプチドの機能的活性は、トランスジェニックで評価され得る。この点に関して、トランスジェニックマウスモデルが使用され得る。ob遺

伝子は、トランスジェニックマウスを用いる相補試験において使用され得る。候補遺伝子の野生型位置に対応するウイルスベクターまたはコスミドクローン(またはファージクローン)を含むトランスジェニックベクターは、単離されたob遺伝子を用いて構築され得る。コスミドは、公表されている手順[Jaenish, Science, 240:1468-1474(1988)]を用いてトランスジェニックマウスに導入され得る。構築物を、C57BL/6J ob/ob×DBA交雑のF1子孫間の交雑から誘導された受精卵に導入する。これらの交雑は、F1動物を作製するためのC57BL/6J ob/ob卵巣移植体の使用を要する。DBA/2Jマウスは、対比株(counterstrain)として使用する。何故なら、このマウスは、卵巣移植体を用いる際に重要な非アグーティ(nonagouti)外皮色を有するからである。コスミドトランスジェニックマウス動物のob位置での遺伝子型は、緊密に連鎖したRFLPまたは変異の側面に位置し、そして先祖株間で多型であるマイクロサテライトで動物を分類することによって、決定される。相補性は、特定の構築物が遺伝的に肥満性型のF2動物(RFLP分析により評価されたものとして)を痩身型および非糖尿的にする場合に示される。このような環境下では、相補性を決定的に証明するために、トランスジーンを有するob/obまたはdb/db動物を、ob/obまたはdb/db卵巣移植体と交配させる必要がある。この交配において、トランスジーンを有しないすべてのN2動物は肥満型およびインスリン耐性/糖尿病性になるが、トランスジーンを有する動物は痩身型となり、そして正常なグルコースおよびインスリン血漿中濃度を有する。遺伝的意義においては、トランスジーンは抑制変異として作用する。

【0132】あるいは、野生型動物においてアンチセンスの方向で発現される場合の表現型の効果を調べることによって、OB遺伝子を試験し得る。このアプローチにおいて、野生型対立遺伝子の発現は抑制され、変異の表現型が生じる。RNA-RNAの二本鎖形成(アンチセンス-センス)は、mRNAの正常な取り扱いを妨げ、野生型遺伝子の効果の部分的または完全な消失を引き起こす。この技術を用いて、組織培養におけるTK合成の阻害ならびにDrosophilaのKruppel変異およびマウスのShiverer変異の表現型が生じさせられているIzantら、Cell, 36, 1007-1015(1984);Greenら、Annu.Rev.Biochem., 55:569-597(1986);Katsukiら、Science, 241:593-595(1988)。このアプローチの重要な利点は、同種mRNA全体の発現の効果的な阻害のために、遺伝子の小さい部分の発現しか必要としないことである。アンチセンストランスジーンを、それ自身のプロモーターまたは適切な細胞のタイプで発現される別のプロモーターの制御下に置き、かつSV40のポリA部位の上流に置く。このトランスジーンを用いてトランスジェニックマウスを作成する。トランスジェニックマウスはまた、卵巣移植体と接合させて、obヘテロ接合体が、アンチセンス構築物の効果に対してより

感受性であるかどうかについて試験する。

【0133】長期的には、OB遺伝子産物(OBポリペプチドまたはOBタンパク質)の生化学的機能を解明することが、その活性に影響する小分子のアゴニストおよびアンタゴニストを同定するのに有用である。

【0134】本明細書を通して用いられる種々の用語は、例えば以下の本明細書で設定させる定義を有する。

【0135】用語「体重モジュレーター」、「モジュレーター(単数)」、「モジュレーター(複数)」、および具体的に列挙されていないいずれの変異体も、本明細書において相互に入れ換えて用いられ得、そして本出願および請求の範囲で用いられる通り、一つの例でヌクレオチドおよびタンパク質性物質を意味し、後者は単一または多数のタンパク質を包含する。さらに具体的には、前記用語は、ヌクレオチドならびに本明細書に記載の配列および図1A-E(配列番号1)ならびに図2AおよびB(配列番号3)に示される配列を有するDNAにまで及ぶ。同様に、本明細書に記載のアミノ酸配列データならびに図1A~E(配列番号2)および図3(配列番号4)に示されるアミノ酸配列データを有するタンパク質ならびに、本明細書中および請求の範囲の両方における全ての物質について記載されている活性のプロフィールも同様に考慮される。従って、実質的に等価なもしくは変化した活性を示すヌクレオチドについても同様に考慮され、これは実質的に相同なアナログおよび対立遺伝子の変異体を包含する。同様に、実質的に等価なもしくは変化した活性を示すタンパク質で、例えば部位特異的変異によって意図的に改変されたタンパク質、またはモジュレーターを生産する宿主における偶発的な変異によるタンパク質を包含するタンパク質についても同様に考慮される。

【0136】「A」(但し、「A」は、単一のタンパク質、DNA分子、ベクター、組換え宿主細胞など)を有する組成物には、実質的に「B」(但し、「B」は、Aのラセミ体を除く1つまたはそれ以上の混入タンパク質、DNA分子、ベクターなどを含む)が存在せず、この場合、組成物において、重量で少なくとも約75%のタンパク質、DNA、ベクター(これらは、AおよびBが属する種のカテゴリーに依存する)が、「A」である。好ましくは、「A」は、組成物においてA+B種の重量で少なくとも約90%を含み、最も好ましくは、重量で少なくとも約99%を含む。また好ましくは、実質的に混入物が存在しない組成物は、目的の種の活性または特徴を有する単一の分子量種のみを含有する。

【0137】OBポリペプチド

用語「タンパク質」(これは天然に存在するポリペプチドを指す)および「ポリペプチド」は、ob遺伝子産物およびその変異体に関して、本明細書中で交換可能に用いられる。用語「成熟タンパク質」または「成熟ポリペプチド」は特に、シグナル配列(または融合タンパク質パートナー)が除去されたOB遺伝子産物を指す。

【0138】上述したように、特定の実施態様では、本発明のobポリペプチドは、本明細書中に記載したアミノ酸配列(例えば、配列番号2、4、5、6など)を有するポリペプチドを包含し、これは保存的アミノ酸置換で改変されたobポリペプチド、ならびにそれらの生物学的に活性なフラグメント、アナログ、および誘導体を包含する。用語「生物学的に活性」は、ポリペプチドの特定の効果を指すために本明細書中で用いられ、これは特異的結合(例えばレセプター、抗体または他の認識分子に対する)；分子レベルでのシグナル伝達経路の活性化；および/またはインビボで天然obポリペプチドにより仲介される生理的効果の誘導(またはアンタゴニストによる阻害)を包含するが、それらに限定されない。OBポリペプチド(フラグメント、アナログ、および誘導体を包含する)は、合成により、例えば、固相または液相ペプチド合成の周知の技術を用いて、調製され得る。好ましくは、固相合成技術が用いられ得る。あるいは、本発明のOBポリペプチドは、以下に記載されるような周知の遺伝子工学技術を用いて調製され得る。さらに別の実施態様では、OBポリペプチドは、例えば免疫アフィニティー精製により、生体液から精製され得る。生体液は、例えば、血漿、血清、または尿であり、好ましくはヒトの血漿、血清、または尿であり、そしてより好ましくはポリペプチドを過剰発現している被験者、例えばOBレセプターにおいて変異を受けている肥満者または「脂肪性」に対応する変異に関連した肥満症の肥満者に由来する血漿、血清、または尿であるが、これらに限定されない。

【0139】OBポリペプチドのフラグメント

特定の実施態様では、本発明は、天然に存在するOBポリペプチドのフラグメントが重要であり得ることを意図する。ペプチド配列は、しばしばタンパク質分解切断の標的となる多くの部位(例えばアルギニン残基)を含む。完全長ポリペプチドが1つまたはそれより多くの部位で切断され得て、生物学的に活性なフラグメントを形成することが可能である。このような生物学的に活性なフラグメントは、体重を低下させるOBポリペプチドの機能的活性に対して作動的または拮抗的のいずれかに作用し得る。

【0140】OBポリペプチドのアナログ

本発明は、特定のには、OBペプチドのアナログの調製を意図する。このアナログは、OBポリペプチドの生物学的活性を保持し得る、例えばobペプチドの特異的結合パートナー(例えばOBレセプター)に結合し得ることにより特徴づけられる。1つの実施態様では、アナログはOB活性に作動的に作用し、すなわちそれはobペプチドと同様に機能する。好ましくは、OBアゴニストは天然タンパク質よりもより効果的である。例えば、OBアゴニストアナログは、より高い親和性でOBレセプターに結合し得るか、またはインビボでより長い半減期を示し得るか、またはその両方であり得る。それにも関わらず、天然タン

パク質より有効性が低いOBペプチドアゴニストアナログもまた意図される。別の実施態様では、アナログはOB活性に拮抗的に作用する。例えば、OBレセプターに結合するがシグナル伝達を誘導しないOBアナログは、天然OBのレセプターへの結合を競合的に阻害し得、従ってインビボでOB活性を低下させる。このようなOBアンタゴニストアナログはまた、obペプチドと異なる特性を示し得、例えばインビボでのより長い（または短い）半減期、OBレセプターに対するより高い（または低い）結合親和性、またはその両方を示し得る。

【0141】1つの実施態様では、OBペプチドのアナログは、ポリペプチドにおいて構造または機能に必須ではない位置でのアミノ酸置換により改変されたOBペプチドである。例えば、ヒトOBペプチドはマウスにおいて生物学的に活性であるので、マウスアミノ酸配列に比較してヒト配列中の分岐アミノ酸残基を置換することにより、OBペプチドの有用なアナログが得られると思われる。例えば、ヒトの53位または98位、またはその両位置のセリン残基（図4中に図示されるプロセスされていないペプチド配列）は、例えばグリシン、アラニン、バリン、システイン、メチオニン、またはスレオニンと置換され得る。同様に、92位のアルギニン残基（図4）は、例えば、アスパラギン、リジン、ヒスチジン、グルタミン、グルタミン酸、アスパラギン酸、セリン、スレオニン、メチオニン、またはシステインと置換され得る。図4をさらに参照すると、置換可能であると考えられるヒトOBペプチドの他のアミノ酸は、118位のヒスチジン、121位のトリプトファン、122位のアラニン、126位のグルタミン酸、127位のスレオニン、128位のロイシン、132位のグリシン、139位のグリシン、159位のトリプトファン、および166位のグリシンである。別の実施態様では、121位から128位（図4中に図示される）のうち1つ以上の残基を、例えばグリシンまたはアラニンと置換するか、または123位のセリンまたは125位のロイシンを除いて一部の残基を置換することが可能であり得る。

【0142】別の実施態様では、OBポリペプチド（好ましくはヒトOBポリペプチド）のアナログはポリペプチドの短縮型である。例えば、49位のグルタミンは必須ではなく、ペプチドから欠失され得ることが既に実証されている。同様に、121位から128位の分岐アミノ酸残基の一部または全てを欠失させることが可能であり得る。さらに、本発明は、生物学的活性に必要な最少アミノ酸配列を有するOBアナログの提供を意図する。これは、例えば、OBフラグメントの活性を、OB特異的抗体に結合する、天然OBポリペプチドの活性を阻害する、または天然OBペプチドの活性に作動的に作用する能力について試験することにより、容易に決定され得る。1つの実施態様では、本発明は、117位および167位のシステイン残基（図4中に図示される）間で形成するジスルフィド結合により形成されたループ構造からなる短縮型OBポリペ

チドを提供する。別の実施態様では、短縮型アナログは、22位（推定シグナルペプチド切断部位の後に続く）から53位（限定タンパク質分解後のOBポリペプチドの質量分析で検出される可動性ループ領域の直前のアミノ酸残基；Cohenら、Protein Science, 4:1088(1995)を参照のこと）のアミノ酸残基に相当する。別の実施態様では、短縮型アナログは、61位（OBポリペプチドの限定タンパク質分解／質量分析で検出される可動性ループ領域の直後の残基）から116位（最初のシステイン残基の直前の残基）のアミノ酸に相当する。さらに別の実施態様では、短縮型アナログは、61位から167位のアミノ酸に相当する。

【0143】さらに、54位から60位の推定可動性ループの1つ以上の残基が置換される。例えば、1つ以上の残基が、架橋結合（例えばポリマーとの）のために、リジン、グルタミン酸、またはシステイン（好ましくはリジン）と置換され得る。これは、可動性ループ構造はタンパク質の誘導体化に好ましい部位であるからである。あるいは、可動性ループ部分の残基が、タンパク質分解に対してより耐性であるが可動性構造を保持するアミノ酸残基、例えば1つ以上のプロリンと置換され得る。さらに別の実施態様では、さらに誘導体化され得てそれらをより分解（例えばタンパク質分解）に対し耐性にするアミノ酸残基での置換が意図される。

【0144】上記フラグメントサイズは概算であり、そしてジスルフィド結合ループアナログにおいてシステイン残基が維持されねばならないことを除いて、1個から約5個のアミノ酸が、ポリペプチドまたはそのフラグメント、列挙された短縮型アナログの各末端または両末端、あるいは内部に含められ得るかまたは欠失され得ることが、当業者により理解される。

【0145】マウスOBペプチドは50%のαヘリックス量を含有し、そしてヒトOBポリペプチドは約60%のαヘリックス量を含有することが判明している。これらは、生理的条件に近い条件下における組換えペプチドの円偏光二色性により検出される。従って、別の実施態様では、アミノ酸残基が他の残基と置換され得て、OBポリペプチドのアナログを形成し、このアナログは、より安定したαヘリックス構造を形成する傾向の増加を示すかまたは形成する。例えば、Glu、Ala、Leu、His、Trpが、天然OBポリペプチド中で見出されるアミノ酸残基に対する置換基として導入される場合、αヘリックス構造をとりやすい。好ましくは、保存的アミノ酸置換が用いられ、例えば、29位、30位、44位、61位、76位、100位、および／または106位のアスパラギン酸（図4中に図示される）のグルタミン酸（Glu）での置換；イソロイシンのロイシンでの置換；グリシンまたはバリンあるいは任意の分岐アミノ酸のアラニンでの置換（例えばヒトOBポリペプチドの53位のセリンのアラニンでの置換）；アルギニンまたはリジンのヒスチジンでの置換；およびチロシ

ンおよび／またはフェニルアラニンのトリプトファンでの置換が挙げられる。 α ヘリックス構造の程度、またはより重要なことに、 α ヘリックス構造の安定性を高めると、より高い活性、増大された結合親和性、またはより長い半減期を有するOBアナログが得られ得る。特定の実施態様では、22位から53位のアミノ酸残基に相当するOBペプチド部分のヘリックス形成能力が増大される。別の実施態様では、61位から116位のアミノ酸残基のヘリックス形成能力または安定性が増大される。さらに別の実施態様では、117位から167位のアミノ酸に相当するジスルフィドループ構造のヘリックス形成能力が増大される。また、上記ドメインの1つより多くにおいて増大された α ヘリックス能力または安定性を含有するOBアナログが意図される。さらなる実施態様では、短縮型OBポリペプチドアナログは、構造形成性（例えばヘリックス形成性）アミノ酸残基を取り込んで、ポリペプチドフラグメントが安定構造を欠如する傾向がより高いことを補うように生成される。

【0146】フラグメントのようなアナログは、例えば、体重モジュレーターペプチド物質のペプシン消化により生成され得る。ムテイン（mutein）のような他のアナログは、体重モジュレーターペプチドコード配列の標準的な部位特異的変異誘発により生成され得る。プロモーターまたはインヒビターのいずれとして機能するにせよ、小分子などのような「体重モジュレーター活性」を示すアナログは、公知のインビボアッセイおよび／またはインビトロアッセイにより同定され得る。

【0147】OBポリペプチドの小分子アナログおよびペプチド模擬体(peptidomimetics)obポリペプチド（好ましくはヒトOBポリペプチド）の構造は、当該分野で公知の種々の方法により分析され得る。タンパク質配列は親水性分析〔例えば、Hoppら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78:3824 (1981)〕により特徴づけられ得る。親水性プロファイルは、OBポリペプチドの疎水性領域および親水性領域を同定するのに用いられ得、フォールディングされたポリペプチドの内部に埋まっている領域、およびポリペプチドの外部で接近可能な領域を示し得る。さらに、二次構造分析〔例えば、Chouら、Biochem., 13:222 (1974)〕もまた行われ得、特定の二次構造をとるOBポリペプチドの領域を同定し得る。二次構造推定を包含する構造の推定または決定の操作は、当該分野で入手可能なコンピューターソフトウェアプログラムを用いて行われ得る。

【0148】組換えOBポリペプチドの豊富な供給源を提供することにより、本発明は、ポリペプチドの定量的構造決定を可能にする。特に、核磁気共鳴(NMR)、赤外(IR)、ラマン、および紫外(UV)、特に円偏光二色性(CD)分光分析のために、十分な材料が提供される。特に、NMRは、溶液中分子の非常に強力な構造分析を提供し、分子の天然の環境により正確に近づく〔Marionら、

Biochim. Biophys. Res. Comm. 113:967-974 (1983); Barら、J. Magn. Reson., 65:355-360 (1985); Kimuraら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:1681-1685 (1980)〕。他の構造分析方法もまた用いられ得る。これらは、X線結晶構造解析〔Engstrom、Biochem. Exp. Biol., 11:7-13 (1974)〕を包含するが、これに限定されない。

【0149】さらに別の実施態様では、OBポリペプチドのアナログが、天然OBポリペプチドまたはそれらの特定のフラグメントに対して特異的な抗体と交差反応するか否かを決定するために試験され得る。交差反応度は、タンパク質の構造相同性または類似性、あるいはフラグメント特異的な抗体を生成するために用いられるポリペプチド部分に相当する領域の接近可能性についての情報を提供する。

【0150】OBアナログのスクリーニング
ポリペプチドのアナログをスクリーニングするために、種々のスクリーニング技術が当該分野で知られている。化学物質の種々のライブラリーが利用可能である。従って、本発明は、このようなライブラリー（例えば、何年もの研究で生成された合成化合物のライブラリー、天然化合物のライブラリー、および組合せのライブラリー、以下でより詳細に記載する）を、OBポリペプチドのアナログについてスクリーニングすることを意図する。1つの実施態様では、本発明は、このようなライブラリーを抗OBポリペプチド抗体、好ましくは抗ヒトobポリペプチド抗体に結合する化合物についてスクリーニングすることを意図する。別の局面では、一旦OBレセプターが同定されれば（以下を参照のこと）、当該分野で公知の任意のスクリーニング技術がOBレセプターアゴニストまたはアンタゴニストについてスクリーニングするために用いられ得る。本発明は、小分子リガンドまたはリガンドアナログおよび模倣物についてのスクリーニング、ならびにインビボでOBレセプターに結合し、そしてその活性化に作動的または拮抗的に作用する天然リガンドについてのスクリーニングを意図する。

【0151】レセプターの一次配列およびその配列と機能が公知であるタンパク質との類似性を認識することにより、タンパク質のアゴニストまたはアンタゴニストに関する端緒が提供され得る。アンタゴニストの同定およびスクリーニングは、タンパク質の構造特徴を、例えば、X線結晶構造解析、中性子回折、核磁気共鳴分光法、および構造決定のための他の技術を用いて決定することにより、さらに容易になる。これらの技術は、アゴニストおよびアンタゴニストの合理的な設計または同定を提供する。

【0152】別のアプローチは、大きなライブラリーを生成するために組換えバクテリオファージを用いる。

「ファージ法」〔Scottら、Science, 249:386-390 (1990); Cwirlaら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6378-

6382 (1990); Devlinら, Science, 249:404-406 (1990)]を用いて、非常に大きなライブラリーが構築され得る($10^6 \sim 10^8$ 化学的実在(chemical entities))。第2の方法は、主に化学的方法を用いる。この方法としては、Geysen法[Geysenら, Molecular Immunology, 23:709-715 (1986); Geysenら, J. Immunologic Method, 102:259-274 (1987)]およびFodorら, Science, 251:767-773 (1991)による最新法が挙げられる。Furkaら 14th International Congress of Biochemistry, Volume 5, AbstractFR:013 (1988); Furka, Int. J. Peptide Protein Res., 37:487-493 (1991)]; Houghton (米国特許第4,631,211号、1986年12月発行); およびRutterら (米国特許第5,010,175号、1991年4月23日発行)は、アゴニストまたはアンタゴニストとして試験され得るペプチドの混合物を生成する方法を記載している。

【0153】別の局面では、合成ライブラリー[Needelsら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:10700-10704 (1993); Lamら, 国際特許公開第W092/00252号、それぞれその全体が本明細書中に参考として援用されている]などが、本発明のOBレセプターリガンドについてスクリーニングするために用いられ得る。このようなライブラリーを用いれば、レセプターアンタゴニストは、実際にOBレセプターをクローニングしなくても、レセプターを発現する細胞を用いて検出され得る。

【0154】あるいは、組換え型のOBレセプターリガンド結合ドメインを発現する細胞への可溶性リガンドの結合についてのアッセイが行われ得る。この可溶性リガンドは、組換えまたは合成OBポリペプチドとして容易に提供され得る。

【0155】スクリーニングは、OBレセプターを発現する組換え細胞を用いて、あるいは精製レセプタータンパク質(例えば、組換えにより生成された)を用いて、上述のように行われ得る。例えば、分子のリガンド結合部分を含む標識した可溶性または可溶化OBレセプターがリガンドに結合する能力が、上述の参照において記載されるように、ライブラリーのスクリーニングのために用いられ得る。

【0156】OBポリペプチドの誘導体
一般に、本発明のタンパク質(ここで用語「タンパク質」は、他に指示されなければ「ポリペプチド」を包含するように用いられる)は、タンパク質部分への1つ以上の化学部分の結合により誘導体化され得る。化学修飾誘導体は、さらに動脈内、腹腔内、筋内、皮下、静脈内、経口、鼻内、直腸、経頬粘膜(buccal)、舌下、肺、局所、経皮、または他の投与経路についてさらに処方され得る。生物学的に活性なタンパク質の化学修飾は、特定の環境下で付加的な利点を提供することが見出されている。この利点としては、例えば、治療タンパク質の安定性および循環時間の増大および免疫原性の低下が挙げられる。例えば、米国特許第4,179,337号、Davisら、19 50

79年12月18日発行を参照のこと。概説については、Abuchowskiら、「可溶性ポリマー-酵素付加物」、Enzyme as Drugs, 367~383頁、HolcenbergおよびRoberts編、Wiley-Interscience, New York, NY, (1981)を参照のこと。タンパク質修飾および融合タンパク質について記載の概説的文献は、Francis, Focus on Growth Factors, 3:4-10(1992)である。

【0157】誘導体化のための化学部分

誘導体化に適切な化学部分は、水溶性ポリマーの中から選択され得る。選択されるポリマーは、それに結合されるタンパク質が生理的環境のような水性環境で沈澱しないように、水溶性でなければならない。好ましくは、最終産物調製物の治療的使用のために、ポリマーは薬学的に受容可能である。当業者は、ポリマー/タンパク質複合体が治療的に用いられるかどうかというような考慮、そしてもし用いられる場合、所望の投与量、循環時間、タンパク質分解に対する耐性、および他の考慮条件に基づいて、所望のポリマーを選択し得る。本発明のタンパク質およびペプチドについて、これらは本明細書中に提供されるアッセイを用いて確かめられ得る。

【0158】ポリマー分子

水溶性ポリマーは、例えばポリエチレングリコール、エチレングリコール/プロピレングリコールのコポリマー、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、ポリ-1,3-ジオキソラン、ポリ-1,3,6-トリオキサン、エチレン/無水マレイン酸コポリマー、ポリアミノ酸(ホモポリマーまたはランダムコポリマーのいずれか)およびデキストランまたはポリ(n-ビニルピロリドン)ポリエチレングリコール、プロピレングリコールホモポリマー、ポリプロピレンオキシド/エチレンオキシドコポリマー、ポリオキシエチル化ポリオール、およびポリビニルアルコールからなる群から選択され得る。ポリエチレングリコールプロピオンアルデヒドは、その水中での安定性のために製造に利点を提供し得る。

【0159】ポリマーは、任意の分子量であり得、そして分枝または非分枝であり得る。ポリエチレングリコールについて、好ましい分子量は、取り扱いおよび製造に容易であるためには約2 kDaと約100 kDaとの間である

(用語「約」はポリエチレングリコールの調製において、いくらかの分子の分子量が記された分子量よりも高く、いくらかは低いことを示す)。他のサイズは、所望の治療プロファイル(例えば所望の徐放期間、(もしあれば)生物学的活性に対する)効果、取り扱いの容易さ、抗原性の程度または欠如、および治療タンパク質またはアナログに対するポリエチレングリコールの他の既知の効果依存して用いられ得る。

【0160】ポリマー/タンパク質比

そのように結合されるポリマー分子数は変化し得、そして当業者は機能に対するその効果を確かめ得る。モノ誘

導体化され得るか、または同一のまたは異なる化学部分（例えば、ポリマー（例えば異なる分子量のポリエチレングリコール））とジ誘導体化、トリ誘導体化、テトラ誘導体化、または誘導体化の組合せが提供され得る。タンパク質（またはペプチド）分子に対するポリマー分子の割合は、反応混合物におけるそれらの濃度の変化につれて変化する。一般に、最適比（過剰な非反応タンパク質またはポリマーが存在しない反応効率に関する）は、

【0161】タンパク質への化学部分の結合

ポリエチレングリコール分子（または他の化学部分）

は、タンパク質の機能性または抗原性ドメインにおける効果を考慮してタンパク質に結合されるべきである。当業者に利用可能な多くの結合方法がある（例えば、本明細書中に参考として援用されるEP 0 401 384（PEGのG-CSFへのカップリング））。Malikら、Exp.Hematol., 20: 1028-1035 (1992)（塩化トレスルを用いるGM-CSFのPEG 20化を報告）もまた参照のこと。例えば、ポリエチレングリコールは、反応基（例えば遊離アミノまたはカルボキシル基）を介してアミノ酸残基に共有結合され得る。反応基は、活性化ポリエチレングリコール分子が結合され得る基である。遊離アミノ基を有するアミノ酸残基は、リジン残基およびN末端アミノ酸残基を含み、遊離カルボキシル基を有するアミノ酸残基は、アスパラギン酸残基、グルタミン酸残基、およびC末端アミノ酸残基を含む。スルフヒドリル基もまた、ポリエチレングリコール 30分子を結合させるための反応基として用いられ得る。治療目的のために好ましいのは、アミノ基での結合、例えば、N末端またはリジン基での結合である。レセプター結合に重要な残基での結合は、レセプター結合が所望である場合避けられるべきである。

【0162】N末端化学修飾タンパク質

特にN末端化学修飾タンパク質を所望し得る。本発明の組成物の例示としてポリエチレングリコールを用いる場合、種々のポリエチレングリコール分子（分子量、分枝などでの）、反応混合物中におけるタンパク質（またはペプチド）分子に対するポリエチレングリコール分子の 40割合、実施されるPEG化反応のタイプ、および選択されたN末端PEG化タンパク質を得る方法から選択され得る。N末端PEG化調製物を得る（すなわち、必要であれば他のモノPEG化部分からこの部分を分離する）方法は、PEG化タンパク質分子の集団からN末端PEG化物質を精製することにより行われ得る。選択的N末端化学修飾は、還元アルキル化により行われ得、特定のタンパク質における誘導体化に利用可能な異なるタイプのもとのアミノ基（N末端に対してリジン）の異なる反応性を用いる。適切な反応条件下で、ポリマーを含むカルボニル基 50

によるN末端でのタンパク質の実質的に選択的な誘導体化が達成される。例えば、タンパク質のリジン残基のεアミノ基とN末端残基のαアミノ基との間のpK_a差を利用し得るpHで反応を行うことにより、タンパク質を選択的にN末端でPEG化し得る。このような選択的誘導体化により、水溶性ポリマーのタンパク質への結合が制御される：ポリマーとの複合体化は、タンパク質のN末端で優勢的に生じ、そして他の反応基（例えばリジン側鎖アミノ基）の有意な修飾は生じない。還元アルキル化を用いる場合、水溶性ポリマーは上記のタイプであり得、そしてタンパク質にカップリングするため1つの反応性アルデヒドを有するべきである。ポリエチレングリコールプロピオンアルデヒド（1つの反応性アルデヒドを含む）は用いられ得る。

【0163】OBポリペプチドに関連する核酸

上記のように、本発明はobポリペプチドをコードする核酸、およびOB遺伝子関連ゲノムの5'、3'、およびイントロンの非コード配列に関する。それゆえ本発明に従って、当該分野の技術範囲において従来の分子生物学、微生物学、および組換えDNA技術が使用され得る。このような技術は文献中に十分に説明されている。例えば、Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、第2版、Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1989); Glover編、DNA Cloning: A Practical Approach、第I巻および第II巻、MRL Press, Ltd., Oxford, U.K. (1985); Gait編、Oligonucleotide Synthesis、Oxford University Press (1984); Hamesら編、Nucleic Acid Hybridization、Springer-Verlag (1985); Hamesら編、Transcription And Translation、Oxford University Press (1984); Freshney編、Animal Cell Culture、Oxford University Press (1986); Immobilized Cells And Enzymes、IRL Press (1986); Perbal、A Practical Guide To Molecular Cloning、Wiley、New York (1984)を参照のこと。本発明に特に関連するのは、遺伝子または核酸の、周知のポリメラーゼ連鎖反応(PCR)技術に基づいた単離、クローニング、配列決定、解析、および特徴付けの戦略である。

【0164】「レプリコン」は、インピボにおけるDNA複製の自律的なユニットとして機能する、すなわちそれ自身の制御のもとに複製し得る任意の遺伝的要素（例えば、プラスミド、染色体、ウイルス）である。

【0165】「ベクター」は、プラスミド、ファージ、またはコスミドのような、他のDNAセグメントを結合して、結合されたセグメントの複製をもたらし得るレプリコンである。

【0166】「カセット」は、特定の制限部位でベクターに挿入し得るDNAのセグメントを意味する。DNAのセグメントは目的のポリペプチドをコードし、そしてカセットおよび制限部位は、転写および翻訳のための適切な読

みとり枠(reading frame)でのカセットの挿入を確実にするように設計される。

【0167】「異種」DNAは、細胞内または細胞の染色体部位に天然には位置しないDNAを意味する。好ましくは、異種DNAは細胞にとって外来の遺伝子を包含する。

【0168】細胞は外因性または異種DNAによりこのようなDNAが細胞内に導入されるとき、「トランスフェクト」される。トランスフェクトされたDNAが表現型の変化をもたらすとき、細胞は外因性または異種DNAにより「トランスフォーム」される。好ましくはトランスフォームDNAは染色体DNAに組み込まれて(共有結合で結合されて)細胞のゲノムを構成するべきである。

【0169】「クローン」は単一の細胞または有糸分裂による共通の祖先に由来する細胞の集団である。

【0170】「核酸分子」は一本鎖型または二本鎖ヘリックスにおけるリン酸エステル重合形態のリボヌクレオシド(アデノシン、グアノシン、ウリジン、またはシチジン;「RNA分子」)またはデオキシリボヌクレオシド(デオキシアデノシン、デオキシグアノシン、デオキシチミジン、またはデオキシシチジン;「DNA分子」)を意味する。二本鎖のDNA-DNA、DNA-RNA、およびRNA-RNAヘリックスが可能である。核酸分子という用語(詳細にはDNAまたはRNA分子)は、分子の1次および2次構造のみを意味し、そしていずれの特定の3次または4次形態に限定しない。それゆえ、この用語はとりわけ直鎖または環状のDNA分子(例えば、制限フラグメント)、プラスミド、および染色体に見出される二本鎖DNAを包含する。特定の二本鎖DNA分子の構造について記載する場合、配列は本明細書中で、DNAの非転写ストランド(すなわちmRNAに相同な配列を有するストランド)に沿って5'から3'の方向の配列のみを示す通常の慣例にしたがって記載され得る。「組換えDNA分子」は分子生物学的操作を経たDNA分子である。

【0171】核酸分子は、cDNA、ゲノムDNA、またはRNAのような他の核酸分子と、核酸分子の一本鎖形態が他の核酸分子と適切な温度および溶液イオン強度の条件下でアニールし得るときに「ハイブリダイズし得る」(Sambrookら、(1989)上記を参照のこと)。温度およびイオン強度の条件はハイブリダイゼーションの「厳密性(stringency)」を決定する。相同な核酸のための予備スクリーニングには、低い厳密性のハイブリダイゼーション条件(55°Cの T_m に相当)が使用され得る(例えば、5×SSC、0.1% SDS、0.25% ミルク、およびホルムアミドなし;または30%ホルムアミド、5×SSC、0.5% SDS)。中程度の厳密性のハイブリダイゼーション条件はより高い T_m 値に相当する(例えば、40%ホルムアミド、5×または6×SSC)。高い厳密性のハイブリダイゼーション条件は、最も高い T_m 値に相当する(例えば、50%ホルムアミド、5×または6×SSC)。ハイブリダイゼーションには相補的な配列を含有する2種の核酸が必要であるが、ハイブ

リダイゼーションの厳密性に依存して塩基間のミスマッチが可能である。核酸をハイブリダイズするための適切な厳密性は、核酸の長さおよび相補性の程度に依存し、当該分野に周知の程度で変化をする。2種のヌクレオチド配列の類似性または相同性が大きければ大きいほど、それらの配列を有する核酸のハイブリッド形成のための T_m 値は大きくなる。核酸ハイブリダイゼーションの相対的安定性(より高い T_m に相当する)は以下の順序で減少する: RNA:RNA、DNA:RNA、DNA:DNA。長さが100ヌクレオチドを超えるハイブリッド形成には T_m 算出のための方程式が導かれている(Sambrookら、(1989)上記、9.50-0.51を参照のこと)。より短い核酸、すなわちオリゴヌクレオチド、とのハイブリダイゼーションにはミスマッチの位置がより重要となり、そしてオリゴヌクレオチドの長さはその特異性を決定する(Sambrookら、(1989)上記、11.7-11.8を参照のこと)。好ましくは、ハイブリダイズし得る核酸の最小の長さは少なくとも約10ヌクレオチドである;より好ましくは、少なくとも約15ヌクレオチドである;最も好ましくは、長さが少なくとも約20ヌクレオチドである。

【0172】「相同的組換え」はベクター中の外来DNAの染色体内への挿入を意味する。好ましくは、ベクターは特異的な染色体の部位を相同的組換えの標的とする。特異的な相同的組換えのために、ベクターは染色体の配列に相同な十分に長い領域を含むことで、相補的結合およびベクターの染色体への取り込みを実現させる。相同性の領域がより長く、そして配列類似性の程度がより大きいと、相同的組換えの効率が増加し得る。

【0173】DNA「コード配列」は、適切な調節配列の制御下に置かれたときにインビトロまたはインビボにおいて細胞内でポリペプチドに転写および翻訳される二本鎖のDNA配列である。コード配列の境界は5'(アミノ)末端の開始コドンおよび3'(カルボキシル)末端の翻訳終止コドンによって決定される。コード配列は原核生物の配列、真核生物のmRNA由来のcDNA、真核(例えば、哺乳類)DNA由来のゲノムDNA配列、および合成DNA配列をも、包含し得るがこれらに限定されない。コード配列が真核細胞内での発現を意図される場合は、ポリアデニル化シグナルおよび転写終結配列がコード配列の3'側に通常位置される。

【0174】OBコード配列およびフランキング配列の単離

本発明により意図される核酸は、記載の通り、本明細書の図1A~D(配列番号2)、図3(配列番号4)、図5(配列番号5)、および図6(配列番号6)に示すようなペプチドの発現をコードする他の核酸まで及ぶ。したがって、ob遺伝子に関連して特異的なDNAが単離および配列決定される一方、いずれの動物細胞も潜在的に本発明のペプチドをコードする遺伝子の分子クローニングの核酸供給源として利用し得る。DNAはクローニングDNA(例え

ば、「DNAライブラリー」)から、化学合成により、cDNAクローニングにより、もしくは所望の細胞より精製したゲノムDNA、またはそのフラグメントのクローニングにより得られ得る(例えば、Sambrookら、(1989)、上記; Glover、(1985)、上記を参照のこと)。ゲノムDNA由来のクローンは調節およびイントロンのDNA領域、さらにコード領域を含有し得る; cDNA由来のクローンはイントロンの配列を含有しない。供給源が何であれ、遺伝子は、その遺伝子の増幅のために適切なベクターに分子的にクローン化される。

【0175】ゲノムDNA由来の遺伝子の分子クローニングでは、ゲノムDNAはcDNA配列から選択されたプライマーを使用して増幅され得る。あるいは、DNAフラグメントが作成され、そのいくつかが所望の遺伝子をコードする。DNAは特異的な部位で種々の制限酵素を使用して切断され得る。DNAをフラグメント化するためにDNアーゼをマンガン存在下で使用し得、またはDNAは、例えば超音波処理によって物理的に剪断され得る。直鎖DNAフラグメントはサイズに従って標準的な技術により分離され得るこのような標準的な技術として、アガロースならび

にポリアクリルアミドゲル電気泳動、およびカラムクロマトグラフィーが挙げられるがそれらに限定されない。

【0176】いったんDNAフラグメントが作成されると、所望のobまたはob様遺伝子を含有する特異的なDNAフラグメントの同定は多くの方法によって達成され得る。例えば、一定量のobまたはob様遺伝子の部分またはその特異的なRNA、あるいはそのフラグメントを入手し得て精製および標識し得る場合は、生じたDNAフラグメントは標識プローブに対する核酸ハイブリダイゼーションによりスクリーニングされ得る(Bentonら、Science, 196:180 (1977); Grunsteinら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72:3961 (1975))。本発明は、このような核酸プローブを提供し、これは本明細書中で開示される特異的な配列から容易に調製され得る。例えば、図1A～E(配列番号1)または図2AおよびB(配列番号3)に記載される配列の少なくとも10、好ましくは15ヌクレオチドフラグメントに相当するヌクレオチド配列を有するハイブリダイズし得るプローブがある。好ましくは、フラグメントは本発明のモジュレーターペプチドに高度に特有であるように選択される。プローブに対して実質的に相同であるDNAフラグメントがハイブリダイズする。上記のように、相同性の程度が大きければ大きいほど、より厳密なハイブリダイゼーション条件が使用され得る。1つの実施態様において、低い厳密性のハイブリダイゼーション条件が相同性のモジュレーターペプチドを同定するために使用される。しかし、好ましい局面において、および本明細書中で実験的に示されるように、本発明のモジュレーターペプチドをコードする核酸は、図1A～E(配列番号1)または図2AおよびB(配列番号3)に記載されるようなヌクレオチド配列を有する核酸、または中

程度に厳密な条件でハイブリダイズし得るそのフラグメントにハイブリダイズする; より好ましくは、核酸は高い厳密性の条件でハイブリダイズする。

【0177】あるいは、遺伝子の存在は、それが発現される生産物の物理的、化学的、または免疫学的特性に基づいたアッセイにより検出され得る。例えば、cDNAクローン、または適切なmRNAをハイブリッドで選択する(hybrid-select) DNAクローンが選択され得、本発明のモジュレーターペプチドについて既知の特性と類似または同一の、電気泳動の移動度、等電点電気泳動上の挙動、プロテアーゼ切断マップ、チロシンホスファターゼ活性、または抗原特性を有するタンパク質を生産する。例えば、本発明の抗体は他の供給源に由来するモジュレーターペプチドのホモログのスクリーニングに容易に利用され得る。

【0178】本発明のモジュレーターペプチドをコードする遺伝子はまた、mRNA選択、すなわち核酸ハイブリダイゼーションおよびそれに続くインビトロトランスレーション、により同定され得る。この手順において、フラグメントは、相補的mRNAをハイブリダイゼーションによって単離するために使用される。そのようなDNAフラグメントは入手可能な精製されたモジュレーターDNAを示し得る。単離されたmRNAの生産物のインビトロトランスレーション生産物の、免疫沈降分析または機能的アッセイ(例えば、チロシンホスファターゼ活性)によりmRNAが同定され、それゆえ所望の配列を含有する相補的DNAフラグメントが、同定される。さらに、特異的なmRNAは、細胞から単離されたポリソームの、モジュレーターペプチドに対して特異的な固定化抗体への吸着により選択され得る。

【0179】放射性標識されたモジュレーターペプチドcDNAは、(吸着されたポリソームから)選択されたmRNAを鋳型として使用して合成され得る。次に放射性標識されたmRNAまたはcDNAは他のゲノムDNAフラグメントの中から相同なモジュレーターペプチドDNAフラグメントを同定するためのプローブとして使用され得る。

【0180】上記のように、本明細書中で開示される体重モジュレーターペプチドをコードするDNA配列は、クローン化によらず合成で調製され得る。DNA配列は、体重モジュレーターペプチドのアミノ酸配列に適切なコードをもって設計され得る。一般に配列を発現に使用する場合は、意図する宿主にとって好ましいコードを選択する。標準的な方法で調製し、そして完全なコード配列に組み合わせた重複するオリゴヌクレオチドから、完全な配列を組み立てる。例えば、Edge, Nature, 292:756 (1981); Nambairら、Science, 223:1299 (1984); Jayら、J. Biol. Chem., 259:6311 (1984)を参照のこと。

【0181】上記のように、合成DNA配列は体重モジュレーターのアナログを発現する遺伝子の簡便な構築を可能にする。あるいは、アナログをコードするDNAは天然

のOB遺伝子またはcDNAの部位特異的突然変異によって作製され得、そしてアナログは従来のポリペプチド合成を使用して直接作製され得る。

【0182】非天然アミノ酸のタンパク質への部位特異的組み込みのための一般的な方法はNorenら、Science, 244:182-188 (1989)に記載されている。本方法は非天然アミノ酸をもつobポリペプチドのアナログの作製に使用され得る。

【0183】非コード核酸

本発明は、アンチセンスヌクレオチドおよびリボザイム 10の調製にまで及び、本発明を用いて体重モジュレータータンパク質の発現を翻訳レベルで妨げ得る。本アプローチでは、アンチセンス核酸およびリボザイムを利用して、特異的なmRNAの翻訳をブロックするが、これは、mRNAをアンチセンス核酸でマスクするかあるいはリボザイムで切断することによる。

【0184】アンチセンス核酸は、特異的なmRNA分子の少なくとも一部に相補的なDNAまたはRNA分子である(Weintraub, Sci. Am., 262:40-46 (1990); Marcus-Sekura, Anal. Biochem., 172:289-295 (1988)を参照のこと)。 20細胞内においてアンチセンス核酸はmRNAにハイブリダイズして二本鎖分子を形成する。細胞はこの二本鎖の形態に複合体化されたmRNAを翻訳しない。それゆえ、アンチセンス核酸はmRNAのタンパク質への発現を妨げる。約15ヌクレオチドのオリゴマーおよびAUG開始コドンにハイブリダイズする分子は特に効率的である。なぜならそれらは合成が容易であり、そして体重モジュレーターペプチド産生細胞に導入する際に生じる問題が、より大きな分子の場合よりも少ないと思われるからである。アンチセンス法は多くの遺伝子のインビトロにおける発現を阻 30害するために使用されている(Marcus-Sekura, (1988)、上記; Hamborら、J. Exp. Med., 168:1237-1245 (1988))。

【0185】リボザイムは、他の一本鎖RNA分子をDNA制限エンドヌクレアーゼにいくぶん類似する様式で特異的に切断する能力を有するRNA分子である。リボザイムは、ある種のmRNAがそれ自身のイントロンを削除する能力を有するという観察から発見された。これらのRNAのヌクレオチド配列を改変することにより、研究者らはRNA分子における特異的なヌクレオチド配列を認識し、そ 40して切断する分子を設計し得る(Cech, J. Am. Med. Assoc., 260:3030-3034 (1988))。これらのリボザイムは配列特異的であるので、特定の配列を有するmRNAのみが不活化される。

【0186】研究者らは2タイプのリボザイム、Tetrahymenaタイプおよび「ハンマーヘッド」タイプ、を同定した。Tetrahymenaタイプリボザイムは4塩基配列を認識し、「ハンマーヘッド」タイプは11~18塩基配列を認識する。認識配列が長ければ長いほど、標的mRNA種により限定されて起こり得る。それゆえ、ハンマーヘッドタ 50

イプリボザイムはTetrahymenaタイプリボザイムよりも特異的なRNA種の不活化において好ましく、そして18塩基認識配列はより短い認識配列よりも好ましい。

【0187】それゆえ、本明細書中に記載のDNA配列は、体重モジュレータータンパク質およびそのリガンドのmRNAに対するアンチセンス分子およびmRNAを切断するリボザイムの調製に使用され得、それゆえob遺伝子の発現を阻害し、そして体重増加および肥満に導く。

【0188】他の実施態様において、OB核酸のコード鎖および相補鎖、またはOB遺伝子の5'、3'、あるいはコード領域の内部の(イントロンの)非コード領域に相補的な短いオリゴヌクレオチドが本発明により提供される。そのような核酸は直接標識されたオリゴヌクレオチドプローブ、またはポリメラーゼ連鎖反応のプライマーのいずれかとしてプローブに有用であり、ob遺伝子内の突然変異の存在、またはOBmRNAの発現レベルの評価を目的とする。好ましくは、本発明の非コード核酸はヒトOB遺伝子由来である。

【0189】特定の実施態様において、非コード核酸は、増幅し得る遺伝子および/または他の調節配列をOB遺伝子の付近に組み込ませるための相同的組換えを目的とし、例えばOBポリペプチドの高レベルの発現、またはOBポリペプチドの適切な発現レベルを妨げるob遺伝子調節配列における変異の克服を目的とする(国際特許公報第W0 91/06666号、1991年5月16日Skoultchiにより公開、; 国際特許公報第W0 91/09955号、1991年7月11日Chappelにより公開、; また国際特許公報第W0 90/14092号、1990年11月29日KucherlapatiおよびCampbellにより公開、を参照のこと)。

【0190】OBポリペプチドの生産: 発現および合成転写および翻訳制御配列はプロモーター、エンハンサー、ターミネーターなどのようなDNA調節配列であり、宿主細胞におけるコード配列の発現を目的とする。真核細胞においては、ポリアデニル化シグナルは制御配列である。

【0191】RNAポリメラーゼがコード配列をmRNAに転写し、次いでこのmRNAがトランスRNAスプライシングを受け、そしてコード配列によってコードされるタンパク質に翻訳されるとき、コード配列は細胞内において転写および翻訳制御配列の「制御下」にある。

【0192】「シグナル配列」は細胞の表面に発現されるタンパク質のコード配列の始めに含まれる。この配列は成熟ポリペプチドのN-末端側にあるシグナルペプチドをコードし、ポリペプチドの輸送を宿主細胞に指示する。用語「輸送シグナル配列」もまた本明細書中に用いられ、この種類のシグナル配列を意味する。輸送シグナル配列は各種の真核生物および原核生物由来のタンパク質に関して見出され得、しばしば両方のタイプの生物において機能的である。

【0193】DNA配列は発現制御配列に、発現制御配列

がDNA配列の転写および翻訳を制御および調節するとき、「作動可能に連結される」。用語「作動可能に連結される」とは、発現されるDNA配列の前に適切な開始シグナル(例えば、ATG)を有すること、および発現制御配列の制御下でのDNA配列の発現およびDNA配列にコードされる所望の生産物の生産をもたらすために正しい読みとり枠を維持することを包含する。組換えDNA分子に挿入しようとする遺伝子が適切な開始シグナルを含有しない場合は、このような開始シグナルがその遺伝子の上流(5')およびその遺伝子を有する読みとり枠内に挿入され得る。

【0194】「プロモーター配列」は細胞内でRNAポリメラーゼと結合して下流(3'方向)のコード配列の転写を開始させ得るDNA調節領域である。本発明を明確にする目的のためには、プロモーター配列はその3'末端で転写開始部位により境界付けられ、そしてバックグラウンド以上の検出し得るレベルの転写を開始するために必要な最小数の塩基または要素を含有するように上流(5'方向)に延長する。プロモーター配列の内部には、転写開始部位(例えばS1ヌクレアーゼによるマッピングにより容易に定義される)、およびRNAポリメラーゼの結合するタンパク質結合ドメイン(コンセンサス配列)が見られる。

【0195】本発明の別の特徴は、本明細書中で開示されるDNA配列の発現である。当該分野において公知のように、DNA配列はそれを適切な発現ベクター内の発現制御配列に作動可能に連結し、そして発現ベクターを適切な単細胞宿主にトランスフォームするために使用することによって発現し得る。

【0196】そのような発現制御配列への本発明のDNA配列の作動可能な連結は、当然、必ずしもDNA配列の一部でない場合でも、開始コドンであるATGの、DNA配列上流の正しい読みとり枠への提供を包含する。

【0197】多種多様な宿主/発現ベクターの組み合わせが、本発明のDNA配列の発現に使用され得る。有用な発現ベクターは、例えば、染色体、非染色体、および合成DNA配列のセグメントからなり得る。適切なベクターは、SV40の誘導体および公知の細菌プラスミド、例えば、大腸菌プラスミドcolE1、pCR1、pBR322、pMB9、pUC、またはpUCプラスミド誘導体、例えば、pGEXベクター、pETベクター、pmal-c、pFLAGなど、およびそれらの誘導体、RP4のようなプラスミド；ファージDNA、例えば、多数のλファージの誘導体、例えば、NM989、および他のファージDNA、例えば、M13および線状一本鎖ファージDNA；2 μプラスミドまたはその誘導体のような酵母プラスミド；昆虫または哺乳類細胞において有用なベクターのような真核細胞において有用なベクター；ファージDNAまたは他の発現制御配列を使用するように改変したプラスミドのような、プラスミドおよびファージDNAの組み合わせから誘導されるベクターなどを含有する。好ましい実施態様において、obの発現はメチロトロ

フ酵母、例えば、*Pichia pastoris*酵母において達成される(例えば、国際特許公報第WO 90/03431号、1990年4月5日Brierleyらにより公開；国際特許公報第WO 90/10697号、1990年9月20日Siegelらにより公開、を参照のこと)。下記の特定の実施態様において、発現ベクターがα接合因子シグナル配列の制御下でのobの発現のために設計される。任意の多種多様な発現制御配列、作動可能に連結されたDNA配列の発現を制御する配列、がこれらのベクターにおいて本発明のDNA配列を発現させるために使用され得る。そのような有用な発現制御配列は、例えばSV40の初期または後期プロモーター、CMV、ワクシニア、ポリオーマまたはアデノウィルス、lacシステム、trpシステム、TACシステム、TRCシステム、LTRシステム、λファージのメジャーオペレーターおよびプロモーター領域、fdコートタンパク質の制御領域、3-ホスホグリセリン酸キナーゼまたはその他の解糖系酵素のプロモーター、酸性ホスファターゼ(例えば、Pho5)のプロモーター、メチロトロフ酵母のAOX1プロモーター、酵母α-接合因子のプロモーター、および原核細胞または真核細胞、あるいはそれらのウィルスの遺伝子の発現を制御することが公知である他の配列、およびそれらの種々の組み合わせを包含する。

【0198】多種多様な単細胞宿主細胞もまた、本発明のDNA配列の発現において有用である。これらの宿主は、*E. coli*、*Pseudomonas*、*Bacillus*、*Streptomyces*、；酵母などの菌類(*Saccharomyces*、および*Pichia*、*Candida*、*Hansenula*、および*Torulopsis*のようなメチロトロフ酵母)；および、CHO、R1.1、B-W、およびLM細胞、アフリカミドリザル肝臓細胞(例えば、COS1、COS7、BSC1、BSC40、およびBMT10)、昆虫細胞(例えば、Sf9)、およびヒト細胞のような動物細胞、ならびに組織培養の植物細胞のような周知の真核性および原核性宿主を包含し得る。

【0199】すべてのベクター、発現制御配列、および宿主が、本発明のDNA配列を発現するために同等に良好に機能するわけではないと理解される。いずれの宿主も同一の発現系に同等に良好に機能するわけではない。しかし、当業者は適切なベクター、発現制御配列、および宿主を、所望の発現を達成するために必要以上に実験をしたり、本発明の範囲を逸脱することなく選択し得る。例えば、ベクターの選択において、宿主を考慮する必要がある、なぜならベクターは其中で機能するはずであるからである。ベクターのコピー数、コピー数の制御能、および抗生物質マーカーのようなベクターにコードされる他のいずれのタンパク質の発現も考慮され得る。

【0200】発現制御配列の選択において、種々の因子が通常考慮される。これらは例えば、系の相対的な強度、その制御能、および、特に取り得る2次構造に関して、その発現される特定のDNA配列または遺伝子との適合性を包含する。適切な単細胞宿主は、例えば選択され

たベクターとの適合性、分泌特性、タンパク質を正確にフォールディングする能力、および発酵要求性、ならびに発現されるDNA配列にコードされる生産物の宿主に対する毒性、および発現生産物の精製の容易さを考慮することによって選択される。

【0201】これらおよびその他の因子を考慮して当業者は、本発明のDNA配列を発酵または大規模動物細胞培養において発現する種々のベクター/発現制御配列/宿主の組み合わせを構築し得る。

【0202】特定の実施態様において、OB融合タンパク質が発現され得る。OB融合タンパク質は、少なくとも機能的に活性なOBポリペプチドの部分にペプチド結合によって結合された少なくとも機能的に活性な非OBタンパク質の部分を含む。非ob配列はOB配列のアミノまたはカルボキシ末端であり得る。より好ましくは、タンパク質分解的に不活性なOB融合タンパク質の安定な発現のためには、非OB融合タンパク質の部分はOBタンパク質のアミノ末端にペプチド結合によって結合される。このような融合タンパク質をコードする組換えDNA分子は、OBコード配列に読み取り枠内で結合された少なくとも機能的に活性な非OBタンパク質の部分をコードする配列を含み、好ましくは、特異的なプロテアーゼ例えば、トロンビンまたは第Xa因子に対する切断部位を、好ましくはOB-非OB連結部でコードする。特定の実施態様において、融合タンパク質は*Escherichia coli*または*P. pastoris*において発現される。

【0203】下記の特の実施態様において、ベクターはマウスおよびヒトob遺伝子を、gln-49のコドンを持しておよび有さないで、細菌発現系および酵母(*Pichia*)発現系において融合タンパク質として発現するために調製した。ob遺伝子は例えばPCRおよび新規なプライマーを使用して、エンドヌクレアーゼ切断部位を有して調製される。PCRによって生じた配列を確認するのが望ましい、なぜなら本技術に関しては点突然変異を含む可能性がより高いからである。ヒスチジンtag(His-Tag)およびプロテアーゼ切断部位を含むプラスミドが使用される。ヒスチジンの存在により組換えタンパク質のNi-キレートカラムまたはアフィニティー精製により選択的単離が可能になる。プロテアーゼ切断部位(下記の特の実施態様ではトロンビン切断部位)が設計されプロテアーゼ(例えばトロンビン)による処理で完全長の成熟(すなわちシグナル配列を欠く)OBポリペプチドを放出する。

【0204】他の局面において、pGEXベクター(Smithら、Gene 67:31-40 (1988))が使用され得る。本ベクターは住血吸虫(*Schistosoma japonicum*)グルタチオンS-トランスフェラーゼcDNAを目的の配列に融合する。細菌のタンパク質を回収し、組換えタンパク質を還元型グルタチオンアフィニティーカラムで迅速に精製し得る。GSTキャリアーは後に部位特異的なプロテアーゼを用いた切

断によって融合タンパク質から切断され得る。切断の後、キャリアーおよび切断されなかった融合タンパク質はグルタチオンアガロースへの吸着によって除去され得る。この系は、コードされるタンパク質が水溶液に不溶性である場合、時おり問題が生じる。

【0205】細菌系における組換えタンパク質の発現は、発現タンパク質の不正確なフォールディングを生じ得、再フォールディングが必要である。組換えタンパク質を切断の前または後に再フォールディングし、機能的に活性なOBポリペプチドを形成し得る。OBポリペプチド、は以下の工程により再フォールディングされる：

(i)タンパク質の還元剤を含む変成バッファー中でインキュベートする工程、(ii)タンパク質を酸化剤、好ましくはタンパク質安定化剤またはカオトロピック剤の一方または両方もまた含む緩衝液中でインキュベートする工程。適切な酸化還元(還元/酸化剤)の対は以下を含むがそれに限定されない、還元型グルタチオン/グルタチオンジスルフィド、シスチン/システイン、シスタミン(cystamine)/システアミン、および2-メルカプトエタノール/2-ヒドロキシエチルジスルフィド。特定の局面において、融合タンパク質は還元バッファーに交換する前に尿素のような変成剤中で可溶化され得る。好ましい実施態様においては、タンパク質は還元バッファーに交換する前に例えば、イオン交換クロマトグラフィーまたはNi-キレートクロマトグラフィーによっても精製される。変成剤は尿素および塩酸グアニジンを含むがそれに限定されない。次に組換えタンパク質を少なくとも約10倍以上に、より好ましくは約100倍に、0.1M Tris-HCl, pH 8.0、1mM EDTA、0.15M NaCl、0.3M酸化型グルタチオンのような、しかし限定されない、酸化剤を含む酸化バッファーに希釈する。次に融合タンパク質は約1から約24時間、好ましくは約2から約16時間、室温で酸化バッファー中でインキュベートされる。酸化バッファーは、例えば糖、アルコール、または硫酸アンモニウムのようなタンパク質安定化剤を含み得る。酸化バッファーはさらにカオトロピック剤を低濃度で含有して、不正確な分子間相互作用を不安定化し、それゆえに適切なフォールディングを促進する。適切なカオトロピック剤としては、界面活性剤、ポリオール、L-アルギニン、塩酸グアニジン、およびポリエチレングリコール(PEG)が挙げられるがそれに限定されない。十分に低濃度のカオトロピック剤を使用してタンパク質の変成を避けることが重要である。再フォールディングしたタンパク質は少なくとも約10倍以上に、より好ましくは酸化バッファーに希釈されたもとの量に濃縮される。

【0206】細菌発酵方法はまた、受容され得ないレベルのエンドトキシンを含むタンパク質調製物を生じさせ得る。それゆえ、本発明は、例えばエンドトキシン特異的な抗体または他のエンドトキシン結合分子を使用したそのようなエンドトキシンの除去を意図する。エンド

トキシンの存在はE-TOXATE試薬(Sigma, St.Louis, Missouri)の使用、またはバイオアッセイのような標準的な技術によって決定され得る。

【0207】特定の実施例に加え、本発明者はバキュロウィルス、哺乳類、および酵母発現系のobタンパク質の発現への使用を意図する。例えば、バキュロウィルス発現系において、pVL941 (BamHIクローニング部位; Summers)、pVL1393 (BamHI, SmaI, XbaI, EcoRI, NotI, XmaII, BglII, およびPstIクローニング部位; Invitrogen)、pVL1392(BglII, PstI, NotI, XmaIII, EcoRI, XbaI, SmaI, およびBamHIクローニング部位; SummersおよびInvitrogen)、およびpBlueBacIII (BamHI, BglII, PstI, NcoI, およびHindIIIクローニング部位、青色/白色組換え体スクリーニング可能; Invitrogen)のような、しかし限定されない非融合トランスファーベクター、およびpAc700 (BamHIおよびKpnIクローニング部位、BamHI認識部位は開始コドンから始まる; Summers)、pAc701およびpAc702 (pAc700と同様、異なる読みとり枠を有する)、pAc360 (ポリヘドリン開始コドンの36塩基対下流のBamHIクローニング部位; Invitrogen (195))、およびpBlueBacHisA、B、C (3種の異なる読みとり枠、BamHI, BglII, PstI, NcoI, およびHindIIIクローニング部位、ProBond精製のためのN-末端ペプチド、およびブルーの青色/白色組換え体スクリーニング; Invitrogen (220))のような、しかし限定されない融合トランスファーベクターの両方が包含される。

【0208】本発明において使用を意図する哺乳類発現ベクターはジヒドロ葉酸レダクターゼ(DHFR)プロモーターのような誘導性プロモーターを有するベクターを包含する。それは例えば、DHFR発現ベクター、またはpED (PstI, SalI, SbaI, SmaI, およびEcoRIクローニング部位、クローン化遺伝子およびDHFRの両方を発現するベクター; Kaufmann, Current Protocols in Molecular Biology, 16.12 (1991)を参照のこと)のようなDHFR/メトトレキセート共増幅ベクターの任意な発現ベクターである。あるいは、pEE14 (HindIII, XbaI, SmaI, SbaI, EcoRI, およびBclIクローニング部位、ベクターはグルタミンシンターゼおよびクローン化遺伝子を発現; Celltech)のようなグルタミンシンターゼ/メチオニンスルフォキシミン共増幅ベクター。その他の実施態様における、pREP4 (BamHI, SfiI, XhoI, NotI, NheI, HindIII, NheI, PvuII, およびKpnIクローニング部位、構成的RSV-LTRプロモーター、ヒグロマイシン選択マーカー; Invitrogen)、pCEP4 (BamHI, SfiI, XhoI, NotI, NheI, HindIII, NheI, PvuII, およびKpnIクローニング部位、構成的hCMV即時初期遺伝子、ヒグロマイシン選択マーカー; Invitrogen)、pMEP4 (KpnI, PvuI, NheI, HindIII, NotI, XhoI, SfiI, BamHIクローニング部位、誘導性メタロチオネインIIa遺伝子プロモーター、ヒグロマイシン選択マーカー; Invitrogen)、pREP8 (BamHI, XhoI, Not

I, HindIII, NheI, およびKpnIクローニング部位、RSV-LTRプロモーター、ヒスチジノール選択マーカー; Invitrogen)、pREP9 (KpnI, NheI, HindIII, NotI, XhoI, SfiI, およびBamHIクローニング部位、RSV-LTRプロモーター、G418選択マーカー; Invitrogen)、およびpEBVHis (RSV-LTRプロモーター、ヒグロマイシン選択マーカー、ProBond樹脂で精製可能で、そしてエンテロキナーゼで切断されるN-末端ペプチド; Invitrogen)などのようなエプスタイン-バーウィルス (Epstein Barr Virus) (EBV)の制御下でのエピソーム発現に導くベクター。本発明において使用される選択し得る哺乳類発現ベクターは、pRc/CMV (HindIII, BstXI, NotI, SbaI, およびApaIクローニング部位、G418選択; Invitrogen)、pRc/RSV (HindIII, SpeI, BstXI, NotI, XbaIクローニング部位、G418選択; Invitrogen)などを含む。本発明に従って使用されるワクシニアウィルス哺乳類発現ベクター(Kaufman, (1991)、上記を参照のこと)は、pSC11 (SmaIクローニング部位、TK-およびβ-gal選択)、pMJ601 (SalI, SmaI, AflI, NarI, BspMII, BamHI, ApaI, NheI, SacII, KpnI, およびHindIIIクローニング部位; TK-およびβ-gal選択)、およびpTKgptFIS (EcoRI, PstI, SalI, AccI, HindII, SbaI, BamHI, およびHpaクローニング部位、TKまたはXPRT選択)などを含むがそれに限定されない。

【0209】酵母発現系もまた本発明に従ってOBポリペプチドの発現に使用され得る。例えば、非融合pYES2ベクター (XbaI, SphI, ShoI, NotI, GstXI, EcoRI, BstXI, BamHI, SacI, KpnI, およびHindIIIクローニング部位; Invitrogen)または融合pYESHisA、B、C (XbaI, SphI, ShoI, NotI, BstXI, EcoRI, BamHI, SacI, KpnI, およびHindIIIクローニング部位、ProBond樹脂で精製され、エンテロキナーゼで切断されるN-末端ペプチド; Invitrogen)の2例のみ挙げるが、本発明に従って使用され得る。

【0210】体重モジュレーターペプチドアナログが、本発明の範囲に由来するスクレオチド配列から調製され得ることがさらに意図される。

【0211】OBポリペプチドの組換え発現に加え、本発明は、OBポリペプチド、またはそのフラグメントの、周知で高度に開発された固相ペプチド合成技術を用いての、調製を想定し完全に可能にする。本発明は一般的なBocおよびFmocの両方、およびその他の保護基ストラテジーのobポリペプチドまたはそのフラグメントの調製への使用を意図する。再フォールディングおよびシステイン側鎖の酸化をしてジスルフィド結合を形成する種々の技術もまた当該分野に周知である。

【0212】OBポリペプチドに対する抗体

本発明に従い、組換えまたは化学合成で生産したOBポリペプチド、およびそのフラグメントまたはその他の誘導体あるいはアナログ (融合タンパク質を含む) は、OBポ

リペプチドを認識する抗体を生じさせるための免疫原として使用され得る。そのような抗体はポリクローナル、モノクローナル、キメラ、一本鎖、Fabフラグメント、およびFab発現ライブラリーを含むがそれに限定されない。

【0213】分子は、免疫グロブリン(抗体)またはT細胞抗原レセプターのような免疫系の抗原認識分子と特異的に相互作用し得るときに「抗原性」である。抗原性のポリペプチドは少なくとも約5個、好ましくは少なくとも約10個アミノ酸を含有する。分子の抗原性部分は、抗体またはT細胞レセプター認識に免疫優先である部分であり得、または免疫感作のために抗原性部分をキャリア分子にコンジュゲートすることにより分子に対する抗体を生じさせるのに使用される部分であり得る。抗原性の分子はそれ自身が免疫原性である、すなわちキャリアなしで免疫応答を引き起こし得る、必要はない。

【0214】「抗体」は特異的なエピトープに結合する任意の免疫グロブリンであり、この免疫グロブリンには抗体およびそのフラグメントが含まれる。この用語はポリクローナル、モノクローナル、キメラ抗体(米国特許第4,816,397号および同第4,816,567号にさらに詳細に記載)、ならびにFab、F(ab')₂、およびF(v) (一本鎖抗体を含む)を含む抗体の抗原結合部分を含む。従って、語句「抗体分子」は、本明細書中で用いられる種々の文法的形態において、インタクトな(intact)免疫グロブリン分子および抗体結合部位を含有する免疫グロブリン分子の免疫的に活性な部分の両方を意図する。「抗体結合部位」は抗原に特異的に結合するH鎖およびL鎖の可変および超可変領域から構成され抗体分子の構造的部分である。抗体分子の例としては、インタクトな免疫グロブリン分子、実質的にインタクトな免疫グロブリン分子、および当該分野においてFab、Fab'、F(ab')₂、およびF(v)として公知の部分を含むパレート含有する免疫グロブリンの部分が挙げられる。

【0215】抗体分子のFabおよびF(ab')₂部分はパパインおよびペプシンそれぞれのタンパク質分解反応により調製され、実質的にインタクトな抗体分子については周知の方法による。例えば、米国特許第4,342,566号、Theofilopolousらを参照のこと。Fab'抗体分子部分もまた周知であり、そしてF(ab')₂部分から、メルカプトエタノールで二本のH鎖部分を連結しているジスルフィド結合を還元し、続いて得られたタンパク質メルカプタンをヨードアセトアミドのような試薬でアルキル化して生産される。インタクトな抗体分子を含む抗体が本明細書中において好ましい。

【0216】語句「モノクローナル抗体」は種々の文法的形態において、特定の抗原と免疫反応し得る抗体結合部位を1種類のみ有する抗体を意味する。モノクローナル抗体はそれゆえ、それが免疫反応する任意の抗原に対して単一の結合親和性を典型的に提示する。従って、モ

ノクローナル抗体は、複数の、それぞれが異なる抗原に免疫特異的な抗体結合部位を有する抗体分子、例えば2特異性(キメラ)モノクローナル抗体、を含み得る。

【0217】用語「アジュバント」は抗原に対する免疫応答を増強する化合物または混合物を意味する。アジュバントは、徐々に抗原を放出する組織貯蔵所として、また免疫応答を非特異的に増強するリンパ系活性因子として作用し得る[Hoodら、Immunology, 384頁、第2版、Benjamin/Cummings, Menlo Park, California (1984)]。しばしば、抗原のみによる、アジュバント非存在下の、1次の免疫は、体液性または細胞性免疫応答を引き起こし得ない。アジュバントは完全フロイントアジュバント、不完全フロイントアジュバント、サポニン、水酸化アルミニウムのようなミネラルゲル、リソレシチンのような表面活性物質、プルロニックポリオール、ポリアニオン、ペプチド、油または炭化水素エマルジョン、キーホールリンペットヘモシアニン、ジニトロフェノール、およびBCG(bacille Calmette-Guerin)およびCorynebacterium parvumのような潜在的に有用なヒトアジュバントを包含するがそれに限定されない。好ましくは、アジュバントは薬学的に受容される。

【0218】当該分野に公知の種々の工程が、OBポリペプチド、あるいはそのフラグメント、誘導体、またはアナログに対するポリクローナル抗体の生産に使用され得る。抗体の生産のためには、ウサギ、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギなどを含むがそれに限定されない種々の宿主動物が、OBポリペプチドまたはその誘導体(例えば、フラグメントまたは融合タンパク質)の注入によって免疫され得る。1つの実施態様において、OBポリペプチドまたはそのフラグメントは、例えばウシ血清アルブミン(BSA)またはキーホールリンペットヘモシアニン(KLH)の免疫原性キャリアーに結合され得る。種々のアジュバント、フロイント(完全および不完全)、水酸化アルミニウムのようなミネラルゲル、リソレシチンのような表面活性物質、プルロニックポリオール、ポリアニオン、ペプチド、油エマルジョン、キーホールリンペットヘモシアニン、ジニトロフェノール、およびBCG(bacille Calmette-Guerin)およびCorynebacterium parvumのような潜在的に有用なヒトアジュバントを含むがそれに限定されない、が宿主種に依存して、免疫学的応答を増加させるために使用され得る。

【0219】OBポリペプチド、あるいはそのフラグメント、アナログ、または誘導体に関するモノクローナル抗体の調製のためには、培養中の連続的細胞株による抗体分子の生産を提供する任意の技術が使用され得る。これらの技術は、Kohlerら(Nature, 256:495-497 (1975))によって最初に開発されたハイブリドーマ技術、ならびにヒトB細胞ハイブリドーマ技術であるトリオーマ技術(Kozbrら、ImmunologyToday, 4:72 (1983))、およびヒトモノクローナル抗体を生産するためのEBV-ハイブリド-

マ技術[Coleら、Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy、77-96頁、Alan R. Liss, Inc., (1985)]を包含するがそれに限定されない。不死の抗体生産細胞株は、Bリンパ吸の癌遺伝子DNAによる直接トランスフォーメーション、またはエプスタイン-バーウィルスによるトランスフェクションなどの融合以外の技術により作製され得る(例えば、M. Schreierら、「Hybridoma Techniques」(1980); Hammerlingら、「Monoclonal Antibodies And T-cell Hybridomas」(1981); Kennettら、「Monoclonal Antibodies」(1980)を参照のこと; また米国特許第4,341,761号; 同第4,399,121号; 同第4,427,783号; 同第4,444,887号; 同第4,451,570号; 同第4,466,917号; 同第4,472,500号; 同第4,491,632号; および同第4,493,890号を参照のこと)。

【0220】本発明のさらなる実施態様において、モノクローナル抗体は近年の技術を利用して無菌動物において生産され得る(PCT/US90/02545)。本発明に従って、ヒト抗体は使用され得、そしてヒトハイブリドーマを使用して[Coteら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80:2026-2030 (1983)]、またはヒトB細胞をEBVウィルスによりインビトロにおいてトランスフォームすることにより(Coleら、1985、上記)、獲得され得る。実際、本発明に従い、「キメラ抗体」[Morrisonら、J. Bacteriol., 159:870 (1984); Neubergerら、Nature, 312:604-608 (1984); Takedaら、Nature, 314:452-454 (1985)]の生産のために、obポリペプチドに特異的なマウス抗体分子からの遺伝子と適切な生物学的活性のヒト抗体分子からの遺伝子とを組み継ぐことによって開発された技術が使用され得る; そのような抗体は本発明の範囲内である。このようなヒトまたはヒト化キメラ抗体は、ヒトの疾病または疾患の治療における使用(以下で記載)に好ましい、なぜならヒトまたはヒト化抗体は異種移植抗体よりもそれ自身で免疫応答、特にアレルギー反応を引き起こす可能性が非常に低いからである。

【0221】本発明に従って、一本鎖抗体の生産のために記載された技術(米国特許第4,946,778号)、がOBポリペプチド特異的一本鎖抗体の生産に適応され得る。本発明のさらなる実施態様は、Fab発現ライブラリーの構築のために記載される技術[Huseら、Science, 246:1275-1281 (1989)]が、obポリペプチド、あるいはその誘導体またはアナログに対する所望の特異性を有するモノクローナルFab断片の迅速で容易な同定をもたらすために利用する。

【0222】抗体分子のイディオタイプを含有する抗体フラグメントを公知の技術により生じさせ得る。例えば、そのようなフラグメントは、抗体分子のペプシン消化で生産され得るF(ab')₂フラグメント、F(ab')₂フラグメントのジスルフィド架橋の還元で生じさせ得るFab'フラグメント、および抗体分子をパパインおよび還元剤で処理して生じさせ得るFabフラグメントを含むが、それ

に限定されない。

【0223】抗体の生産において、所望の抗体のスクリーニングは当該分野に公知の技術、例えば、ラジオイムノアッセイ、ELISA(酵素免疫吸着測定法)、「サンドウィッチ」イムノアッセイ、イムノラジオメトリックアッセイ、ゲル拡散沈降反応、免疫拡散測定法、インサイチュイムノアッセイ(例えば、金コロイド、酵素、または放射性同位元素標識物使用)、ウェスタンブロット、沈降反応、凝集測定法(例えば、ゲル凝集測定法、血液凝集測定法)、補体結合測定法、免疫蛍光測定法、プロテインA測定法、および免疫電気泳動測定法など、により達成され得る。1つの実施態様において、抗体は1次抗体の標識を検出することにより検出される。他の実施態様において、1次抗体は2次抗体または試薬の1次抗体の結合を検出することにより検出される。さらなる実施態様において、2次抗体は標識される。イムノアッセイにおける結合の検出のための多くの方法が当該分野において公知であり、本発明の範囲内にある。例えば、OBポリペプチドの特異的なエピトープを認識する抗体を選択するために、このようなエピトープを含有するOBポリペプチドフラグメントに結合する生産物について、生じたハイブリドーマをアッセイし得る。特定の動物種からのOBポリペプチドに特異的な抗体の選択のために、動物種の細胞から発現または単離されるOBポリペプチドとの陽性結合に基づいて選択し得る。

【0224】上記の抗体はOBポリペプチドの位置測定(localization)および活性に関連して、例えば、ウェスタンブロットティング、インサイチュにおけるOBポリペプチドのイメージング、適切な生理学的サンプル中のそのレベルの測定など、当該分野で公知の方法で使用され得る。

【0225】特定の実施態様において、OBポリペプチドの活性を作動的または拮抗的に作用する抗体を生じ得る。そのような抗体は後述のリガンド同定のためのアッセイを使用して試験され得る。

【0226】特定の実施態様において、抗体は、タンパク質の配列から予想された合成ペプチドまたは細菌発現ベクターを使用して作製された組換えタンパク質でウサギを免疫して開発される。合成ペプチドの選択は上記のように、予想されるタンパク質構造の慎重な解析によりなされる。特に、推定上の切断部位の間のペプチド配列が選択される。合成ペプチドはKLHヘモシアニンまたはBSAのようなキャリアーにカルボジイミドを使用して結合され、フロイントアジュバント中でウサギの免疫に使用される。組換えタンパク質を調製するために、pGEXベクターがポリペプチドの発現に使用され得る(Smithら、1988、上記)。あるいは、親水性ドメインのみが融合タンパク質を生じさせるために使用され得る。発現タンパク質は大量に調製されフロイントアジュバント中でウサギの免疫に使用される。

【0227】他の特定の実施態様において、組換えOBポリペプチドはニワトリの免疫に使用され、ニワトリ抗OB抗体は卵黄から、例えば、OBカラムのアフィニティ精製によって、回収される。好ましくは、免疫に使用されるニワトリは特定の無病原体(SPF)状態に保たれる。

【0228】他の実施態様において、レプチンに対する抗体が、循環OBタンパク質を欠くob/obマウスにおいて生じ、それゆえ抗OBポリペプチド応答を生じる得ると期待される、なぜなら、それはポリペプチドおよび野生型マウスにたいして寛容でないからである。

【0229】さらなる実施態様において、組換えOBポリペプチドはウサギの免疫に使用され、ポリクローナル抗体は以後の使用前に免疫精製される。精製された抗体は、半定量的アッセイ、特に血清または血漿中の循環OBポリペプチドの存在の検出に、特に有用である。

【0230】モジュレーターペプチドに対して生産されたモノクローナル抗体のパネルは種々の特性、すなわちイソタイプ、エピトープ、親和性など、についてスクリーニングされ得る。特に重要なのはモジュレーターペプチドの活性を中和するモノクローナル抗体である。そのようなモノクローナルは体重モジュレーターの活性アッセイで容易に同定される。高親和性抗体はまた、天然のまたは組換えモジュレーターの免疫親和性精製が可能であるときに有用である。

【0231】好ましくは、本発明の診断および治療方法に使用される抗モジュレーター抗体は親和性精製されたポリクローナル抗体である。より好ましくは、抗体はモノクローナル抗体(mAb)である。さらに、本明細書中で使用される抗モジュレーター抗体は、抗体分子全体のFab、Fab'、F(ab')₂、またはF(v)の形態であることが好ましい。

【0232】診断用途

本発明はまた、本発明の体重モジュレーターに媒介される活性を引き出すそれらの能力に関連して、体重の異常または脂肪症に影響を与える状態および/または刺激の存在を検出する方法を包含する、種々の診断への応用に関する。上に記載したように、体重モジュレーターペプチドは種々の公知の技術により本ペプチドに対する抗体を産生するために使用され得、次いでこのような抗体が単離され、そして対象の標的細胞における特定の転写活性の存在についての試験において使用され得る。あるいは、本発明の核酸は診断に使用され得る。

【0233】抗体に基づいた診断

上に示唆したように、本発明において有用な診断法は、抗モジュレーター抗体、好ましくはアフィニティ精製したポリクローナル抗体、より好ましくはモノクローナル抗体(mAb)のようなモジュレータータンパク質に対するアンタゴニストの有効量を含むアッセイによって細胞サンプルまたは培養液を試験することを包含する。さらに、本明細書中で使用される抗モジュレーター抗体分子

は、好ましくは抗体分子全体のFab、Fab'、F(ab')₂、あるいはF(v)部分の形態または抗体分子全体である。既に論じたように、この方法からの利益を得られ得る患者は癌、AIDS、肥満症または異常な体重が特徴または因子となる他の状態を患う患者を含む。モジュレーターを単離し、そして抗モジュレーター抗体を誘導する方法および抗モジュレーター抗体の能力を測定し、そして最適化して標的細胞の試験を援助する方法は当該分野に周知である。

10 【0234】また、ポリクローナルおよびモノクローナル抗体の両方を含む抗体、および体重モジュレーターおよび他の認識因子および/またはそのサブユニットの産生または活性を調節する薬物は、ある種の診断への応用を有し得、例えば、体重の異常が発症しているかあるいは発達しそうであり得る状態を検出および/または測定する目的のために利用され得る。例えば、モジュレーターペプチドまたはその活性なフラグメントは、例えば、融合されたマウス脾臓リンパ球および骨髓腫細胞を利用するハイブリドーマ技術のような公知の技術によって、種々の細胞培地中に自身に対するポリクローナルおよびモノクローナル両方の抗体を産生することに使用され得る。これらの技術については以下に詳細に記載する。同様に、本発明のレセプター認識因子の活性を模倣するまたはそれに拮抗する小分子が発見または合成され得、診断的および/または治療的プロトコルに使用され得る。

【0235】細胞中の体重モジュレーターの存在は、このような測定に応用され得る通常の免疫学的手順によって確認され得る。多くの有用な手順が公知である。3つのこのような特に有用な手順は、検出可能な標識で標識されたレセプター認識因子、検出可能な標識で標識された抗体Ab₁、または検出可能な標識で標識された抗体Ab₂を利用する。手順は以下の式で要約され、ここで式中のアステリスク(*)は粒子が標識されていることを示し、「WM」は体重モジュレーターを表す。

【0236】A. $WM^* + Ab_1 = WM^* Ab_1$

B. $WM + Ab_1^* = WM Ab_1^*$

C. $WM + Ab_1 + Ab_2^* = Ab_1 WM Ab_2^*$

手順およびその応用はすべて当業者に周知であり、従って本発明の範囲で利用され得る。「競合」手順、手順A、は米国特許第3,654,090号および同第3,850,752号に記載されている。手順Bは周知の競合アッセイ技術の典型である。手順C、「サンドウィッチ」手順、は米国特許第RE 31,006号および同第4,016,043号に記載されている。さらに「2重抗体」、または「DASP」手順のような他の手順が公知である。

【0237】各々の場合において、体重モジュレーターは1つまたはそれ以上の抗体または結合パートナーと複合体を形成し、複合体の1つのメンバーが検出可能な標識で標識されている。複合体が形成された事実および、

所望する場合その量は、標識の検出に応用され得る公知の方法により測定され得る。

【0238】 Ab_2 の特徴的特性はそれが Ab_1 と反応することであることが上記から理解される。なぜなら、これは1種の哺乳類種から生じた Ab_1 が、その他の動物種において抗体 Ab_2 を生じる抗原として使用されたからである。例えば Ab_2 は、ウサギ抗体を用いて、ヤギ中で生じさせ得る。 Ab_2 はそれゆえヤギで生じた抗ウサギ抗体である。本明細書中および特許請求の範囲の目的のために、 Ab_1 は1次または抗体重モジュレーター抗体を意味し、そして Ab_2 は2次または抗 Ab_1 抗体を意味する。

【0239】これらの研究のために最も一般的に使用される標識は、放射性要素、酵素、紫外光線にさらすと蛍光を発する化学物質などである。

【0240】多くの蛍光物質が公知であり標識として利用され得る。これらは例えば、フルオレセイン、ローダミンおよびオーラミンを含む。特定の検出物質はヤギで調製された抗ウサギ抗体であり、イソチオシアネートによりフルオレセインと結合される。

【0241】体重モジュレーターまたはその結合パートナーは放射性要素または酵素で標識され得る。放射性標識は任意の現在入手し得る計数手順により検出され得る。好ましい同位体元素は、 3H 、 ^{14}C 、 ^{32}P 、 ^{35}S 、 ^{36}Cl 、 ^{51}Cr 、 ^{57}Co 、 ^{58}Co 、 ^{59}Fe 、 ^{90}Y 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、および ^{186}Re から選択され得る。

【0242】酵素標識は同様に有用であり、任意の現在利用される比色、分光光度、蛍光分光光度、電流測定またはガス測定の技術により検出され得る。酵素は選択された粒子にカルボジイミド、ジイソシアネート、グルタルアルデヒドのような架橋分子を用いた反応により結合される。これらの手順で使用され得る多くの酵素が公知であり、そして利用され得る。好ましくは、ペルオキシダーゼ、 β -グルクロニダーゼ、 β -D-グルコシダーゼ、 β -D-ガラクトシダーゼ、ウレアーゼ、グルコースオキシダーゼ+ペルオキシダーゼおよびアルカリ性ホスファターゼである。米国特許第3,654,090号；同第3,850,752号；および同第4,016,043号が他の標識物質および方法の開示例として引用される。

【0243】本発明のさらなる実施態様において、医学専門家による使用に適切な試験キットが、対象の標的細胞における所定の転写活性の有無、あるいは所定の転写活性を測定するために調製され得る。上記の試験技術に従って、このようなキットの1つのクラスは少なくとも標識された体重モジュレーターまたはその結合パートナー、例えばそれに特異的な抗体、およびもちろん、例えば「競合」、「サンドウィッチ」、「DASP」などの選択された方法に依存して、説明書を含有する。キットはバッファー、安定化剤などの周辺試薬もまた含有し得る。

【0244】従って、試験キットは所定の転写活性につ

いて細胞での存在または能力を示すために調製され得、以下のものを含有する：

(a) 所定量の少なくとも1つの標識された免疫化学的に反応性の成分であって、検出されるレベルの本発明の体重モジュレーターまたはその特異的な結合パートナーの直接的または間接的な付着により得られる成分；

(b) 他の試薬；および

(c) そのキットの使用説明書

より具体的には、診断試験キットは以下のものを包含し得る：

(a) 既知の量の上記の体重モジュレーター(または結合パートナーであって)一般に固相に結合して免疫吸着剤を形成するか、あるいは適切なタグ、または複数のそれらの最終産物など(またはそれらの結合パートナー)の各々の1つに結合した、体重モジュレーター；

(b) 必要な場合、他の試薬；および

(c) そのキットの使用説明書。

【0245】さらなる多様性において、試験キットは上記の目的のために調製および使用され、所定のプロトコール(例えば、「競合」、「サンドウィッチ」、「2重抗体」など)に従って作用し、以下のものを包含する：

(a) 体重モジュレーターを検出し得る標識に結合して得られる標識された成分；

(b) 1つまたはそれ以上の別の免疫化学的試薬であって少なくとも1つの試薬がリガンドまたは固定化されたリガンドであり、リガンドが以下からなる群より選択される免疫化学的試薬：

(i) 標識された成分(a)に結合可能なリガンド；

(ii) 標識された成分(a)の結合パートナーに結合可能なリガンド；

(iii) 測定しようとする単一または複数の成分の少なくとも1つに結合可能なリガンド；および

(iv) 測定しようとする少なくとも1つの単一または複数の成分の少なくとも1つの結合パートナーに結合可能なリガンド；ならびに

(c) 体重モジュレーターとその特異的な結合パートナーとの間の免疫化学的反応の1つまたはそれ以上の成分の検出および/または測定のプロトコールの実施のための説明書。

【0246】核酸に基づいた診断

下記の実施例に示すように、本発明の核酸は、結果として肥満表現型を生じるOBポリペプチドにおける欠陥に関連する欠陥の検出に使用され得る。例えば、核酸プローブ(例えば、ノーザン解析またはRT-PCR解析)が肥満表現型がOBmRNA発現の欠損、または非機能性OBmRNAの発現、例えば、db/dbマウス(その欠陥はOBレセプターの欠損から生じる)または突然変異により非転写mRNAを生じる場合、のいずれと関連するのかを決定するために使用される。そのうえ、本発明の核酸に基づいた診断技術は抗体に基づいた技術とともに使用され得、さらなる肥満また

は無食欲症の表現型の分子的理解を進展させる。

【0247】近年単離されたヒトcDNAクローンが本明細書中で示すように配列決定された。これによりヒト遺伝子の完全な配列の決定が容易になった(図20A~C; 配列番号22を参照のこと)。ヒトOB遺伝子のイントロンからのDNA配列が得られ(図20)、そしてこれらはOB遺伝子の突然変異または対立遺伝子変異体(allelic variant)を同定するためにヒトゲノムDNAからOB遺伝子のコード配列をPCR増幅するためのPCRプライマーを調製するために使用され、すべては本明細書中で上に詳細に記載したプロトコルに従う。ヒトゲノムOBの増幅のための特異的なPCRプライマーは下記の特定の実施例に記載される。

【0248】最新の仮説では、ob遺伝子におけるヘテロ接合体の突然変異は軽度/中程度の肥満に関連し、一方ホモ接合体の突然変異は肥満のためのいくつかのDNA配列に基づいた診断的試験に関連する。これが真実であれば、発症のおそれのある人々の肥満の進行についての確認が行え、体重の増加が完全に進行する前に薬物治療および/または生活様式の変化の適用が可能になる。

【0249】あるいは、変異型ヒトOBとともに分離するマイクロサテライト(microsatellite)の存在が診断に使用され得る。(図20A~Cに提供されるヌクレオチド配列に基づいたプライマーを含む)種々のPCRプライマーが、これに関して使用され得る。

【0250】OB遺伝子はまた、特に栄養障害においてそのコードするRNAおよびタンパク質の測定に診断上有用であり得る。特定の栄養障害において、OB RNAおよび/またはそれにコードされるタンパク質が調節されていないかまたは負の調節がなされているかを知ることは重要である。それゆえ、肥満型の人々がOBレベルの増加を有する場合は、問題はOBの下流にありそうであり、一方OBが減少していれば、OBの不適切に低いレベルが肥満の原因であり得る(欠陥がOB遺伝子内であるか否かにかかわらず)。逆に、体重を落とした癌またはAIDSの患者が上昇したレベルのOBを有する場合は、不適切に高いOBの発現が体重低下の原因であると結論され得る。

【0251】クローン化されたヒトcDNAはヒトOB RNAのレベルの測定に使用される。さらに、組換えヒトタンパク質は調製され、そしてOBタンパク質の脂肪およびおそらく血漿レベルの測定を可能にするイムノアッセイの開発に使用される。

【0252】治療用途

本発明のポリペプチド、核酸、および抗体は顕著な治療能力を有する。

【0253】好ましくは、このような試薬の治療有効量を、薬学的に受容可能なキャリア、希釈剤、または賦形剤中で投与する。

【0254】用語「薬学的に受容可能な」は、ヒトに投与する場合、生理学的に許容可能であり、代表的にはアレルギーまたは同様の厄介な反応(例えば、胃の不調、

めまいなど)を起こさない分子の実体および組成物を意味する。好ましくは、本明細書で用いる場合、用語「薬学的に受容可能な」は、動物における、そしてさらに特定すればヒトにおける使用のために、連邦または州政府の規制局により認可されていること、もしくは米国薬局方(U.S. Pharmacopeia)、または他の一般に認められた薬局方に列挙されていることを意味する。用語「キャリア」は、化合物とともに投与される希釈剤、アジュバント、賦形剤、またはビヒクルを意味する。このような薬学的なキャリアは、水、および油などの滅菌した液体であり得、これらは、ピーナツ油、大豆油、鉱油、ゴマ油などのような石油、動物、植物、または合成起源の液体を含む。好ましくは、水、または生理食塩水およびデキストロース水溶液およびグリセロール溶液が、キャリアとして、特に注射液として使用される。適切な薬学的キャリアは、Martin, Remington's Pharmaceutical Science, 第18版, Mack Publishing Co., Easton, PA, (1990)に記載されている。

【0255】本明細書中で用いられる用語「治療有効量」は、宿主の活性、機能、および応答において、臨床的に重篤な欠陥を少なくとも約15%、好ましくは少なくとも50%、さらに好ましくは少なくとも90%減少するために、そして最も好ましくは予防するに十分な量を意味する。あるいは、治療有効量は、宿主の、臨床的に重篤な症状を改善するに十分である。

【0256】組換えOBポリペプチドの投与は、体重減少、特に脂肪組織の減少をもたらす。本明細書で先に全てを詳細に記述したように、OBポリペプチドは、標準の、細菌および/または哺乳動物発現ベクターを用いて、合成的に、調製され得、または血漿または血清から精製され得る。あるいは、天然OBポリペプチドの増加した発現が、上記のように相同組換え技術により誘導され得る。

【0257】OBポリペプチド活性の減少(アンタゴニスト、インヒビター、中和抗体の使用、またはアンチセンス分子を開発することによる)は、癌、AIDS、または神経性食欲不振にともなう体重減少の処置が望まれる場合、体重増加の結果を生じる。OB活性の調整は、体重の減少(その活性を増加することによる)または体重の増加(その活性を減少することによる)に有用であり得る。

【0258】ポリペプチドを基礎にした治療処置最も単純な分析では、OB遺伝子は、哺乳動物、特にマウスおよびヒトで体重を決定する。OB遺伝子産物および対応して同種の分子は、脂肪組織が脳および他の器官と連絡するシグナル経路の一部分であるようである。OBポリペプチドはそれ自身がシグナル分子、すなわちホルモンであると考えられている。

【0259】OBポリペプチド、または機能的に活性なその断片、またはそのアンタゴニストは、経口または非経口、好ましくは非経口的に投与され得る。なぜなら、代

謝恒常性は連続的なプロセスであり、OBポリペプチドの制御された放出投与が好ましいからである。例えば、ポリペプチドは、静脈内注入、移植性浸透圧ポンプ、経皮パッチ、リポソーム、または他の投与様式を用いて投与され得る。1つの実施態様では、ポンプが用いられ得る[Langerら編、Medical Applications of Controlled Release, CRC Pres., Boca Raton, Florida(1974); Sefton, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng., 14:201 (1987); Buchwaldら、Surgery, 88:507 (1980); Saudekら、N. Engl. J. Med., 321:574 (1989)]。別の実施態様では、ポリマー材料が用いられ得る[Langer、1974、前出; Sefton、1987、前出; Smolenら編、Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Wiley, New York (1984); Rangerら、J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem., 23:61(1983); 以下も参照のこと、Levyら、Science, 228:190 (1985); Duringら、Ann. Neurol., 25:351 (1989); Howardら、J. Neurosurg., 71:105 (1989)]。さらに別の実施態様では、制御された放出系は治療標的(すなわち、脳)に近接して配置され得、従って、全身投与量の一画分のみを必要とする[例えば、Goodson, Medical Applications of Controlled Release, 第2巻、115-138頁(1984)参照]。他の制御放出系は、Langer、Science, 249:1527-1533(1990)による総説で述べられている。別の実施態様では、治療用化合物は、小胞、特にリポソームを用いて送達され得る(Langer、1990 前出、を参照); Treatら、Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer, Lopez-BeresteinおよびFidler(編)、Liss, New York, 353-365頁(1989); Lopez-Berestein、同書、317-327頁; 一般に同書を参照)。

【0260】さらなる局面において、OB遺伝子でトランスフォームされた組換え細胞および高レベルのポリペプチドを発現する細胞は、OBポリペプチドを必要とする被験体に移植され得る。好ましくは、拒絶を避けるために、OBでトランスフォームされた自己の細胞が移植される; あるいは、免疫認識および拒絶を防ぐポリマーマトリックス内に、可溶性因子を生産する非自己の細胞を防御する技術が有用である。

【0261】OBポリペプチドは、静脈内、動脈内、腹腔内、筋肉内、または皮下経路の投与により送達され得る。あるいは、OBポリペプチドは、適切に製剤化され、鼻腔または経口投与により投与され得る。OBの一定供給は、必要な間隔で、例えば、毎日、12時間毎に、治療有効投与量(すなわち、被験体において代謝変化を誘導するために有効な投与量)を提供することにより確保され得る。これらのパラメーターは、処置されている病状の重篤度、他の作用(例えば、補充されている食餌改変)、被験体の体重、年齢、および性別、ならびに他の基準に依存するが、それらは、当業者による標準の良好な医療の実践に従って容易に決定され得る。

【0262】薬学的組成物

本発明のさらに別の実施態様では、上記の薬学的組成物が提供される。このような薬学的組成物は、注射用、または経口、肺、鼻腔用の投与、または他の形態の投与用であり得る。一般に、薬学的に受容可能な希釈剤、保存剤、可溶化剤、乳化剤、アジュバント、および/またはキャリアとともに、本発明の有効量のタンパク質または誘導体産物を含有する薬学的組成物が、本発明に包含される。このような組成物は、種々の緩衝液成分(例えば、Tris-HCl、酢酸塩、リン酸塩)、pH、イオン強度の希釈剤; デタージェントおよび可溶化剤のような添加物(例えば、Tween 80、Polysorbate 80)、抗酸化剤(例えば、アスコルビン酸、メタ重亜硫酸ナトリウム)、保存剤(例えば、Thimersol、ベンジルアルコール)、および増量物質(例えば、ラクトース、マンニトール)を含み; ポリマー化合物(例えば、ポリ乳酸、ポリグリコール酸など)の粒子状調製物中またはリポソーム中への材料の取り込みを含む。ヒラウロン酸(hyaluronic acid)もまた用いられ得る。このような組成物は、身体の状態、安定性、インビボ放出速度、および本タンパク質および誘導体のインビボクリアランス速度に影響し得る。例えば、本明細書中に参考として援用されるMartin, Remington's Pharmaceutical Sciences, 第18版、(1990、Mack Publishing Co., Easton, PA 18042)1435-1712頁を参照。組成物は、液体形態で調製され得るか、または凍結乾燥形態のような乾燥粉末であり得る。

【0263】経口送達

本明細書における使用には、参考として本明細書に援用されるMartin, Remington's Pharmaceutical Sciences, 第18版、(1990、Mack Publishing Co. Easton PA 18042)の第89章に一般に記載されている経口固形投与量形態が意図されている。固形投与形態は、タブレット、カプセル、ピル、トローチまたはロゼンジ、カシェ剤またはペレットを含む。また、リポソームまたはプロテインノイドカプセル化(例えば、米国特許第4,925,673号に報告されているプロテインノイドマイクロスフェアのような)を用いて、本発明の組成物を処方し得る。リポソームのカプセル化が用いられ得、そしてリポソームを種々のポリマーを用いて誘導体化し得る(例えば、米国特許第5,013,556号)。治療用の可能な固形投与形態の説明は、参考として本明細書に援用されるMarshallによる、Modern Pharmaceutics, 第10章、BankerおよびRhodes編、(1979)に記載されている。一般に、製剤は、タンパク質(または化学的に改変されたタンパク質)および胃の環境に対する保護を可能とする不活性成分を含み、そして腸内に生物学的に活性な物質を放出し得る。

【0264】より特定すれば、上記の誘導体化タンパク質の経口投与形態もまた意図される。タンパク質は化学的に改変され得、誘導体の経口送達を有効にする。一般に、タンパク質(またはペプチド)分子自身への少なくとも

も1つの部分の付着が意図される化学的改変であり、ここで、この部分は、(a)タンパク質分解を阻害し得；そして(b)胃または腸から血流中への取り込みを可能にする。タンパク質の全体的な安定性の増加および体内での循環時間の増加もまた所望される。このような部分の例は、ポリエチレングリコール、エチレングリコールとプロピレングリコールとのコポリマー、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、ならびにポリプロリンを含む。Abuchowskiら、1981、前出；Newmarkら、J. Appl. Biochem. 4:185-189(1982)。用いられ得る他のポリマーは、ポリ-1,3-ジオキソランおよびポリ-1,3,6-チオキソカン(tioxocane)である。上記に示したような薬学的用途には、ポリエチレングリコール部分が好ましい。

【0265】タンパク質(または誘導体)の放出場所は、胃、小腸(十二指腸、空腸、または回腸)、または大腸であり得る。当業者は、胃で溶解せず、十二指腸または腸の他の場所で物質を放出する入手可能な製剤を有する。好ましくは、放出は、タンパク質(または誘導体)の保護により、もしくは胃の環境を越えて、例えば腸における生物学的に活性な物質の放出によるのいずれかにより胃環境の有害な影響を避ける。

【0266】胃腸管における耐性を十分に確実にするために、少なくともpH5.0までは不浸透性であるコーティングが必須である。腸溶コーティング剤として用いられる、より一般的な不活性成分の例は、セルロースアセテートトリメリテート(CAT)、ヒドロキシプロピルメチルセルロースフタレート(HPMCP)、HPMCP50、HPMCP55、ポリビニルアセテートフタレート(PVAP)、Eudragit L30 D、Aquateric、セルロースアセテートフタレート(CA P)、Eudragit L、Eudragit S、およびShellacである。これらのコーティング剤は混合フィルムとして用いられ得る。

【0267】コーティングまたはコーティング混合物はまた、胃に対する保護を意図しないで、タブレット上で用いられ得る。これは、糖コーティング、またはタブレットを飲み込み易くするコーティングを含み得る。カプセルは乾燥治療剤、すなわち、粉末の送達には硬い殻(例えば、ゼラチン)からなり；液体形態には、柔軟なゼラチン殻が用いられ得る。カシエ剤の殻材料は厚いデンプンまたは他の食用紙であり得る。ピル、ロゼンジ、成形タブレットまたはタブレット粉薬には、湿潤塊状化技術が用いられ得る。

【0268】治療剤は、粒子サイズ約1mmの顆粒またはペレットの形態で微細な複数粒子として製剤に含まれ得る。カプセル投与のための物質の製剤はまた、粉末、軽く圧縮されたプラグ、またはタブレットであり得る。治療剤は圧縮により調製され得る。

【0269】着色料および香料もすべてに含有され得る。例えば、タンパク質(または誘導体)(例えば、リポ

ソームまたはマイクロスフェアのカプセル化により)は処方され得、次いで、食品、例えば、着色料および香料を含有する冷却飲料中にさらに含有され得る。

【0270】不活性物質を用いて治療剤の容量を希釈または増加し得る。これらの希釈剤は、炭水化物、特にマンニトール、 α -ラクトース、無水ラクトース、セルロース、スクロース、改変デキストランおよびデンプンを含み得る。特定の無機塩もまた、カルシウム三リン酸、炭酸マグネシウム、および塩化ナトリウムを含有する充填剤として用いられ得る。いくつかの市販の希釈剤は、Fast-Flo、Emdex、STARx 1500、Emcompress、およびAvicellである。

【0271】崩壊剤が、固形投与形態の治療剤の製剤中に含まれ得る。崩壊剤として使用される物質は、デンプン、Explotabに基づく市販の崩壊剤を含むデンプンを包含するが、これに限定されない。デンプングリコール酸ナトリウム、Amberlite、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ウルトラアミロペクチン(ultramylopectin)、アルギン酸ナトリウム、ゼラチン、オレンジ皮、酸性カルボキシメチルセルロース、天然スポンジおよびベントナイトも全て用いられ得る。崩壊剤の別の形態は、不溶性カチオン交換樹脂である。粉末化ゴムは崩壊剤および結合剤として用いられ得、そしてこれらは寒天、Karaaya、またはトラガカントゴムのような粉末化ゴムを含み得る。アルギン酸およびそのナトリウム塩もまた、崩壊剤として有用である。

【0272】結合剤を用いて、治療剤と一緒に保持し硬いタブレットを形成し得、そして結合剤には、アラビアゴム、トラガカントゴム、デンプン、およびゼラチンのような天然物由来の物質が含まれる。その他には、メチルセルロース(MC)、エチルセルロース(EC)、およびカルボキシメチルセルロース(CMC)が含まれる。ポリビニルピロリドン(PVP)およびヒドロキシプロピルメチルセルロース(HPMC)は、ともにアルコール溶液中で使用し得、治療剤を顆粒化し得る。

【0273】減摩剤が治療剤の製剤に含まれ得、製剤プロセスの間、粘着を妨ぐ。潤滑剤が治療剤と型版の壁の間の層として使用され得、そしてそれらは、ステアリン酸マグネシウムおよびステアリン酸カルシウムを含むステアリン酸、ポリテトラフルオロエチレン(PTFE)、液体パラフィン、植物油、およびワックスを含み得るが、それらに限定されない。可溶性潤滑剤がまた使用され得、これには、ラウリル硫酸ナトリウム、ラウリル硫酸マグネシウム、種々の分子量のポリエチレングリコール、およびCarbowax 4000および6000が含まれる。

【0274】製剤の間の薬剤の流動特性を改良し、そして圧縮の間の転位を補助するために滑材を添加し得る。滑材は、デンプン、タルク、火成シリカ、およびシリコアルミネート水和物を含み得る。

【0275】水溶性環境への治療剤の溶解を補助するた

めに、界面活性剤を湿潤剤として添加し得る。界面活性剤は、アニオン性デタージェント、例えば、ラウリル硫酸ナトリウム、ジオクチルスルホスクシネートナトリウム、およびジオクチルスルホン酸ナトリウムを含み得る。カチオン性デタージェントが用いられ得、そして塩化ベンザルコニウムまたは塩化ベンゼトミウムを含み得る。界面活性剤として製剤中に含まれ得る可能な非イオン性デタージェントを列挙すれば、ラウロマクロゴール400、ポリオキシシラン40ステアレート、ポリオキシエチレン硬化ひまし油10、50、および60、グリセロールモノステアレート、ポリソルベート40、60、65および80、スクロース脂肪酸エステル、メチルセルロース、およびカルボキシメチルセルロースを含み得る。これらの界面活性剤は、タンパク質または誘導体の製剤中に、単独または異なる割合の混合物としてのいずれかで存在し得る。

【0276】潜在的にタンパク質(または誘導体)の取り込みを促進する混合剤は、例えば、脂肪酸、オレイン酸、リノール酸、およびリノレン酸である。

【0277】制御放出製剤が所望され得る。薬剤は、拡散または浸出メカニズム(すなわちゴム)のいずれかにより放出を許容する不活性なマトリックス中に取り込まれ得る。ゆっくりと変性するマトリックスもまた処方剤に取り込まれ得る。この治療剤の制御放出の他の形態は、Oros治療系(Alza Corp.)に基づく方法により、換言すれば、薬剤が半透膜に包まれている。半透膜は、浸透性効果に起因して、単一な小さな開口部を通じて水を入れ、そして薬剤を押し出させる。いくつかの腸溶コーティングがまた、遅延放出効果を有する。

【0278】他のコーティングを製剤に用い得る。これらは、コーティングパンで付加し得る種々の糖を含む。治療剤はまた、フィルムでコートされたタブレットであり得；この例で用られる物質は、2つのグループに分けられる。第1のグループは、非腸溶性物質であり、メチルセルロース、エチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、メチルヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、カルボキシナトリウム-メチルセルロース、プロビドン、およびポリエチレングリコールを含む。第2のグループは、一般にフタル酸のエステルである腸溶性物質からなる。

【0279】物質の混合物を用いて、最適なフィルムコーティングを提供し得る。フィルムコーティングは、コーティング機または流動床でまたは圧縮コーティングにより実施され得る。

【0280】肺送達

本発明のタンパク質(またはその誘導体)の肺送達もまた本明細書中で意図される。タンパク質(または誘導体)は、吸入する間に哺乳動物の肺に送達され、そして血流に沿って肺の上皮を横切って移動する。このことを示す他の報告は、以下を含む：Adjeiら、Pharmaceutical Re

search, 7(6):565-569 (1990); Adjeiら、International Journal of Pharmaceutics, 63:135-144 (1990) (酢酸ロイプロレリン)；Braquetら、Journal of Cardiovascular Pharmacology, 13(同上5):143-146 (1989) (エンドセリン-1)；Hubbardら、Annals of Internal Medicine, 3(3):206-212 (1989) (α 1-アンチトリプシン)；Smithら、J. Clin. Invest., 84:1145-1146 (1989) (α 1-プロテイナーゼ)；Osweinら、"Aerosolization of Proteins", Proceedings of Symposium on Respiratory Drug Delivery II, Keystone, Colorado, (March 1990) (組換えヒト成長ホルモン)；Debsら、J. Immunol., 140:3482-3488 (1988)およびPlatzら、米国特許第5,284,656号(顆粒球コロニー刺激因子)。

【0281】本発明の実施における使用には、治療用製品の肺送達に設計された広範囲の機械的デバイスが意図され、その全てが当業者によく知られたネブライザー、投与量測定吸入器、および粉末吸入器を含むがこれらに限定されない。

【0282】本発明の実施に適切な市販されているデバイスのいくつかの特定の例は、Mallinckrodt, Inc., St. Louis, Missouriにより製造されるUltraventネブライザー；Marquest Medical Products, Englewood, Coloradoにより製造されるAcornIIネブライザー；Glaxo Inc., Research Triangle Park, North Carolinaにより製造されるVentolin投与量測定吸入器；およびFisons Corp., Bedford, Massachusettsにより製造されるSpinhaler粉末吸入器である。

【0283】このようなデバイス全ては、タンパク質(または誘導体)の調剤に適した製剤の使用を必要とする。代表的には、各製剤は、使用したデバイスのタイプに特異的であり、そして治療に有用な通常の希釈剤、アジュバント、および/またはキャリアに加えて適切な推進剤の使用を含み得る。また、リポソーム、マイクロカプセルまたはマイクロスフェア、封入複合体、または他のタイプのキャリアの使用が意図される。化学的に改変されたタンパク質もまた、化学的改変のタイプまたは使用するデバイスのタイプに依存して異なる製剤中で調製され得る。

【0284】ジェットまたは超音波のいずれかのネブライザーでの使用に適した製剤は、代表的には、溶液1mlにつき約0.1~25mgの生物学的に活性なタンパク質の濃度で水に溶解されたタンパク質(または誘導体)を含む。製剤はまた、緩衝液および単糖を(例えば、タンパク質の安定化および浸透圧の調節のために)含み得る。ネブライザーの製剤はまた、界面活性剤を含み得、エアロゾルの形成において、溶液の噴霧により生じるタンパク質の表面誘導凝集を減少または妨げ得る。

【0285】投与量測定吸入デバイスで用いる製剤は、一般に、界面活性剤の助けで、推進剤中に懸濁されるタンパク質(または誘導体)を含有する、微細に分けられた

粉末を含む。この推進剤は、この目的のために用いられる任意の従来物質であり得、例えば、クロロフルオロカーボン、ヒドロクロロフルオロカーボン、ヒドロフルオロカーボン、または炭化水素(トリクロロフルオロメタン、ジクロロジフルオロメタン、ジクロロテトラフルオロエタノール、および1,1,1,2-テトラフルオロエタンを含む)、またはそれらの組合せを含む。適切な界面活性剤は、ソルビタントリオレートおよび大豆レシチンを含む。オレイン酸もまた界面活性剤として有用であり得る。

【0286】粉末吸入デバイスから調剤される製剤は、タンパク質(または誘導体)を含有する、微細に分けられた乾燥粉末を含み、そしてまた、増量剤、例えば、デバイスからの粉末の散布を促進する量のラクトース、ソルビトール、スクロース、またはマンニトールを、例えば、製剤の50~90重量%で含む。タンパク質(または誘導体)は、肺末端に最も効率的に送達するために、10 μ m(またはミクロン)以下の、最も好ましくは0.5~5 μ mの平均粒子サイズで粒子形態で最も有利に調製され得る。

【0287】鼻腔送達

タンパク質(または誘導体)の鼻腔送達もまた意図される。鼻腔送達は、鼻に治療製品を投与した後、肺における製品の沈着を必要とせずに、直接的に、血流へのタンパク質輸送を可能にする。鼻腔送達のための製剤は、デキストランまたはサイクロデキストランとともにこれらを含む。

【0288】処置方法、薬物の調製法

本発明のさらに他の局面では、処置方法および薬物の製造方法が提供される。本発明の誘導体の投与による緩和または調整される症状は、上記の症状である。

【0289】投与量

上記の分子の全てについて、さらなる研究が行われ、種々の患者における種々の症状の処置に対する適切な投与量レベルについての情報が増え、そして受容体の治療状況、年齢、および全身的な健康を考慮する当業者は、適切な投与量を確認する。一般に、注射または注入について、投与量は、0.01 μ gの生物学的活性タンパク質/kg体重(化学的改変のないタンパク質のみの量を計算)と10mg/kg(同様に基づく)との間である。投与量スケジュールは、用いるタンパク質または誘導体の循環半減期、ポリペプチドがボーラス投与量または連続注入により送達されるかどうか、および用いる製剤に依存して変化し得る。

【0290】他の化合物との投与

肥満症に関連した治療に対しては、本発明のタンパク質(または誘導体)を、肥満症の他の医療合併症を処置するために用いられる1つまたはそれ以上の薬学的組成物、例えば、糖尿病(例えば、インスリン)、高血圧、高コレステロール、および肥満症に付随する他の有害な症状の処置に用いられる薬学的組成物とともに投与し得る。ま

た、他の食欲抑制剤、例えばアンフェタミンが、ともに投与され得る。投与は同時であり得る(例えば、本発明のタンパク質およびインスリンの混合物の投与)か、または逐次であり得る。

【0291】核酸を基礎にした治療処置

OB遺伝子は、肥満症の遺伝子治療を開発するために、ヒト脂肪細胞中に導入され得る。このような治療は、体重を減少させると予期され得る。反対に、ヒト脂肪細胞中へのアンチセンス構築物の導入は、活性OBポリペプチドのレベルを減少し得、身体の脂肪症を増加すると予測され得る。

【0292】1つの実施態様では、OBポリペプチドをコードしている遺伝子は、インビボでウイルスベクターで導入される。このようなベクターは弱毒化または欠陥DNAウイルス、例えば、単純ヘルペスウイルス(HSV)、パピローマウイルス、エプスタインバーウイルス(EBV)、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス(AAV)などを含むがこれらに限定されない。完全にまたはほぼ完全にウイルス遺伝子を欠く欠陥ウイルスが好ましい。欠陥ウイルスは、細胞に導入した後、感染性でない。欠陥ウイルスベクターの使用は、ベクターが他の細胞に感染し得ることを考慮せずに、細胞中の特異的な局在領域に投与することが可能である。従って、脂肪組織が特異的に標的され得る。特定のベクターの例は、欠陥ヘルペスウイルス1(HSV1)ベクター[Kaplittら、Molec. Cell. Neurosci., 2:320-330 (1991)]、弱毒化アデノウイルスベクター、例えば、Stratford-Perricaudetら、J. Clin. Invest., 90:626-630 (1992)により記載されるベクター、および欠陥アデノ随伴ウイルスベクター[Samulskiら、J. Virology, 61:3096-3101 (1987); Samulskiら、J. Virology, 63:3822-3828 (1989)]を含むが、これらに限定されない。

【0293】もう一つの実施態様では、遺伝子は、例えば以下に記載されるように、レトロウイルスベクターで導入され得る：Andersonら、米国特許第5,399,346号；Mannら、Cell, 33:153(1983)；Teminら、米国特許第4,650,764号；Teminら、米国特許第4,980,289号；Markowitzら、J. Virology, 62:1120(1988)；Teminら、米国特許第5,124,263号；Doughertyらによる、1995年3月16日に公開された国際特許公開第W095/07358号；およびKuoら、Blood, 82:845(1993)。

【0294】あるいは、ベクターはインビボでリポフェクションにより導入され得る。過去10年間、インビトロで、核酸のカプセル化およびトランスフェクションのためのリポソームの使用が増加している。リポソームが介在するトランスフェクションで遭遇する困難性および危険性を限定するために設計された合成のカチオン性脂質が、マーカーをコードする遺伝子のインビボトランスフェクションのためのリポソームを調製するために用いられ得る[Felgnerら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84:7

413-7417(1987); Mackeyら、Proc. Natl. Acad. Sci. U SA, 85:8027-8031(1988)参照]。カチオン性脂質の使用は、負に荷電した核酸のカプセル化を促進し得、そして負に荷電した細胞膜との融合も促進する[Felgnerら、Science, 337:387-388(1989)]。外因性遺伝子を、インビボで、特定の器官に導入するためのリポフェクションの使用は、特定の実用的な利点を有する。特定細胞へのリポソームの分子標的は、1つの有益な領域である。特定の細胞タイプをトランスフェクションすることは、細胞の不均質性を有する組織、例えば、脾臓、肝臓、腎臓、および脳で特に有益であり得る。脂質は、標的の目的のために他の分子に化学的に結合され得る(Mackeyら、1988、前出)。標的されたペプチド、例えば、ホルモンまたは神経伝達物質、および抗体のようなタンパク質、または非ペプチド分子が化学的にリポソームに結合され得る。

【0295】裸のDNAプラスミドとしてインビボでベクターを導入することも可能である。遺伝子治療のための裸のDNAベクターは、当該分野で公知の方法、例えば、トランスフェクション、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、形質導入、細胞融合、DEAEデキストラン、リン酸カルシウム沈澱、遺伝子銃の使用、またはDNAベクタートランスポーターの使用により、所望の宿主細胞に導入され得る(例えば、Wuら、J. Biol. Chem., 267:963-967(1992); Wuら、J. Biol. Chem., 263:14621-14624(1988); 1990年3月15日に出願されたHartmutら、カナダ特許出願第2,012,311号を参照)。

【0296】農業への応用

OB遺伝子はまた、家畜動物から単離され得、そしてそれによって相当するOBポリペプチドが得られ得る。下記の特定の例では、マウスOB遺伝子由来のプロープは、多数の種の動物由来の相当する相同性のコード配列にハイブリダイズする。ヒトの治療について述べられたように、組換えタンパク質がまた調製され得、そして家畜動物に投与され得る。ポリペプチドの投与は、より痩身型の食用動物、例えば、ウシ、ブタ、家禽、ヒツジなどを生産するために実行され得る。好ましくは、自己のポリペプチドOBポリペプチドが投与されるが、本発明はまた、抗自己のポリペプチドの投与を意図する。OBポリペプチドは約160のアミノ酸残基からなるので、高度に免疫原性であり得ない。従って、非自己のポリペプチドの投与は、免疫応答を生じ得ない。

【0297】あるいは、トランスジェニック家畜動物へのクローン化遺伝子の導入は、OBトランスジーンの過剰発現によるトランスジェニック家畜動物の潜在的な体重および脂肪症の減少を可能にし得る。このことを達成するための最も簡単な手法は、それ自身のまたは別の脂肪特異的なプロモーターを用いて、OBトランスジーンを脂肪に標的することであり得る。

【0298】反対に、体脂肪の増加は、神戸牛またはフ

ォアグラをつくるための肥大肝臓の開発の目的のような他の情況では所望される。これは、アンチセンスなOBトランスジーンを脂肪に標的すること、または遺伝子ノックアウト技法を用いることにより達成され得た。あるいは、体重において脂肪パーセントの増加が所望される場合、OBポリペプチドのインヒビターまたはアンタゴニストが投与され得る。このようなインヒビターまたはアンタゴニストは、ポリペプチドと反応性の抗体、およびOBレセプターに結合するが活性化しないポリペプチドの断片、すなわちOBポリペプチドのアンタゴニストを含むが、それらに限定されない。

【0299】美容用途

OBポリペプチドは、健康の利益に加えて美容使用に重要な価値を有する。特に、誘導体およびそのアゴニストアナログを含む本発明のOBポリペプチドが、動物の脂肪細胞沈着の速度および量の調整に有用であるので、目ざわりな脂肪組織、例えば、肥満状態に必ずしも達しないが、やはり個人の外見を損なう腹部、股関節部、腿、首、および顎での脂肪沈着を減少するために有用である。脂肪減少効果は、部分的には、食欲の減少、すなわち食糧摂取の減少によるか、基礎代謝の増加によるか、または両方により達成されると考えられている。従って、本発明のOBポリペプチド、もしくはその誘導体またはアゴニストアナログは、脂肪沈着を調整することにより、食欲を減少することにより、またはその両方により、脂肪組織沈着において美容上の変化をもたらすために、被験体への投与に有用である。

【0300】さらに、本発明の組成物および方法は、脂肪組織のパーセントを減少し、そして身体の外見を改善するための試み得る方法の例として、種々の手順、例えば、身体全体の外見を変えるために設計された美容手術(例えば、脂肪組織を吸引または除去することにより体重を減少するために設計された脂肪吸引(liposuction)またはレーザー手術)、運動(特に、ランニングおよびウエイトトレーニング)、低脂肪食餌、催眠、生体フィードバックとともに用いられ得る。

【0301】従って、本発明は、個体において美容のために脂肪組織調整を行う方法に関し、この方法は、OBポリペプチド、もしくは誘導体またはそのアゴニストアナログの脂肪調整量を、身体全体の外見を改善するために、美容のために脂肪組織調整を所望する個体に投与する工程を包含する。特定の局面では、脂肪組織調整は食欲抑制の結果である。好ましくは、脂肪組織調整は、脂肪組織の減少である。

【0302】さらなる実施態様では、本発明は、美容のために脂肪組織損失を行う方法に関し、この方法は、OBポリペプチド、もしくは誘導体またはそのアゴニストアナログの脂肪調整量を、身体全体の外見を改善するために、美容のために脂肪組織調整を所望する個体に投与することにより身体の外見を変化させるための手順を組み

合わせる工程を包含する。

【0303】OBレセプター

OB因子の小分子アゴニストおよびアンタゴニストの開発は、そのレセプターの単離により大きく促進される。これは、活性なOBポリペプチドを調製しそしてそれを標準的な方法を用いて発現ライブラリーをスクリーニングするために使用して達成され得る。発現ライブラリー中のレセプターの結合は、細菌または哺乳動物発現ベクターのいずれかを用いて調製された組換えポリペプチドを投与する工程、および発現ライブラリーの細胞について組換えポリペプチドの短期間および連続投与の効果を観察する工程、または細胞へのOBポリペプチドの結合を直接検出する工程により試験され得る。

【0304】OBレセプターは、現在、視床下部およびおそらく肝臓に局在するようであると考えられているので、好ましくは、これらの組織由来のcDNAライブラリーが、標準的な発現クローニングベクター中で構築される。次に、これらのcDNAクローンが、プールとしてCOS細胞に導入され得、そして得られるトランスフォーマントは、OBレセプターを発現するCOS細胞を同定するために、活性リガンドを用いてスクリーニングされ得る。次いで、陽性のクローンが、クローン化レセプターを回収するために単離され得る。クローン化レセプターは、OBリガンド(それがホルモンであると仮定して)とともに用いられ、OBの小分子モジュレーターのスクリーニングに必要な成分を開発する。

【0305】本発明に従って利用されるべき特定のアクセシ系は、レセプターアクセシとして公知である。レセプターアクセシでは、アクセシされるべき物質は、適切に標識され、次いで、特定の細胞試験コロニーは、所定量の標識および非標識の両物質が接種され、その後、標識物質が細胞レセプターに結合する程度を決定するために結合研究が行われる。このように、物質間の親和性の違いが確認され得る。

【0306】従って、所定量の精製体重モジュレーターが、放射性標識され得、そして例えば、抗体またはそれらに対する他のインヒビターと組み合わせられ、その後結合研究が実施された得る。次いで、種々の量の標識および非標識の組み合わせられていない体積モジュレーターを含む溶液が調製され得、次いで細胞試料が接種され、そしてその後インキュベートされ得る。得られる細胞の単層を、次いで洗浄し、可溶化し、そして5%以下の標準誤差を生じるに十分な時間の長さの間、ガンマーカウンターで計測した。次いで、これらのデータは、スキッチャード分析に供せられ、その後、物質の活性についての観察および結論づけが行われ得る。先行する記載は例示であり、それは、レセプターアクセシが行われ用いられる様式を例示し、例ではアクセシした物質の細胞結合能力が区別する特徴として供し得る。あるいは、レセプターアクセシは、dbレセプターのような本発明のモジュ

レーターに対する特異的レセプターの同定に特に有用である。

【0307】本発明による有用なそして意図されたさらなるアクセシは、「シス/トランス」アクセシとして知られている。簡単に説明すると、このアクセシは、2つの遺伝子構築物を使用し、その内の1つは、代表的には、適切な細胞株にトランスフェクトする場合、目的の特定のレセプターを速続的に発現するプラスミドであり、そしてその第2番目は、レセプター/リガンド複合体の制御下で、ルシフェラーゼのようなレポーターを発現するプラスミドである。従って、例えば、特定のレセプターに対するリガンドとして化合物を評価することが所望される場合、プラスミドの1つは、選択された細胞株でレセプターの発現を生じる構築物であり得、その一方、第二のプラスミドは、特定のレセプターに対して応答要素が挿入されるルシフェラーゼ遺伝子に連結されたプロモーターを所有する。試験される化合物がレセプターに対するアゴニストである場合、リガンドはレセプターと複合体化し、そして生じた複合体は応答要素と結合し、そしてルシフェラーゼ遺伝子の転写を開始する。次いで、生じた化学発光を光度計により測定し、投与量応答曲線を得、そして既知のリガンドの投与量応答曲線と比較する。前記のプロトコールは、当業者が参考とする目的のために、米国特許第4,981,784号およびPCT国際公開第W088/03168号で詳細に記載されている。

【0308】一旦、OBレセプター遺伝子配列を発現する組換え体が同定されると、組換えOBレセプターが分析され得る。これは、レセプターの放射性標識を含むOBレセプターの物理学または機能的特徴に基づくアクセシとそれに続くゲル電気泳動、イムノアクセシ、リガンド結合などによる分析により達成される。さらに、OBレセプターに対する抗体が上記のように生成され得る。

【0309】OBレセプターの構造は、当該分野で公知の種々の方法により分析され得る。好ましくは、種々のドメインの構造、特にOB結合部位が分析される。構造分析は、他の公知のタンパク質、特にホルモンおよびタンパク質レセプターとの配列類似性を同定することにより行われ得る。類似性(または相同性)の程度は、OBレセプターまたはそのドメインの構造および機能を推定するための基礎を提供し得る。特定の実施態様では、配列比較は、例えば、FASTAおよびFASTPプログラム[Pearsonら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85:2444-48(1988)]を用いてGenBankで見い出される配列を用いて行われ得る。

【0310】タンパク質配列は、親水性分析によりさらに特徴付けられ得る(例えば、Hoppら、1981、同上)。親水性プロフィールを用いて、OBレセプタータンパク質の疎水性および親水性領域を同定し得、それはまた、細胞質外、膜結合性、および細胞質内領域を示し得る。

【0311】二次構造の分析(例えば、Chouら、1974、同上)がまた行われ、特異的な二次構造をとると推定さ

れるOBレセプターの領域を同定し得る。

【0312】操作、翻訳、および二次構造の推定、ならびにオープンリーディングフレームの推定および製図(plotting)はまた、当該分野で利用可能なコンピューターソフトウェアプログラムを用いても達成され得る。

【0313】組換えOBポリペプチドの大量の供給源、およびOBレセプター(すなわち、db遺伝子産物)を単離する機会を提供することにより、本発明は、OBポリペプチドおよびOBレセプター、またはそのドメインの活性なコンホメーションの定量的な構造決定を可能にする。特に、十分量の物質が、核磁気共鳴(NMR)、赤外(IR)、Raman、および紫外(UV)、特に円二色性(CD)、分光分析のために提供される。特に、NMRは、溶液中の分子の非常に強力な構造分析を提供し、それは、それらの天然環境により緊密に近づける(Marionら、1983、同上; Barら、1985、同上; Kimuraら、1980、同上)。構造分析の他の方法がまた使用され得る。これらは、X線結晶学(Engstrom, 1974, 同上)を含むがこれらに限定されない。

【0314】さらに好ましくは、OBポリペプチドおよびOBレセプターの共結晶(co-crystal)が研究され得る。共結晶の分析は、結合についての詳細な情報を提供し、それはさらに、リガンドアゴニストおよびアンタゴニストの合理的な設計を可能にする。コンピューターモデリングもまた使用され得、特にNMRまたはX線法[Fletterickら編、Computer Graphics and Molecular Modeling, in Current Communications in Molecular Biology, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York(1986)]と組み合わせて使用され得る。

【0315】本発明のOBレセプターをコードする遺伝子の同定および単離は、天然供給源から単離され得るより大量に、または細胞のトランスフェクションまたはトランスフォーメーション後に発現するレセプターの活性を示すように特に加工されたインジケーター細胞でレセプターの発現を提供する。従って、OBポリペプチドの構造に基づくアゴニストおよびアンタゴニストの合理的な設計に加えて、本発明は、当該分野で公知の種々のスクリーニングアッセイを用いて、OBレセプターの特異的リガンドを同定する代替の方法を意図する。

【0316】本発明は、以下の実施例を参照してより良好に理解され得、実施例は、本発明の例示であり、そして限定することを意図しない。

【0317】

【実施例】以下は、本発明の例示である遺伝子物質を同定するために使用する方法の概要を述べる。この努力は4つの連続的な工程を含む：A) 遺伝子地図作製、B) 物理地図作製、C) 候補遺伝子単離、およびD) 変異検出。目的のマウス遺伝子が単離された(工程D)ことの確認の後、相同なヒト遺伝子が捜され、そしてマウスおよびヒトの両遺伝子および推定タンパク質が特徴付けられた。この工程は、さらに詳細に以下に要約される。

【0318】A. 遺伝子地図作製

ob変異は遺伝的交雑で分離し、そして標準の連鎖分析を用いて、RFLP(制限酵素断片長多型)に対する変異を位置付けた。これらのデータは、OB遺伝子をマウス第6染色体近位約5cMに置いた。(5cMは、100匹の動物当たりの5つのみかけの遺伝的交差に相当する遺伝子距離の測定値である。) 全部で771の情報を与える減数分裂が生じ、そしてその後の遺伝子地図作製(Friedmanら、1991、同上)で用いられた。OBに対してマップされた遺伝子座は、全て先に公開された。記載された最も近い2つのRFLPは、カルボキシペプチダーゼおよびmetガン遺伝子由来のプロープにより定義された。

【0319】上記の実験の遺伝子解析は、原理的には、いずれの遺伝子マーカーも強く連鎖しないので、obをクローン化するためには不適當であった。強く連鎖する必要とするRFLPを同定するために、特別のプロープが単離され、そして遺伝的交雑を行った。公知の方法である染色体顕微解剖を用いて、マウス第6染色体の近位からDNAのランダムな小片を単離した[Baharyら、Mammalian Genome, 4:511-515(1993)]。個々のクローン化プロープをobに対する強い連鎖について試験した。これらの研究を基礎にして、1つのプロープD6Rck13(psd3とも称せられる)を、OBに対するその遺伝的近接性によりさらなる解析のために選択した。

【0320】このプロープを、種間および亜種間交雑由来の835のob子孫の遺伝子型決定のために用い、D6Rck13が、Baharyらに報告されているように、835匹全ての動物において非組換え体であることを示した。物理地図作製の過程で、新規な多型マーカーを、YAC53A6由来のコスミドのサブクローンから同定した。この新規マーカーは、D6Rck13とOB遺伝子との間に位置し、種間内交雑および戻し交雑由来の別の771の情報を与える減数分裂の遺伝子型決定のために用いた。1匹の動物#167は、obとD6Rck39との間の組換え交差を保有すると同定された。これらの研究は、D6Rck39/D6Rck13がobから約0.06cMであることを示した。別のプロープPax4は、obに0.12cM近接していたことが同定された。Pax4は2匹の動物(#111および#420)で組換えられていた。Pax4は、Grussおよび共同研究者により、マウス第6染色体近位に先にマップされた偽遺伝子である[Grussら、Genomics, 11:424-434(1991)]。これを基礎に、OB遺伝子は、Pax4とD6Rck13との間の約0.2cM間隔で存在すると決定された。これは、OBを単離する成果において介在DNAをクローンする成果を導く。

【0321】B. 物理地図作製

この間隔でのDNAのクローニングには、酵母人工染色体(YAC)を使用した。YACは、比較的新しいクローニングベクターであり、しばしば長さが100万塩基対以上の連続するDNAの長い鎖をクローニングし得る。

【0322】酵母人工染色体は、D6Rck13およびPax4を

用いて単離された。これは、精製DNAプローブを調製し、そして対応するYACを単離するためにそれらを使用することにより達成された。これらのYAC(#8、#16、#107、および#24)を単離し、そして最初に特徴付け、そして得られた分析に基づき、YAC16は最も遠くまで、すなわちobの最も近くまで伸びたYACであったと結論された。次いで、YAC#16の重要な末端を回収し、そしてこの末端がPax4よりobに近いと決定された。この末端を16M(+)と名付けた。このプローブは動物#420においては(Pax4と同様に)組換えられていなかったことが示されたので、この結果が得られた。この末端を配列決定し、そしてPCRアッセイを開発するために用いた。このPCRアッセイを用いて、YACライブラリーをスクリーニングした。4つの陽性のクローンを単離した。続いて、エンド-レスキュー法、制限地図作製、パルスフィールドゲル電気泳動、および遺伝的交雑を用いるサザンブロットによるこれらのYACの特徴付けにより、これらのYACのうちの2つaduおよびaadが、引き続き研究に重要であることを決定した。YAC aadは、最も遠くまで伸びた550kbの非キメラYACである。従って、このYAC、aad(pICL)の遠位末端を用いて物理地図を完成した。YAC aduは370kbの非キメラYACであり、そしてその遠位末端adu(+)は、動物#111および#167を含む遺伝的交雑の全てのob子孫において非組換え体であることが決定され、OB遺伝子がこのYACに存在することを示唆した。

【0323】これら2つの末端、aad(pICL)およびadu(+)に対するPCRアッセイを開発し、物理地図作製を続行するために、さらにYACおよびP1クローンを単離するために用いた。重要なP1クローンを、498、499、500(aad(pICL)由来のプローブを用いて単離された)、ならびに322、323、および324(adu(+))由来のプローブを用いて)を含むこの成果により単離した。

【0324】こうして、D6Rck13により単離されたYAC(53A6、25A8、25A9、25A10)を特徴付けた。これらの研究により、53A6がaad YACの近くの方に最も遠くまで伸びることが決定された。53A6とaadとの間のギャップのサイズは、約70kbであると決定された。次いで、53A6の重要な末端である53(pICL)を用いて、3つの利用可能なYACライブラリーおよびP1ライブラリーをスクリーニングした。重要なP1クローン、325を単離した。このP1クローンは、上記のように、aad(pICL)により単離されたP1クローンとオーバーラップし、そしてそれ故53(pICL)とaad(pICL)の間のギャップを近づけるために供された。結果として、長さが約2.5百万塩基対のYACおよびP1クローンを含み、そしてPax4、16M(+), adu(+), aad(pICL)、53(pICL)、D6Rck39、およびD6Rck13に達する全コンティグがクローン化された。動物#111および#167における明らかな組換え部位を注意深くマッピングすることにより、OBが400kb間隔で位置していたと結論された。OB遺伝子を単離するために作用するDNAの供給源を提供す

るために、この非組換え領域をカバーする約500kbを合計24のP1クローンで単離した。これらのP1クローンは、322および323を含み、それらは後に有用なクローンであることが見い出され、エキソントラッピングのために用いた。

【0325】OBを有する染色体の1部分の物理地図を図7Aに示す。図7BはYAコンティグを示す。図7CはP1コンティグを示す。

【0326】C. 候補遺伝子の単離

この間隔にある遺伝子を単離するために用いた方法は、エキソントラッピングである。この方法では、市販のベクターを用い、試験構築物中に導入されたゲノムDNAにおける機能的なスプライスアクセプターおよびドナー配列について選択することにより、エキソンDNA(すなわち、コード配列)を同定した。これらのP1クローン由来のDNAを増幅し、エキソントラッピングベクター中にサブクローニングした。これらのクローンは、Bluescriptベクターにクローン化された短い挿入物であった。各クローンを、挿入物に近接するプラスミド配列に対応するPCRプライマーを用いてPCR増幅した。PCR増幅を、プラスミドを有する細菌に対し直接行った。反応はBiomekロボットを用いてセットアップした。PCR産物は、臭化エチジウムを含むTBE緩衝液中1%アガロースゲルで電気泳動した。エキソントラッピング技術を改変し、P1クローンから混入しているE. coli DNAを除去し、そして大量の人工エキソンをスクリーニングした。人工エキソンはトラップされた推定エキソンの80~90%を超えた。エキソントラッピングベクターは、HIV配列；この人工産物に対応するこれらベクター配列の短いセグメントを含む。

【0327】エキソントラッピング実験は種々のP1クローンをを用いて行った。次いで、エキソントラッピング産物をPCRにより増幅し、選択し、そして配列決定した。推定「エキソン」配列を、Blastコンピュータープログラムを用いて、Genbankの配列と比較した。約15のエキソンを、さらなる実験のために、RT-PCR、ノーザン分析、および対応するRNAまたは保存配列の存在についてのゾーブロット(zoo blot)により選択した。15の推定エキソンのうち7つ、325-2、323-9、322-5、D1-F7、IH3、および2G7が、RNA転写物をコードすることが見い出された。325-2は、精巣に特異的な遺伝子であり；323-9および323-9は、主に脳および腎臓で発現される同じ遺伝子由来の2つのエキソンのようである。IH3および322-5は、2つの低レベルの脳転写物を示す。D1-F7は、先にクローン化された遺伝子であるイノシンモノホスフェートデヒドロゲナーゼ(IMPDH)由来のエキソンで、遍在性発現パターンを有する。これらの遺伝子は、いずれも、OBをコードしないようであった。OBエキソンである2G7を以下でさらに説明する。

【0328】OB遺伝子をエキソントラップできなかった

3回の結果の後に、他の試みを、重要なOB領域由来の全てのP1からのDNAをプールすることにより行った。これらは、以下のP1を含む：258、259、322、323、324、325、498、499、500、653、654、およびその他。その後、258、260、322、498、および499のP1をエキソントラッピングベクターにサブクローニングし、次にいくつかのプレートで、推定エキソンを有していた細菌クローンで調製した。推定OB候補を示す約192のクローンを得た。上記のように、多くの単離物がベクター由来の2つのトラップされたエキソンを含むことに一致する人工産物が観察された。従って、クローンは、それらのサイズによる、およびゲルのサザンブロット上の対応するバンドにハイブリダイズするこの人工産物に対応するDNAプローブのハイブリダイゼーションの事実による両方により同定された。この方法で、192クローンのうち185をさらなる評価から除外した。結局、OBに対応するエキソンの排除に至り得るので、サイズ単独を基礎にした人工産物の排除は不可能であった。

【0329】従って、192のエキソンのうち、合計7つのエキソンをさらなる研究のために選択した。7つのエキソンの配列決定のための鋳型を調製し、そして配列決定を行った。7つのエキソンの配列を分析し、そして7つが同一であり、そして1つが明らかに人工産物であることが見い出された。特に、クローン1D12は、「HIV配列」、すなわち人工産物バンドを含んでいた。これは、さらなる分析のために3つのエキソン：1F1、2G7、および1H3を残した。1F1が重要領域の外側にマップされたので排除された。1H3および2G7の両方に対するPCRプライマーを選択し、そして合成した。

【0330】2G7に関するエキソン配列を決定し、図10(配列番号7)に示す。2G7に対するPCRプライマーを選択し、そして合成した。PCRプライマーに対応する配列部分に下線を引く。用いたプライマーは以下のとおりである：

5' CCA GGG CAG GAA AAT GTG (Tm=60.0°C)(配列番号8)

3' CAT CCT GGA CTT TCT GGA TAG G (Tm=60.0°C)(配列番号9)

これらのプライマーは、以下のようなPCR条件でゲノムDNAを増幅した：標準PCR緩衝液中、55°Cで2分間のアニーリング、72°Cで2分間の伸長、94°Cで1分間の変性の25〜30サイクル。これらのプライマーをまた、非放射能dCTP量を対応して減少させ、PCR反応において、³²P-dCTPを含めることにより標識プローブを生成するために用いた。

【0331】RT-PCRを種々の組織RNAについて行い、そして2G7が試験された組織の中で白色脂肪において排他的に発現されたと結論された(図11A)。その後、³²Pで標識した2G7を組織RNAのノーザンブロットとハイブリダイズし(図11B)、そしてそのRNAが脂肪組織で高レベルで発現するが、他の全ての組織(ここで、シグナルは、組織

調製物中に混入する脂肪の結果であり得る)において、発現されないか、または非常に低いレベルで発現されたことを示した。列挙された各組織由来の全RNAの10 μgを、ホルムアルデヒドを含むアガロースゲルで電気泳動した。プローブを、標準ハイブリダイゼーション緩衝液Rapid Hybe(Amersham)中、65°Cで、ブロットにハイブリダイズさせた。RNAのサイズは約4.9kBであった。この時点で、2G7はOBについての有効な候補遺伝子であると考えられ、そしてさらに分析された。

【0332】D. 変異検出。

【0333】2G7がOB遺伝子をコードしていたことを確認するために、野生型動物と比較して、変異体におけるこの遺伝子のDNA配列のRNA発現のレベルの違いを示すことが必要であった。ob遺伝子の2つの別の変異(C57BL/6J ob/ob (1J)およびCk/Smjob/ob (2J))が、研究に利用可能である。これらは、以降1Jおよび2Jとそれぞれ呼ばれる。(非公式な命名を、研究されるマウス株を呼ぶために用いる。本明細書および図面では、C57BL/6Jは、C57BL/6J +/+を意味し；CKC/smjは、SM/Ckc-+^{Dac}-+/+を意味し；CKC/smj ob/obは、SM/Ckc-+^{Dac}-ob^{2J}/ob^{2J}を意味することを理解されたい)。RNAは、1J、2J、およびコントロール動物から単離された脂肪組織から調製された。各試料由来の全RNAを、DNアーゼで処理し、次いで、プライマーとしてのオリゴ-dT、および逆転写酵素を用いて逆転写した。次いで、得られる1本鎖cDNAを、下方のバンドについて2G7プライマー(上記の条件)または上方のバンドについて市販のアクチンプライマーのいずれかを用いてPCR増幅した。RT-PCR産物を、臭化エチジウムで染色した1%アガロースTBEゲルで泳動した(図12A)。RT-PCRを用いて、2G7 mRNAが、1Jおよび全ての他のコントロールマウスで発現されたが、それは2Jマウスでは完全に見あたらなかったことが見い出された。30サイクルの増幅後、シグナルは検出されなかった。この実験は、2G7がOB遺伝子由来のエキソンに対応する直接的な証拠を提供した。

【0334】2J変異は比較的最近であり、そして類似遺伝子型株として維持されているので、この結果は、2G7がOB遺伝子由来のエキソンであることを示した最初に得られた証拠であった。変異は、mRNA合成の全体的な停止に至るプロモーター領域に位置するようである。このRT-PCR実験における1Jマウスにおけるシグナルの存在は、1JがRNA試料のサイズに大きな変化を生じない点突然変異を有し得ることを示唆した。さらに、RT-PCRにより試験された場合、2G7 mRNAは、4匹の追加の2J動物には存在しなかった。

【0335】この結果は、ノーザンブロット上で確認された(図12B)。脂肪細胞RNAを、各株(C57BL/6J、1J、CKC/smj、および2J)から調製した。これらのRNAの10 μgを泳動してブロットした。このブロットは、PCR反応中に、³²P-dCTPを用いる物質、すなわち図11中のバンドの

増幅により、PCR標識された2G7プローブで釣った。アクチンは、付与されたRNAの量に対するコントロールである。アクチンシグナルは、全ての試料中でほぼ同じである。mRNAが脂肪細胞に特異的であるので、OBシグナルは脳では存在していない。

【0336】ノーザン分析の結果は、2G7特異的RNAが2Jマウスでは存在していないことを確認した。この肥満型変異株においては、RNAが作られないように遺伝子が破壊されているので、ob RNAはCKC/smj ob/obマウスで存在していない。さらに、2G7 RNAのレベルは1Jおよびdb/db脂肪で約10-20倍増加した。これらの結果は、OBが循環ホルモンをコードしている、またはOBが体重を調整する脂肪細胞からのシグナル発生の原因であるといういずれかの仮説に適合する。これらの結果は、2G7がOB遺伝子であるという結論を支持し、そして1Jマウスが、点突然変異、おそらく未成熟翻訳終止に至るナンセンス変異を有することを予測した。

【0337】これらのノーザンの結果は、4つの異なる2J動物からの脂肪細胞RNA調製物を用いても繰り返された(図13)。このアッセイでは、ap2は、図12Bのアクチンと全く同様に、コントロールとして用いた脂肪特異的転写物である。ap2バンドの変化する濃度には有意差はない。ap2は、公開されたap2配列からPCRプライマーを設計することにより標識された。次いで、脂肪細胞RNAのRT-PCR産物は、PCR標識のための同じプロトコルを用いて再度標識された。この分析は、正常の同型接合(homozygous)または異型接合(heterozygous)動物におけるOB mRNAの存在、および2J変異体動物におけるその不在を示す。

【0338】変異は、1Jマウスで同定された。変異はCからTへの塩基の変化であり、それはアミノ酸108でアルギニンの見かけ上未成熟終止コドンへの変化を生じ、そして、おそらくこれがob mRNAの高レベル発現に反する1J変異(図14)の原因である(図12および13、C57BL/6J ob/ob参照)。

【0339】さらに最近では、サザンブロットを用いて、2J変異が、RNA発現を完全になくするに見えるOBの5'末端で検出可能なDNA変化の結果であると結論された。この可能な再配置の正確な性質は、決定されるべきまでである。

【0340】4つの異なる制限エンドヌクレアーゼを用いて、CKC/smj (SM/Ckc-^{Dac})およびC57BL/6Jマウス由来のDNAのゲノムサザンブロットを、変異obが独特なフラグメントパターンを生じるかどうかを決定するために行った(図15A)。約10 μgのDNA(肝臓、腎臓、または脾臓から調製されたゲノムDNA由来)を、示された制限酵素で切断した。次いで、DNAを1%アガロースTBEゲルで電気泳動した。DNAをイモビロン(imobilon)膜にトランスファーし、PCR標識2G7プローブにハイブリダイズした。重要なバンドは、CKC/smj ob/ob(SM/Ckc-^{Dac} ob^{2J}/ob^{2J})DN

AのBglIII消化物中の一番上のバンドである。このバンドは、他の株におけるより分子量が大きく、この株における変異を示している。

【0341】図15Bは、ob^{2J}/+×ob^{2J}/+交雑の子孫由来のゲノムDNAのBglIII消化物のサザンブロットである。いくつかのDNAは、上方のバンドのみを有し、いくつかは下方のバンドのみを有し、そしていくつかは両方のバンドを有する。上方のバンドのみを有する動物は、アロ型の肥満型(allo-obese)、すなわちob^{2J}/ob^{2J}である。これらのデータは、図15Aに示される多型(すなわち、変異)が遺伝的意味で(in agnetic sense)分離することを示す。

【0342】実施例1：OBのcDNAクローニングおよび配列決定

標識2G7PCRプローブを用いて、マウス脂肪細胞λgt11 cDNAライブラリー(Swissマウスの睾丸の脂肪パッド由来のClontech 5'-STRETCH cDNA、#ML3005b)からの合計50のマウスcDNAクローン、およびヒト脂肪細胞λgt10cDNAライブラリー(腹部由来のClontech 5'-STRETCH cDNA、#HL1108a)からの30のクロスハイブリダイズするヒトcDNAクローンを単離した。ライブラリーのスクリーニングは、ブランクリフト手順を用いて行った。ブランクリフトからのフィルターを、オートクレーブ法を用いて変性した。フィルターをPCR標識2G7プローブを用いて2重(duplicate)ハイブリダイズした(Rapid Hybe緩衝液、65°C、一晚)。2〜4時間のプレハイブリダイゼーションの後、フィルターを2×SSC、2%SDS中、65°Cで30分間2回洗浄し、そしてx線フィルムに感光させた。2重陽性についてブランク精製した。ブランク精製したファージを、市販のベクタープライマー、例えば、λgt10およびλgt11を用いて増幅した。得られたPCR産物は、いずれかの末端に少量のベクター配列を有する各ファージについてのcDNA挿入物に対応した。バンドをゲル精製し、そしてABI自動シーケンサーおよびDNAポリメラーゼをプローブするためのベクタープライマーを用いて配列決定した。

【0343】次いで、生の配列データは、コンピュータープログラムに由来する誤りを正すために手動で塩基毎に調べた。正しい配列が利用可能になったので、下流のプライマーを合成し、配列決定を継続するために用いた。各利用可能なcDNAクローンは配列決定され、コンテイングに合成されるまで、このような実験を繰り返した。現在までのところ、mRNAの5'末端から約3000塩基対が蓄積された。cDNAクローンの1つは、mRNAの5'末端まで伸長しており、その配列は脂肪組織RNAの5'RACE産物の配列と同一であった(データは示さない)。

【0344】配列データは、167アミノ酸のオープンリーディングフレームが存在することを示した(図1)。Kozak翻訳開始共通配列は、ATGの3塩基上流のアデノシン残基で存在した。cDNAの2つのクラスは、1つのグルタ

ミンコドンを含むまたは含まないで異なることが見い出された。この残基は、2G7エキソンのスプライスアクセプターに対して3'側直ぐ近くに位置することが見い出されている。グルタミンのCAGコドンは可能なAGスプライスアクセプター配列を含むので、下記のようなcDNAの

gln ser val

ag CAG TCG GTA (グルタミンを含む) (配列番号17)

↑

(スプライスアクセプター部位)

ser val

ag CAG TCG GTA (グルタミンを含まない) (配列番号17)

↑

(スプライスアクセプター部位)

上記の配列の「ag」は、グルタミンコドンの上流の推定されたイントロン配列に相当し、そしてAGは推定のオルタナティブスプライス部位である。このグルタミン残基は分子の高度に保存された領域に位置し、そして生物学的活性についてのその重要性は、未だに知られていない。

【0346】推定のN末端シグナル配列が検出され、そのシグナル切断部位は、アミノ酸位置21のアラニン残基のカルボキシル末端にあると推測される。この推定のシグナル配列は、von Heijneの方法によるコンピューターアルゴリズムの適用により確認された。この技術を用いて、最も確からしいシグナル配列はアミノ酸1~23に相当するポリペプチドコード領域で同定され、以下の配列を有する：

MCWRPLCRFLWLWSYLSYVQA↑VP
(配列番号10)

ここで、矢印は、推定のシグナル配列切断部位を示す。アミノ酸配列の残りの部分は非常に親水性であり、そして任意の注目すべき構造モチーフまたはN末端シグナル配列以外の膜に達するドメインを有さなかった。特に、本発明者らは、N結合型グリコシル化に関する、または推定のプロセッシングされたタンパク質中のタンパク質切断を示唆する二塩基性アミノ酸配列の共通配列を(Sabatiniら、The metabolic basis of inherited disease, pp.177-223, C.V. Scriverら編、McGraw-Hill, New York)見出せなかった。BlastおよびBlockプログラムを用いたデータベース検索は、任意の相同性配列を同定しなかった。

【0347】ヒト脂肪組織RNAをノーザンブロットで分析し、マウスob遺伝子と同様のサイズのRNA種を検出した。cDNAクローンの配列決定および分析は、ヒトOBがまた、167アミノ酸ポリペプチドをコードすることを示した(図2AおよびB、図3)。3塩基対の欠失を有するかまたは有さない2つのcDNAクラスが、同様にヒトで見い出された(図6)。マウスおよびヒトOB遺伝子は、推定のコード領域において高度に相同性であるが、得られた3'

サブセットにおいて見かけ上3塩基対欠失しているスプライスアクセプター部位でのずれが存在しているようである。

【0345】

および5'の非翻訳領域で30%だけの相同性を有する。N末端シグナル配列はまた、ヒトOBポリペプチド中に存在していた。ヒトおよびマウスOBポリペプチド配列の比較により、2つの分子はアミノ酸レベルで全体で83%の同一性を有することを示した(図4)。両方の種由来の成熟タンパク質のN末端は、N末端の100アミノ酸残基のうち6つの保存および3つの非保存アミノ酸置換だけを有して、より高い相同性を共有する。

【0348】ゲノムDNAを、マウス、ラット、ウサギ、ハタネズミ、ネコ、ウシ、ヒツジ、ブタ、ヒト、ニワトリ、ウナギ、およびショウジョウバエから単離し、EcoRIで制限切断した。切断物を1%アガロースTBEゲルで電気泳動した。次いで、DNAをイモビロン膜に転写し、そしてPCR標識2G7プローブで釣った。このフィルターを、65°Cでハイブリダイズし、そして20分間の各洗浄につき、65°Cで、2×SSC、0.2%SDSで2回洗浄した(すなわち、緩衝液を2回変えた)。これらのデータは、OBが脊椎動物間で保存されていることを示した(図16)。この観点から、ウナギDNAに2+のシグナルがあること；ウナギは魚であることに留意。

【0349】要約すると、得られた証拠は、体重および脂肪症が生理学的に制御されることを示唆する。7年前、この系の2つの重要な成分(OBおよびDB遺伝子)を同定する努力を開始した。この実施例に示すように、OB遺伝子は、今や、体重を調節する重要な役割を果たす脂肪特異的遺伝子として同定された。この遺伝子の産物は、分泌ホルモンである可能性が最も高く、ヒトおよびヒト以外の動物における栄養障害の診断および処置のための重要な用途を有し得る。

【0350】実施例2：細菌におけるOBの発現
obをコードしているマウスおよびヒトの両方のcDNAを、pET-15b発現ベクター(Novagen)にクローン化した。このベクターは、lacオペレーターとともにT7プロモーターを含み、そしてヒスチジンtag(His-tag)およびコード配列挿入部位の直ぐ上流のトロンピン切断部位(図17)(配列番号11および12)を含む融合タンパク質を発現す

20

30

40

50

る。

【0351】マウスおよびヒトcDNAを、シグナル配列の末端のアラニンをNdeI部位に変えるように改変した。これは、別の配列が3'領域において存在していたからである。NdeI部位の挿入は、以下の新規なプライマーを用いるPCRを用いて達成された：

Mnde-5' (マウス5プライムプライマー) :
CTTATGTTCA TATGGTGCCG ATCCAGAAAG TC (配列番号13)

Mnde-3' (マウス3プライムプライマー) :
TCCCTCTACA TATGTCTTGG GAGCCTGGTG GC (配列番号14)

Hnde-5' (ヒト5プライムプライマー) :
TCTATGTCCA TATGGTGCCG ATCCAAAAAG TC (配列番号15)

Hnde-3' (ヒト3プライムプライマー) :
TTCCTTCCGA TATGGTACTC CTTCAGGAA GA (配列番号16)

プライマーは、PCRフラグメントの各末端にNdeI制限部位を導入する、中央に6塩基対のミスマッチを含む。マウスまたはヒトcDNAのいずれかを有するファージを、これらのプライマーを用いてPCR増幅した。PCR産物をNdeIで切断し、1%低融点アガロースゲルでゲル精製した。ゲル精製したバンドをpETベクターにサブクローニングした。得られるプラスミドを配列決定し、変異がクローニングのPCR増幅工程の間に導入されないことを確実にした。グルタミン49をコードする、およびグルタミン49を欠失するヒトおよびマウスcDNAの構築物を調製した。特に、ヒトまたはマウスいずれかのOBコード配列を含み、シグナル配列がなく、そしてHis-tagと融合したpET15b構築物を、PCRクローニング法を用いて作成した。この構築物は、配列の誤りがPCR増幅工程の間にOB遺伝子のコード領域に導入されていないことを確認するために配列決定した。

【0352】2つの得られたプラスミド構築物であるpETM9およびpETH14を細菌発現宿主をトランスフォームするために選択した。最適条件下で1mM IPTGを用いた誘導に際し、トランスフォームされた細菌は、100-300 μg/mlのOB融合物を生産し得た。大部分のOB融合タンパク質が封入体で見出された。6Mグアニジン-HClまたは尿素を用いた可溶化の後、融合タンパク質は、His結合(Ni-キレート化)樹脂カラムを通して精製された。OB融合タンパク質のカラム精製のための条件(結合、洗浄、および溶出を含む)は、実験的に確立された。OB融合タンパク質は、5mMイミダゾール/6Mグアニジン-HClで樹脂に結合し、そして20mMまでのイミダゾール/6Mグアニジン-HClで結合したままである。タンパク質は、樹脂から60mMイミダゾール/6Mグアニジンで溶出し得る(図18A、B)。精製ヒトおよびマウスの両OB融合タンパク質を、PBS中でさらに透析し、調製物からグアニジン-HClを除去し、次いでポリクローナル抗体を惹起するために用いた。

【0353】融合タンパク質産物の生物学的活性を試験するために、精製タンパク質の再フォールディング条件を試験しそして開発した。これは、1Mグアニジン溶液中

で融合タンパク質を最初に透析し、次いで0.4Mアルギニン溶液を用いて希釈することを含む。His-tagを、生物学的機能を実験する前に、融合タンパク質から除去した。tagの除去は、ヒト胎盤由来のトロンビンで融合タンパク質を処理することにより達成された。

【0354】さらに、シグナル配列のないヒトおよびマウスOB遺伝子コード配列を、PCRクローニング法を用いてpET12cベクターにそれぞれ挿入した。これらの構築物は、細菌宿主細胞の周辺腔(periplasmic space)に合成したOB融合タンパク質を指向し得る。周辺腔から回収したOB融合タンパク質は、他の宿主タンパク質から精製するために簡単なゲル濾過を必要とするだけで、そしてこのようなプロセスの間変性されない。

【0355】実施例3：OBポリペプチドに対する抗体の調製

ポリクローナル抗体を生成するために組換えタンパク質を用いることに加えて、論理的に推理されたマウスOB配列由来の4種のペプチド配列のセットを、免疫原性プロットソフトウェア(GCG Package)を用いて同定した。4つのカルボキシ末端ペプチドフラグメントは以下の通りである：

(配列番号18) :

Val-Pro-Ile-Lys-Val-Gln-Asp-Asp-Thr-Lys-Thr-Leu-Ile-Lys-Thr

(配列番号19) :

Leu-His-Pro-Ile-Leu-Ser-Leu-Ser-Lys-Met-Asp-Gln-Thr-Leu-Ala

(配列番号20) :

Ser-Lys-Ser-Cys-Ser-Leu-Pro-Gln-Thr-Ser-Gly-Leu-Gln-Lys-Pro-Glu-Ser-Leu-Asp

(配列番号21) : Ser-Arg-Leu-Gln-Gly-Ser-Leu-Gln-Asp-Ile-Leu-Gln-Gln-Leu-Asp-Val-Ser-Pro-Glu-Cys

これらのペプチドは、KLHと結合し、そしてこのペプチド-KLH結合体を用いて、標準的技術を用いてウサギを免疫した。各ペプチドに特異的なポリクローナル抗血清をウサギから回収する。

【0356】実施例4：OBポリペプチドのインビトロ転移

機能的シグナル配列の存在を確認するために、オープンリーディングフレーム全体を含むヒトcDNAをpGEMベクターにサブクローニングした。この実験にはヒトcDNAのみを用いた。なぜなら、適切なマウスサブクローンは回収されなかったからである。ポジティブ鎖であるヒトob RNAをSp6ポリメラーゼを用いて転写し、イヌ睪膜ミクロソーム膜を伴ってまたは伴わずにインビトロ翻訳反応に用いた。一次翻訳産物は、約18kD(これは、cDNA配列から予想された分子量と一致する)の見かけの分子量で移動した。ミクロソーム膜を反応物中に含有することにより翻訳の全体的な効率が約5倍阻害された。それにも関わらず、約50~70%のOBの一次翻訳産物は、膜調製物の

存在下では約2 kDに短縮された。このことは、シグナル配列が機能的であることを示唆する(図19A)。インターロイキン-1 α RNA (これはシグナル配列をコードしない)の一次翻訳産物のサイズは、反応物にミクロソーム膜が含まれない場合には、変化しなかった。OBタンパク質の転移(translocation)が起こったことを確認するために、インビトロ翻訳産物をプロティナーゼ-Kで処理した。プロテアーゼ処理の結果、18kDの一次翻訳産物は完全にタンパク質分解されたが、16kDのプロセスされた形態は酵素処理により影響を受けなかった。このことは、それがミクロソームの内腔へ転移したことを示す(図19B)。これらのデータは、OBが分泌された分子であるという仮説に適合する。

【0357】シグナル配列の開裂後、2つのシステイン残基が予想されたタンパク質中に残り、この分子が他の分泌ポリペプチドの特徴であるジスルフィド結合を含む可能性を高めた[Shenら、Science, 224:168-171 (1984)]。

【0358】実施例5：OB遺伝子の特徴付け

ヒトにおける肥満症とOB遺伝子内の遺伝的改変との関*20

HOB 1gF 5'-CCCAAGAAGCCCATCCTG-3'

(配列番号29)

HOB 1gR 5'-GACTATCTGGGTCCAGTGCC-3'

(配列番号30)

DNAサンプルを種々の消化酵素から入手し、CCATCTCGAGCのプライマーのセットを用いて配列番号3112のヒト由来のヒトゲノムDNAを増幅し、2gのPCR産物を低融点TCAGAGアースゲル上で流し、330秒を配列番号320のアガラーゼ (agrase) で消化した。ABI 373A DNAシーケンサーおよびTaqジデオキシターミネーターキット (ABI, Perkin-Elmer) を用いてその配列を得た。患者サンプル由来のob遺伝子内に1点変異が現在までに検出された。この変異は第1エキソン内にあり、アミノ酸配列を変化させない。予備データは、別の患者の第1エキソン内に挿入配列が存在し得ることを示す。Taq DNAポリメラーゼの代わりにSequenaseを用いる異なる自動化された配列決定法が、変異検出のためにより容易に読める配列を得るために用いられ得る。

【0361】 実施例6：酵母におけるOBの発現

OBのポジショナルクローニングに続き、OBタンパク質が食物の摂取量および体重を減少させる生理学的メカニズムを明らかにすることが重要になった。この方針の第1段階は、発現系を用いて機能的タンパク質を組換えによって産生させることであった。細菌の発現系が好結果であることに加えて、酵母の発現系もまた選択された。酵母発現は、OBの発現のためにいくつかの魅力的な特徴を有する。最も重要なのは、生物学的に活性な真核生物のタンパク質が産生されやすいということである。OBポリペプチドは哺乳動物細胞によって分泌される。タンパク質の分泌は全ての真核生物について非常に

*係を確認するために、ヒトOB遺伝子の配列を決定した(図20A~20C)(配列番号22および24)。ヒトコード配列由来の特定のプライマーを用いてヒトP1ライブラリーをスクリーニングした。3つの異なるP1クローンを入手し、増殖させ、そして第1コードエキソンと第2コードエキソンとの間のスプライシング部位に隣接するプライマーを用いてPCR増幅を行った。約2kbの全イントロン領域を増幅し、部分的に配列決定した(図20A参照; および配列番号22および24に示す)。

10 【0359】マウス遺伝子およびヒト遺伝子の両方の遺伝子構造を、PCRアッセイおよび他の標準的技術を用いて特徴付けた。マウスOB遺伝子は、3つのエキソンからなることが見出され、第2および第3のエキソンがコード配列を占める(図20D)。ヒトOB遺伝子のコード領域は、同じ構造を有する；しかし、ヒト遺伝子は5'エキソンおよびイントロンを欠いている(図20E)。

【0360】ヒト遺伝子のイントロン配列から生成された2セットのプライマーを調製した(図20A~C)。プライマーの配列は以下の通りである(FおよびRはそれぞれフォワードおよびリバースを表す)：

類似している。このことは、細菌の分泌経路が似ている
よりずっと酵母の分泌器官が哺乳動物の分泌経路に似て
TACCTGGGのことを意味する。特に、哺乳動物細胞で見られるO
Bのタンパク質改変は、酵母の分泌系を通じての発現に
おいてもよく見られる。さらに、タンパク質のフォール
ディングは分泌器官を通過中に行われ、従って酵母の分
泌器官を介してobを送達することは、天然の生物学的活
性を有する適切にフォールディングしたタンパク質を生
じやすい。このことは、2つのシステイン残基がジスル
フィド結合を形成し得るのでOBについて著しい。分泌
経路とは対照的に、細胞の細胞質の還元環境は、ジスル
フィド結合の形成を妨げる；従って、インビボでこのジ
スルフィド結合が形成されるためにはOBが分泌経路を
通過することが必須である。他の利点は、酵母の操作の
簡便性と迅速性、ベクターおよび株の利用性、ならびに
酵母の組換え技術の膨大な経験に關係する。

【0362】*Pichia pastoris*発現系を以下の4つの理由により選択した：（1）それが他の酵母の系（例えば、*S.cerevisiae*）より高レベルの異種タンパク質の発現を有する；（2）*P.pastoris*におけるタンパク質のグリコシル化が*S.cerevisiae*においてより哺乳動物の系に類似している（もっとも、コンピューターサーチを用いてグリコシル化部位をobにおいて検出したのではないが、認識されていない部位でのグリコシル化の可能性はまだ残っている）；（3）*P.pastoris*は、天然にはほとんどタンパク質を分泌しない、従って、一般に発現し

た外来タンパク質を精製することが容易である；そして（4）ベクターおよび酵母の株が市販されている（Invitrogenから）。図21および22に酵母発現ベクターを生成する2つのストラテジーを示す。

【0363】選択されたベクターはpPIC.9であった。このベクターは、 α -接合因子(α -mating factor)プレプロコード配列のすぐ下流のクローニング部位を含む。この配列は、分泌経路によって分泌されるクローニング部位にクローン化された遺伝子によってコードされるタンパク質を支配する。このベクターの別の重要な特徴はHIS4遺伝子である。この遺伝子は、このベクターによって酵母をトランスフォームした後、ヒスチジン欠損培地で増殖させた酵母の栄養要求性株を用いてこのベクターの取り込みに関して選択を可能にする。クローニングのストラテジーは以下の通りであった：OB cDNAを5'プライマーを用いてPCR増幅する。このプライマーは、3'末端部に、予想されるリーダーペプチド開裂部位のすぐ後ろのOB配列と相補的な配列を、そしてそのほぼ5'末端部にはベクターの α -接合因子配列の3'末端部に相補的な配列を含む。この5'プライマーはまたXhoI部位も含む。3'プライマーは、その3'末端部にOBの最後の数個のアミノ酸に相補的な配列を、その5'末端部にはEcoRI部位を有するように設計された。PCR増幅の後、このPCR産物をXhoIおよびEcoRIで消化して同様に消化したpPIC.9にクローニングした。マウスおよびヒトの両OB cDNAをクローニングした後（各々、コドン49位にグルタミンを有するものおよび有さないもの）、個々のクローンを4つの構築物全てについて単離し、配列決定して構築物が正しい方向、およびフレームにクローニングされたこと、およびPCR増幅工程に由来する変異を含まないことを立証した。正しい配列を有するクローンの同定後、これらをP.pastoris GS115株（ヒスチジン要求株）にトランスフォームした。

【0364】2つのマウスOB構築物に関して、トランスフォームされた酵母クローンをタンパク質の発現に関してスクリーニングした。トランスフォームされた酵母はOBを含むという証拠として、DNAドットブロットアッセイおよびコロニーハイブリダイゼーションアッセイを行った。これらはどちらもOB配列がトランスフォームされた酵母内にはあるが、トランスフォームされていない酵母内にはないことを示した。さらに、トランスフォームされた酵母は今では16kDaのタンパク質を培養培地に分泌したが、トランスフォームされていない酵母はこのサイズのタンパク質を分泌しない（図23A）。これはOBの予想されたサイズである。OBの高い発現体である両方のマウスの構築物の個々のクローンを同定した。現在、obを均一に精製するための精製ストラテジーが開発されている。1つのストラテジーは、OBをカチオン交換カラムで精製することである（図23B）；予備データは、強いカチオン交換体が有用であり得ることを

示唆している。しかし、カチオン交換クロマトグラフィー後、推定されるob産物は失われている。このことは、サンプル中のプロテアーゼの存在を示す。

【0365】この問題を克服する1つのストラテジーは、酵母における発現のためにob-His-tag融合物を調製することである（図22）。さらなる評価は、His-tagを持たないOBがNi-キレート化カラムにしっかりと結合していることを示した。Ni-キレート化とそれに続くゲル濾過によるOBポリペプチドの精製は、質量分析法に十分な純度の産物を生じた。質量分析は、発現されたタンパク質の分子量が予想した分子量と同じであることを裏付け、このことはOBがPichiaにおいて成功裡に発現されたことを強く確証する。

【0366】しかし、Ni-キレート化/ゲル濾過精製プロトコルは、OBポリペプチドを十分に純粋な形態で生じない。別の小分子が存在する。タンパク質分解活性はNi-キレート化カラムからの排除体積に溶出するようである。従って、3工程の精製プロセスを計画する：Ni-キレート化、続いてカチオン交換（これは小分子混入物を除く）、その後ゲル濾過。

【0367】SDS-PAGEゲルのクマシーブルー染色による推定発現レベルは、酵母が振とうフラスコ内で増殖された場合には、約10mg/lであることを示す。これらのレベルは発酵容器内で増加することが期待され、そして本発明者らはより多量のタンパク質を得るという希望を持って発酵を開始しようとしている。ヒトOB構築物に関しては、高コピー数のOB遺伝子を含むトランスフォームされた酵母のクローンが同定され、それらはOBタンパク質を発現することが予想される。抗体が開発されれば、分泌された16kDaのタンパク質の独自性(identity)の確認のためにそれらが用いられるであろう。

【0368】実施例7：細菌におけるOb融合ペプチドの高レベルの発現

フリーザー貯蔵物の調製：炭素供給源を含まない滅菌されたM9ZB培地の2つの4mlアリコートそれぞれに、40 μ lのストックデキストロース(0.4g/ml、フィルター滅菌済み)、10 μ lのアンピシリンストック(200mg/ml)、および5 μ lのクロラムフェニコールストック(34mg/ml、エタノール中)を添加した。それらに、Novagen pET-14bベクター内にクローン化されたマウスおよびヒトOB1 DNAを有するE.coliの単一のコロニーそれぞれを用いてこれらを接種した。チューブを37°Cで一晩インキュベートした。

【0369】一晩培養した培養物0.5mlを用いて、デキストロース、アンピシリン、およびクロラムフェニコールを含む50mlのM9ZB培地に接種した。これらを30°Cでインキュベートして600nmでの吸光度(A_{600})を定期的にモニターした。 A_{600} が約1~1.2の時点で、175 μ lの培養物のアリコートを2mlのエッペンドルフチューブ内で25 μ lの60%グリセロールと混合し、液体窒素中で瞬間凍結し

-80°Cで保存した。

【0370】培養物の増殖：0.5mlの40%デキストロース、125μlのアンピシリンストックおよび50μlのクロラムフェニコールストックを含む50mlのM9ZB培地に1mlの凍結ストックを接種して30°Cでインキュベートした。 A_{600} が1~1.2の時点で、この培養物10mlを用いて、デキストロース、アンピシリンおよびクロラムフェニコールを含む500mlのM9ZB培地の入った2Lのフラスコ4本に接種した。これらを、 A_{600} が約1~1.2の時点で最終濃度0.5mMのIPTGを用いた誘導まで30°Cでインキュベートした。培養物を一晩インキュベートした。細胞を4000rpmで20分間遠心分離して回収した。この発現系は全タンパク質のかなり高い割合（グラム/1リットルE.coliのオーダー）として組換えOBポリペプチドを生じる。

【0371】細胞溶解および封入体の再懸濁：細胞ペーストを最少容量の20mM HEPES, pH7.2、10%グリセロール、0.1M KCl、5mM $MgCl_2$ 、1%アプロチニン、1mM PMSF、5μg/mlロイペプチン、および50μg/ml DNase Iに再懸濁した。懸濁物を液体窒素および温湯を用いて凍結融解を3度行った。溶解した細胞を18000rpmで30分間遠心分離して、20mM HEPES, pH7.5、0.1M NaClに再懸濁した。懸濁物を超音波処理してTriton X100を最終濃度2%になるように添加した。これを18000rpmで15分間遠心分離した。このサイクルをさらに2回行った後、Tritonなしで3サイクル洗浄した。最後に、ペレットを、超音波処理およびそれに続く遠心分離により6M GdHCl（グアニジン-HCl）、20mM HEPES, pH7.5に溶解した。上清をさらなる精製に用いた。

【0372】フォールディングされていない状態のOBタンパク質を固定化金属イオンアフィニティークロマトグラフィー（IMAC）により精製した。5カラム容量の50mM Na_2SO_4 で帯電させて6M GdHCl、20mM HEPES, pH7.5で平衡化したPharmacia chelating fast flow sepharoseの40mlカラムに溶液をかけた。このカラムを6M GdHCl、30mM イミダゾール、20mM HEPES, pH7.5で洗浄した。最後に、タンパク質を0.2M イミダゾールを含む同じ緩衝液で溶出した。6M GdHCl中のフォールディングされていないタンパク質を、酢酸ナトリウム（NaAc）を10mMまで添加してpHを酢酸で約4.5に調整した後、4°Cで保存した。

【0373】タンパク質の再フォールディングおよび精製：100mgのタンパク質を含む6M GdHCl溶液を、67μlの1Mジチオスレイトール（DTT）で処理し、そして6M GdHCl、10mM NaAc, pH4.5で約67mlまで希釈した。それを室温で約1時間攪拌した。それを攪拌しながら4Lの20%グリセロール、2.5mM $CaCl_2$ 、20mM Tris, pH8.4緩衝液に希釈した。適切に混合した後、この溶液をさらには攪拌せずに室温に約8時間おいた。次いで、2000単位の精製ウシトロンビン（Parke-Davis製品のthrombostat由来）を添加し、そしてこの溶液を緩やかに攪拌しながら放置した。2.5時間後、2000単位のトロンビンを再度投与し、

ヒスチジン-tagの開裂をさらに3時間続けた。トロンビンの開裂はPMSFを最終濃度0.1mMまで添加することにより停止させた。この溶液を濾過して4°Cで保存した。

【0374】開裂したタンパク質を、1M KCl、20%グリセロール、20mM HEPES, pH8.4緩衝液で平衡化した上記と同じIMACカラムでさらに精製した。タンパク質溶液をロード後、それを同じ緩衝液で洗浄し、そして開裂したタンパク質を1M KCl、20%グリセロール、40mM イミダゾール、20mM HEPES, pH8.4で溶出した。開裂しなかったタンパク質を0.2M イミダゾールで溶出した。

【0375】精製された開裂タンパク質を濃縮し、50~100mMのEDTA、10mMフェリシアン化カリウムで処理して（全ての不完全な酸化を完全にするため）、superdex 7516/60カラムでゲル濾過した。この手順を用いた収率は出発ペプチドの約50%に近づいた。

【0376】一旦精製されると、発現されたタンパク質はいくつかの方法によって特徴付けられた。物理的な特徴付けは、構造の均一性を決定するための動的光散乱を含み、そして適切なフォールディングの尺度として用いられる。光散乱データは、ヒトOBポリペプチドは、主に、または専らモノマーとして発現され、一方、マウスOBポリペプチドは、ダイマーならびにモノマーとして見出され得ることを示した。

【0377】Ellman試薬および質量分析法を用いるアッセイは、システイン残基がタンパク質内でジスルフィド結合を形成することを確認した。このポリペプチドの酸化型は以下のようにマウスに投与され、そして生物学的活性を示した。

【0378】円偏光二色性を用いてこのタンパク質の構造的な形状を概略で決定した。生理学的緩衝液（pH約8、およそ生理学的イオン強度）中のCDスペクトルは、ヒトOBポリペプチドが約60%のαヘリックス構造および約40%のランダムコイル構造を有することを示す。マウスOBポリペプチドは、CD分光法により約50%のαヘリックスおよび50%のランダムコイルを有することが見出された。

【0379】制限タンパク質分解に続く質量分析（Cohenら、1995、前出）を用いて、タンパク質分解の影響を受けやすいOBポリペプチドの部分を同定した。この分析はアミノ酸残基54位~60位の可動性ループ構造の存在を示した（図4に図示）。この可動性ループは定義された2°の構造（例えば、α-ヘリックス）の2つのドメインに結合しているようである。

【0380】重要なことは、次の実施例で示すように、精製されたタンパク質の生物学的活性を、そのタンパク質を痩身型齧歯類および肥満型齧歯類の両方に浸透圧ポンプ（例えば、Alza Corporation, Palo Alto, CAのALZET浸透圧ポンプ）を介して投与することにより、または少なくとも2週間にわたって毎日腹腔内にボーラス投与することによりアッセイし、そして摂食行動および体重

に及ぼす影響を観察した。

【0381】実施例8：OBポリペプチド（レプチン）の体重減少効果

マウスOB遺伝子座の遺伝子産物は、体重調節に重要な役割を果たす。この実施例は、マウス、ラット、およびヒト血漿においてOBタンパク質が循環していることを立証する。3つの全ての種における循環形態は、SDS-PAGEによるとシグナル配列を持たない推定ポリペプチド配列と同じ分子量を有する。このことは、インビボではこのタンパク質がシグナル配列を開裂した後でプロセスされることが示唆される。OBタンパク質はC57/B16J ob/obマウス由来の血漿には存在せず、コントロールと比較してdb/dbマウスの血漿中には10倍高い濃度で存在し、fa/faラットの血漿中には20倍高いレベルで存在した。これらの肥満動物変異体はOBの効果に耐性であることが示唆される。6人の痩身型ヒト被検者の群内でOBタンパク質の血漿レベルに7倍の差があった。組換えマウスOBタンパク質の毎日の注射は、ob/obマウスの体重を劇的に減少させ、野生型マウスの体重に対して有意な効果を有したが、db/dbマウスに対しては影響を有さなかった。これらのデータは、OB遺伝子座の遺伝子産物が体重調節のための内分泌機能を提供することを示唆する。

【0382】材料および方法

ウサギをフロイントアジュバント(HRP, Inc.)中の組換えタンパク質で免疫した。免疫精製された抗マウスOB抗体を、記載されたように組換えタンパク質に結合させたsepharose 4Bカラムに抗血清を通過させることにより調製した[Harlowら, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY(1988)]。マウス血漿の免疫沈降を次のように行った：約2.5mMのEDTAを含むマウス、ラット、およびヒト由来の血漿0.5mlを、結合していないsepharose-4Bと揺動かしながら室温で2時間予め明澄化(pre-clear)した。スピンの後sepharoseを取り出し、アフィニティー精製した抗体を1mg/mlのパックされたsepharoseの濃度で含む抗体結合sepharoseの50%スラリー50mlを添加した。1/2mlの2×RIPA緩衝液を添加して最終結合条件を次のようにした：50mM Tris-HCl, pH7.5、100mM NaCl、1% NP-40、0.1% SDS、0.5%デオキシコール酸ナトリウム、および0.025%アジ化ナトリウム。反応を揺らしながら4℃で一晩行った。抗体結合sepharoseをRIPA緩衝液を用いて8回洗浄し、続いて、PBSを用いて3回濯ぎ、15%のSDS-PAGE上で泳動した。タンパク質をニトロセルロースフィルターに移し、組換えタンパク質に対するビオチン化した免疫精製抗体でウェスタンブロットした。用いた二次抗体はHRP-ストレプトアビジンであり、ECLを検出に用いた。

【0383】マウス血清中のOBの量を定量するために、再びフォールディングした(refolded)組換えマウスOBタンパク質の量を増加させて(0.01、0.1、0.5、2、

0、15.0ng)100λのC57BL/6J ob/ob血漿に添加し、protein A sepharoseに結合した抗体と共に4℃で3時間インキュベートした。緩衝液A(10mMリン酸ナトリウム緩衝液, pH7.4; 100mM NaCl; 1% Triton X-100、5mM EDTA、1mM PMSF)による多数回の洗浄の後、サンプルをサンプル緩衝液に再懸濁し、15%SDS-PAGEにロードして、ニトロセルロースメンブレンに移した。免疫精製ビオチン化抗アミノ末端抗体を一次抗体として、HRP-ストレプトアビジンを二次抗体として用いてウェスタンブロットを行い、続いてECL検出を行った。

【0384】細胞質抽出物は脂肪組織をNDS緩衝液(10mM Tris, pH7.5、10mM NaCl、60mM ICCI、0.15mM スペルミン、0.5mM スペルミジン、14mM β-メルカプトエタノール、0.5mM EGTA、2mM EDTA、0.5% NP-40)中でpolytronおよびdounceホモジナイゼーションによってホモジナイズすることにより調製し、そして核の除去は700gでの遠心分離によって行った。

【0385】免疫沈降は、免疫精製抗ヒトOB抗体を用いたこと以外は、上記のように行った。ELISAに関しては、免疫精製抗ヒトOB抗体の1mg/ml溶液100mlをホウ酸緩衝PBS溶液に溶解し、マイクロタイター(Corning cat.#2595)プレートに入れ一晩4℃で置いた。次いで、このプレートを0.05%Tween20を含むホウ酸生理食塩水溶液で4回洗浄し、余分な液体を除いた。プレートを室温で2時間1ウェル当たり240mlの0.3%ゼラチンを含むホウ酸生理食塩水溶液とともにインキュベートすることによりブロックし、次いで、洗浄して乾燥した。既知量の再びフォールディングしたヒトOBタンパク質または血漿サンプルのいずれかを100mlの容量で個々のウェル中4℃で一晩インキュベートした。洗浄後、このプレートを100mlのビオチン化免疫精製抗ヒト抗体(ゼラチン-ホウ酸緩衝溶液中0.1mg/ml)とともに室温で4時間インキュベートした。洗浄後、西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)-ストレプトアビジンをこのプレートに添加した(ホウ酸緩衝液中0.1mg/ml、0.3%ゼラチン)。次いで、HRP基質溶液(クエン酸中ABTS、0.3mg/mlおよびH₂O₂、0.01%)を検出に用いてO.D.を414nmで測定して抗体の結合を定量した。

【0386】マウスおよびヒトOB遺伝子コード配列を、OB cDNA配列を含むプラスミドからPCR増幅し、pPIC9プラスミド(Invitrogen)にサブクローニングした。用いたヒト5'プライマーは5'GTATCTCTCGAGAAAAGAGTGCCCATCCAAAAGTCCAAG3'(配列番号34)であり、そして3'プライマーは5'GCGCGAATTCTCAGCACCCAGGGCTGAGGTC3'(配列番号35)であった。

【0387】マウスに関しては、5'プライマーは5'GTATCTCTCGAGAAAAGAGTGCCATCCAGAAAGTCCAGG3'(配列番号36)

であり、そして3'プライマーは5'GCGCGAATTCTCAGCATTACAGGCTAACATC3' (配列番号37)であった。

【0388】マウスおよびヒトのどちらの5'プライマーも、5'末端にXhoI部位、およびベクターpPIC.9内に存在する α 接合因子シグナル配列の最後の4アミノ酸のコード配列を含む。このベクターは不均一に発現される遺伝子の細胞から培養培地への分泌を支配する。5'PCRプライマーはまた、シグナル配列開裂部位の後で21位のアミノ酸アラニンの前のOB遺伝子のオープンリーディングフレームの最初の19ヌクレオチドを含む。3'プライマーはその5'末端にEcoRI部位を含む。この部位のすぐ後ろに推定OB停止コドンと相補的な配列が続いている。PCR条件は次の通りであった：94°Cで1分間の変性、55°Cで1分間のアニーリング、そして72°Cで2.5分間の伸長。低サイクルPCR (15サイクル) および校正ポリメラーゼPFU (Stratagene) を用いてPCRによって生成される変異の数を制限した。PCR産物をXhoIおよびEcoRIによって消化し、そして同様に消化されたベクターpPIC.9にクローニングした。全ての構築物を両方の鎖について配列決定し、PCRによって生成された変異がないことを確認した。クローンを、スフェロプラスト法によって*Pichia pastoris* (His⁻) にトランスフォームし、ヒスチジン欠損培地で選択した。コロニーハイブリダイゼーションアッセイによって高コピー数の組み込みに関して約200のマウスおよびヒトクローンがスクリーニングされた。次いで、高コピー数のクローンを、OB発現についてアッセイした。始めはクマシー染色によって、トランスフォームされた酵母の培養培地中に存在する新規な16kDタンパク質の存在が示された。この16kDのバンドは、細菌で発現されたOBタンパク質に対して生じた抗体を用いてOBであることが確認された。この組換えタンパク質は以下に記載する2段階の精製方法によって精製された。質量分析および臭化シアン処理をBeavisら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:6873-6877 (1990)に記載のように行った。

【0389】マウスおよびヒトOB遺伝子のC末端からシグナル配列までの全OBコード配列をpET15b発現ベクター (Novagen) にサブクローニングし、そして*Escherichia coli* [BL21(DE3)pLYsS] 内でT7 RNAポリメラーゼ系を用いて過剰発現させた [Studierら、*Meth. Enzymology*, 185:80-89 (1990)]。30°Cで595nmにおける吸光度が0.7になるまで増殖させ、そして0.5mMのイソプロピル- β -D-チオガラクト-ピラノシドで一晩誘導した細胞を低速遠心分離により回収した。溶解を3サイクルの凍結溶解によって行い、DNA消化はDNaseIを用いて行った。膜抽出を超音波処理およびデタージェント可溶化 (detergent solubilization) によって行い、そして最終封入体ペレット (final inclusion body pellet) を6Mグアニジン-HCl、20mM HEPES, pH8.4に溶解した。組換えOBタンパク

質を、Niイオンアフィニティーカラムを用い、イミダゾールの量を増加させながら洗浄するIMACによって、変性条件下で精製した。次いで、精製された変性OBタンパク質を6Mグアニジン-HCl、10mM酢酸ナトリウム (NaAc), pH5中で貯蔵し、そして1mM DTTを用いて室温で1時間還元した。還元したタンパク質を20%グリセロール、5mM CaCl₂、5mM NaAc, pH5に希釈し、混合して室温で8~12時間インキュベートすることによって変性を行った。変性後、Trisを10mMまで添加することによりpHを8.4に調整し、そしてヘキサ-ヒスチジンtagをトロンビン開裂によって除いた。開裂され、還元されたタンパク質をIMACによって再精製し、トロンビンおよび開裂されなかった融合タンパク質から生成物を分離した。開裂され、還元されたタンパク質はNiイオンアフィニティーカラムから40mMイミダゾールで溶出するが、トロンビンは保持されず、そして開裂されなかった融合タンパク質は0.2mMイミダゾールで溶出する。次いで、生成物を濃縮し、100mM EDTAおよび10mMフェリシアン化カリウムで処理してPharmacia superdex 75 16/60カラムを用いるゲル濾過によってさらに精製した。

【0390】EllmanアッセイをEllman, *Arch. Biochem. Biophys.*, 82:70-77 (1959)に記載のように行った。Ellman試薬は、39.6mgの5,5'-ジチオ-ビス(2-ニトロ安息香酸) (DTNB) を10mlの0.05Mホスフェート、pH8に溶解することにより調製した。校正曲線を10~120mMの遊離スルフヒドリル (還元DTTの1mMストック溶液を用いる) の濃度範囲で412nmで構成した。各アッセイは0.02mlのEllman試薬および総反応混合物0.5mlを用いて行った。測定された消光係数は遊離スルフヒドリル基に関しては12974M⁻¹cm⁻¹ (相関係数0.99987) であり、これは、先に報告された値13600M⁻¹cm⁻¹の5%以内である。

【0391】50mlの2mg/ml精製ゲル濾過タンパク質 (最終反応混合物中の可能な遊離スルフヒドリル濃度約24mMに相当) をEllmanアッセイに供した。得られた溶液はA₄₁₂が約0.02であり、このことはタンパク質中の2つのシステイン残基がシスチンを形成する酸化された状態であるか、またはそれらの遊離スルフヒドリル基が、フォールディングしたタンパク質の近づきにくいコア内に完全に埋まっていることを示唆する。同じアッセイを6Mグアニジン-HClの存在下でフォールディングされていないタンパク質に関して行うことによって同じ結果が得られた。

【0392】マウスを病原体のない環境で個別にケージに入れ、35%(w/w) Laboratory Rodent Diet 5001 (PMP Feeds, Inc.)、5.9%(w/w) タピオカブリンミックス (General Foods)、および59.1%水を含む飼料 (エネルギー含量1.30kcal/gm) に順応させた。この飼料はオートクレーブで滅菌されそして60mmプラスチック皿 (この皿は100mmのペトリ皿の頂部に固定されている) に詰めた。タピオカは飼料に糊状の性質を与え、それにより動物が食

物をケージに散らかすのを困難にする。100mmの蓋により動物がこぼした少量の食物を回収する。毎朝新鮮な食物をケージに入れそして前日の皿を取り出して重量を量った。重量の差は毎日の食物消費の尺度を提供する。組換えタンパク質が食物摂取量および体重に与える影響は3系統のマウスで測定された：C57Bl/6J ob/ob、C57 Bl/Ks db/db、およびCBA/J +/+ (Jackson Laboratoryから購入)。30匹の各系統のマウスを10匹ずつの群に分けた。各系統の1群には毎日300 μ lのPBS中5mg/g/日の用量で再びフォールディングした細菌obタンパク質を腹腔内(i.p.)に注射した。第2の群には同容量のPBSを腹腔内注射した。これらのコントロールマウスに組換えタンパク質をPBSで透析したものを注射した。このPBSはActi clean ETOXカラムを用いてエンドトキシンを取り除かれた。第3群の動物には注射しなかった。食物摂取量を毎日記録し、そして体重測定値を3.5週間隔で定期的に記録した。ペアーフィーディング実験については、別の群のobマウスの食物摂取量は、タンパク質を与えられているobマウスによって消費される食物摂取量と日毎ベースで(on a daily basis)一致した。

【0393】結果

OBタンパク質はマウス、ラット、およびヒト血漿中を循環している

組換えマウスおよびヒトOBタンパク質をpET 15b細菌発現ベクター(Novagen)を用い、そしてPichia pastoris (酵母の発現系で組換えタンパク質を培養培地に直接分泌する)にクローニングすることにより調製した。酵母で発現されるobタンパク質は、カルボキシ末端からシグナル配列までの146アミノ酸を含む。ウサギを細菌タンパク質(HRP, Inc.)で免疫した。抗体を免疫精製して(Research Genetics)、免疫沈降、および血漿および脂肪組織由来のタンパク質のウエスタンブロットに用いた。

【0394】マウスの血漿由来のOBタンパク質はSDS-PAGEにより見かけの分子量16kDで移動した。電気泳動による移動性が、シグナル配列を除去した後の酵母によって分泌される組換えOBタンパク質と一致する(図24A)。このタンパク質は、105位のコドンにナンセンス変異を有するC57BL/6J ob/obマウス由来の血漿では検出されなかった。いくつかの異なる抗血清は、cDNA配列から予想された短縮された105残基ポリペプチド鎖を同定できなかった。

【0395】db/dbマウスではコントロール動物に比べて循環タンパク質のレベルが10倍増大していることが観察された(図24A)。野生型およびfa/faラット由来の血漿の免疫沈降は、変異ラットにおけるOBタンパク質のレベルが、野生型と比較して20倍増加していることを明らかにした(図24B)。db変異は、結果としてobマウスに見られるのと同じ肥満型表現型になる(Baharyら、1990、前出)。fattyのラットは、dbに相同な遺伝子内の劣性変異の結果として肥満する(Truettら、1991、前

出)。マウス血漿中OBのレベルを定量するために、組換えタンパク質の量を増加させながら血清に添加して免疫沈降させた(図24C)。組換えタンパク質の量の増加に伴ってウエスタンブロットのシグナル強度の直線的増加が見られた。マウス血漿中の天然タンパク質のシグナル強度と標準との比較は、野生型マウスにおいて循環しているOBタンパク質のレベルは約20ng/mlであることを示した。これらのデータは、免疫沈降およびウエスタンブロットが抗体過剰条件下で行われたことを示す。コントロールと比較して増加したレベルのOBタンパク質はdb/dbマウス由来の脂肪組織のタンパク質抽出物においても見られる(図24D)。分泌されたタンパク質について予想されたように、脂肪組織由来のタンパク質は粗膜画分と一緒に分画された(データは示していない)。

【0396】体重指数(Body Mass Index)(BMI=体重/身長²)が25より小さい6人の痩身型ヒト被検者の血漿サンプルを、ヒトタンパク質に対する免疫精製抗体を用いて免疫沈降させた。免疫沈降した物質は、酵母で発現された146アミノ酸のヒトタンパク質で見られた電気泳動の移動度と同じ移動度で移動した。シグナルの強度は6サンプル間で有意に異なった(図25A)。オートラジオグラフのデンストメトリーは、個体HP1およびHP6におけるレベルはおおよそ5倍の差があり、他の被検者におけるレベルは中間にあることを明らかにした。酵素連結免疫アッセイ(ELISA)を、免疫精製された抗体およびスタンダードとして再びフォールディングした細菌タンパク質を用いて行った(下記参照)。得られた標準曲線を図25Bに示す。このアッセイを用いると、この6人のヒト血漿サンプル中のOBタンパク質血漿レベルは2~15ng/mlの間で変化した(図25C)。HP6由来の血漿中のOBタンパク質のレベルは免疫アッセイの直線範囲の外側にあり、 ≥ 15 ng/mlである。これらの量的な差はウエスタンブロットで見られる差と相関していた。

【0397】予備データは、レプチンが少なくとも部分的に別の1つのまたは複数のタンパク質と複合体化して循環し得ることを示唆する。この結論は、組換えスタンダードに比べて血清の滴定曲線の形の不均一性に基づく。変性条件および非変性条件下でゲル濾過HPLCによりウサギ抗OBカラムで免疫精製された多量のレプチンの分析(ELISAおよびSDS-PAGEによりモニターした)は、OBポリペプチドが高分子量複合体のように振る舞うことを示唆した。しかし、これらのデータは予備的なままである；もし必要であれば、OB結合タンパク質をさらに特徴付けなければならない。

【0398】OBタンパク質の構造的特徴

OBタンパク質は2つのシステイン残基を有するので、インビボの酸化条件下では分子内または分子間ジスルフィド結合を形成し得る。サンプル緩衝液に還元剤を添加してまたはしないでウエスタンブロットを繰り返した。どちらの条件下でも、ヒト血清中のOBタンパク質はモ

ノマーとして移動した（データは示さない）。非還元条件下ではdbマウス血清から免疫沈降したタンパク質が、16kDのモノマーおよび約32kDのダイマーの両方のタンパク質と一致した位置に検出された（図26A）。高分子量部分が還元条件下で消失したことは、マウスOB画分が分子間ジスルフィド結合の形成を通じて高分子量種として循環していることを示唆する。約80%のマウスOBが約16kDのタンパク質として循環し、そして20%が約32kDの形態で循環している。

【0399】マウスおよびヒトのタンパク質がPichia pastoris中で発現される場合に、同じ分子形態が見られる[Abramsら、Immunol.Rev.,:5-24(1992)]。これらの研究において、146アミノ酸の成熟OBタンパク質に対応するDNA配列がpPIC.9ベクター(Invitrogen)内の酵母α接合因子シグナル配列の下流にクローニングされた。OBタンパク質を、マウスおよびヒトのタンパク質を発現する株の酵母培地から精製し、そして還元条件および非還元条件下で電気泳動した（図26A）。マウスのタンパク質は非還元条件下では主にダイマーとして酵母内で発現され、還元剤存在下でモノマーとしてのみ発現された。組換えヒトタンパク質はどちらの条件下でもモノマーの位置に移動した（データは示さない）。

【0400】Pichia内で発現された精製ヒトタンパク質は、質量分析1990(Beavis, 1990,前出)により測定された $16,024 \pm 3\text{Da}$ の分子量を有した。この値は、1個の分子内ジスルフィド架橋を含むタンパク質のアミノ酸配列から計算した質量($16,024\text{Da}$)と一致する。このタンパク質の臭化シアン開裂産物のマトリックスアシストレーザー脱着(Matrix-assisted laser desorption)質量分析は、117位のシステインと167位のシステインとが分子内ジスルフィド結合を通じて結合していることを示す（図26B）。臭化シアンはカルボキシ末端からメチオニン残基までを開裂する。

【0401】生物活性な組換えタンパク質の調製および特徴付け

マウスOBタンパク質は、E.coli内でpET 15bプラスミドから、トロンビン開裂部位を含む20残基のN-末端のヘキサ-ヒスチジンtagを有する不溶性融合タンパク質として発現された。細菌の封入体をグアニジン-HClを用いて可溶化しそして固定化金属イオンアフィニティークロマトグラフィー(IMAC)を用いて変性条件下で精製した（図27）。精製され、変性された融合タンパク質を還元、希釈して室温で水溶液中で再びフォールディングさせた。トロンビン開裂に続いて、さらに4つのN-末端残基(Gly-Ser-His-Met; 配列番号38)を含む還元した(renatured)マウスOBタンパク質を、IMACによって(SDS-PAGEおよび質量分析による判定によると) >98%均一まで再精製した。マトリックスアシストレーザー脱着質量分析は、 $16,414 \pm 3\text{Da}$ の質量を測定された（予想された質量= $16,415\text{Da}$ ）。還元および非還元SDS-PAGEゲルは共に、見か

けの分子量が16kDである単一の分子種を示した（データは示していない）。

【0402】DP801 Molecular Size Detector(Protein Solutions, Inc.)を用いる動的光散乱測定は、還元したマウスOBタンパク質が主としてモノマー性であり、いくつかはより高次の凝集物であることを示した。このタンパク質をEDTAで処理して化学的に酸化した。次いで、高分子量種をゲル濾過により除いた。さらなる動的光散乱測定は、精製され還元された組換えマウスOBタンパク質が単分散していることを確認した。リン酸緩衝生理食塩水(PBS)に対して透析した後、細菌のエンドトキシンをActiclean ETOXカラム(Stereogene Bioseparations, Inc.)を用いて除去した。タンパク質の最終収量は 45mg/l であった。

【0403】精製され還元された組換えマウスOBタンパク質についてEllmanアッセイを行い、その酸化状態を評価した(Ellman, 1959, 前出)。還元されたタンパク質も6Mグアニジン-HClによってフォールディングしないタンパク質もどちらも遊離のスルフヒドリル含有量が<0.5%であることを示し、モノマー産物が分子内ジスルフィド結合を含むことが示された。このことは再フォールディングした細菌性タンパク質の臭化シアン開裂生成物の質量分析により確かめられた。

【0404】OBタンパク質の生物活性。 精製され、還元された組換えマウスOBタンパク質を、 5mg/kg/日 の腹腔内注射として10匹のC57B1/6J ob/ob(16週齢)、C57B1/Ks db/db (12週齢)、およびCBA/J +/+ (8週齢)マウスの群に毎日投与した。同数の動物にPBSを毎日注射した。コントロール注射に用いたPBSは、タンパク質を平衡化した後の透析物に由来した。3種のマウス系統のさらに10匹の動物は注射を受けなかった。個々の動物の食物摂取量を毎日モニターし、そしてその動物の体重を3、4日おきに記録した。9群のマウスのそれぞれの食物摂取量と体重の累積結果を図28A~Fに示し、そしてデータの統計学的な有意性を表1に示す。タンパク質を注射したC57B1/6J ob/obマウスの食物摂取量は、最初の注射の後有意に減少し、第5日目（すなわち、PBSの注射を受けた動物の摂取量の約40%と同じレベルに安定したとき）まで減少し続けた($p < 0.001$)。擬注射したOBマウスは3週間の研究期間を通じて、体重が減少しなかった。タンパク質を与えたC57B1/6J ob/obマウスは、5日後に体重が約10%減少した($p < 0.001$)。これらの動物は3週間の処理を通して体重が減少し続け、その時点で、タンパク質を与えられていたob動物の体重は、平均でそれらの始めの体重の60%まで減少していた($p < 0.0001$)。別の群のobマウスとタンパク質を与えられているobマウスとをペアフィードした。図29Bに示したデータは、ペアフィードしたマウスの体重の減少が組換えタンパク質を与えられた動物より有意に少ないことを示す($p < 0.02$)。タンパク質またはビヒクルのいずれ

かの注射を受けた2匹のマウスの写真は、タンパク質処置の結果として外見に著しい違いを示している(図29B)。このタンパク質の効果をさらに確かめるために、各群の2匹のマウスの剖検を行った。タンパク質を与えたobマウスの総合的な視診により、体脂肪および肝臓のサイズの劇的な減少が明らかにされた。dbマウスおよび野生型マウスの肝臓の重量は処置によって変化しなかった。PBSの注射を受けたobマウスの肝臓は5.04gおよび5.02gであり、これに対して組換えタンパク質を与えた動物のそれは2.23gおよび2.03gであった。obマウスに特徴的な色の薄い脂肪肝とは対照的に、タンパク質を与えたobマウスの肝臓は、正常な肝臓の特徴である濃い色をしていた(図29C)。肝臓の組織切片は、未処置の動物は、タンパク質で処置した動物では著しく改善された脂肪肝を有することを示した(データは示していない)。

【0405】このobマウスとは対照的に、タンパク質を与えたC57BL/Ks db/dbマウスの体重または食物摂取量はビヒクルを与えたコントロール群と比較して有意差はなかった(図28A~F、表1)。db/dbマウスの3つ全て *20

*の群は処置期間中に2~5g体重が減少した。dbマウスの平均血糖値をグルコメーターを用いて測定し、それは全てのマウスで $\geq 500\text{mg/dl}$ であった。このことは、これらの動物が肥満症に続いて糖尿病を発症したことを示す。dbマウスの注射は、2週間後に終了した。

【0406】野生型マウスでは、組換えobタンパク質の投与に続いて少ないが有意な体重減少があった(図28A~F、表1)。タンパク質注射の5日後、処置したマウスは平均0.5gの減少であったが、コントロールマウスは0.4g増加していた($p < 0.02$)。続く2回の時点では、タンパク質を与えたマウスは毎日PBSを注射されたマウスより有意に軽かった。体重変化の有意性は、後の時点では減少した。体重の減った動物では、食物摂取量はコントロール動物と有意差はなかった。PBSの注射は、注射を受けなかったマウスと比較して少ないが有意な影響をob、db、および野生型マウスの食物摂取量および体重に及ぼした($p < 0.05$)。

【0407】

【表1】

動物 グループ	処理 グループ	体重変化				
		日	n	平均	標準誤差	p
ob/ob	タンパク質 媒体	1-5	10 9	-6.38000000 -0.14444444	0.47628190 0.24444444	<0.001
	タンパク質 媒体	1-12	10 9	-14.45000000 0.98888889	0.70793126 0.38058597	<0.001
	タンパク質 媒体	1-27	6 5	-24.28333333 4.30000000	0.69924563 0.79874902	<0.0001
db/db	タンパク質 媒体	1-5	10 10	-1.47000000 -2.00000000	0.36939891 0.23142073	0.240
	タンパク質 媒体	1-12	10 10	-3.75000000 -4.19000000	0.77348418 0.34655447	0.610
CBA/J	タンパク質 媒体	1-5	10 10	-0.48000000 0.38000000	0.17876117 0.21489015	0.006
	タンパク質 媒体	1-12	10 10	-0.12000000 1.20000000	0.45748103 0.18378732	0.015
	タンパク質 媒体	1-27	5 6	1.98000000 2.23333333	0.48723711 0.20763215	<0.651

【0408】考察

OB遺伝子座位のタンパク質産物に対する内分泌機能は、Colemanによって最初に示唆された。彼は、ob/obマウスの体重が正常またはdbマウスに対する並体癒合(parabiotic union)の後減少することを示した(Colemanら、1978、前出)。上記に示した結果は、OBタンパク質が血流中で循環し、組換えタンパク質の注射が体重を減少させることを示すことによりこの仮説を支持した。 50

OB遺伝子によってコードされる遺伝子産物の分子量はおよそ16kDであり、これは、カルボキシ末端からシグナル配列までの146アミノ酸配列と等しい。組換えOBタンパク質はPichia pastoris中で発現される場合には改変されない。Pichiaにおける哺乳動物遺伝子の発現は、一般に結果として、正しいタンパク質構造の形成に至る[Creggら、Bio/Technology, 11:905-914(1993)]。これらの知見は、インビボでOBタンパク質がグリコシル化

されず、そして翻訳後にプロセスされないことを示唆する。このデータは、OBタンパク質が、それ自身あるいは血漿または脂肪組織内の他のタンパク質に非共有結合している可能性を排除するものではない。このタンパク質のタンパク質分解性開裂は排除されていないが、低分子形態のOBタンパク質は、どのような抗血清（4種の抗ペプチド抗体を含む）を用いても検出されなかった。

【0409】OBタンパク質は、2つのシステイン残基を有し、ヒトにおいてはモノマーとして、マウスにおいてはモノマーおよびダイマーとして循環している。分泌される分子に典型的な分子内ジスルフィド結合は、ヒトタンパク質が*Pichia pastoris*内で発現される場合に見出され、このことは、それがインビボで存在しやすいことを示唆する。このことは、分子内ジスルフィド結合を有する組換え細菌タンパク質の生物活性によって支持される。マウスOBタンパク質は、血漿中でモノマーおよびダイマーとして見出され得る。このモノマーおよびダイマーは、マウスOBタンパク質が酵母で発現される場合に見られ、このマウスタンパク質がダイマーを形成する傾向は、一次配列がヒトと比べて異なることに起因することを示す。モノマーが生物活性を有することは明らかであるが、ダイマーの機能的活性は不明である。

【0410】obマウスにおいてOBタンパク質が食物摂取量および体重に与える影響は、劇的である。3週間の処置の後、組換えタンパク質を毎日注射されたobマウスはその体重を40%減少させ、そしてコントロール動物の40%程度の食物を消費した。さらに、処置されたobマウスの体重は、実験を終了した時点でもまだ平衡化していなかった。ペアーフィーディング実験の結果は、体重の減少が、食物摂取量およびエネルギー消費量の両方に対する影響の結果であることを示す。従って、カロリー摂取量が、タンパク質を与えられたobマウスの摂取量に制限された別の群のobマウスは、タンパク質を与えた動物より体重減少が有意に少なかった。OBタンパク質を与えて1日以内に、ob/obマウスの食物摂取量が野生型マウスのそれよりも低いレベルに減少することは、ob/obマウスがOBタンパク質の効果に対して特に感受性であることを示す。実際、OBレセプターは、これらの動物においてアップレギュレートされ得る。処置されたobマウスの食物摂取量は5日間の処置後には比較的一定になった。もしこれがタンパク質が定常期レベルに達したことの結果なら、このタンパク質が比較的長い半減期を有することが示唆される[The Pharmacological Basis of Therapeutics, pp. 19-45, Goodman およびGilman編, Pergamon Press, New York, (1990)]。この結論は、並体癒合実験のデータに一致する[Colemanら、1978、前出; Weigle, Int.J.Obesity, 12:567-578(1988)]。

【0411】実験の最初の2週間の間に、組換えタンパ

ク質が野生型マウスの体重に与える影響は小さいが、統計的には有意であった。タンパク質を与えた野生型マウスとPBSを与えた野生型マウスとの間の体重の差は後の時点でも維持されたが、データの統計的有意性は3週間後に著しく減少した。初期の体重減少は、食物摂取量の違いによると説明され得ない。おそらく、食物摂取量の測定は、処置期間中の体重の1gの差を生じる減少を検出するには正確さが十分ではなかった。この観察は、先の実験の結果と異なる。先の実験では、野生型の齧歯類が、dbマウス、faラット、視床下部を損傷したラット、および高カロリーの飼料によって肥満にさせたラットとの並体癒合によって結合された[Colemanら、1978、前出; Harrisら、1987、前出; Harrisら、「Physiological and metabolic changes in parabiotic partners of obese rats」、Hormones, Thermogenesis and Obesity, LardyおよびStraatman編, Elsevier Science Publishing Co., New York(1989); Hervey, J.Physiol., 145:336-352(1959)]。それぞれの場合において、野生型動物は食欲が減退し大量の体重が減少する。dbマウスおよびfaラットではOBタンパク質のレベルが増加し、そして視床下部を損傷したマウスではOB RNAのレベルが増加するので、野生型マウスは、OBタンパク質が十分に高いレベルで血漿中を循環している場合には、OBに应答し得るようである。本明細書で報告される知見は、投与されるタンパク質のレベルが内因性レベルよりも低かったという可能性と一致し、それは、僅かに少ない体重で平衡化することにつながる。処置されたマウスにおいてOBタンパク質の循環レベルを定量することは、この問題を解決するであろう。マウスタンパク質の免疫アッセイは未だ利用し得ないが、免疫沈降は、循環OBタンパク質のレベルがタンパク質を与えた野生型マウスにおいて実質的に上昇しないことを示唆した。

【0412】このタンパク質が野生型マウスに与える影響の低さおよびdbマウスにおける应答の欠如により、この処置が非特異的または有害な影響を有するということはありそうもない。全てのdbマウスは、それらがobタンパク質を与えられたか否かに関わらず、処置期間中に少量の体重が減少した。db動物は明らかに高血糖症であり、体重の減少は糖尿病の結果であって、実験プロトコルの結果ではないようである。C57BL/Ks db/dbマウスは、しばしば糖尿病を発症し、この実験に用いられた動物の年齢で少量の体重が減少し始める(Colemanら、1978、前出)。同様な年齢のC57Bl/6J ob/obマウスは、著しい高血糖症を発症しない。これらの表現型の違いは、変異を有する系統間(C57Bl/6J対C57Bl/Ks)の遺伝的違いの結果であると考えられる(Colemanら、1978、前出)。

【0413】C57Bl/6J ob/obマウスにおけるOB遺伝子のcDNA配列から予想された短縮された105アミノ酸タンパク質の検出の失敗は、変異タンパク質が分解されるか

翻訳されないかのどちらかであることを示唆する。しかし、用いた抗血清がこの短縮されたタンパク質を検出しないという可能性は排除され得ない。dbマウスにおけるobタンパク質のレベルが野生型と比較して10倍増加していることが観察されたことは、obタンパク質の効果に対して耐性がある場合にはobタンパク質が過剰に産生されることを示唆する。これらのデータは、OB mRNAの研究と相関する。言及したように、先の実験は、マウスdb遺伝子およびラットfa遺伝子の変異（これらは相同な染色体領域に位置する）が、体重を抑制する血漿因子の過剰生産に結果として至ることを示した(Truettら、1991、前出；Coleman、1978、前出；Hervey、1959、前出)。どちらの場合においても、変異動物がOBタンパク質の効果に対して耐性であることが示唆された。この可能性は、OBタンパク質がdbマウスに投与された場合には体重または食物摂取量に影響を及ぼさないという観察によって確認される。

【0414】ヒトの肥満症は、ホルモンに比較的非応答性である個人の血漿中のOBタンパク質のレベルの増加と関連し得る。一方、OBの発現の減少もまた肥満症につながる。この場合、「正常」（すなわち、不適切に低い）レベルのこのタンパク質が見出され得る。したがって、ヒト血漿中のOBタンパク質のレベルは、肥満症の別の形態のマーカーであり得る。BMI<25である痩身型被検者の少人数の群では、低いナノグラムレベルの循環OBタンパク質がELISAによって検出される。重要なのは、種々の濃度が示されたことにより、発現のレベルおよび／またはタンパク質に対する感受性が体重の決定にある役割を果たし得るということが示唆されることである。

【0415】このOBタンパク質の作用部位は不明である。このタンパク質は、食物摂取量およびエネルギー消費量のどちらにも影響する。これは両システムの変更が、体重の調節に働くことを示す臨床研究[Leibelら、N.Engl.J.Med.、332:621-628(1995)；Keeseyら、「Metabolic defense of the body weight set-point (体重セットポイントの代謝的防御)」、Association for Research in Nervous and Mental Disease、pp.87-96、StunkardおよびStellar編、Raven Press、New York.(1984)]と一致する知見である。視床下部は、体重を制御する経路においてOBの下流にあるようであるが、直接的な影響を種々の器官に及ぼすことは可能である。

【0416】実施例9：視床下部に損傷を受けたマウスおよびdb遺伝子座に変異を有するマウスにおけるOB RNAの脂肪細胞における発現の増加

最近クローニングされたマウス肥満遺伝子(OB)の遺伝子産物は、脂肪組織の量の調節に重要な役割を果たす。OB RNAは、褐色脂肪を含むいくつかの異なる脂肪細胞貯蔵部それぞれにおいてインビボでマウス脂肪細胞によって特異的に発現される。それはまた、分化に誘導された培

養3T3-442A前脂肪細胞においても発現される。視床下部に損傷を有するマウスおよびdb遺伝子座に変異を有するマウスは、脂肪組織中で20倍高いレベルのOB RNAを発現する。これらのデータは、db遺伝子および視床下部のどちらも、脂肪組織の量を調節する経路においてOB遺伝子の下流にあることを示唆し、そしてdb遺伝子座がOBレセプターをコードすることを示唆する先の実験と一致する。db/dbおよび損傷マウスでは、OB RNAの発現レベルにおける量的な差が脂肪細胞の脂質含有量と関連していた。脂肪細胞中でOB遺伝子の発現レベルを調節する分子は、OBの作用部位でOBの効果を仲介する分子のように、体重の決定に重要な役割を果たしているようである。

【0417】材料および方法

インサイチュハイブリダイゼーション

野生型(wt)およびdbマウスの同じ腹部領域由来の白色脂肪(white fat)組織を、Richardsonら、Growth,Development & Aging,56:149-157(1992)によって記載された改変方法に従って、同時にプロセスした。簡単にいうと、組織をBouin溶液中で2時間4℃で固定した。次いで、それらをエタノール濃度を10%から100%まで増加させる連続処理(4℃で各5分間ずつ)により脱水した。組織をキシレン(1時間)とそしてパラフィン(2時間)とともに65℃でさらにインキュベートした。包埋されたwtおよびdb/db脂肪組織を切片にし、後に同じ条件によりマウントした。薄切片を65℃で1時間ベイクし、そしてキシレン、およびエタノールの100%から50%の連続希釈液(室温で各3分間ずつ)で処理した。OB遺伝子のアンチセンスRNAプローブを、Sp6 RNAポリメラーゼプロモーターの上流の直鎖状化(linearized)されたOB遺伝子コード配列のインビトロ転写により合成した。インサイチュハイブリダイゼーションをSchaeren-Wiemersら、Histochemistry,100:431-440(1993)に正確に従って行った。

【0418】RNA調製および細胞培養

全RNAおよびノーザンブロットを記載されたように調製した。間質血管細胞および脂肪細胞をRodbellに従って調製し、そしてDaniら、Mol.Cell.Endocrinol.,63:199-208(1989)；Rodbell,J.Biol.Chem.239:375-380(19)に従って、両画分からRNAを調製した。サブクローニング後、3T3-F442細胞を、10%ウシ胎児血清を含むDulbeccoの改変Eagle培地(標準培地と規定した)中で生育させた[Daniら、"Molecular biology techniques in the study of adipocyte differentiation (脂肪細胞の分化の研究における分子生物学技術)"、Obesity in Europe vol 88, pp.371-376,BjorntorpおよびRossner編、Johon Libbey Company Ltd.,London, England(1989)]。集密時に、細胞を、2nMトリヨードチロニン (T3)および17nMインスリンを補足した標準培地中で処理した。12日後、上記のようにRNAを調製した。

【0419】金チオグルコース処理(GTG)

2ヶ月齢の雌性CBA/Jマウスをオーロチオグルコース(aurothioglucose)(SigmaCatalog No.A0632) 単回腹腔内注射(用量0.2mg/g、正常生理食塩水中)で処置した。コントロール動物には正常生理食塩水を注射した。処置の1ヶ月後にマウスの体重を測定した。GTG処理後に20g以上体重が増加した処置動物由来の脂肪組織RNAを単離した。

【0420】結果

最近、OB遺伝子は脂肪組織で発現されることが見出された[Zhangら、Nature,372:425-432(1994)]。脂肪組織は脂肪細胞、前脂肪細胞、線維芽細胞、および血管細胞を含む多くの細胞タイプから成るので、インサイチュハイブリダイゼーションをセンスおよびアンチセンスOBリボプローブを用いて正常動物の精巢上体脂肪パッドの薄切片に対して行った[Richardsonら、1992、前出; Waserman, "The concept of the fat organ (脂肪器官の概念)", Rodhal, Issekutz, fat as a tissue", pp.22-92, McGraw Hill, New York(1964)]。アンチセンスプローブを用いる場合、ポジティブシグナルは薄切片中の全ての脂肪細胞において検出された。(図30、Wtと標記した)。アンチセンスプローブを脳の薄切片とハイブリダイズさせた場合、シグナルは示されなかった(データは示さず)。C57Bl/Ks db/dbマウス由来の脂肪組織の薄切片へのアンチセンスプローブのハイブリダイゼーションは、著しく増加し、そのことは、OB RNAの脂肪細胞特異的発現を確認し、そしてこれらの動物における脂肪細胞当たりのOB RNAレベルの大きな増加を示した(図30、db/dbと標記した)。db遺伝子座におけるマウスの変異は、C57Bl/6J ob/obマウスに見られる症候群と表現型的に同一の症候群の一部としての広範囲の肥満である(Baharyら、1990、前出)。

【0421】OB RNAは、脂肪細胞から分離された脂肪組織間質細胞によって合成されなかった。予想したように、脂肪細胞画分中の細胞はノーザンブロットを用いてOB RNAを発現していた(図31)。RT-PCRを用いても同じ結果が得られた(データは示さず)。これらのデータは、脂肪細胞のみがOB遺伝子を発現するという結論を支持する。培養された脂肪細胞由来のデータはこの結論を確認する。これらの研究において、3T3-F442A細胞は、脂肪細胞への分化につながる細胞プログラムの一部としての脂質蓄積を導く条件を用いて、培養された。OB RNAは指数関数的に増殖する細胞内で発現されたのでも、集密3T3-F442A前脂肪細胞(初期のマーカーを発現する)内で発現されたのでもない。しかし、これらの細胞の脂肪細胞への分化は、検出可能なレベルのOB RNAの発現につながった(図31)[Daniら、J.Biol.Chem.,264:10119-10125(1989)]。OB RNAのレベルは、培養条件に非常に感受性である。なぜなら、インスリンに曝されなかった後期の集密後(post-confluent)細胞では、メッセー

ジが観察されなかったからである。

【0422】ハイブリダイゼーション研究は、OB RNAが精巢上体、子宮傍組織、腹部、腎周囲、および鼠蹊部の脂肪パッドを含むいくつかの異なる脂肪貯蔵部においてインビボで発現されることを示した(図32A)。各貯蔵部における正確な発現レベルはいくらか可変であり、鼠蹊部および子宮傍組織の脂肪はより低いレベルのOB RNAを発現した。OB RNAはまた、褐色脂肪組織でも発現されるが、発現レベルは他の脂肪組織貯蔵部と比べて褐色脂肪内ではおよそ50倍低い。これらの量的な違いは、先に報告された異なる脂肪細胞貯蔵部間の細胞サイズの違いと緩やかに相関している[Johnsonら、J.Lipid Res.,13:2-11(1972)]。褐色脂肪中のOB RNAの量は低温に曝されることによって影響を受けない(図32B)。この実験では、カップリングしていないタンパク質RNA(UCP)のレベルは低温に曝された後に褐色脂肪中で増加したが、ob RNAレベルは変化しなかった[Jacobssonら、J.Biol.Chem.,260:16250-16254(1985)]。凝集体において、これらのデータは、全ての脂肪細胞がOB RNAを産生し得、そして異なる脂肪貯蔵部で種々の発現レベルを示すことを確認する。これらのデータは、コードされたタンパク質のレベルが脂肪組織の総量と相関するという可能性を支持する。

【0423】db/dbマウスおよび視床下部に損傷を受けたマウスにおけるOB RNAレベルを測定した。腹内側視床下部(VMH)の損傷は、ob/obマウスおよびdb/dbマウスに見られるのと似た症候群の一部としての肥満症に至る[Brayら、Metabolism,24:99-117(1975)]。並体癒合実験は、そのような損傷が結果として血液によって運ばれる食物摂取量および体重を抑制する因子の過剰発現につながることを示唆する(Hervay,1959,前出)。db遺伝子座に変異を有するマウス変異体を正常マウスと並体癒合させる場合、同様の結果が示され、このことは、OBレセプターがdb遺伝子座によってコードされ得ることを示唆する(Coleman等、1978、前出)。従って、VMH損傷およびdb変異の結果に由来する肥満症は、OBタンパク質の効果に対する耐性の結果であり得る。もしそうなら、脂肪組織中のOB RNAのレベルの二次的な増加が予想される。

【0424】化学物質金チオグルコース(GTG)を用いて雌性CBAマウスに視床下部損傷を誘導した(Debonsら、Fed.Proc.,36:143-147(1977))。この処置は結果として視床下部(主として腹内側視床下部(VMH))に特定された損傷を生じ、続いて、数週間うちに肥満症が発症した。通常、単回のGTG腹腔内注射(0.2mg/gm体重)の結果、4週間以内に肥満症が発症する。1ヶ月齢の雌性CBA/Jマウス(20~25g)をGTGで処置し、その後の体重増加の処置およびコントロール動物を示す(表2)。脂肪組織RNAをdb/dbマウスおよび>20gm体重増加したこれらGTG処置動物から調製した。ノーザンブロットは、2ヶ月齢のdb/dbマウスおよびGTG処置マウスでは正常動物に比

べてOB RNAレベルが20倍増加していることを示した(図33)。

【0425】

【表2】

金チオグルコース処置したマウスの体重増加

	コントロール(n=41)	GTG(n=93)
<10 g	41, (100%)	4, (4%)
10g~20g	0, (0%)	15, (16%)
>20 g	0, (0%)	74, (80%)

【0426】2ヶ月齢の雌性CBA/Jマウスを金チオグルコース(GTG)で処置した。金チオグルコース(Sigma A0632)を正常生理食塩水中で2.0mg/gの用量で腹腔内投与した。コントロールおよび処置動物の体重を注射の前および1ヶ月後に記録した。1つのケージに5匹の動物をいれ、自由に摂食させた。注射の1ヶ月後に増えた体重の量を表2に示す。注射1ヶ月後に体重が20g以上増加した動物を更なる研究用に選択した。

【0427】考察

マウスOB遺伝子の遺伝子産物はマウスおよびヒトの血漿中で循環する。ここでは、その産物は脂肪組織の質を調節するように作用し得る。OBの作用の発現およびメカニズムの調節に関するさらなる研究は、体重を調節する生理学的経路についての理解にとって重要な示唆を有するであろう。

【0428】この実施例はOB遺伝子産物が脂肪組織貯蔵部中の脂肪細胞によって著しく発現されることを示す。この結果は、OB遺伝子のタンパク質産物が身体の脂質貯蔵と相関するという可能性と一致する。さらに、OB RNAは、dbマウスおよび視床下部損傷を受けたマウスにおいて20倍アップレギュレートされる。これらの動物においては、細胞当たりのOB RNAレベルの実際の増加は20倍より高いようである。なぜなら、脂肪細胞の細胞サイズはこれらの動物において約5倍増加しているからである(図30参照)(Debonsら、1977、前出)。これらのデータはdb遺伝子および視床下部が体重を調節する経路においてOBの下流にあると位置づけ、そしてOBレセプターがdb遺伝子座でコードされるという仮説に一致する[Colemanら、Diabetologia 14:141-148(1978)]。OBレセプター遺伝子および/またはdb遺伝子の分子クローニングがこの問題を解決するであろう。db/dbマウスおよびGTG処置マウスにおけるOB RNAレベルの増加もまた、脂肪細胞におけるOB遺伝子産物の非細胞自律機能を示唆する[Ashwellら、Proc.R.Soc.Lond.,195:343-353(1977); Ashwellら、Diabetologia,15:465-470]。従って、コードされたタンパク質が脂肪細胞に直接作用して成長または分化を阻害するならば、GTG処置されたマウスにおける野生型OB遺伝子の過剰発現は、結果として痩身型表現型となる。

【0429】このデータの最も注意深い(parsimonious) 50

説明は、OBタンパク質が脂肪細胞によって分泌される内分泌シグナル分子として機能し、視床下部に直接あるいは間接的に作用するというものである。視床下部への直接の影響には、OB遺伝子産物が血液脳関門を通過することを可能にするメカニズムの存在が必要である。脳室周囲器官(circumventricular organ)および/または特定の輸送体を含むメカニズムが、OB遺伝子によってコードされるサイズの分子を脳へ進入させ得るであろう[Johnsonら、FASEB J.,7:678-686(1983); Bauraら、J.Clin. Invest.,92:1824-1830(1993); Pardridge, Endocrine Reviews,7:314-330(1986)]。しかし、この仮説は、タンパク質を血液脳関門を通過させ得る手段が同定されるまでは注意して考慮されなければならない。さらに、他の標的器官におよぼす可能な影響が評価されることが必要であろう。

【0430】OB遺伝子の発現レベルの量的な変動の原因である脂肪細胞シグナルは未だ知られていないが、脂肪細胞の細胞サイズの差と相関する。db/dbマウスの脂肪細胞は正常マウスのその5倍の大きさであり、細胞サイズはおおよそ1.0μg脂質/細胞である(Johnsonら、1972、前出)。先の証拠は、脂肪細胞の脂質含有量および/またはサイズが体重決定の重要なパラメーターであることを示した[Faustら、Am.J.Physiol.,235:279-286(1978); Faustら、Science,197:393-396(1977)]。各脂肪細胞は、細胞サイズに比例してさらに増加する低レベルのOB RNAを発現し得る。細胞サイズは意味のあるパラメーターではなく、db/dbマウスおよびVMH損傷マウスの脂肪細胞内のOB遺伝子発現を増加させる細胞内シグナルと単に相関することもあり得る。どの場合も、OB RNAの合成を調節するシグナル伝達経路の要素が体重の決定には重要であるようである。コードされたタンパク質に対する感受性を減少させる影響が働くにつれ、OBの発現レベルを低下させる遺伝的および環境的影響が働いて体重を増加させるであろう。OB遺伝子の発現レベルを調節する特定の分子は、未だ不明であり、OB RNAのレベルにおける量的な変動につながる遺伝子コントロールのレベルの決定、およびOB遺伝子の調節因子の研究が待たれる。脂肪細胞におけるOB遺伝子の発現を調節する分子、およびコードされたタンパク質の効果をその作用部位で仲介する分子の同定は、体重を調節する生理学的メカニズムに対する理解を大いに高めるであろう。

【0431】実施例10: RNA発現パターンおよび第7染色体の物理的、細胞遺伝学的、遺伝学的地図におけるマッピング

OB RNAはヒトの脂肪組織において高いレベルで発現し、そして胎盤および心臓においてはかなり低いレベルで発現する。ヒトOB遺伝子地図は、染色体7q31.3に由来する大きな酵母人工染色体(YAC)コンティグに、マッピングされる。マウス-ヒト比較マッピングに基づいて遺伝子の相対位置を確認することに加えて、この研究は、ヒト

OB遺伝子に物理的に近接した位置にある、8つの確立されたマイクロサテライトマーカーを同定した。マウスOBにおける突然変異は、ヒトの病的肥満に非常に類似する症候群を生じさせ得るので、これらの遺伝マーカーは、ヒト肥満症の遺伝形態におけるOB遺伝子の可能な役割を研究するための重要なツールを表す。

【0432】材料と方法

ノーザンブロット分析

全RNAを脂肪組織からChirgwinら、Biochem., 18:5294-5299(1979)の方法を用いて調製した。ノーザンブロット、放射性標識法、およびハイブリダイゼーションは記述(Zhangら、1994、上記)に従って行った。ポリA⁺ RNA (ヒトMTN、ヒトMTNII、およびヒト胎児MTNII)のノーザンブロットは、放射性標識化したヒトアクチンプローブを生成するために用いられるPCRプライマーと同様に、CLONETECH(Palo Alto, CA)から得た。

【0433】STS 展開

配列タグ部位(STS)特異的PCRアッセイは、本質的に次の記述に従って展開および最適化した[(Greenら、PCR Methods Applic., 1991;Greenら、Genomics, 11:548-564(1991);

Green, 「ヒト染色体の物理的マッピング: 染色体特異的配列タグ部位の生成」, Methods in Molecular Genetics Vol.1, Gene and Chromosome Analysis(Part A), pp. 192-210, Adolph編., Academic Press, Inc., San Diego(1993); Greenら、Hum. Mol. Genet., 3:489-501(1994)]。それぞれのSTSは接頭辞「sWSS」の後に独自の番号をつなげたものを用いて命名する。ここで報告した19のSTSについての詳細は、表3に示し、追加情報(例えば、PCR反応条件、完全DNA配列)は、GenBankおよび/あるいはGenome Data Base(GDB)で入手可能である。マイクロサテライト特異的STSについて、PCRアッセイに用いたオリゴヌクレオチドプライマー(表3)は、遺伝子型分析に使用したもの(表4)、あるいはGenBankで入手可能なDNA配列を用いて設計されたもの(通常コンピュータプログラムOSPを用いる)[Hillierら、PCR Methods Applic., 1:124-128(1991)]のどちらかに相当した。表3は、ヒトOB遺伝子を含むYACコンティグでのSTSを示す。

【0434】

【表3】

118

STS 名称	別名	遺伝座	供給源	PCR プライマー	サイズ (bp)	配列 番号	GDB 番号
sWSS1734		D7S2185	YAC 末端	CAAGACAAATGAGATAAAGG AGAGTTACACGCTTACAG	72	39 40	G00-455-235
sWSS494		D7S2016	ラムダクローン	CTAAACACCTTTCCATTCC TTATATTCACITTTCCCTCTC	112	41 42	G00-334-404
sWSS883	UT528	D7S1498	遺伝子マーカー	TGCAGTAAGCTGTGATTGAG GTGCAGCTTAAATTGTGACC	490	43 44	G00-455-262
sWSS2359	AFM4065zg9	D7S1873	遺伝子マーカー	AGTGTGTGTTTCTCCTG AAAGGGGATCTGATAAGTG	142	45 46	G00-455-247
sWSS2336	AFM4125wh1	D7S1874	遺伝子マーカー	GGTGTACGTTTAGTTAC GGAATAATGAGAGAAGATTG	112	47 48	G00-455-244
sWSS1218	AFM309yfl	D7S680	遺伝子マーカー	GCTCAACTGACAGAAAAC GACTATGTAAAAGAAATGCC	134	49 50	G00-307-733
sWSS1402		D7S1916	YAC 末端	AAAGGGCTTCTAATCTAC CCTTCCAACTTCTTTGAC	137	51 52	G00-344-044
sWSS999		D7S1674	YAC 挿入物	TAAACCCGCTTTCTGTTT TTGCATAATAGTCACACCC	105	53 54	G00-334-839
sWSS1751		D7S2186	YAC 末端	CCAAAATCAGAATTGTGAGAAG AAACCGAAGTTGAGATACAG	186	55 56	G00-455-238
sWSS1174	AFM218xfl0	D7S514	遺伝子マーカー	AATATCTGACATTGGCAC TTAGACCTGAGAAAAGAG	144	57 58	G00-307-700
sWSS2061		D7S2184	YAC 末端	GTTGCACAATACAAAATCC CTTCCATTAGTGTCTTATAG	200	59 60	G00-455-241

STS 名称	別名	遺伝座	供給源	PCR プライマー	サイズ (bp)	配列 番号	GDB 番号
sWSS2588		D7S2187	YAC 末端	ATCACTACACACCTAATC CCATCTACATTTCCACC	117	61 62	G00-455-253
sWSS808	Pax-4	PAX4	遺伝子	GGCTGTGTGAGCAAGATCCTAGGA TTGCCAGCCAAAGAGGGCTGGAC	153	63 64	G00-455-259
sWSS1392	AFM206xe1	D7S635	遺伝子マーカー	CTCAGGTATGTCTTTATC TGTCTCTGCATTCTTTTC	75	65 66	G00-307-815
sWSS1148	AFM199xk12	D7S504	遺伝子マーカー	GACACATACAAACACAAG ATTGAGTTGAGTGTAGTAG	60	67 68	G00-307-652
sWSS1529		D7S1943	YAC 末端	CACGGATTCTAATTGTC AAAAGATGGAGCC1TTTG	116	69 70	G00-334-119
sWSS2619	OB	OB	遺伝子	CGTTAAGGGAAGGAACCTGG TGGCTTAGAGGAGTCAGGGA	106	71 72	G00-455-256
sWSS404		D7S1956	ラムダクローン	ACCAGGGTCAATACAAAAG TAATGTGTCCTTCTTGCC	122	73 74	G00-334-251
sWSS2367	AFM4345wc9	D7S1875	遺伝子マーカー	CAATCCTGGCTTCATTG AACGTGGGTAGGATGCTA	81	75 76	G00-455-250

【0435】ヒトOB遺伝子含有YACコンテイングにマッピングされた19の第7染色体特異的STS(図35)を列挙する。それぞれの場合において、各「sWSS」名、関連別名、GDB指定遺伝子座名、STS供給源、PCRプライマー配列、STSサイズ、GDB同定番号を示す。STSの供給源は次の通りである：「YAC末端」(YACの単離された挿入物末端)(Green, 1993, 上記)、「ラムダクローン」(ランダム第7染色体特異的ラムダクローン)(Greenら、1991, 上記; Green, 1993, 上記)、「遺伝子マーカー」(マイクロサテライトマーカー、表2参照)(Greenら、1994, 上記)、「YAC 挿入物」(YAC挿入物由来のランダムセグメント)、および「遺伝子」(遺伝子特異的STS)。注意すべきことは、いくつかの遺伝マーカー特異的STSについて

て、YACを同定するために用いたPCRプライマー(この表に示した)は遺伝子型分析を行うために用いられたもの(表4)と異なっていることであり、この理由としては、遺伝子マーカーを含むYACの検出には多型領域自体の増幅を必要としないことが挙げられる。指示したPCRアッセイは、全て55°Cのアニーリング温度を用いた[但しsWSS494、sWSS883、sWSS1529、およびsWSS2619(50°C)、sWSS999およびsWSS1174(60°C)、ならびにsWSS808(65°C)を除く]。STS特異的PCRアッセイに関する追加の詳細は、GDBにおいて入手可能である。

【0436】

【表4】

ヒトOB遺伝子を含むYACコンテグにおけるマイクロサテライトマーカー

マーカー名	タイプ	遺伝子座	プライマー	配列番号	GDB番号
UT528	Tetra.	D7S1498	TGCAGTAAGCTGTGATTGAG GTGCAGCTTTAATTGTGAGC	77 78	G00-312-446
AFMa065zg9	(CA) _n	D7S1873	AGCTTCAAGACTTTNAGCCT GGTCAGCAGCACTGTGATT	79 80	G00-437-253
AFMa125wh1	(CA) _n	D7S1874	TCACCTTGAGATTCCATCC AACACCGTGGTCTTATCAAA	81 82	G00-437-263
AFM309yfl0	(CA) _n	D7S680	CATCCAAGTTGGCAGTTTTT AGATGCTGAATTCACAGACA	83 84	G00-200-283
AFM218xf10	(CA) _n	D7S514	TGGGCAACACAGCAAA TGCAGTTAGTGCCAATGTCA	85 86	G00-188-404
AFM206xcl	(CA) _n	D7S635	CCAGGCCATGTGGAAC AGTTCTTCGCTTGCCTCAGT	87 88	G00-199-240
AFM199xh12	(CA) _n	D7S504	TCTGATTGCTGGCTGC GCGCGTGTGTATGTGAG	89 90	G00-188-280
AFMa345wc9	(CA) _n	D7S1875	AGCTCTTGGCAAACCTCACAT GCCTAAGGGAATGAGACACA	91 92	G00-437-259

【0437】ヒトOB遺伝子含有YACコンテグにマッピングされた8つのマイクロサテライトマーカー(図35)を列挙する。それぞれの場合において、マーカー名(表3に別名として示した)、マイクロサテライトモチーフのタイプ(テトラヌクレオチド-「Tetra」反復あるいは(CA)_n反復)、GDB指定遺伝子座名、PCRに基づいた遺伝子型分析で用いたプライマー配列およびGDB同定番号を示す。PCRアッセイおよび多型性に関する追加の詳細は、GDBで入手可能である。

【0438】ヒトOB特異的STS(sWSS2619)を、cDNAの3' 10非翻訳領域から得られたDNA配列を用いて設計した。ヒトPax4特異的STS(sWSS808)は、次のストラトジーを用いて生成した。マウスPax4遺伝子(GGCTGTGTGAGCAAGATCCTAGGA)(配列番号63)および(GGGAGCCTTGTCTGGGTACAAAG)(配列番号93)[Waltherら、1991, Genomics 11:424-434(1991)]に対して特異的なオリゴヌクレオチドプライマーを用いて、ヒトゲノムDNA(マウスゲノムDNAから生成させたものと同サイズの産物)由来の204bpフラグメントを増幅した。このPCRアッセイは、対応するYACを同定するのには適していなかった。これは、同様のサイズの産物(200bp)もまた酵母DNAから増幅されたからである。しかしながら、ヒトDNAから生成されたPCR産物のDNA配列分析は、分析された156の塩基中20箇所では置換が生じていることを明らかにした(データは示していない)。このヒト特異的配列を用いて、新しいプライマー(TTGCCAGGCAAGAGGGCTGGAC)(配列番号64)を設計し、また、最初の上記マウスPax4特異的プライマーと共に用いた(表3を参照のこと)。得られるヒトPax4特異的PCRアッセイは、

酵母DNAからの有意な産物を増幅しなかったため、このアッセイを対応するYACの同定に用いた。

【0439】PCRに基づくスクリーニングによるYACの同定

図35に示したYACの多くは、PCRに基づくスクリーニングストラトジー[Greenら、1995, 上記; Greenaら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:1213-1217(1990)]を用いたヒト第7染色体DNA「第7染色体YAC供給源」(Greenら、1995, 上記)について高く富化されたクローンのコレクションに由来した。数例では、クローンは、CEPH[Daussetら、Behring Inst. Mitt., 91:13-20(1992); Albertsenら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:4256-4260(1990)]あるいはICI[Anandら、Nucl. Acids Res., 17:3425-3433(1989); Anandら、Nucl. Acids Res. 18:1951-1956(1990)]で構築された入手可能な全ヒトゲノムYACライブラリーのPCRに基づくスクリーニング(Greenaら、1990, 上記)により単離された。それぞれのYACは、接頭辞「yWSS」の後に独自の番号をつなげたものを用いて命名する。

【0440】結果および考察

ノーザンブロット分析によるヒトOB遺伝子の組織発現の検査では、OB RNAがヒト脂肪組織において高レベルで発現し、そして胎盤および心臓においてはかなり低レベルで発現することが示された(図34)。RNAのサイズ(およそ4.5kb)は、ヒトおよびマウスにおいてならびに発現している組織のそれぞれにおいて等価であった。これらの研究では、2μgのポリA⁺胎盤RNAにおいてと同様に、5倍高いシグナルが10μgの全脂肪組織RNAで見られた。胎盤と

比較して心臓のポリA⁺RNAでは、5倍低いシグナルが見られた。OB RNAのレベルは、脂肪組織よりも胎盤組織の方がおよそ250倍低いと概算される。この実験では、OB RNAは、脳、肺、肝臓、骨格筋、腎臓、および脾臓を含む、分析を行った他の組織のいずれにおいても、検出されなかった。追加の実験では、脾臓、胸腺、前立腺、睾丸、卵巣、小腸、結腸、末梢白血球、あるいは、胎児の脳、肝臓または腎臓においてOB RNAを示さなかった(データは示していない)。OBは、これらの後者の組織あるいは研究されていない他の組織において、検出できない(ノーザンブロット分析により)レベルで発現している可能性がある。ヒトで観測された発現パターンは、OB RNAが脂肪組織においてほぼ独占的に検出されるマウスの場合と幾分異なっている。

【0441】マウスおよびヒトゲノムにおけるOB遺伝子領域の比較マッピング。マウスOB遺伝子は、ヒト第7染色体qの一部と相同な領域にある近位の第6染色体上に位置している。このセグメント内の遺伝子は、以下を含んでいる(近位から遠位へ): Met癌原遺伝子、嚢胞性線維症膜貫通伝導調節因子(Cftr)、対合ボックス含有遺伝子4(Pax4)、OB、およびカルボキシペプチダーゼA(Cpa)(Zhangら、1994、上記; Friedmanら、1991、上記)。マウスでは、遺伝的マッピングを用いて、Pax4が強くobに連鎖していることが示された[Waltherら、1991、上記; Zhangら、1994、上記]。OBおよびPax4間の物理的距離は、およそ1メガ塩基対(Mb)であることが明らかとなった(Zhangら、1994、上記)。これらの比較マッピングの研究に基づくと、ヒトOB遺伝子は染色体7q上のPax4およびCPA間に存在すると予測された。さらに、ヒトCFTR[Hengら、Cell Genet., 62:108-109(1993)]およびPax4[Tamuraら、Cytogenet. Cell Genet., 66:132-134(1994)]は、蛍光インサイチュハイブリダイゼーション(FISH)により、それぞれ、7q31.3および7q32にマッピングされたので、ヒトOB遺伝子の最も考えられる細胞遺伝的位置は、7q31.3~q32境界の付近であり得る。

【0442】ヒト第7染色体におけるOB遺伝子のマッピング

ヒトOB遺伝子の3'非翻訳領域の小セグメントを増幅しているSTS(sWSS2619)を、ヒト第7染色体のDNA(Greenら、1995a, Genomics 25:170-183)について高く富化されているYACクローンのコレクションをスクリーンするのに用いた。そして、9のYACを同定した(yWSS691、yWSS1332、yWSS1998、yWSS2087、yWSS3319、yWSS3512、yWSS4875、yWSS4970、およびyWSS5004)。これらのYACが真正ヒトOB遺伝子を含むことを証明するために、二つの追加実験を行った。第一に、YACのそれぞれを別のヒトOB特異的PCRアッセイでテストした。その結果、全てが陽性であることが明らかとなった(データは示していない)。第二に、それぞれのクローン由来の酵母DNAを、EcoRIで消化し、ヒトOB cDNA-由来プローブを用いたゲルトランス 50

ファーハイブリダイゼーションにより分析した。全ての例において、単独のハイブリダイズバンドが見られた。そしてこのバンドは、ヒトOB遺伝子を含むことが既知であるYACおよびP1クローンにおいて同サイズであった(データは示していない)。

【0443】コンピュータプログラムSEGMAP(GreenおよびGreen, 1991, 上記)および本発明者らが第7染色体について生じさせた他のYACに基づくSTS内容データ(Greenら、1991、上記; Greenら、1994、上記; Greenら、1995、上記)を用いて、ヒトOB遺伝子が図35に示したYACコンティグ内に存在することが明らかとなった。特筆すべきは、このコンティグは、43の重複YACおよび19の独自に整列化したSTSから構成されていることである。19のSTSのそれぞれについての詳細は、表3に示す。OB特異的STSに加えて、コンティグはまたヒトPax4遺伝子に対して特異的なSTS(sWSS808)(Tamuraら、1994、上記; Stapletonら、1993, Nature Genet. 3:292-298)、第7染色体特異的YAC由来の7つのSTS、第7染色体特異的ラムダクローン由来の2つのSTS、および重要なことに、8つのマイクロサテライト特異的STSを含む。遺伝子型分析に用いたプライマーの配列を含む、これらの8つの遺伝マーカーについての追加の詳細は、表2に示す。ここで注意したいのは、コンティグ全体にわたって多くのYACに基づく連結性がある(すなわち、STSのそれぞれの隣接対に接続する2あるいはそれ以上のYACが存在する)ことであり、図35に示されるSTSの相対順序に対する強い支持を与える。

【0444】図35に示したように、ヒトOB含有YACコンティグの推定配位は、sWSS1734は最もセントロメア側(c entrometric-most)STS(すなわち、CFTRに最も近接)であり、一方、sWSS2367は、最もテロメア側(teromeric-most)STS(すなわち、CPAに最も近接)である。この配位は、主として、比較マッピングデータに基づき、これはマウスおよびヒトDNAに存在するシンテニックブロック内のPax4近位およびOB遠位に位置する(Zhangら、1994、上記)。OB遺伝子は、OB特異的STS(sWSS2619)の配置に基づくと、コンティグのテロメア末端近傍にマップされる。

【0445】図35に示すコンティグは、YACサイズを考慮せずにSEGMAPより推定した(それにより、STSを互いから等距離で示す)が、YACサイズについて説明したSEGMAPによるデータの同様の解析は、コンティグによりカバーされた領域の全サイズがちょうど2Mb強であることを示した(データは示していない)。このように、8つのマイクロサテライト特異的STS(表4)の全てが、概算で2Mbにわたるゲノム区間隔内に含まれている一方、コンティグのテロメア末端に最も近い3つ(sWSS1392、sWSS148、およびsWSS2367)は、特にOB遺伝子自体に近い(おそらく約500kb程度の小さな区間内)。実際、後者の3つのSTSの全ては、ヒトOB含有YACの少なくとも1つに存在する。ここで注意したいのは、ヒトPax4(sWSS808)およ

びob(sWSS2619)の間の間隔がおよそ400kbと見積もられている一方、この領域はマウスにおいては、約1Mbにわたると予測されていたことである(Zhangら、1994、上記)。最後に、コンテグ内の3つのYAC(yWSS691、yWSS999およびyWSS2935)もまたFISHにより分析されており、そしてそれぞれは、専ら7q31.3とハイブリダイズすることが明らかとなった。これらのYACの1つ(yWSS691)は、OB特異的STSを含む一方、その他の2つのクローンは、Pax4特異的STSを含む。後者の結果は、一般的に7q32へのヒトPax4の以前の細胞遺伝的割り当て(Tamuraら、1994、10上記)と一致する。これらのデータに基づいて、ヒトOB遺伝子は、細胞遺伝的バンド7q31.3に割り当てられ得る。

*
処理された ob/ob マウスの食物摂取/日(g) (値 ± S.Dev)

処理	第0日	第1日	第2日	第3日	第4日	第5日	第6日	第7日
生理食塩水	13.4 ± 2.6	12.8	12.8	13.1	14.0	12.3	12.4	8.3
マウス OB	14.9	3.7	4.4	5.1	8.9	8.1	8.7	3.5
ヒト OB	14.3	10.3	8.7	7.0	8.9	5.3	3.8	13.0

【0448】

* * 【表6】
処理された ob/ob マウスの体重および体重変化 (値 ± S.Dev)

処理	体重 (第0日)	体重 (第4日)	パーセント 変化 (第 0~4日)	体重 (第6日)	パーセント 変化 (第0~6日)
生理食塩水	39.9 ± 1.8	40.7 ± 1.6	0.8 ± 0.5	41.1 ± 2.2	1.2 ± 1.1
マウス OB	39.5 ± 2.1	36.2 ± 2.0	-3.3 ± 1.2	36.3 ± 2.2	-3.1 ± 1.2
ヒト OB	39.5 ± 2.0	37.6 ± 1.7	-2.0 ± 1.0	36.1 ± 1.3	-3.5 ± 1.3

【0449】これらのデータは、ヒトOBがマウスにおいて生物学的に活性であることを実証している。

【0450】実施例12：高用量OBが野生型マウスに影響を及ぼす

野生型マウス(C57B16T +/?)を、10μg/g/日の組換えマ

* 【0446】実施例11：ヒトOBポリペプチドは、マウスにおいて生物学的に活性である

10匹のob/obマウスのグループを、10μg/g/日の組換え(細菌性)ヒトおよびマウスOBポリペプチドあるいは食塩水の腹腔内注射により処理した。4日後、食塩水を与えたグループは、0.3g増加した。マウスOBを与えたグループは、3.2g減少した。ヒトOBを与えたグループは、2g減少した(p<0.01 食塩水コントロールと比較)。これらのグループへは、食物摂取のテストも行った。食物摂取のデータを表5に、体重に対するデータを表6に示す。

【0447】

【表5】

ウスOBの腹腔内注射で処理し、4日ごとに体重の測定を行った。その結果を表7に示す。

【0451】

【表7】

OBを受けた正常なマウスの体重(g)

処置	第0日	第4日	第8日	第12日	第16日
生理食塩水	22.6±1.4	22.2±1.2	22.5±1.3	23	22.5
マウス OB	22.4±1.5	20.6±1.5	20.8±1.3	20.8	21.8

【0452】これらのデータは、非常に程度が低いとはいえ、OBが肥満型(ob/ob)マウスと同様、野生型マウスの体重に影響を及ぼすことを実証している。

【0453】実施例13：連続ポンプ注入により投与されたOBポリペプチド

本実施例は、OBポリペプチドの連続注入が正常なマウスの体重損失をもたらすことを実証している。正常な(肥

満型でない)マウスに浸透ポンプ注入によってマウスのobポリペプチドを投与した。0.5mgタンパク質/kg 体重/日の用量が、6日目の注入により、基線体重から4.62%損失(+/-1.34%)を生じさせた。

【0454】材料および方法

動物

本実施例では、野生型(+/+)C57B16マウスを用いた。マ

ウスには、個室を与えゆったりとした条件下で飼育した。初期時点におけるマウスの年齢は8週齢であり、また、動物の体重は安定していた。各グループ(媒体(vehicle)対タンパク質)に対して、10匹のマウスを用いた。

【0455】給餌および体重測定

マウスへは、粉末化食物フィーダー(Allentown Caging and Equipment)で粉末状齧歯類用食物(PMI Feeds, Inc.)を与え、これにより通常の固形状食物を用いる場合より正確および鋭敏な食物摂取の測定が可能であった。体重は、6日間、毎日同時刻(午後2:00)に測定した。注入前

【0456】マウスOB DNAのクローニング

E. coliでの発現のために、マウスOB DNAのクローニングを以下のように行った。発行された(Zhangら、1994,

上記,すなわち、実施例1,上記)公開ペプチド配列から推定したDNA配列を、E. coli最適コドンを用いて逆翻訳した。末端クローニング部位は、XbaIからBamHIであった。リボソーム結合エンハンサーおよび強いリボソーム結合部位は、コード領域の前方に含まれていた。二本鎖DNA配列を標準的な技法により合成した。正確なクローンは、組換えタンパク質の発現およびレジデント(resident)プラスミド中の正確なOB DNA配列の存在を実証することにより確認した。アミノ酸配列(およびDNA配列)は、以下の通りである：組換えマウスmet OB(二本鎖)DNAおよびアミノ酸配列(配列番号94および95)：

【0457】

【化1】

128

489

10

【0459】タンパク質あるいは媒体の投与
この実験では、組換えマウスOBポリペプチドを一般的に約0.9mg/ml濃度でリン酸緩衝化生理食塩水(pH7.4)中で用いた。用いたアミノ酸配列(およびDNA配列)をすぐ上に示す。タンパク質あるいは媒体(リン酸緩衝化生理食塩水、pH7.4)を、浸透ポンプ注入によって投与した。Alzert浸透ミニポンプ(Alza, Palo Alto, CA, model no.

1007D)を、それぞれのマウスの肩甲下領域にある皮下ポケットへ外科的に配した。ポンプは、0.5mgタンパク質/kg 体重/日の用量のために、1時間当たり0.5mlの溶液中にタンパク質を投与するように目盛りを付けた。コントロール動物は、Alzert浸透ミニポンプを用いてリン酸緩衝化生理食塩水(pH7.4)を注入した。

【0460】発酵プロセス：供給バッチプロセスとして知られる三相発酵プロトコールをタンパク質を調製するために用いた。培地組成は以下に説明する。

【0461】バッチ：窒素およびリン酸塩源を、発酵容器(Biolafitte, 12リットル容量)内で滅菌した(18~20psiで35分間122°Cまで温度を上昇させることによった)。冷却時に、炭素源、マグネシウム源、ビタミン源および微量金属源を、無菌的に添加した。一晚培養(16時間あるいはそれ以上)500mlの上記組換えマウスタンパク質生産細菌(LB培地内で成長)を、発酵槽に加えた。

【0462】供給材I：4.0~6.0 O.D.₆₀₀間に達した際に、供給材Iを培養物に加えた。その後、グルコースを成長速度(μ)を制御するために、制限速度で加えた。自動システム(分布制御システムと呼ばれる)は、0.15世代 hr^{-1} に成長速度を制御するようプログラムした。

【0463】供給材II：O.D.が30に達したとき、温度をゆっくり42°Cまで上げ、供給材を以下に記述のように供給材I IIに変更した。その後、発酵を2時間ごとにサンプリングを行いながら10時間続けた。10時間後、発酵槽の中身を20°C以下に冷却した後、遠心分離により採集した。

【0464】

培地組成：

バッチ：	10 g/L	酵母エキス
	5.25 g/L	(NH ₄) ₂ SO ₄
	3.5 g/L	K ₂ HPO ₄
	4.0 g/L	KH ₂ PO ₄
	5.0 g/L	グルコース
	1.0 g/L	MgSO ₄ · 7H ₂ O
	2.0 ml/L	ビタミン溶液
	2.0 ml/L	微量金属溶液
	1.0 ml/L	P2000 Antifoam
供給材I：	50 g/L	バクトトリプトン
	50 g/L	酵母エキス
	450 g/L	グルコース
	8.75 g/L	MgSO ₄ · 7H ₂ O
	10 ml/L	ビタミン溶液
	10 ml/L	微量金属溶液
供給材II：	200 g/L	バクトトリプトン
	100 g/L	酵母エキス
	110 g/L	グルコース

ビタミン溶液(バッチ、供給材I)：0.5gビオチン、0.4g葉酸、および4.2gリボフラビンを450mlのH₂Oおよび3mlの10N NaOHに溶解し、その後H₂Oを加えて500mlとした。

14gのピリドキシン-HClおよび61gのナイアシンを150mlのH₂Oおよび50mlの10N NaOHに溶解し、その後をH₂Oを加えて250mlとした。54gのパントテン酸を200mlのH₂Oに溶解して250mlとした。3つの溶液を混合し、全容積を10リットルとした。

【0465】微量金属溶液(バッチ、供給源I)：

塩化鉄(FeCl₃ · 6H₂O)：27g/L

塩化亜鉛(ZnCl₂ · 4H₂O)：2g/L

塩化コバルト(CoCl₂ · 6H₂O)：2g/L

モリブデン酸ナトリウム(NaMoO₄ · 2H₂O)：2g/L

塩化カルシウム(CaCl₂ · 2H₂O)：1g/L

硫酸銅(CuSO₄ · 5H₂O)：1.9g/L

ホウ酸(H₃BO₃)：0.5g/L

塩化マンガン(MnCl₂ · 4H₂O)：1.6g/L

クエン酸ナトリウム二水和物：73.5g/L

マウス0Bポリペプチドの精製プロセス

精製は、以下の工程により行った(もし他に記されていないければ、以下の工程は4°Cで行った)。

【0466】1. 細胞ペースト. E. coli 細胞ペーストを、5倍容量の7mM EDTA(pH7.0)で懸濁した。EDTA中の細胞を、マイクロフルイダイザー(microfluidizer)の2つの流路により、さらに破壊した。破壊した細胞を、J5-4.2ローターを用いてBeckmanJB-6遠心機において4.2krpmで1時間遠心分離した。

【0467】2. 封入体洗浄#1. 上記から上清を除去し、ペレットを5倍容量の7mMのEDTA(pH7.0)で再懸濁させ、ホモジナイズした。この混合物を、工程1と同様に遠心分離した。

【0468】3. 封入体洗浄#2. 上記から上清を除去し、ペレットを10倍容量の20mM Tris(pH8.5)、10mM DT T、1%デオキシコール酸塩で再懸濁し、ホモジナイズした。この混合物を、工程1と同様に遠心分離した。

【0469】4. 封入体洗浄#3. 上記から上清を除去し、ペレットを10倍容量の蒸留水で再懸濁し、ホモジナイズした。この混合物を、工程1と同様に遠心分離した。

【0470】5. 再フォールディング. ペレットを15倍容量の10mM HEPES(pH8.5)、1%ナトリウムサルコシン(N-lauryl sarcosine)を用い、室温で再フォールディングさせた。60分後、溶液を60mM 硫酸銅にし、その後一晚攪拌した。

【0471】6. サルコシンの除去. 再フォールディング混合物を5倍容量の10mM Tris緩衝液(pH7.5)で希釈し、その後、工程1と同様に遠心分離した。上清を集め、Dowex 1-X4樹脂、20~50メッシュ、塩化物型とともに1時間攪拌して混合した(0.066%希釈再フォールディング混合物の全容量)。次に、この混合物をカラムに通し、その溶出液を集めた。サルコシンの除去は、HPLCによって確認した。

【0472】7. 酸沈殿. 以前の工程からの溶出液を集

め、そのpHをpH5.5に調整した後、室温で30分間インキュベートした。この混合物を、工程1と同様に遠心分離した。

【0473】8. カチオン交換クロマトグラフィー. 以前の工程からの上清のpHをpH4.2に調整し、CM-Sepharose Fast Flow上に流した。20カラム容量の塩勾配を、20mM NaOAc, pH4.2, 0M~1.0M NaClで用いた。

【0474】9. HICクロマトグラフィー. 上記工程からのピーク画分CM-Sepharoseプール(紫外分析から確認) *

連続注入における体重損失

時間(日)	標体 (PBS)	組換え OB ポリペプチド
日 1-2	3.24 +/- 1.13	1.68 +/- 1.4
日 3-4	4.3 +/- .97	-2.12 +/- .79
日 5-6	4.64 +/- .96	-4.62 +/- 1.3

【0477】見て分かるように、6日間の連続注入処方の終わりに、OBポリペプチドを与えていた動物では、基線と比較して体重が4%以上減少した。これは、腹腔内(i.p.)注射で観測された体重損失よりも、実質的に急速な体重損失である。10mg/kg用量の組換えマウスOBポリペプチドの毎日のi.p.注射では、受けた野生型(正常)マウスにおいて、32日注入期間の終わりで、ほんの2.6~3.0%の体重損失しか見られなかった。また、投与スケジュール中いかなるときにも、体重損失は4%を超えることはなかった(データは示していない)。本データは、連

【0478】ここに見られた結果は、統計学的に有意である、例えば、-4.62% は $p < 0.0001$ である。

【0479】実施例14: 組換えヒトOBポリペプチドアナログのクローニングおよび発現

*を、0.2Mの硫酸アンモニウムとなるよう調整した。20カラム容量の逆塩勾配は、0.4Mから0Mの硫酸アンモニウムを有する5mM NaOAc, pH4.2で行った。この物質を濃縮し、PBS中へダイアフィルトレーションした。

【0475】結果

以下に、C57B16Jマウス(8週齢)の基線体重からのパーセント(%)差を示す。

【0476】

【表8】

本実施例は、OBポリペプチドのアナログ組換えヒト型の組成および調製方法を提供する。

【0480】OB DNAのヒト型は、上記実施例13と同様に、20のコドン置換が設計されている2本鎖DNA(合成オリゴヌクレオチドから生成)を有するMluIおよびBamHI部位間の領域を置換することによってマウスOB DNAから構築した。マウス成熟35位のアルギニンおよびマウスの成熟74位のロイシンに対するコドンは変化しなかった。下記の配列ではMluI部位を実線の下に示す。このDNAは、上記のように、組換えマウスタンパク質と同様の様式で、pCFM1656ベクター(ATCC受託番号第69576号)中に入れた。

【0481】組換えヒトmet OB(二本鎖)DNAおよびアミノ酸配列(配列番号96および97)

【0482】

【化2】

組換えヒトmet OB(二本鎖)DNAおよびアミノ¹³³酸配列(配列番号96および97)

```

CATATGGTACCGATCCAGAAAGTTCAGGACGACACCAAAACCTTAATTAAAACGATCGTT
1  -----+-----+-----+-----+-----+ 60
GTATACCATGGCTAGGTCTTTCAAGTCCTGCTGTGGTTTTGGAATTAATTTTGCTAGCAA

    M V P I Q K V Q D D T K T L I K T I V -

ACCGGTATCAACGACATCAGTCACACCCAGTCGGTGAGCTCTAAACAGCGTGTTACAGGC
51  -----+-----+-----+-----+-----+ 120
TGCGCATAGTTGCTGTAGTCAGTGTGGGTCAGCCACTCGAGATTTGTCGCACAATGTCCG

    T R I N D I S H T Q S V S S K Q R V T G -

CTGGACTTCATCCCGGGTCTGCACCCGATCCTGACCTTGTCAAAATGGACCAGACCCCTG
121 -----+-----+-----+-----+-----+ 180
GACCTGAAGTAGGGCCAGACGTGGGCTAGGACTGGAACAGGTTTTACCTGGTCTGGGAC

    L D F I P G L H P I L T L S K M D Q T L -

GCTGTATACCAGCAGATCTTAACCTCCATGCCGTCCCGTAACGTTCTTCAGATCTCTAAC
181 -----+-----+-----+-----+-----+ 240
CGACATATGGTCTGCTAGAAATTGGAGGTACGGCAGGGCATTGCAAGAAGTCTAGAGATTG

    A V Y Q Q I L T S M P S R N V L Q I S N -

GACCTCGAGAACCTTCGCGACCTGCTGCACGTGCTGGCATTCTCCAAATCCTGCCACCTG
241 -----+-----+-----+-----+-----+ 300
CTGGAGCTCTTGAAGCGCTGGACGACGTGCACGACCGTAAGAGGTTTAGGACGGTGGAC

    D L E N L R D L L H V L A F S K S C H L -

CCATGGGCTTCAGGTCTTGAGACTCTGGACTCTCTGGGCGGGGTCCTGGAAGCATCCGGT
301 -----+-----+-----+-----+-----+ 360
GGTACCCGAAGTCCAGAACTCTGAGACCTGAGAGACCCGCCCCAGGACCTTCGTAGGCCA

    P W A S G L E T L D S L G G V L E A S G -

TACAGCACCGAAGTTGTTGCTCTGTCCCCTGTCAGGGTTCCTTCAGGACATGCTTTGG
361 -----+-----+-----+-----+-----+ 420
ATGTCTGTGGCTTCAACAACGAGACAGGGCAGACGTCCCAAGGGAAGTCTGTACGAAACC

    Y S T E V V A L S R L Q G S L Q D M L W -

CAGCTGGACCTGTCTCCGGGTTGTTAATGGATCC
421 -----+-----+-----+-----+ 454
GTCGACCTGGACAGAGGCCCAACAATTACCTAGG

    Q L D L S P G C *

```

【0483】発酵

組換えヒトOBポリペプチドを生産するための上記宿主細胞の発酵を、組換えマウス物質について上述した条件および組成を用いて行った。結果は、組換えヒトOB物質(および微量の細菌性タンパク質)の収率(グラム/リット

ル)(精製前)について解析を行い、そして細菌発現を解析するために関連づけた。

【0484】

【表9】

136
ヒトOBポリペプチド発現の解析

8時点、	OD (@600 nm)	収率 (g/L)	発現 (mg/OD・L)
Ind. + 2 時間	47	1.91	41
Ind. + 4 時間	79	9.48	120
Ind. + 6 時間	95	13.01	137
Ind. + 8 時間	94	13.24	141
Ind. + 10 時間	98	14.65	149

【0485】略語：Ind.+ 時間は、タンパク質発現の誘導後の時間を意味し、これはpCFM1656を用いた組換えマウス物質のための実施例13の記載と同様である。

【0486】O.D.：光学濃度、分光光度計で測定。1リットル当たり10.D.当たりミリグラムmg/O.D.・L：1リットル当たり10.D.単位当たりタンパク質mgに換算した発現

組換えヒトobポリペプチドの精製

組換えヒトタンパク質は、上記実施例13のように組換えマウスタンパク質の精製について用いられた方法と同様の方法を用いて精製され得る。組換えヒトOBポリペプチドの調製のために、工程7の上清のpHをpH5.0に調整することにより工程8を行い、これをCM-Sepharose fast flowカラムへ流した。20カラム容量塩勾配は、20mM NaOAc, pH5.5, 0M~0.5MのNaClで行った。工程9はCM-Senhar*

連続投与に伴う用量応答

*oseプールを水で4倍に希釈し、pHを7.5に調整することによって行った。この混合物を、0.7Mの硫酸アンモニウムにした。20カラム容量の逆塩勾配を5mMのNaOAc, pH5.5, 0.2Mから0Mの硫酸アンモニウムで行った。その他の点では、上記の工程は同一であった。

【0487】実施例15：用量応答研究

追加研究は、OBタンパク質の連続投与に対する用量応答が存在することを実証した。この研究では、野生型マウス(肥満型でない、体重35~40gのCD-1マウス)に実施例12および13と同様の方法を用いて組換えマウスOBタンパク質を投与した。その結果は次の通りであった(上記のように測定した、基線と比較した体重損失%を示す)。

【0488】

【表10】

用量	時間	% 体重減少
0.03 mg/kg/日	第2日	3.5%
1 mg/kg/日	第2日	7.5%
1 mg/kg/日	第4日	14%

【0489】見て分かるように、0.03mg/kg/日から1mg/kg/日まで用量の増加に伴い、体重損失も3.5%から7.5%へ増加した。注目すべきは14日目において、1mg/kg/日投与量の結果が、14%の体重損失となったことである。

【0490】実施例16：ob/obマウスの体組成におけるレプチンの効果

C57Bl/6J ob/ob 16週齢マウスに、5μg/g/日のマウスレプチン、媒体で処理するか、あるいは33日間いかなる処理も施さなかった。第二の実験では、7週齢ob/obマウスに10μg/g/日のヒトレプチン、マウスレプチン、あるいは媒体で12日間処理した。マウスを屠殺し、全体重、体組成、インスリンレベル、およびグルコースレベルを

評価した。これらの実験のデータを表11において報告する。

【0491】

【表11】

処理したマウスの体重、体組成、インスリンレベル、およびグルコースレベル

処理グループ	16週齢マウス, 5mg/日 レプチン	7週齢マウス, 10mg/日 レプチン
処理	マウスレプチン	マウスレプチン
全体重	31.90±2.8	31.00±1.3
脂肪	9.10±1.7 28.40±3.4	33.40±2.4
瘦身体重	6.80±1.0 21.30±1.7	
水分	16.00±0.8 50.30±4.2	
インスリン (UIU/ml)	<2.0	<2.0
グルコース (mg/dl)	170.0±20.9	320.0±44.0

【0492】体組成データは、以下の体の3つのコンパートメントにおけるレプチンの効果を実証している:脂肪量、瘦身体重、および水分量。データは、レプチンが、体脂肪量を有意に減少させ、そして瘦身体重には最低限の効果を及ぼすことを示している。しかしながら、瘦身体重への効果は、統計上有意ではなかった。

【0493】レプチン処理マウスおよびコントロール(未処理)マウスにおけるインスリンおよびグルコースレベルの比較により、レプチンが血糖およびインスリンレベルを低下させ、従ってこれらの糖尿病の徴候を改善することが示された。

【0494】実施例17: 野生型マウスにおけるレプチンの高用量効果

ob/obマウス(C57B1/6J+/?)の瘦身コントロールに、10 μ g/gのマウスレプチンあるいは媒体(PBS)を一日一度腹腔内注射し、体重および食物摂取を次の二週間にわたって測定した。4日目から体重に有意な減少が現れ、最初の一週間は食物摂取にも有意な減少が現れた。しかしながら、一週間後には食物摂取のレベルは双方のマウスグループ間で区別が付かなくなった。動物を、二週間後に屠殺し、体組成を測定した。体組成分析の結果を表12に示す。データは、レプチンを与えた動物対PBSを与えた動物の体脂肪の減少を示す。

【0495】

【表12】

野生型 (+/?) マウスの体組成および体重

グループ	C57Bl/6J	体重	脂肪	体脂肪率 %	瘦身体重	水分	%
タンパク質	1	17.3	0.30	1.71%	5.00	12.00	69.36%
	2	20.5	2.39	11.65%	5.41	12.70	61.95%
	3	16.9	0.34	1.99%	4.76	11.80	69.82%
	4	18.3	0.84	4.62%	5.16	12.30	67.21%
	5	17.7	0.44	2.51%	4.96	12.30	69.49%
	6	18.7	2.56	13.72%	4.84	11.30	60.43%
	7	15.7	0.37	2.38%	4.53	10.80	68.79%
	8	16.4	0.29	1.79%	4.51	11.60	70.73%
	9	16.5	0.83	5.05%	4.67	11.00	66.67%
	10	14.9				10.40	69.80%
媒体	Avg.	17.3	0.93	5.04%	4.87	11.62	67.43%
	Std. Dev.	1.6	0.90	4.52%	0.30	0.74	3.52%
	11	18.8	1.30	6.93%	5.00	12.50	66.49%
	12	17.6	2.17	12.34%	4.53	10.90	61.93%
	13	18.0	2.29	12.74%	4.61	11.10	61.67%
	14	19.6	3.79	19.34%	4.61	11.20	57.14%
	15	18.6	2.35	12.65%	4.75	11.50	61.83%
	16	17.3	1.96	11.32%	4.54	10.80	62.43%
	17	19.3	1.38	7.12%	5.02	12.90	66.84%
	18	20.6	4.16	20.19%	4.94	11.50	55.83%
	19	17.7	1.08	6.13%	4.72	11.90	67.23%
	20	19.5				12.30	63.08%
	Avg.	18.7	2.28	12.09%	4.75	11.66	62.45%
	Std. Dev.	1.1	1.07	5.08%	0.20	0.72	3.83%

【0496】第二の実験は、野生型マウスC57Bl/6Jへの12.5 $\mu\text{g/g}$ のマウスレプチンの一日二度の腹腔内注射の効果を示した。ポリペプチドの一日二度の注射に関連した体重および食物摂取の有意の減少が見られた。この実験のために、動物は代謝室に配した。食物は、粉末状Purina #5001チャウダイエツトで構成された。この食物は、チャウダイエツト、タピオカ、および水で構成された食物を用いた初期の実験とは異なった。このように代謝室で用いた食物は、高カロリーであった。これによ

り、消費した食物の量が、水分含有食物を与えられたこれらの動物とは異なることが説明される。

【0497】以下は、上記の開示および特に実験手順および考察に関連する参考文献のリストである。

【0498】Baharyら、Genomics, 11:33-47(1991).

Baharyら、Genomics, 13:761-769(1992).

Baharyら、Molecular mapping of mouse chromosomes 4 and 6: Use of a flow-sorted Robertsonian chromosome(1991).

Blankら、Mammalian Genome, 1:s51-s78(1991).
 Bogardusら、Annals of the New York Academy of Sciences, 630:100-115(1991).
 Friedmanら、Mammalian Genome, 1:130-144(1991).
 Harris, FASEB J., 4:3310-3318(1990).
 Jacobowitzら、N. Engl. J. Med., 315:96-100(1986).
 Kessey, Obesity, pp.144-166, Stunkard編., Philadelphia, W.B. Saunders Co.(1980).
 Kesseyら、Ann. Rev. Psychol., 37:109-133.22(1986).
 Leibelら、「肥満症における遺伝子変化および栄養：肥満症の分子遺伝学へのアプローチ」 Genetic Variation and Nutrition, pp.90-101.1, SimopoulosおよびChilds編, S. Karger, Basel(1990).
 Siegelら、Cytogenet. Cell Genet., 61(3):184-185(1992).

本発明は、その意図的あるいは不可欠な特性から逸脱することなく、他の形式で実施され得たり、他の方法で実行され得る。従って、本開示は、全ての点で例示的でありかつ非限定的であり、発明の範囲は添付の請求の範囲によって示されてると考えられるべきである。また、意^{*}20

配列番号：1

配列の長さ：2793塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA (genomic)

他の情報：マウスob cDNA

ハイボセティカル：NO

アンチセンス：NO

起源：

生物名：マウス

配列の特徴

特徴を表す記号：CDS

存在位置：57..560

配列：

GGATCCCTGC TCCAGCAGCT GCAAGGTGCA AGAA
 GAAGAA GATCCCAGGG AGGAAA 56
 ATG TGC TGG AGA CCC CTG TGT CGG TTC CTG
 TGG CTT TGG TCC TAT CTG 104
 Met Cys Trp Arg Pro Leu Cys Arg Phe Leu
 Trp Leu Trp Ser Tyr Leu

1

5

10

15

TCT TAT GTT CAA GCA GTG CCT ATC CAG AAA
 GTC CAG GAT GAC ACC AAA 152
 Ser Tyr Val Gln Ala Val Pro Ile Gln Lys
 Val Gln Asp Asp Thr Lys

20

25

30

ACC CTC ATC AAG ACC ATT GTC ACC AGG ATC
 AAT GAC ATT TCA CAC ACG 200
 Thr Leu Ile Lys Thr Ile Val Thr Arg Ile
 Asn Asp Ile Ser His Thr

*味および等価の範囲内の全ての変化が、本発明中に含まれることが意図される。

【0499】様々な参考文献が本明細書に引用され、それぞれの文献は、その全体が、本明細書中で参考として援用される。

【0500】クレームされた発明は、上記の明細書および容易に入手できる参考文献および開始物質に従って実施可能である。それにも関わらず、出願人は、1995年8月9日に以下の寄託をアメリカンタイプカルチャーコレクション、12301 Parklawn Drive, Rockville, MD, 20852-1178, U.S.A.に特許手続上の微生物の寄託の国際的承認に関するブダベスト条約の規定に従って行った：プラスミドpETH14保有E. coli H14、受託番号第69880号；プラスミドpETM9保有E. coli M9；受託番号第69879号。

【0501】

【発明の効果】本発明により、哺乳動物の脂肪蓄積および脂肪含量の制御を可能にする体重のモジュレーターが提供される。

【0502】

【配列表】

65	70	75	80
GTC TAT CAA CAG GTC CTC ACC AGC CTG CCT			
TCC CAA AAT GTG CTG CAG	344		
Val Tyr Gln Gln Val Leu Thr Ser Leu Pro			
Ser Gln Asn Val Leu Gln			
	85	90	95
ATA GCC AAT GAC CTG GAG AAT CTC CGA GAC			
CTC CTC CAT CTG CTG GCC	392		
Ile Ala Asn Asp Leu Glu Asn Leu Arg Asp			
Leu Leu His Leu Leu Ala			
	100	105	110
TTC TCC AAG AGC TGC TCC CTG CCT CAG ACC			
AGT GGC CTG CAG AAG CCA	440		
Phe Ser Lys Ser Cys Ser Leu Pro Gln Thr			
Ser Gly Leu Gln Lys Pro			
	115	120	125
GAG AGC CTG GAT GGC GTC CTG GAA GCC TCA			
CTC TAC TCC ACA GAG GTG	488		
Glu Ser Leu Asp Gly Val Leu Glu Ala Ser			
Leu Tyr Ser Thr Glu Val			
	130	135	140
GTG GCT TTG AGC AGG CTG CAG GGC TCT CTG			
CAG GAC ATT CTT CAA CAG	536		
Val Ala Leu Ser Arg Leu Gln Gly Ser Leu			
Gln Asp Ile Leu Gln Gln			
145	150	155	1
60			
TTG GAT GTT AGC CCT GAA TGC TGA AGTTTCA			
AAG GCCACCAGGC TCCCAAGA	588		
Leu Asp Val Ser Pro Glu Cys	*		
	165		
ATCATGTAGA GGAAGAAAC CTTGGCTTCC AGGG			
GTCTTC AGGAGAAGAG AGCCATGTGC	648		
ACACATCCAT CATTATTTC TCTCCCTCCT GTAG			
ACCACC CATCCAAAGG CATGACTCCA	708		
CAATGCTTGA CTCAAGTTAT CCACACAACT TCAT			
GAGCAC AAGGAGGGGC CAGCCTGCAG	768		
AGGGGACTCT CACCTAGTTC TTCAGCAAGT AGAG			
ATAAGA GCCATCCCAT CCCCTCCATG	828		
TCCCACCTGC TCCGGGTACA TGTTCCTCCG TGGG			
TACACG CTTGCTGCG GCCCAGGAGA	888		
GGTGAGGTAG GGATGGGTAG AGCCTTTGGG CTGT			
CTCAGA GTCTTTGGGA GCACCGTGAA	948		
GGCTGCATCC ACACACAGCT GGAAACTCCC AAGC			
AGCACA CGATGGAAGC ACTTATTAT	1008		
TTATTCTGCA TTCTATTTTG GATGGATCTG AAGC			
AAGGCA TCAGCTTTTT CAGGCTTTGG	1068		

ATTTATATTT CATAATACCG TATAGACACT GCTT
 GAAGTG TAGTTTTATA CAGTGTTTTA 2508
 AATAACGTTG TATGCATGAA AGACGTTTTT ACAG
 CATGAA CCTGTCTACT CATGCCAGCA 2568
 CTCAAAAACC TTGGGGTTTT GGAGCAGTTT GGAT
 CTTGGG TTTTCTGTTA AGAGATGGTT 2628
 AGCTTATACC TAAAACCATA ATGGCAAACA GGCT
 GCAGGA CCAGACTGGA TCCTCAGCCC 2688
 TGAAGTGTGC CCTCCAGCC AGGTCATACC CTGT
 GGAGGT GAGCGGGATC AGGTTTTGTG 2748
 GTGCTAAGAG AGGAGTTGGA GGTAGATTTT GGAG
 GATCTG AGGGC 2793

配列番号：2

配列の長さ：167アミノ酸

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

他の情報：マウスobポリペプチド

配列：

Met Cys Trp Arg Pro Leu Cys Arg Phe Leu
 Trp Leu Trp Ser Tyr Leu

1 5 10 15

Ser Tyr Val Gln Ala Val Pro Ile Gln Lys
 Val Gln Asp Asp Thr Lys

20 25 30

Thr Leu Ile Lys Thr Ile Val Thr Arg Ile
 Asn Asp Ile Ser His Thr

35 40 45

Gln Ser Val Ser Ala Lys Gln Arg Val Thr
 Gly Leu Asp Phe Ile Pro

50 55 60

Gly Leu His Pro Ile Leu Ser Leu Ser Lys
 Met Asp Gln Thr Leu Ala

65 70 75 80

Val Tyr Gln Gln Val Leu Thr Ser Leu Pro
 Ser Gln Asn Val Leu Gln

85 90 95

Ile Ala Asn Asp Leu Glu Asn Leu Arg Asp
 Leu Leu His Leu Leu Ala

100 105 110

Phe Ser Lys Ser Cys Ser Leu Pro Gln Thr
 Ser Gly Leu Gln Lys Pro

115 120 125

Glu Ser Leu Asp Gly Val Leu Glu Ala Ser
 Leu Tyr Ser Thr Glu Val

NNNGNNGTTG CAAGGCCCAA GAAGCCCANN NTCC
TGGGAA GGAAA ATG CAT TGG 54

Met His Trp

1

GGA ACC CTG TGC GGA TTC TTG TGG CTT TGG
CCC TAT CTT TTC TAT GTC 102
Gly Thr Leu Cys Gly Phe Leu Trp Leu Trp
Pro Tyr Leu Phe Tyr Val

5

10

15

CAA GCT GTG CCC ATC CAA AAA GTC CAA GAT
GAC ACC AAA ACC CTC ATC 150
Gln Ala Val Pro Ile Gln Lys Val Gln Asp
Asp Thr Lys Thr Leu Ile

20

25

30

35

AAG ACA ATT GTC ACC AGG ATC AAT GAC ATT
TCA CAC ACG CAG TCA GTC 198
Lys Thr Ile Val Thr Arg Ile Asn Asp Ile
Ser His Thr Gln Ser Val

40

45

50

TCC TCC AAA CAG AAA GTC ACC GGT TTG GAC
TTC ATT CCT GGG CTC CAC 246
Ser Ser Lys Gln Lys Val Thr Gly Leu Asp
Phe Ile Pro Gly Leu His

55

60

65

CCC ATC CTG ACC TTA TCC AAG ATG GAC CAG
ACA CTG GCA GTC TAC CAA 294
Pro Ile Leu Thr Leu Ser Lys Met Asp Gln
Thr Leu Ala Val Tyr Gln

70

75

80

CAG ATC CTC ACC AGT ATG CCT TCC AGA AAC
GTG ATC CAA ATA TCC AAC 342
Gln Ile Leu Thr Ser Met Pro Ser Arg Asn
Val Ile Gln Ile Ser Asn

85

90

95

GAC CTG GAG AAC CTC CGG GAT CTT CTT CAC
GTG CTG GCC TTC TCT AAG 390
Asp Leu Glu Asn Leu Arg Asp Leu Leu His
Val Leu Ala Phe Ser Lys

100

105

110

1

15

AGC TGC CAC TTG CCC TGG GCC AGT GGC CTG
GAG ACC TTG GAC AGC CTG 438
Ser Cys His Leu Pro Trp Ala Ser Gly Leu
Glu Thr Leu Asp Ser Leu

120

125

130

Thr Leu Ile Lys Thr Ile Val Thr Arg Ile
 Asn Asp Ile Ser His Thr
 35 40 45

Gln Ser Val Ser Ser Lys Gln Lys Val Thr
 Gly Leu Asp Phe Ile Pro
 50 55 60

Gly Leu His Pro Ile Leu Thr Leu Ser Lys
 Met Asp Gln Thr Leu Ala
 65 70 75 80

Val Tyr Gln Gln Ile Leu Thr Ser Met Pro
 Ser Arg Asn Val Ile Gln
 85 90 95

Ile Ser Asn Asp Leu Glu Asn Leu Arg Asp
 Leu Leu His Val Leu Ala
 100 105 110

Phe Ser Lys Ser Cys His Leu Pro Trp Ala
 Ser Gly Leu Glu Thr Leu
 115 120 125

Asp Ser Leu Gly Gly Val Leu Glu Ala Ser
 Gly Tyr Ser Thr Glu Val
 130 135 140

Val Ala Leu Ser Arg Leu Gln Gly Ser Leu
 Gln Asp Met Leu Trp Gln
 145 150 155 1

60
 Leu Asp Leu Ser Pro Gly Cys
 165

配列番号：5

配列の長さ：166アミノ酸

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

他の情報：49位でGlnを欠くマウスobポリペプチド

起源：

生物名：マウス

配列：

Met Cys Trp Arg Pro Leu Cys Arg Phe Leu
 Trp Leu Trp Ser Tyr Leu
 1 5 10 15

Ser Tyr Val Gln Ala Val Pro Ile Gln Lys
 Val Gln Asp Asp Thr Lys
 20 25 30

Thr Leu Ile Lys Thr Ile Val Thr Arg Ile
 Asn Asp Ile Ser His Thr
 35 40 45

配列の長さ：166アミノ酸

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

他の情報：49位でGlnを欠くヒトobポリペプチド

起源：

生物名：ヒト

配列：

Met His Trp Gly Thr Leu Cys Gly Phe Leu

Trp Leu Trp Pro Tyr Leu

1 5 10 15

Phe Tyr Val Gln Ala Val Pro Ile Gln Lys

Val Gln Asp Asp Thr Lys

20 25 30

Thr Leu Ile Lys Thr Ile Val Thr Arg Ile

Asn Asp Ile Ser His Thr

35 40 45

Ser Val Ser Ser Lys Gln Lys Val Thr Gly

Leu Asp Phe Ile Pro Gly

50 55 60

Leu His Pro Ile Leu Thr Leu Ser Lys Met

Asp Gln Thr Leu Ala Val

65 70 75 80

Tyr Gln Gln Ile Leu Thr Ser Met Pro Ser

Arg Asn Val Ile Gln Ile

85 90 95

Ser Asn Asp Leu Glu Asn Leu Arg Asp Leu

Leu His Val Leu Ala Phe

100 105 110

Ser Lys Ser Cys His Leu Pro Trp Ala Ser

Gly Leu Glu Thr Leu Asp

115 120 125

Ser Leu Gly Gly Val Leu Glu Ala Ser Gly

Tyr Ser Thr Glu Val Val

130 135 140

Ala Leu Ser Arg Leu Gln Gly Ser Leu Gln

Asp Met Leu Trp Gln Leu

145 150 155 1

60

Asp Leu Ser Pro Gly Cys

165

配列番号：7

配列の長さ：175塩基対

配列の型：核酸

ハイポセティカル：NO

アンチセンス：NO

配列：

CCAGGGCAGG AAAATGTG

18

配列番号：9

配列の長さ：22塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA (primer)

他の情報：エクソン2G7に対するPCR 3プライマー

ハイポセティカル：NO

アンチセンス：YES

配列：

CATCCTGGAC TTTCTGGATA GG

22

配列番号：10

配列の長さ：23アミノ酸

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

他の情報：推定のN末端シグナルペプチド

配列

Met Cys Trp Arg Pro Leu Cys Arg Phe Leu

Trp Leu Trp Ser Tyr Leu

1

5

10

15

Ser Tyr Val Gln Ala Val Pro

20

配列番号：11

配列の長さ：287塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：環状

配列の種類：DNA (plasmid)

他の情報：発現ベクターpET-15b

ハイポセティカル：NO

アンチセンス：NO

配列の特徴

特徴を表す記号：T7プロモーター

存在位置：20..37

配列の特徴

特徴を表す記号：lacオペレーター

存在位置：39..64

配列の特徴

特徴を表す記号：CDS

存在位置：108..243

配列の特徴

特徴を表す記号：His-Tag

存在位置：123..137

配列の特徴

特徴を表す記号：トロンピン切断部位

配列

AGATCTCGAT CCCGCGAAAT TAATACGACT CACT
 ATAGGG GAATTGTGAG CGGATAACAA 60
 TTCCCCTCTA CAAATAATTT TGTTTAACTT TAAG
 AAGGAG ATATACC ATG GGC AGC 116

Met Gly Se

r

1

AGC CAT CAT CAT CAT CAT CAC AGC AGC GGC
 CTG GTG CCG CGC GGC AGC 164
 Ser His His His His His His Ser Ser Gly
 Leu Val Pro Arg Gly Ser

5

10

15

CAT ATG CTC GAG GAT CCC GCT GCT AAC AAA
 GCC CGA AAG GAA GCT GAG 212
 His Met Leu Glu Asp Pro Ala Ala Asn Lys
 Ala Arg Lys Glu Ala Glu

20

25

30

35

TTG GCT GCT GCC ACC GCT GAG CAA TAA CTA
 G CATAACCCCT TGGGGCCTCT 263
 Leu Ala Ala Ala Thr Ala Glu Gln *

40

AAACGGGTCT TGAGGGGTTT TTTG
 287

配列番号：12

配列の長さ：43アミノ酸

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

配列

Met Gly Ser Ser His His His His His His
 Ser Ser Gly Leu Val Pro

1

5

10

15

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

20

25

30

Glu Ala Glu Leu Ala Ala Ala Thr Ala Glu
 Gln

35

40

配列番号：13

配列の長さ：32塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA (primer)

他の情報：マウス5プライマー

ハイポセティカル：NO

アンチセンス：NO

配列の長さ：32塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA (primer)

他の情報： ヒト5プライマー

ハイボセティカル：NO

アンチセンス：NO

配列

TCTATGTCCA TATGGTGCCG ATCCAAAAAG TC

32

配列番号：16

配列の長さ：32塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA (primer)

他の情報： ヒト3プライマー

ハイボセティカル：NO

アンチセンス：Yes

配列

TTCCTTCCCA TATGGTACTC CTTGCAGGAA GA

32

配列番号：17

配列の長さ：11塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

他の情報：obにおけるスプライスアクセプター部位

ハイボセティカル：NO

アンチセンス：NO

配列の特徴

特徴を表す記号：Splice acceptor site

配列

AGCAGTCGGT A

11

配列番号：18

配列の長さ：16アミノ酸

配列の型：アミノ酸

トポロジー：不明

配列の種類：ペプチド

他の情報： ob ペプチドフラグメント

フラグメント型：中間部フラグメント

起源：

生物名：マウス

配列

Val Pro Ile Gln Lys Val Gln Asp Asp Thr

Lys Thr Leu Ile Lys Thr

1

5

10

15

配列番号：19

配列の長さ：15アミノ酸

配列の種類：ペプチド

他の情報： ob ペプチドフラグメント

フラグメント型：中間部フラグメント

起源：

生物名：マウス

配列

Leu His Pro Ile Leu Ser Leu Ser Lys Met

Asp Gln Thr Leu Ala

1 5 10 15

配列番号：20

配列の長さ：19アミノ酸

配列の型：アミノ酸

トポロジー：不明

配列の種類：ペプチド

他の情報： ob ペプチドフラグメント

フラグメント型：中間部フラグメント

起源：

生物名：マウス

配列

Ser Lys Ser Cys Ser Leu Pro Gln Thr Ser

Gly Leu Gln Lys Pro Glu

1 5 10 15

Ser Leu Asp

配列番号：21

配列の長さ：20アミノ酸

配列の型：アミノ酸

トポロジー：不明

配列の種類：ペプチド

他の情報： ob ペプチドフラグメント

フラグメント型：カルボキシル末端

起源：

生物名：マウス

配列

Ser Arg Leu Gln Gly Ser Leu Gln Asp Ile

Leu Gln Gln Leu Asp Val

1 5 10 15

Ser Pro Glu Cys

20

配列番号：22

配列の長さ：414塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA (genomic)

他の情報：第1エクソンの非コード配列上流を含むヒトob遺伝子の一部分、第

1エクソンのコード配列、および第1イントロンの5領域

ハイポセティカル：NO

アンチセンス：NO

起源：

生物名：ヒト

配列の特徴

特徴を表す記号：第1イントロンの5領域

存在位置：182..414

配列の特徴

特徴を表す記号：HOB 1gF DNAプライマーが生成されたヒトob遺伝子の5非コード配列

存在位置：11..28

配列の特徴

特徴を表す記号：HOB 1gRプライマーが生成されたヒトob遺伝子のイントロンの配列

存在位置：241..260

配列

GGTTGCAAGG CCAAGAAGC CCATCCTGGG AAGG

AAA ATG CAT TGG GGA ACC CTG 55

Met His Trp Gly T

hr Leu

1

5

TGC GGA TTC TTG TGG CTT TGG CCC TAT CTT

TTC TAT GTC CAA GCT GTG 103

Cys Gly Phe Leu Trp Leu Trp Pro Tyr Leu

Phe Tyr Val Gln Ala Val

10

15

20

CCC ATC CAA AAA GTC CAA GAT GAC ACC AAA

ACC CTC ATC AAG ACA ATT 151

Pro Ile Gln Lys Val Gln Asp Asp Thr Lys

Thr Leu Ile Lys Thr Ile

25

30

35

GTC ACC AGG ATC AAT GAC ATT TCA CAC ACG

GTAAGGAGAG TATGCGGGGA 201

Val Thr Arg Ile Asn Asp Ile Ser His Thr

40

45

CAAAGTAGAA CTGCAGCCAG CCCAGCACTG GCTC

CTAGTG GCACTGGACC CAGATAGTCC 261

AAGAAACATT TATTGAACGC CTCCTGAATG CCAG

GCACCT ACTGGAAGCT GAGAAGGATT 321

TTGGATAGCA CAGGGCTCCA CTCTTTCTGG TTGT

TTCTTN TGGCCCCCTC TGCCTGCTGA 381

GATNCCAGGG GTTAGNGGTT CTTAATTCCT AAA

414

配列番号：23

配列の長さ：48アミノ酸

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

他の情報：第1エクソンによりコードされるヒトobタンパク質のN末端部分

配列

Met His Trp Gly Thr Leu Cys Gly Phe Leu

アンチセンス：N0

起源：

生物名：ヒト

配列の特徴

特徴を表す記号：CDS

存在位置：291..648

配列の特徴

特徴を表す記号：第1イントロンの3

存在位置：1..290

配列の特徴

特徴を表す記号：HOB 2gFプライマーが生成されたヒトob遺伝子のイントロン

の配列

存在位置：250..269

配列の特徴

特徴を表す記号：HOB 2gR DNAプライマーが生成されたヒトob遺伝子の3非コード配列

の配列

存在位置：707..728

配列

CTGTTCTTT CAGGAAGAGG CCATGTAAGA GAAA
GGAATT GACCTAGGGA AAATTGGCCT 60
GGGAAGTGA GGAACGGAT GGTGTGGGAA AAGC
AGGAAT CTCGAGACC AGCTTAGAGG 120
CTTGGCAGTC ACCTGGGTGC AGGANACAAG GGCC
TGAGCC AAAGTGGTGA GGGAGGGTGG 180
AAGGAGACAG CCCAGAGAAT GACCCTCCAT GCCC
ACGGGG AAGGCAGAGG GCTCTGAGAG 240
CGATTCTCC CACATGCTGA GCACTTGTTT TCCC
TCTTCC TCCTNCATAG CAG TCA 296

Gln Ser

1

GTC TCC TCC AAA CAG AAA GTC ACC GGT TTG
GAC TTC ATT CCT GGG CTC 344
Val Ser Ser Lys Gln Lys Val Thr Gly Leu
Asp Phe Ile Pro Gly Leu

5

10

15

CAC CCC ATC CTG ACC TTA TCC AAG ATG GAC
CAG ACA CTG GCA GTC TAC 392
His Pro Ile Leu Thr Leu Ser Lys Met Asp
Gln Thr Leu Ala Val Tyr

20

25

30

CAA CAG ATC CTC ACC AGT ATG CCT TCC AGA
AAC GTG ATC CAA ATA TCC 440
Gln Gln Ile Leu Thr Ser Met Pro Ser Arg
Asn Val Ile Gln Ile Ser

35

40

45

50

AAC GAC CTG GAG AAC CTC CGG GAT CTT CTT
CAC GTG CTG GCC TTC TCT 488

TTATCCAGGA CTCTGTCAAT TTCCTGACT CCTC
TAAGCC ACTCTTCCAA AGG 801

配列番号：25

配列の長さ：119アミノ酸

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

他の情報：第2エクソンによりコードされるヒトobタンパク質のC末端部
分

配列

Gln Ser Val Ser Ser Lys Gln Lys Val Thr

Gly Leu Asp Phe Ile Pro

1

5

10

15

Gly Leu His Pro Ile Leu Thr Leu Ser Lys

Met Asp Gln Thr Leu Ala

20

25

30

Val Tyr Gln Gln Ile Leu Thr Ser Met Pro

Ser Arg Asn Val Ile Gln

35

40

45

Ile Ser Asn Asp Leu Glu Asn Leu Arg Asp

Leu Leu His Val Leu Ala

50

55

60

Phe Ser Lys Ser Cys His Leu Pro Trp Ala

Ser Gly Leu Glu Thr Leu

65

70

75

80

Asp Ser Leu Gly Gly Val Leu Glu Ala Ser

Gly Tyr Ser Thr Glu Val

85

90

95

Val Ala Leu Ser Arg Leu Gln Gly Ser Leu

Gln Asp Met Leu Trp Gln

100

105

110

Leu Asp Leu Ser Pro Gly Cys

115

配列番号：26

配列の長さ：8アミノ酸

配列の型：アミノ酸

トポロジー：不明

配列の種類：ペプチド

フラグメント型：中間部フラグメント

起源：

生物名：pichia 酵母

配列

Leu Glu Lys Arg Glu Ala Glu Ala

1

5

配列番号：27

配列の長さ：4アミノ酸

配列の種類：ペプチド

フラグメント型：中間部フラグメント

起源：

生物名：pichia 酵母

配列

Leu Glu Lys Arg

1

配列番号：29

配列の長さ：18塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA (primer)

他の情報：ヒトob遺伝子の5 非コード配列から生成されたHOB 1gF

DNAプライ

マー

ハイポセティカル：NO

アンチセンス：NO

配列

CCCAAGAAGC CCATCCTG

18

配列番号：30

配列の長さ：20塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA (primer)

他の情報：ヒトob遺伝子の第1イントロンの配列から生成されたHOB 1

gR DNA

プライマー

ハイポセティカル：NO

アンチセンス：YES

配列

GACTATCTGG GTCCAGTGCC

20

配列番号：31

配列の長さ：20塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA (primer)

他の情報：ヒトob遺伝子の第1イントロンの配列から生成されたHOB 2

gF DNA

プライマー

ハイポセティカル：NO

アンチセンス：NO

配列

CCACATGCTG AGCACTTGTT

20

配列番号：32

配列の長さ：22塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

マー

ハイボセティカル：NO

アンチセンス：YES

配列

CTTCAATCCT GGAGATACCT GG

22

配列番号：33

配列の長さ：51塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：環状

配列の種類：DNA

他の情報：pPIC.9 クローニング部位

ハイボセティカル：NO

アンチセンス：NO

配列

CTCGAGAAAA GAGAGGCTGA AGCTTACGTA GAAT

TCCCTA GGCCGGCCGG G 51

配列番号：34

配列の長さ：40塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA (primer)

他の情報：ヒトob cDNA 配列を増幅するためのPCR 5プライマー

ハイボセティカル：NO

アンチセンス：NO

配列

GTATCTCTCG AGAAAAGAGT GCCCATCCAA AAAG

TCCAAG 40

配列番号：35

配列の長さ：31塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA (primer)

他の情報：ヒトob cDNA 配列を増幅するためのPCR 3プライマー

ハイボセティカル：NO

アンチセンス：YES

配列

GCGCGAATTC TCAGCACCCA GGGCTGAGGT C

31

配列番号：36

配列の長さ：40塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA (primer)

他の情報：マウスob cDNA配列を増幅するためのPCR 5プライマー

ハイボセティカル：NO

アンチセンス：NO

配列の長さ：31塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA (primer)

他の情報：マウスob cDNA 配列を増幅するためのPCR 3プライマー

ハイポセティカル：NO

アンチセンス：YES

配列

GCGCGAATTC TCAGCATTCA GGGCTAACAT C

31

配列番号：38

配列の長さ：4アミノ酸

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

他の情報：トロンビン切断後の再生マウスob タンパク質のN末端における

テト

ラペプチド

起源：

生物名：マウス

配列

Gly Ser His Met

1

配列番号：39

配列の長さ：19塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA (primer)

他の情報：配列タグ部位に特異的なPCRプライマー sWSS1734

ハイポセティカル：NO

アンチセンス：NO

起源：

生物名：ヒト

配列

CAAGACAAAT GAGATAAGG

19

配列番号：40

配列の長さ：18塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA (primer)

他の情報：配列タグ部位に特異的なPCRプライマー sWSS1734

ハイポセティカル：NO

アンチセンス：NO

起源：

生物名：ヒト

配列

AGAGTTACAG CTTTACAG

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA (primer)

他の情報： 配列タグ部位に特異的なPCRプライマー sWSS494

ハイボセティカル：NO

アンチセンス：NO

起源：

生物名：ヒト

配列

CTAAACACCT TTCCATTCC

19

配列番号：42

配列の長さ：22塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA (primer)

他の情報： 配列タグ部位に特異的なPCRプライマー sWSS494

ハイボセティカル：NO

アンチセンス：NO

起源：

生物名：ヒト

配列

TTATATTGAC TTTTCCCCTC TC

22

配列番号：43

配列の長さ：20塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA (primer)

他の情報： 配列タグ部位に特異的なPCRプライマー sWSS883

ハイボセティカル：NO

アンチセンス：NO

起源：

生物名：ヒト

配列

TGCAGTAAGC TGTGATTGAG

20

配列番号：44

配列の長さ：20塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA (primer)

他の情報： 配列タグ部位に特異的なPCRプライマー sWSS883

ハイボセティカル：NO

アンチセンス：NO

起源：

生物名：ヒト

配列

GTGCAGCTTT AATTGTGAGC

配列番号：45

配列の長さ：18塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA (primer)

他の情報： 配列タグ部位に特異的なPCRプライマー sWSS2359

ハイポセティカル：NO

アンチセンス：NO

起源：

生物名：ヒト

配列

AGTGTTGTGT TTCTCCTG

18

配列番号：46

配列の長さ：19塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA (primer)

他の情報： 配列タグ部位に特異的なPCRプライマー sWSS2359

ハイポセティカル：NO

アンチセンス：NO

起源：

生物名：ヒト

配列

AAAGGGGATG TGATAAGTG

19

配列番号：47

配列の長さ：18塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA (primer)

他の情報： 配列タグ部位に特異的なPCRプライマー sWSS2336

ハイポセティカル：NO

アンチセンス：NO

起源：

生物名：ヒト

配列

GGTGTTACGT TTAGTTAC

18

配列番号：48

配列の長さ：20塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA (primer)

他の情報： 配列タグ部位に特異的なPCRプライマー sWSS2336

ハイポセティカル：NO

アンチセンス：NO

起源：

生物名：ヒト

配列

GGAATAATGA GAGAAGATTG

20

配列番号：49

配列の長さ：18塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA (primer)

他の情報： 配列タグ部位に特異的なPCRプライマー sWSS1218

ハイポセティカル：NO

アンチセンス：NO

起源：

生物名：ヒト

配列

GCTCAACTGA CAGAAAAC

18

配列番号：50

配列の長さ：20塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA (primer)

他の情報： 配列タグ部位に特異的なPCRプライマー sWSS1218

ハイポセティカル：NO

アンチセンス：NO

起源：

生物名：ヒト

配列

GACTATGTAA AAGAAATGCC

20

配列番号：51

配列の長さ：18塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA (primer)

他の情報： 配列タグ部位に特異的なPCRプライマー sWSS1402

ハイポセティカル：NO

アンチセンス：NO

起源：

生物名：ヒト

配列

AAAGGGCTTC TAATCTAC

18

配列番号：52

配列の長さ：18塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA (primer)

他の情報： 配列タグ部位に特異的なPCRプライマー sWSS1402

ハイポセティカル：NO

起源：

生物名：ヒト

配列

CCTTCCAAC TCTTTGAC

18

配列番号：53

配列の長さ：18塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA (primer)

他の情報： 配列タグ部位に特異的なPCRプライマー sWSS999

ハイポセティカル：NO

アンチセンス：NO

起源：

生物名：ヒト

配列

TAAACCCCT TTCTGTTC

18

配列番号：54

配列の長さ：19塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA (primer)

他の情報： 配列タグ部位に特異的なPCRプライマー sWSS999

ハイポセティカル：NO

アンチセンス：NO

起源：

生物名：ヒト

配列

TTGCATAATA GTCACACC

19

配列番号：55

配列の長さ：22塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA (primer)

他の情報： 配列タグ部位に特異的なPCRプライマー sWSS1751

ハイポセティカル：NO

アンチセンス：NO

起源：

生物名：ヒト

配列

CCAAAATCAG AATTGTCAGA AG

22

配列番号：56

配列の長さ：20塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA (primer)

ハイポセティカル：NO

アンチセンス：NO

起源

生物名：ヒト

配列

AAACCGAAGT TCAGATACAG

20

配列番号：57

配列の長さ：18塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA (primer)

他の情報： 配列タグ部位に特異的なPCRプライマー sWSS1174

ハイポセティカル：NO

アンチセンス：NO

起源：

生物名：ヒト

配列

AATATCTGAC ATTGGCAC

18

配列番号：58

配列の長さ：18塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA (primer)

他の情報： 配列タグ部位に特異的なPCRプライマー sWSS1174

ハイポセティカル：NO

アンチセンス：NO

起源：

生物名：ヒト

配列

TTAGACCTGA GAAAAGAG

18

配列番号：59

配列の長さ：19塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA (primer)

他の情報： 配列タグ部位に特異的なPCRプライマー sWSS2061

ハイポセティカル：NO

アンチセンス：NO

起源：

生物名：ヒト

配列

GTTGCACAAT AAAAAATCC

19

配列番号：60

配列の長さ：20塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

配列の種類：DNA (primer)

他の情報： 配列タグ部位に特異的なPCRプライマー sWSS2061

ハイポセティカル：NO

アンチセンス：NO

起源：

生物名：ヒト

配列

CTTCCATTAG TGTCTTATAG

20

配列番号：61

配列の長さ：18塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA (primer)

他の情報： 配列タグ部位に特異的なPCRプライマー sWSS2588

ハイポセティカル：NO

アンチセンス：NO

起源：

生物名：ヒト

配列 142

ATCACTACAC ACCTAATC

配列番号：62 18

配列の長さ：18塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA (primer)

他の情報： 配列タグ部位に特異的なPCRプライマー sWSS2588

ハイポセティカル：NO

アンチセンス：NO

起源：

生物名：ヒト

配列

CCATTCTACA TTTCCACC

18

配列番号：63

配列の長さ：24塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA (primer)

他の情報： 配列タグ部位に特異的なPCRプライマー sWSS808

ハイポセティカル：NO

アンチセンス：NO

起源：

生物名：ヒト

配列

GGCTGTGTGA GCAAGATCCT AGGA

24

配列番号：64

配列の長さ：23塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA (primer)

他の情報： 配列タグ部位に特異的なPCRプライマー sWSS808

ハイボセティカル：NO

アンチセンス：NO

起源：

生物名：ヒト

配列

TTGCCAGGCA AAGAGGGCTG GAC

23

配列番号：65

配列の長さ：18塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA (primer)

他の情報： 配列タグ部位に特異的なPCRプライマー sWSS1392

ハイボセティカル：NO

アンチセンス：NO

起源：

生物名：ヒト

配列

CTCAGGTATG TCTTTATC

18

配列番号：66

配列の長さ：18塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA (primer)

他の情報： 配列タグ部位に特異的なPCRプライマー sWSS1392

ハイボセティカル：NO

アンチセンス：NO

起源：

生物名：ヒト

配列

TGTCTCTGCA TTCTTTTC

18

配列番号：67

配列の長さ：18塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA (primer)

他の情報： 配列タグ部位に特異的なPCRプライマー sWSS1148

ハイボセティカル：NO

アンチセンス：NO

起源：

生物名：ヒト

配列

GACACATACA AACACAAG

配列番号：68

配列の長さ：19塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA (primer)

他の情報： 配列タグ部位に特異的なPCRプライマー sWSS1148

ハイポセティカル：NO

アンチセンス：NO

起源：

生物名：ヒト

配列

ATTGAGTTGA GTGTAGTAG

19

配列番号：69

配列の長さ：18塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA (primer)

他の情報： 配列タグ部位に特異的なPCRプライマー sWSS1529

ハイポセティカル：NO

アンチセンス：NO

起源：

生物名：ヒト

配列

CAGGGATTTTC TAATTGTC

18

配列番号：70

配列の長さ：18塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA (primer)

他の情報： 配列タグ部位に特異的なPCRプライマー sWSS1529

ハイポセティカル：NO

アンチセンス：NO

起源：

生物名：ヒト

配列

AAAAGATGGA GCCTTTTG

18

配列番号：71

配列の長さ：21塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA (primer)

他の情報： 配列タグ部位に特異的なPCRプライマー sWSS2619

ハイポセティカル：NO

アンチセンス：NO

起源：

生物名：ヒト

配列

CGTTAAGGGA AGGAACTCTG G

21

配列番号：72

配列の長さ：20塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA (primer)

他の情報： 配列タグ部位に特異的なPCRプライマー sWSS2619

ハイポセティカル：NO

アンチセンス：NO

起源：

生物名：ヒト

配列

TGGCTTAGAG GAGTCAGGGA

20

配列番号：73

配列の長さ：18塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA (primer)

他の情報： 配列タグ部位に特異的なPCRプライマー sWSS404

ハイポセティカル：NO

アンチセンス：NO

起源：

生物名：ヒト

配列

ACCAGGGTCA ATACAAAG

18

配列番号：74

配列の長さ：18塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA (primer)

他の情報： 配列タグ部位に特異的なPCRプライマー sWSS404

ハイポセティカル：NO

アンチセンス：NO

起源：

生物名：ヒト

配列

TAATGTGTCC TTCTTGCC

18

配列番号：75

配列の長さ：18塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA (primer)

他の情報： 配列タグ部位に特異的なPCRプライマー sWSS2367

ハイポセティカル：NO

起源：

生物名：ヒト

配列

CAATCCTGGC TTCATTTG

18

配列番号：76

配列の長さ：18塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA (primer)

他の情報：配列タグ部位に特異的なPCRプライマー sWSS2367

ハイポセティカル：NO

アンチセンス：NO

起源：

生物名：ヒト

配列

AAGGTGGGTA GGATGCTA

18

配列番号：77

配列の長さ：20塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA (primer)

他の情報：マーカ-UT528

ハイポセティカル：NO

アンチセンス：NO

起源：

生物名：ヒト

配列

TGCAGTAAGC TGTGATTGAG

20

配列番号：78

配列の長さ：20塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA (primer)

他の情報：マーカ-UT528

ハイポセティカル：NO

アンチセンス：NO

起源：

生物名：ヒト

配列

GTGCAGCTTT AATTGTGAGC

20

配列番号：79

配列の長さ：20塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA (primer)

ハイポセティカル：NO

アンチセンス：NO

起源：

生物名：ヒト

配列

AGCTTCAAGA CTTTNA GCCT

20

配列番号：80

配列の長さ：19塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA (primer)

他の情報：マーカーAFMa065zg9

ハイポセティカル：NO

アンチセンス：NO

起源：

生物名：ヒト

配列

GGTCAGCAGC ACTGTGATT

19

配列番号：81

配列の長さ：19塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA (primer)

他の情報：マーカーAFMa125wh1

ハイポセティカル：NO

アンチセンス：NO

起源：

生物名：ヒト

配列 143

TCACCTTGAG ATTCCATCC

配列の長さ：20塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA (primer)

他の情報：マーカーAFMa125wh1

ハイポセティカル：NO

アンチセンス：NO

起源：

生物名：ヒト

配列

AACACCGTGG TCTTATCAAA

20

配列番号：83

配列の長さ：20塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状
配列の種類：DNA (primer)
他の情報：マーカーAFM309yf10
ハイポセティカル：NO
アンチセンス：NO
起源：

生物名：ヒト
配列
CATCCAAGTT GGCAGTTTT
20

配列番号：84
配列の長さ：20塩基対
配列の型：核酸
鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
配列の種類：DNA (primer)
他の情報：マーカーAFM309yf10
ハイポセティカル：NO
アンチセンス：NO
起源：

生物名：ヒト
配列
AGATGCTGAA TTCCAGACA
20

配列番号：85
配列の長さ：16塩基対
配列の型：核酸
鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
配列の種類：DNA (primer)
他の情報：マーカーAFM218xf10
ハイポセティカル：NO
アンチセンス：NO
起源：

生物名：ヒト
配列
TGGGCAACAC AGCAAA
16

配列番号：86
配列の長さ：20塩基対
配列の型：核酸
鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
配列の種類：DNA (primer)
他の情報：マーカーAFM218xf10
ハイポセティカル：NO
アンチセンス：NO
起源：

生物名：ヒト
配列
TGCAGTTAGT GCCAATGTCA
20

配列番号：87

配列の型：核酸
鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
配列の種類：DNA (primer)
他の情報：マーカーAFM206xc1
ハイボセティカル：NO
アンチセンス：NO
起源：
生物名：ヒト
配列
CCAGGCCATG TGGAAC
16
配列番号：88
配列の長さ：20塩基対
配列の型：核酸
鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
配列の種類：DNA (primer)
他の情報：マーカーAFM206xc1
ハイボセティカル：NO
アンチセンス：NO
起源：
生物名：ヒト
配列
AGTTCTGGC TTGCCTCAGT
20
配列番号：89
配列の長さ：16塩基対
配列の型：核酸
鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
配列の種類：DNA (primer)
他の情報：マーカーAFM199xh12
ハイボセティカル：NO
アンチセンス：NO
起源：
生物名：ヒト
配列
TCTGATTGCT GGCTGC
16
配列番号：90
配列の長さ：17塩基対
配列の型：核酸
鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
配列の種類：DNA (primer)
他の情報：マーカーAFM199xh12
ハイボセティカル：NO
アンチセンス：NO
起源：
生物名：ヒト
配列
GCGCGTGTGT ATGTGAG

配列番号：91

配列の長さ：20塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA (primer)

他の情報：マーカーAFMa345wc9

ハイボセティカル：NO

アンチセンス：NO

起源：

生物名：ヒト

配列

AGCTCTTGGC AAACACAT

20

配列番号：92

配列の長さ：20塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA (primer)

他の情報：マーカーAFMa345wc9

ハイボセティカル：NO

アンチセンス：NO

起源：

生物名：ヒト

配列

GCCTAAGGGA ATGAGACACA

20

配列番号：93

配列の長さ：24塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA (primer)

他の情報：マウスPax4遺伝子に対するプライマー

ハイボセティカル：NO

アンチセンス：NO

起源：

生物名：マウス

配列

GGGAGCCTTG TCCTGGGTAC AAAG

24

配列番号：94

配列の長さ：491塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

他の情報：組換えマウスmet ob

ハイボセティカル：NO

アンチセンス：NO

起源：

生物名：マウス

配列の特徴

特徴を表す記号：CDS

存在位置：41..478

配列

TCTAGATTTG AGTTTAACT TTTAGAAGGA GGAA

TAACAT ATG GTA CCG ATC CAG 55

Met Val Pro Ile

Gln

1

5

AAA GTT CAG GAC GAC ACC AAA ACC TTA ATT

AAA ACG ATC GTT ACG CGT 103

Lys Val Gln Asp Asp Thr Lys Thr Leu Ile

Lys Thr Ile Val Thr Arg

10

15

20

ATC AAC GAC ATC AGT CAC ACC CAG TCG GTC

TCC GCT AAA CAG CGT GTT 151

Ile Asn Asp Ile Ser His Thr Gln Ser Val

Ser Ala Lys Gln Arg Val

25

30

35

ACC GGT CTG GAC TTC ATC CCG GGT CTG CAC

CCG ATC CTA AGC TTG TCC 199

Thr Gly Leu Asp Phe Ile Pro Gly Leu His

Pro Ile Leu Ser Leu Ser

40

45

50

AAA ATG GAC CAG ACC CTG GCT GTA TAC CAG

CAG GTG TTA ACC TCC CTG 247

Lys Met Asp Gln Thr Leu Ala Val Tyr Gln

Gln Val Leu Thr Ser Leu

55

60

65

CCG TCC CAG AAC GTT CTT CAG ATC GCT AAC

GAC CTC GAG AAC CTT CGC 295

Pro Ser Gln Asn Val Leu Gln Ile Ala Asn

Asp Leu Glu Asn Leu Arg

70

75

80

85

GAC CTG CTG CAC CTG CTG GCA TTC TCC AAA

TCC TGC TCC CTG CCG CAG 343

Asp Leu Leu His Leu Leu Ala Phe Ser Lys

Ser Cys Ser Leu Pro Gln

90

95

100

ACC TCA GGT CTT CAG AAA CCG GAA TCC CTG

GAC GGG GTC CTG GAA GCA 391

Thr Ser Gly Leu Gln Lys Pro Glu Ser Leu

Asp Gly Val Leu Glu Ala

105

110

115

TCC CTG TAC AGC ACC GAA GTT GTT GCT CTG

TCC CGT CTG CAG GGT TCC 439

Val Leu Thr Ser Leu Pro Ser Gln Asn Val
 Leu Gln Ile Ala Asn Asp
 65 70 75 80

Leu Glu Asn Leu Arg Asp Leu Leu His Leu
 Leu Ala Phe Ser Lys Ser
 85 90 95

Cys Ser Leu Pro Gln Thr Ser Gly Leu Gln
 Lys Pro Glu Ser Leu Asp
 100 105 110

Gly Val Leu Glu Ala Ser Leu Tyr Ser Thr
 Glu Val Val Ala Leu Ser
 115 120 125

Arg Leu Gln Gly Ser Leu Gln Asp Ile Leu
 Gln Gln Leu Asp Val Ser
 130 135 140

Pro Glu Cys
 145

配列番号：96

配列の長さ：454塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA

他の情報：組換えヒトmet ob

ハイボセティカル：NO

アンチセンス：NO

起源：

生物名：ヒト

配列の特徴

特徴を表す記号：CDS

存在位置：4..444

配列

CAT ATG GTA CCG ATC CAG AAA GTT CAG GAC

GAC ACC AAA ACC TTA ATT 48

Met Val Pro Ile Gln Lys Val Gln Asp As
 p Thr Lys Thr Leu Ile

1 5 10 15

AAA ACG ATC GTT ACG CGT ATC AAC GAC ATC

AGT CAC ACC CAG TCG GTG 96

Lys Thr Ile Val Thr Arg Ile Asn Asp Ile
 Ser His Thr Gln Ser Val

20 25 30

AGC TCT AAA CAG CGT GTT ACA GGC CTG GAC

TTC ATC CCG GGT CTG CAC 144

Ser Ser Lys Gln Arg Val Thr Gly Leu Asp
 Phe Ile Pro Gly Leu His

115	120	125
TCC CGT CTG CAG GGT TCC CTT CAG GAC ATG		
CTT TGG CAG CTG GAC CTG	432	
Ser Arg Leu Gln Gly Ser Leu Gln Asp Met		
Leu Trp Gln Leu Asp Leu		
130	135	140
TCT CCG GGT TGT TAATGGATCC		
454		
Ser Pro Gly Cys		
145		
配列番号：97		
配列の長さ：147アミノ酸		
配列の型：アミノ酸		
トポロジー：直鎖状		
配列の種類：タンパク質		
他の情報：組換えヒトmet ob タンパク質		
配列		
Met Val Pro Ile Gln Lys Val Gln Asp Asp		
Thr Lys Thr Leu Ile Lys		
1	5	10
		15
Thr Ile Val Thr Arg Ile Asn Asp Ile Ser		
His Thr Gln Ser Val Ser		
20	25	30
Ser Lys Gln Arg Val Thr Gly Leu Asp Phe		
Ile Pro Gly Leu His Pro		
35	40	45
Ile Leu Thr Leu Ser Lys Met Asp Gln Thr		
Leu Ala Val Tyr Gln Gln		
50	55	60
Ile Leu Thr Ser Met Pro Ser Arg Asn Val		
Leu Gln Ile Ser Asn Asp		
65	70	75
		80
Leu Glu Asn Leu Arg Asp Leu Leu His Val		
Leu Ala Phe Ser Lys Ser		
85	90	95
Cys His Leu Pro Trp Ala Ser Gly Leu Glu		
Thr Leu Asp Ser Leu Gly		
100	105	110
Gly Val Leu Glu Ala Ser Gly Tyr Ser Thr		
Glu Val Val Ala Leu Ser		
115	120	125
Arg Leu Gln Gly Ser Leu Gln Asp Met Leu		
Trp Gln Leu Asp Leu Ser		

フラグメント型：N末端His-タグ

配列

Met Gly Ser Ser His His His His His

Ser Ser Gly Leu Val Pro

1

5

10

15

Arg Gly Ser

145

【図面の簡単な説明】

20

【図1 A】図1(A~E)は、マウスOB cDNAについて誘導される核酸配列(配列番号1)および推定アミノ酸配列(配列番号2)を示す。39塩基対の5'リーダーの後方に予測167アミノ酸オープンリーディングフレームおよび約3.7kbの3'非翻訳配列が続く。(既に1994年11月30日出願の出願第08/347,563号および1995年5月10日出願の第08/438,431号において、さらなる58塩基の5'非コード配列が続いて決定され、クローニングアーチファクトとされた。このアーチファクトは、コード領域、図1に示されている39塩基の5'非コード領域、または遺伝子の3'非コード領域とは関係がない。)3'非翻訳配列の約2500塩基対のすべてを示す。観察およびSigSeqコンピュータプログラムを用いることによる推定タンパク質の分析は、シグナル配列の存在を示す(下線)。cDNAの微小不均一性(micro heterogeneity)が認められ、約70%のcDNAがコドン49にグルタミンのコドンを含み、そして30%が有しなかった(以下の図5および6を参照のこと)。このアミノ酸には下線を付し、C57BL/6J ob/obマウス(1Jマウス)内で変異しているアルギニンのコドンにも同様に下線を付す。

【図1 B】図1(A~E)は、マウスOB cDNAについて誘導される核酸配列(配列番号1)および推定アミノ酸配列(配列番号2)を示す。39塩基対の5'リーダーの後方に予測167アミノ酸オープンリーディングフレームおよび約3.7kbの3'非翻訳配列が続く。(既に1994年11月30日出願の出願第08/347,563号および1995年5月10日出願の第08/438,431号において、さらなる58塩基の5'非コード配列が続いて決定され、クローニングアーチファクトとされた。このアーチファクトは、コード領域、図1に示されている39塩基の5'非コード領域、または遺伝子の3'非コード領域とは関係がない。)3'非翻訳配列の約2500塩基対のすべてを示す。観察およびSigSeqコンピュータプログラムを用いることによる推定タンパク質の分析は、シグナル配列の存在を示す(下線)。cDNAの微小不均一性(micro heterogeneity)が認められ、約70%のcDNAがコドン49にグルタミンのコドンを含み、そして30%が有しなかった(以下の図5および6を参照のこと)。このアミノ酸には下線を付し、C57BL/6J ob/obマウス(1Jマウス)内で変異しているアルギニンのコドンにも同様に下線を付す。

【図1 C】図1(A~E)は、マウスOB cDNAについて誘導される核酸配列(配列番号1)および推定アミノ酸配列(配列番号2)を示す。39塩基対の5'リーダーの後方に予測167アミノ酸オープンリーディングフレームおよび約3.7kbの3'非翻訳配列が続く。(既に1994年11月30日出願の出

願第08/347,563号および1995年5月10日出願の第08/438,431号において、さらなる58塩基の5'非コード配列が続いて決定され、クローニングアーチファクトとされた。このアーチファクトは、コード領域、図1に示されている39塩基の5'非コード領域、または遺伝子の3'非コード領域とは関係がない。)3'非翻訳配列の約2500塩基対のすべてを示す。観察およびSigSeqコンピュータプログラムを用いることによる推定タンパク質の分析は、シグナル配列の存在を示す(下線)。cDNAの微小不均一性(micro heterogeneity)が認められ、約70%のcDNAがコドン49にグルタミンのコドンを含み、そして30%が有しなかった(以下の図5および6を参照のこと)。このアミノ酸には下線を付し、C57BL/6J ob/obマウス(1Jマウス)内で変異しているアルギニンのコドンにも同様に下線を付す。

【図1 D】図1(A~E)は、マウスOB cDNAについて誘導される核酸配列(配列番号1)および推定アミノ酸配列(配列番号2)を示す。39塩基対の5'リーダーの後方に予測167アミノ酸オープンリーディングフレームおよび約3.7kbの3'非翻訳配列が続く。(既に1994年11月30日出願の出願第08/347,563号および1995年5月10日出願の第08/438,431号において、さらなる58塩基の5'非コード配列が続いて決定され、クローニングアーチファクトとされた。このアーチファクトは、コード領域、図1に示されている39塩基の5'非コード領域、または遺伝子の3'非コード領域とは関係がない。)3'非翻訳配列の約2500塩基対のすべてを示す。観察およびSigSeqコンピュータプログラムを用いることによる推定タンパク質の分析は、シグナル配列の存在を示す(下線)。cDNAの微小不均一性(micro heterogeneity)が認められ、約70%のcDNAがコドン49にグルタミンのコドンを含み、そして30%が有しなかった(以下の図5および6を参照のこと)。このアミノ酸には下線を付し、C57BL/6J ob/obマウス(1Jマウス)内で変異しているアルギニンのコドンにも同様に下線を付す。

【図1 E】図1(A~E)は、マウスOB cDNAについて誘導される核酸配列(配列番号1)および推定アミノ酸配列(配列番号2)を示す。39塩基対の5'リーダーの後方に予測167アミノ酸オープンリーディングフレームおよび約3.7kbの3'非翻訳配列が続く。(既に1994年11月30日出願の出願第08/347,563号および1995年5月10日出願の第08/438,431号において、さらなる58塩基の5'非コード配列が続いて決定され、クローニングアーチファクトとされた。このアーチファクトは、コード領域、図1に示されている39塩基の5'非コード領域、または遺伝子の3'非コード領域とは関係がない。)3'非翻訳配列の約2500塩基対の

すべてを示す。観察およびSigSeqコンピュータプログラムを用いることによる推定タンパク質の分析は、シグナル配列の存在を示す(下線)。cDNAの微小不均一性(micro heterogeneity)が認められ、約70%のcDNAがコドン49にグルタミンのコドン(1Jマウス)内に変異しているアルギニンのコドンにも同様に下線を付す。

【図2A】図2(AおよびB)は、ヒトOB cDNAについて誘導された核酸配列(配列番号3)を示す。ヌクレオチドには1~701の番号を付し、開始部位はヌクレオチド46で終

【図2B】図2(AおよびB)は、ヒトOB cDNAについて誘導された核酸配列(配列番号3)を示す。ヌクレオチドには1~701の番号を付し、開始部位はヌクレオチド46で終

【図3】図3は、図2AおよびBの核酸配列に対応するヒトOB遺伝子について誘導された全推定アミノ酸配列(配列番号4)を示す。アミノ酸には1~167の番号を付す。シグナル配列切断部位がアミノ酸21(Ala)の後に位置し、このため成熟タンパク質がアミノ酸22(Val)からアミノ酸167(Cys)に伸長している。

【図4】図4は、マウス(配列番号2)とヒト(配列番号4)との推定アミノ酸配列間の比較を示す。ヒトOB推定アミノ酸配列の配列は、マウスの配列に対して高度に相同性である。保存的变化を破線で、そして非保存的变化をアスタリスクで示す。可変のグルタミンのコドンには下線を付し、これはC57BL/6J ob/ob(1J)マウスのナンセンス変異の位置にも同様に下線を付す。全体的では、アミノ酸レベルで83%の同一性があるが、コドン22のバリ

【図5】図5は、図3に示されたマウスOB遺伝子について誘導される全長アミノ酸配列(配列番号5)であるが、グルタミン49を欠失する配列を示す。アミノ酸には1~166の番号を付す。シグナル配列切断部位がアミノ酸21(Ala)の後(つまりグルタミン酸49欠失の前方)に位置し、このため成熟タンパク質がアミノ酸22(Val)からアミノ酸166(Cys)に伸長している。

【図6】図6は、図4に示されたヒトOB遺伝子について誘導される全長推定アミノ酸配列(配列番号6)であるがグルタミン49を欠失する配列を示す。アミノ酸には1~166の番号を付す。シグナル配列切断部位がアミノ酸21(Ala)の後(つまりグルタミン酸49欠失の前方)に位置し、このため成熟タンパク質がアミノ酸22(Val)からアミノ酸166(Cys)に伸長している。

【図7】(A)マウス染色体におけるobの位置の物理地図ならびにYACおよびP1クローニング地図。「MおよびN」はM

動物に対応する。Met、Pax4、D6Rck39、D6Rck13、およびCpaは、DNAプローブに結合するobの領域内の位置を意味する。D6Rack13およびPax - 4を用いてYACを単離し、そしてベクトレット(vectorette)PCRおよび/またはプラスミドエンドレスキュー(plasmid end rescue)を用いて末端を回収し、そして順次新たなYACを単離するために使用した。(B)得られたYACコンティグ(contig)。このコンティグにおけるYACの1つ(Y902A0925)はキメラであった。組換え動物の遺伝子型を決定するために使用したプローブのそれぞれを括弧内に示す。(6)はYAC107に対応する;(5)はM16(+)(またはM16(pLUS))に対応する;(4)はadu(+)(またはM16(pLUS))に対応する;(3)はaad(pICL)に対応する;(2)は53(pICL)に対応する;そして(1)は53(+)(またはM16(pLUS))に対応する。(C)選択されたYAC末端プローブにより単離されるバクテリオファージP1のP1コンティグ。YAC YB6S2F12の遠位末端(末端(4))(あるいは、本明細書中においてadu(+))と呼ぶを用いて、単離されたP1クローンにおいてob遺伝子を単離した。

【図8】図8は、第4エキソンのトラッピング実験の192個の個々の単離物(PCRで増幅し、そして特徴付けした)のエチジウムブロミド染色の写真を示す。

【図9】図9は、obを有していると思われるPCR増幅クロンのエチジウムブロミド染色の写真である。アーチファクトを有さない7個のクロンのそれぞれをPCRを用いて再増幅し、そしてTBE中の1%アガロースゲル上で電気泳動し、そしてエチジウムブロミドで染色した。サイズマーカー(最も左側の番号を付していないレーン)は市販の「1kbラダー」である。レーン1 - 「HIV配列」を含有するクロン1D12。レーン2 - クローン1F1、ob領域外の新規のクロン。レーン3 - クローン1H3。レーン4 - クローン2B2(1F1と同一)。レーン5 - クローン2G7(obエキソンを含有)。レーン6 - クローン2G11(1F1と同一)。レーン7 - クローン2H1(挿入物を含有しない)。

【図10】図10は、OB遺伝子の一部をコードするエキソンを含む2G7クローン(配列番号7)の配列を示す。このエキソンの増幅に使用したプライマー配列を図の枠内に示す(配列番号8および9)。

【図11A】図11(A)2G7プライマーおよびアクチンプライマーを用いた同マウスの異なる組織由来のmRNAの逆転写PCR分析。第1鎖cDNA合成用プライマーとして、オリゴdTを用いて逆転写した100ngの全RNAを用い、RT - PCR反応を実施した。PCR増幅を、94°Cの熱変性1分間、55°Cのハイブリダイゼーション1分間、1サイクルあたり1秒間の自動延長を含む72°Cの伸長2分間で35サイクル実施した。RT - PCR産物を1×TBE緩衝液中で泳動した2%低融点アガロースゲル内で分離した。(B)プローブとしてPCR標識2G7を用いるマウスの異なる器官由来のmRNAのノーザンブロット。各組織由来の全RNAの10 μgを、ホルムアルデヒドを含むアガロースゲル上で電気泳動した。プロ

ープを65°CでRapid Hybe(Amersham)内でハイブリダイズした。暴露の1時間後にオートラジオグラフィシグナルが出現した;示す実験は、24時間暴露の結果である。

【図11B】図11(A)2G7プライマーおよびアクチンプライマーを用いた同マウスの異なる組織由来のmRNAの逆転写PCR分析。第1鎖cDNA合成用プライマーとして、オリゴdTを用いて逆転写した100ngの全RNAを用い、RT-PCR反応を実施した。PCR増幅を、94°Cの熱変性1分間、55°Cのハイブリダイゼーション1分間、1サイクルあたり1秒間の自動延長を含む72°Cの伸長2分間で35サイクル実施した。RT-PCR産物を1×TBE緩衝液中で泳動した2%低融点アガロースゲル内で分離した。(B)プローブとしてPCR標識2G7を用いるマウスの異なる器官由来のmRNAのノーザンブロット。各組織由来の全RNAの10μgを、ホルムアルデヒドを含むアガロースゲル上で電気泳動した。プローブを65°CでRapid Hybe(Amersham)内でハイブリダイズした。暴露の1時間後にオートラジオグラフィシグナルが出現した;示す実験は、24時間暴露の結果である。

【図12A】図12(A)記載される各マウス株由来の脂肪細胞(白色脂肪組織)RNA上でのRT-PCR反応からのエチジウムブロミド染色。各サンプルに対する全RNA(100ng)を、オリゴdTおよび逆転写酵素を用いて逆転写し、そして得られた一本鎖cDNAを2G7プライマー(下のバンド)またはアクチンプライマー(上のバンド)でPCR増幅した。2G7プライマーおよびアクチンプライマーの両方は、同一のPCR反応に含まれた。産物を1%アガロースTBEゲル上で泳動した。(B)(A)に対応するノーザン分析。示される各株由来の脂肪細胞(白色脂肪組織)RNAの10μgを泳動し、そして上の図11BのPCR標識2G7プローブで検出した。2G7 mRNAのレベルにおける約20倍の増加がC57BL/6J ob/ob (1J)株由来の白色脂肪において、痩身型同腹子に比較して明白であった。RT-PCRおよびノーザン実験の両方において、SM/Ckc-+^{Dac}ob^{2J}/ob^{2J}(2J)マウス由来の2G7 RNAの検出し得るシグナルは、2週間の暴露後でも存在しなかった。24時間のオートラジオグラフィ暴露が示される。同じフィルターをアクチンプローブに対してハイブリダイズした(パネル下部)。

【図12B】図12(A)記載される各マウス株由来の脂肪細胞(白色脂肪組織)RNA上でのRT-PCR反応からのエチジウムブロミド染色。各サンプルに対する全RNA(100ng)を、オリゴdTおよび逆転写酵素を用いて逆転写し、そして得られた一本鎖cDNAを2G7プライマー(下のバンド)またはアクチンプライマー(上のバンド)でPCR増幅した。2G7プライマーおよびアクチンプライマーの両方は、同一のPCR反応に含まれた。産物を1%アガロースTBEゲル上で泳動した。(B)(A)に対応するノーザン分析。示される各株由来の脂肪細胞(白色脂肪組織)RNAの10μgを泳動し、そして上の図11BのPCR標識2G7プローブで検出した。2G7 mRNAのレベルにおける約20倍の増加がC57BL/6J ob/ob (1J)株由来の白色脂肪において、痩身型同腹子に比較し

て明白であった。RT-PCRおよびノーザン実験の両方において、SM/Ckc-+^{Dac}ob^{2J}/ob^{2J}(2J)マウス由来の2G7 RNAの検出し得るシグナルは、2週間の暴露後でも存在しなかった。24時間のオートラジオグラフィ暴露が示される。同じフィルターをアクチンプローブに対してハイブリダイズした(パネル下部)。

【図13】図13は、さらなる2J動物およびコントロール動物のノーザンブロット分析であり、ここで2J動物由来のob mRNAがないことを確認している。ノーザン分析は、図11および12の通りに実施した。この場合、コントロールRNAはap2(脂肪特異的転写物)であった。ap2のバンドの密度の変化に有意性は認められない。

【図14】図14は、変異株のcDNAにおける未成熟な終始コドン(ナンセンス変異)の導入を引き起こす点突然変異の領域において、C57BL/6J(正常)マウスとC57BL/6J ob/ob(1J)マウスのDNA配列を比較している。ob/obマウスは、105位のアルギニン残基を変化させるC→T変異を有する。この塩基の変化は、自動DNAシーケンサーからの出力として示される。5'および3'非翻訳領域由来のプライマーを用いて両株(+/+およびob/ob)由来の白色脂肪のRNAを用いるRT-PCRを実施した。PCR反応産物をゲル精製し、そしてコード配列の両鎖に沿ったプライマーを用いて直接手動で、およびApplied Biosystems, Inc. 373 A自動シーケンサーを用いて配列を決定した。

【図15A】図15(A)記載される各マウス株由来のゲノムDNAのサザンブロット。約5μgのDNA(肝臓、腎臓、または脾臓から調製されるゲノムDNAに由来する)を示された制限酵素で制限消化した。DNAを、次に1%アガロースTBEゲル内で電気泳動し、そしてPCR標識2G7プローブで検出した。BglIIIによる制限消化は、SM/Ckc-+^{Dac}ob^{2J}/ob^{2J}(2J) DNAにおいて約9kB(最大のBglIIIフラグメント)のサイズの増大があることを示した。RFLPは、他のいずれの制限酵素でも検出されなかった。ゲノムDNAの予備制限マッピングは、多型のBglIII部位が転写開始部位の約7kB上流にあることを示した。試験を行った他のいずれの酵素でもmRNA開始部位を越えるものはない。(B) SM/Ckc-+^{Dac}ob^{2J}/ob^{2J}株におけるBglIII多型の分離。(A)に示されたBglIII多型を評価することによって、類似遺伝子型のSM/Ckc-+^{Dac}ob^{2J}/ob^{2J}(2J)コロニーの同世代由来の6匹の肥満型の子孫および5匹の痩身型の子孫の遺伝子型を決定した。表現型上で肥満型の動物のすべてが、多型BglIIIフラグメントの大きい方の対立遺伝子に対してホモ接合型であった。「コントロール」レーンのDNAを、SM/Ckc-+^{Dac}ob^{2J}/ob^{2J}コロニーとは別に飼育した血縁の無いSM/Ckc-+^{Dac}+/+マウスから調製した。

【図15B】図15(A)記載される各マウス株由来のゲノムDNAのサザンブロット。約5μgのDNA(肝臓、腎臓、または脾臓から調製されるゲノムDNAに由来する)を示された制限酵素で制限消化した。DNAを、次に1%アガロースTBEゲル内で電気泳動し、そしてPCR標識2G7プローブで検

出した。BglIIIによる制限消化は、SM/Ckc-+^{Dac}ob^{2J}/ob^{2J}(2J) DNAにおいて約9kB(最大)のBglIIIフラグメントのサイズの増大があることを示した。RFLPは、他のいずれの制限酵素でも検出されなかった。ゲノムDNAの予備制限マッピングは、多型のBglIII部位が転写開始部位の約7kB上流にあることを示した。試験を行った他のいずれの酵素でもmRNA開始部位を越えるものはない。(B) SM/Ckc-+^{Dac}ob^{2J}/ob^{2J}株におけるBglIII多型の分離。(A)に示されたBglIII多型を評価することによって、類似遺伝子型のSM/Ckc-+^{Dac}ob^{2J}/ob^{2J}(2J)コロニーの同世代由来の6匹の肥満型の子孫および5匹の痩身型の子孫の遺伝子型を決定した。表現型上で肥満型の動物のすべてが、多型BglIIIフラグメントの大きい方の対立遺伝子に対してホモ接合型であった。「コントロール」レーンのDNAを、SM/Ckc-+^{Dac}ob^{2J}/ob^{2J}コロニーとは別に飼育した血縁の無いSM/Ckc-+^{Dac}+/+マウスから調製した。

【図16】図16は、記載される種由来のEcoRI消化ゲノムDNAのサザンブロットであり、プローブとしてOB cDNAを用いている(即ち動物ブロット)。中程度にストレンジなハイブリダイゼーション後でも、すべての脊椎動物サンプルにおいてハイブリダイゼーションシグナルが検出された。本実験のネコDNAは僅かに分解していた。制限されたDNAを1%アガロースTBEゲル上で泳動し、そしてプローブ分析用にimobilon膜に移した。65°Cでフィルターをハイブリダイズし、そして2×SSC/0.2%SDSで65°Cで2回、20分間洗浄し、そしてKodak(Rochester, N. Y.) X-OMATフィルムを用いて3日間暴露した。

【図17】図17は、ベクターpET-15b(Novagen)の発現クローニング領域(配列番号11および12)を示す。

【図18A】図18は、His-tagに対する組換え成熟マウスob融合体(A)、およびHis-tagに対する組換え成熟ヒトOB融合体(B)に関するHis-結合樹脂(Ni)カラムからの溶出物の分析を示す。細菌をベクターpETM9およびpETH14でそれぞれトランスフォームした。至適条件での1mM IPTGによる誘導において、トランスフォームされた細菌は、まず封入体(inclusion body)中に、100-300 μg/mlのOB融合タンパク質を生産し得た。インクルージョンボディを6Mグアニジン-HClまたは尿素で可溶化し、そして融合タンパク質(溶解物上清に存在する)を尿素を含む10mlの1×結合緩衝液中のHis-結合樹脂(Ni)カラムに添加した。カラムを、5mlアリコートの20 μM、60 μM、および300 μMイミダゾールで段階的に溶出し、最後にストリップ(strip)緩衝液で溶出した。そのアリコートを、15%アクリルアミドゲル上でOBポリペプチド融合体の存在について分析した。各レーンは、100 μlの細菌抽出物の同等物を含む。

【図18B】図18は、His-tagに対する組換え成熟マウスob融合体(A)、およびHis-tagに対する組換え成熟ヒトOB融合体(B)に関するHis-結合樹脂(Ni)カラムからの溶出物の分析を示す。細菌をベクターpETM9およびpETH1

4でそれぞれトランスフォームした。至適条件での1mM IPTGによる誘導において、トランスフォームされた細菌は、まず封入体(inclusion body)中に、100-300 μg/mlのOB融合タンパク質を生産し得た。インクルージョンボディを6Mグアニジン-HClまたは尿素で可溶化し、そして融合タンパク質(溶解物上清に存在する)を尿素を含む10mlの1×結合緩衝液中のHis-結合樹脂(Ni)カラムに添加した。カラムを、5mlアリコートの20 μM、60 μM、および300 μMイミダゾールで段階的に溶出し、最後にストリップ(strip)緩衝液で溶出した。そのアリコートを、15%アクリルアミドゲル上でOBポリペプチド融合体の存在について分析した。各レーンは、100 μlの細菌抽出物の同等物を含む。

【図19A】図19(A)OB RNAのインビトロ翻訳。ヒトOB cDNAをpGEMベクターにサブクローニングした。プラスミドを線状化し、そしてSp6ポリメラーゼを用いて+鎖RNAを合成した。インビトロで合成されたRNAを、イヌ臍ミクロソーム膜の存在または非存在下で翻訳した。インビトロ翻訳後に、約18kDの一次翻訳産物が認められた。ミクロソーム膜を反応物に添加すると、一次翻訳産物より約2kD小さい第2の翻訳産物が出現した。コードされたシグナル配列を欠くインターロイキン-1α RNAの翻訳産物のサイズは、ミクロソーム膜の添加によっては変化しなかった。これらのデータは、機能的シグナル配列の存在を示す。(B)プロテアーゼKの存在または非存在下でのインビトロ翻訳。プロテアーゼ処理により、18kD一次翻訳産物の完全な蛋白質分解を得たが、16kDのプロセスを受けた形態は影響を受けなかった。0.1%TRITON-X100によるミクロソームの透過化は、プロセスを受けた形態をプロテアーゼ感受性にした。これらの結果は、この産物がミクロソームの内腔へ翻訳していたことを示す。

【図19B】図19(A)OB RNAのインビトロ翻訳。ヒトOB cDNAをpGEMベクターにサブクローニングした。プラスミドを線状化し、そしてSp6ポリメラーゼを用いて+鎖RNAを合成した。インビトロで合成されたRNAを、イヌ臍ミクロソーム膜の存在または非存在下で翻訳した。インビトロ翻訳後に、約18kDの一次翻訳産物が認められた。ミクロソーム膜を反応物に添加すると、一次翻訳産物より約2kD小さい第2の翻訳産物が出現した。コードされたシグナル配列を欠くインターロイキン-1α RNAの翻訳産物のサイズは、ミクロソーム膜の添加によっては変化しなかった。これらのデータは、機能的シグナル配列の存在を示す。(B)プロテアーゼKの存在または非存在下でのインビトロ翻訳。プロテアーゼ処理により、18kD一次翻訳産物の完全な蛋白質分解を得たが、16kDのプロセスを受けた形態は影響を受けなかった。0.1%TRITON-X100によるミクロソームの透過化は、プロセスを受けた形態をプロテアーゼ感受性にした。これらの結果は、この産物がミクロソームの内腔へ翻訳していたことを示す。

【図20A】図20(A~E)ヒトOB遺伝子の配列(配列番号2

2および24)。(F)マウスOB遺伝子の概略図。(G)ヒトOB遺伝子の概略図。(F)および(G)両者においては、開始コドンおよび終始コドンに下線を付す。ヒト遺伝子における、マウスの第1イントロンに相同的な第1イントロンの証拠は認められないが、その存在は否定できない。

【図20B】図20(A~E)ヒトOB遺伝子の配列(配列番号22および24)。(F)マウスOB遺伝子の概略図。(G)ヒトOB遺伝子の概略図。(F)および(G)両者においては、開始コドンおよび終始コドンに下線を付す。ヒト遺伝子における、マウスの第1イントロンに相同的な第1イントロンの証拠は認められないが、その存在は否定できない。

【図20C】図20(A~E)ヒトOB遺伝子の配列(配列番号22および24)。(F)マウスOB遺伝子の概略図。(G)ヒトOB遺伝子の概略図。(F)および(G)両者においては、開始コドンおよび終始コドンに下線を付す。ヒト遺伝子における、マウスの第1イントロンに相同的な第1イントロンの証拠は認められないが、その存在は否定できない。

【図20D】図20(A~E)ヒトOB遺伝子の配列(配列番号22および24)。(F)マウスOB遺伝子の概略図。(G)ヒトOB遺伝子の概略図。(F)および(G)両者においては、開始コドンおよび終始コドンに下線を付す。ヒト遺伝子における、マウスの第1イントロンに相同的な第1イントロンの証拠は認められないが、その存在は否定できない。

【図20E】図20(A~E)ヒトOB遺伝子の配列(配列番号22および24)。(F)マウスOB遺伝子の概略図。(G)ヒトOB遺伝子の概略図。(F)および(G)両者においては、開始コドンおよび終始コドンに下線を付す。ヒト遺伝子における、マウスの第1イントロンに相同的な第1イントロンの証拠は認められないが、その存在は否定できない。

【図20F】図20(A~E)ヒトOB遺伝子の配列(配列番号22および24)。(F)マウスOB遺伝子の概略図。(G)ヒトOB遺伝子の概略図。(F)および(G)両者においては、開始コドンおよび終始コドンに下線を付す。ヒト遺伝子における、マウスの第1イントロンに相同的な第1イントロンの証拠は認められないが、その存在は否定できない。

【図20G】図20(A~E)ヒトOB遺伝子の配列(配列番号22および24)。(F)マウスOB遺伝子の概略図。(G)ヒトOB遺伝子の概略図。(F)および(G)両者においては、開始コドンおよび終始コドンに下線を付す。ヒト遺伝子における、マウスの第1イントロンに相同的な第1イントロンの証拠は認められないが、その存在は否定できない。

【図21A】図21は、Pichia酵母におけるOBの組換え発現を達成するために用いたクローニングストラテジーの一つの概略図を示す。(A)α-接合因子シグナル配列を有するOBの発現ベクター。(B)組換え融合タンパク質構造の概略図で、XhoI部位、ならびに推定KEX-2およびSTE-13切断部位を示したアミノ酸配列(配列番号26)、およびKEX-2切断後に存在するN末端余剰アミノ酸(配列番号27)を含む。(C)成熟OBを生産するための別のストラテジーは、成熟obポリペプチド配列のすぐ上流のXhoI切断部

位およびKEX-2切断部位に対応するアミノ酸配列(配列番号28)を有する構築物を調製する工程を包含する。

【図21B】図21は、Pichia酵母におけるOBの組換え発現を達成するために用いたクローニングストラテジーの一つの概略図を示す。(A)α-接合因子シグナル配列を有するOBの発現ベクター。(B)組換え融合タンパク質構造の概略図で、XhoI部位、ならびに推定KEX-2およびSTE-13切断部位を示したアミノ酸配列(配列番号26)、およびKEX-2切断後に存在するN末端余剰アミノ酸(配列番号27)を含む。(C)成熟OBを生産するための別のストラテジーは、成熟obポリペプチド配列のすぐ上流のXhoI切断部位およびKEX-2切断部位に対応するアミノ酸配列(配列番号28)を有する構築物を調製する工程を包含する。

【図21C】図21は、Pichia酵母におけるOBの組換え発現を達成するために用いたクローニングストラテジーの一つの概略図を示す。(A)α-接合因子シグナル配列を有するOBの発現ベクター。(B)組換え融合タンパク質構造の概略図で、XhoI部位、ならびに推定KEX-2およびSTE-13切断部位を示したアミノ酸配列(配列番号26)、およびKEX-2切断後に存在するN末端余剰アミノ酸(配列番号27)を含む。(C)成熟OBを生産するための別のストラテジーは、成熟obポリペプチド配列のすぐ上流のXhoI切断部位およびKEX-2切断部位に対応するアミノ酸配列(配列番号28)を有する構築物を調製する工程を包含する。

【図22A】図22 Pichiaにおける別の発現ストラテジー。(A)α-接合因子シグナル配列制御下で、pET発現系から採用されたHis-tagを含有するOB融合体の発現ベクター(配列番号33)。(B)His-tagを含有する組換えOB融合タンパク質構造の概略図で、α-接合因子シグナル配列、推定KEX-2およびSTE-13切断部位、His-tag、およびトロンピン切断部位を含み、3つの余剰N末端アミノ酸残基を伴うOBを産出する。

【図22B】図22 Pichiaにおける別の発現ストラテジー。(A)α-接合因子シグナル配列制御下で、pET発現系から採用されたHis-tagを含有するOB融合体の発現ベクター(配列番号33)。(B)His-tagを含有する組換えOB融合タンパク質構造の概略図で、α-接合因子シグナル配列、推定KEX-2およびSTE-13切断部位、His-tag、およびトロンピン切断部位を含み、3つの余剰N末端アミノ酸残基を伴うOBを産出する。

【図23A】図23(A)トランスフォームされたpichia酵母におけるマウスOB(両微小不均一性形態、即ち、Gln49を含有する形態および含有しない形態)の発現のPAGE分析。約16kDの予想バンドが、トランスフォームされた酵母培養液において認められる(2番目および3番目のレーン)が、トランスフォームされていない酵母の培養液では認められない(1番目のレーン)。(B)カルボキシメチルセルロース(弱い陽イオン交換体)上の部分精製組換えOBポリペプチドのPAGE分析。約16kDのバンドは、カラムから250mM NaClで溶出された画分3および4においてよく認

められる。レーン1 - -添加されたサンプル;レーン2 -
- 素通り;レーン3~5 - - 250mM NaClによる溶出画
分。

【図23B】図23(A)トランスフォームされたpichia酵
母におけるマウスOB(両微小不均一性形態、即ち、Gln49
を含有する形態および含有しない形態)の発現のPAGE分
析。約16kDの予想バンドが、トランスフォームされた酵
母培養液において認められる(2番目および3番目のレー
ン)が、トランスフォームされていない酵母の培養液で
は認められない(1番目のレーン)。(B)カルボキシメチル
セルロース(弱い陽イオン交換体)上の部分精製組換えOB
ポリペプチドのPAGE分析。約16kDのバンドは、カラムか
ら250mM NaClで溶出された画分3および4においてよく認
められる。レーン1 - -添加されたサンプル;レーン2 -
- 素通り;レーン3~5 - - 250mM NaClによる溶出画
分。

【図24A】図24は、OBタンパク質がマウス血漿中を循
環することを示す。(A)マウス血液からの免疫沈降。0.5
mlのマウス血漿を非結合型セファロースで予め澄明に
し、そしてセファロース4Bビーズに結合した免疫精製抗
OB抗体と一晚インキュベートした。免疫沈降物を15%SDS
- PAGEゲル上で分離し、トランスファーし、そして抗OB
抗体でウェスタンブロットを行った。タンパク質は約16
kDの分子量で、酵母で発現された成熟マウスobタンパク
質と同じ位置まで泳動した。C57BL/6L ob/obマウス由来
の血漿にはこのタンパク質は認められず、そしてC57BLB
/Ks db/dbマウス由来の血漿では、野生型マウスに比較
して10倍増加した。dbマウスは、OBタンパク質を過剰生
産することが示唆されており、またそれに伴いその効果
に対する耐性も示唆されている。(B)脂肪過多ラットに
おけるOBレベルの増加。脂肪過多ラットは、ラット第5
染色体の劣性変異の結果、肥満型である。遺伝子データ
は、dbマウスにおいて変異した同遺伝子の欠損を示唆し
ている。脂肪過多ラットおよび痩身型の同腹子由来の血
漿を免疫沈降し、そしてウェスタンブロット上で泳動し
た。OBの循環レベルの20倍の増加が変異動物内に認めら
れた。(C)。マウス血漿におけるOBタンパク質の定量。
組換えマウスタンパク質の増加量をobマウス由来の100
λの血漿に添加し、免疫沈降を行った。ウェスタンブロ
ットのシグナルの強度を野生型マウス由来の100λの血
漿からのシグナル強度と比較した。組み換えタンパク質
量の増加に伴い、シグナル強度の直線的増加が認めら
れ、本免疫沈降が抗体過剰の条件下で実施されたことが
示された。同様のシグナルが野生型血漿サンプルおよび
2ngの組換えタンパク質を有するサンプルに認められ、
マウス血漿における循環レベルが約20ng/mlであること
が示された。(D)肥満組織抽出物におけるOBタンパク
質。マウス肥満組織の細胞質抽出物をdbおよび野生型マ
ウスから調製した。ウェスタンブロットは、dbマウスか
ら調製した抽出物において16kDのタンパク質のレベルの

増加を示した。

【図24B】図24は、OBタンパク質がマウス血漿中を循
環することを示す。(A)マウス血液からの免疫沈降。0.5
mlのマウス血漿を非結合型セファロースで予め澄明に
し、そしてセファロース4Bビーズに結合した免疫精製抗
OB抗体と一晚インキュベートした。免疫沈降物を15%SDS
- PAGEゲル上で分離し、トランスファーし、そして抗OB
抗体でウェスタンブロットを行った。タンパク質は約16
kDの分子量で、酵母で発現された成熟マウスobタンパク
質と同じ位置まで泳動した。C57BL/6L ob/obマウス由来
の血漿にはこのタンパク質は認められず、そしてC57BLB
/Ks db/dbマウス由来の血漿では、野生型マウスに比較
して10倍増加した。dbマウスは、OBタンパク質を過剰生
産することが示唆されており、またそれに伴いその効果
に対する耐性も示唆されている。(B)脂肪過多ラットに
おけるOBレベルの増加。脂肪過多ラットは、ラット第5
染色体の劣性変異の結果、肥満型である。遺伝子データ
は、dbマウスにおいて変異した同遺伝子の欠損を示唆し
ている。脂肪過多ラットおよび痩身型の同腹子由来の血
漿を免疫沈降し、そしてウェスタンブロット上で泳動し
た。OBの循環レベルの20倍の増加が変異動物内に認めら
れた。(C)。マウス血漿におけるOBタンパク質の定量。
組換えマウスタンパク質の増加量をobマウス由来の100
λの血漿に添加し、免疫沈降を行った。ウェスタンブロ
ットのシグナルの強度を野生型マウス由来の100λの血
漿からのシグナル強度と比較した。組み換えタンパク質
量の増加に伴い、シグナル強度の直線的増加が認めら
れ、本免疫沈降が抗体過剰の条件下で実施されたことが
示された。同様のシグナルが野生型血漿サンプルおよび
2ngの組換えタンパク質を有するサンプルに認められ、
マウス血漿における循環レベルが約20ng/mlであること
が示された。(D)肥満組織抽出物におけるOBタンパク
質。マウス肥満組織の細胞質抽出物をdbおよび野生型マ
ウスから調製した。ウェスタンブロットは、dbマウスか
ら調製した抽出物において16kDのタンパク質のレベルの

【図24C】図24は、OBタンパク質がマウス血漿中を循
環することを示す。(A)マウス血液からの免疫沈降。0.5
mlのマウス血漿を非結合型セファロースで予め澄明に
し、そしてセファロース4Bビーズに結合した免疫精製抗
OB抗体と一晚インキュベートした。免疫沈降物を15%SDS
- PAGEゲル上で分離し、トランスファーし、そして抗OB
抗体でウェスタンブロットを行った。タンパク質は約16
kDの分子量で、酵母で発現された成熟マウスobタンパク
質と同じ位置まで泳動した。C57BL/6L ob/obマウス由来
の血漿にはこのタンパク質は認められず、そしてC57BLB
/Ks db/dbマウス由来の血漿では、野生型マウスに比較
して10倍増加した。dbマウスは、OBタンパク質を過剰生
産することが示唆されており、またそれに伴いその効果
に対する耐性も示唆されている。(B)脂肪過多ラットに

におけるOBレベルの増加。脂肪過多ラットは、ラット第5染色体の劣性変異の結果、肥満型である。遺伝子データは、dbマウスにおいて変異した同遺伝子の欠損を示唆している。脂肪過多ラットおよび痩身型の同腹子由来の血漿を免疫沈降し、そしてウエスタンブロット上で泳動した。OBの循環レベルの20倍の増加が変異動物内に認められた。(C)。マウス血漿におけるOBタンパク質の定量。組換えマウスタンパク質の増加量をobマウス由来の100入の血漿に添加し、免疫沈降を行った。ウエスタンブロットのシグナルの強度を野生型マウス由来の100入の血漿からのシグナル強度と比較した。組み換えタンパク質量の増加に伴い、シグナル強度の直線的増加が認められ、本免疫沈降が抗体過剰の条件下で実施されたことが示された。同様のシグナルが野生型血漿サンプルおよび2ngの組換えタンパク質を有するサンプルに認められ、マウス血漿における循環レベルが約20ng/mlであることが示された。(D)肥満組織抽出物におけるOBタンパク質。マウス肥満組織の細胞質抽出物をdbおよび野生型マウスから調製した。ウエスタンブロットは、dbマウスから調製した抽出物において16kDのタンパク質のレベルの増加を示した。

【図24D】図24は、OBタンパク質がマウス血漿中を循環することを示す。(A)マウス血液からの免疫沈降。0.5 mlのマウス血漿を非結合型セファロースで予め澄明にし、そしてセファロース4Bビーズに結合した免疫精製抗OB抗体と一晩インキュベートした。免疫沈降物を15%SDS-PAGEゲル上で分離し、トランスファーし、そして抗OB抗体でウエスタンブロットを行った。タンパク質は約16 kDの分子量で、酵母で発現された成熟マウスobタンパク質と同じ位置まで泳動した。C57BL/6L ob/obマウス由来の血漿にはこのタンパク質は認められず、そしてC57BLB/Ks db/dbマウス由来の血漿では、野生型マウスに比較して10倍増加した。dbマウスは、OBタンパク質を過剰生産することが示唆されており、またそれに伴いその効果に対する耐性も示唆されている。(B)脂肪過多ラットにおけるOBレベルの増加。脂肪過多ラットは、ラット第5染色体の劣性変異の結果、肥満型である。遺伝子データは、dbマウスにおいて変異した同遺伝子の欠損を示唆している。脂肪過多ラットおよび痩身型の同腹子由来の血漿を免疫沈降し、そしてウエスタンブロット上で泳動した。OBの循環レベルの20倍の増加が変異動物内に認められた。(C)。マウス血漿におけるOBタンパク質の定量。組換えマウスタンパク質の増加量をobマウス由来の100入の血漿に添加し、免疫沈降を行った。ウエスタンブロットのシグナルの強度を野生型マウス由来の100入の血漿からのシグナル強度と比較した。組み換えタンパク質量の増加に伴い、シグナル強度の直線的増加が認められ、本免疫沈降が抗体過剰の条件下で実施されたことが示された。同様のシグナルが野生型血漿サンプルおよび2ngの組換えタンパク質を有するサンプルに認められ、

マウス血漿における循環レベルが約20ng/mlであることが示された。(D)肥満組織抽出物におけるOBタンパク質。マウス肥満組織の細胞質抽出物をdbおよび野生型マウスから調製した。ウエスタンブロットは、dbマウスから調製した抽出物において16kDのタンパク質のレベルの増加を示した。

【図25A】図25は、OBタンパク質が種々のレベルでヒト血漿中を循環することを示す。(A)ヒト血漿のウエスタンブロット。6名の痩身体型の志願者から血漿サンプルを得た。免疫沈降およびウエスタンブロッティングは、免疫反応性の16kDのタンパク質の存在を示し、このタンパク質は酵母で発現された組換え型の146アミノ酸ヒトタンパク質とサイズが同一であった。6つのサンプルのそれぞれにおいて、一定しないレベルのタンパク質が認められた。(B)ヒトobに対するELISA(酵素結合免疫アッセイ)。マイクロタイタープレートに免疫精製抗ヒトOB抗体でコートした。既知量の組換えタンパク質をプレートに添加し、そして免疫精製ビオチン化抗ob抗体を用いて検出した。414nmでの吸光度を既知濃度のOBに対してプロットし、標準曲線を作成した。得られた標準曲線は、このアッセイが1ng/mlまたはそれ以上のヒトOBタンパク質を検出可能であることを示した。(C)ヒト血漿におけるOBタンパク質の定量。ELISA免疫アッセイを、6名の痩身体型志願者由来の100入の血漿およびパネルBで使用した標準物を用いて実施した。HPLの2 ng/ml~HP6の15ng/mlの範囲のOBタンパク質のレベルが認められた。これらのデータは、パネルAのウエスタンブロットのデータと相関した。

【図25B】図25は、OBタンパク質が種々のレベルでヒト血漿中を循環することを示す。(A)ヒト血漿のウエスタンブロット。6名の痩身体型の志願者から血漿サンプルを得た。免疫沈降およびウエスタンブロッティングは、免疫反応性の16kDのタンパク質の存在を示し、このタンパク質は酵母で発現された組換え型の146アミノ酸ヒトタンパク質とサイズが同一であった。6つのサンプルのそれぞれにおいて、一定しないレベルのタンパク質が認められた。(B)ヒトobに対するELISA(酵素結合免疫アッセイ)。マイクロタイタープレートに免疫精製抗ヒトOB抗体でコートした。既知量の組換えタンパク質をプレートに添加し、そして免疫精製ビオチン化抗ob抗体を用いて検出した。414nmでの吸光度を既知濃度のOBに対してプロットし、標準曲線を作成した。得られた標準曲線は、このアッセイが1ng/mlまたはそれ以上のヒトOBタンパク質を検出可能であることを示した。(C)ヒト血漿におけるOBタンパク質の定量。ELISA免疫アッセイを、6名の痩身体型志願者由来の100入の血漿およびパネルBで使用した標準物を用いて実施した。HPLの2 ng/ml~HP6の15ng/mlの範囲のOBタンパク質のレベルが認められた。これらのデータは、パネルAのウエスタンブロットのデータと相関した。

【図25C】図25は、OBタンパク質が種々のレベルでヒト血漿中を循環することを示す。(A)ヒト血漿のウエスタンブロット。6名の瘦身体型の志願者から血漿サンプルを得た。免疫沈降およびウエスタンブロッティングは、免疫反応性の16kDのタンパク質の存在を示し、このタンパク質は酵母で発現された組換え型の146アミノ酸ヒトタンパク質とサイズが同一であった。6つのサンプルのそれぞれにおいて、一定しないレベルのタンパク質が認められた。(B)ヒトobに対するELISA(酵素結合免疫アッセイ)。マイクロタイタープレートに免疫精製抗ヒトOB抗体でコートした。既知量の組換えタンパク質をプレートに添加し、そして免疫精製ビオチン化抗ob抗体を用いて検出した。414nmでの吸光度を既知濃度のOBに対してプロットし、標準曲線を作成した。得られた標準曲線は、このアッセイが1ng/mlまたはそれ以上のヒトOBタンパク質を検出可能であることを示した。(C)ヒト血漿におけるOBタンパク質の定量。ELISA免疫アッセイを、6名の痩身型志願者由来の100スルの血漿およびパネルBで使用した標準物を用いて実施した。HPLの2ng/ml〜HP6の15ng/mlの範囲のOBタンパク質のレベルが認められた。これらのデータは、パネルAのウエスタンブロットのデータと相関した。

【図26A】図26は、OBタンパク質が分子間または分子内のジスルフィド結合を形成することを示す。(A)還元および非還元条件下でのウエスタンブロット。マウスおよびヒト血漿のウエスタンブロットを、還元剤をサンプル緩衝液に添加するかまたはせずに繰り返した。 β -メルカプトエタノールをサンプル緩衝液から除いた場合は、db血漿由来の免疫沈降物が見かけの分子量16kDおよび32kDで泳動する。緩衝液に β -メルカプトエタノールを添加すると、32kDの部分が消失する(図24を参照のこと)。この結果は酵母(*Pichia pastoris*)でマウスタンパク質を発現する場合にも再現される。この場合、マウスOBタンパク質はダイマーの位置まで泳動する。還元状態では、精製された組換えマウスタンパク質は、見かけの分子量16kDで泳動することから、32kDの分子形態は1つまたは2つの分子間ジスルフィド結合の結果であることが示される。インビボおよび*Pichia pastoris*で発現されたヒトタンパク質は、還元および非還元状態で、分子量16kDで泳動する(データ示さず)。(B)酵母内で発現されたヒトタンパク質は、分子内ジスルフィド結合を有する。分泌されたタンパク質は、一般に*Pichia pastoris*発現系で発現された場合でも正確なコンフォメーションをとる。146アミノ酸成熟ヒトタンパク質を*Pichia pastoris*で発現させ、そしてIMACおよびゲル濾過を含む2工程の精製プロトコールによって酵母培地から精製した。臭化シアン分解の前後に、精製組換えタンパク質を質量分析に供した。臭化シアンはメチオニン残基のカルボキシ端で切断する。組換え酵母タンパク質の分子質量は、 $16,024 \pm 3\text{Da}$ (算出された分子質量=16,024Da)であ

った。臭化シアンは、タンパク質配列中のアミノ酸75、89、および157の3つのメチオニンの後ろを切断する。測定された質量8435.6Daを有する臭化シアンフラグメントは、cys-117とcys-167との間のジスルフィド結合で結合したアミノ酸90〜157およびアミノ酸158〜167に対応する(算出された分子質量=8434.5Da)。N.D.=検出されず。

【図26B】図26は、OBタンパク質が分子間または分子内のジスルフィド結合を形成することを示す。(A)還元および非還元条件下でのウエスタンブロット。マウスおよびヒト血漿のウエスタンブロットを、還元剤をサンプル緩衝液に添加するかまたはせずに繰り返した。 β -メルカプトエタノールをサンプル緩衝液から除いた場合は、db血漿由来の免疫沈降物が見かけの分子量16kDおよび32kDで泳動する。緩衝液に β -メルカプトエタノールを添加すると、32kDの部分が消失する(図24を参照のこと)。この結果は酵母(*Pichia pastoris*)でマウスタンパク質を発現する場合にも再現される。この場合、マウスOBタンパク質はダイマーの位置まで泳動する。還元状態では、精製された組換えマウスタンパク質は、見かけの分子量16kDで泳動することから、32kDの分子形態は1つまたは2つの分子間ジスルフィド結合の結果であることが示される。インビボおよび*Pichia pastoris*で発現されたヒトタンパク質は、還元および非還元状態で、分子量16kDで泳動する(データ示さず)。(B)酵母内で発現されたヒトタンパク質は、分子内ジスルフィド結合を有する。分泌されたタンパク質は、一般に*Pichia pastoris*発現系で発現された場合でも正確なコンフォメーションをとる。146アミノ酸成熟ヒトタンパク質を*Pichia pastoris*で発現させ、そしてIMACおよびゲル濾過を含む2工程の精製プロトコールによって酵母培地から精製した。臭化シアン分解の前後に、精製組換えタンパク質を質量分析に供した。臭化シアンはメチオニン残基のカルボキシ端で切断する。組換え酵母タンパク質の分子質量は、 $16,024 \pm 3\text{Da}$ (算出された分子質量=16,024Da)であった。臭化シアンは、タンパク質配列中のアミノ酸75、89、および157の3つのメチオニンの後ろを切断する。測定された質量8435.6Daを有する臭化シアンフラグメントは、cys-117とcys-167との間のジスルフィド結合で結合したアミノ酸90〜157およびアミノ酸158〜167に対応する(算出された分子質量=8434.5Da)。N.D.=検出されず。

【図27】図27は、生物活性な組換えタンパク質の調製を示す。145アミノ酸成熟マウスOBタンパク質に対応するヌクレオチド配列を、pET15b発現ベクターにクローン化した。このpETベクターは、固定化金属アフィニティークロマトグラフィー(IMAC)を用いた効率的な精製を可能にする、ポリヒスチジン領域(His-tag)をクローン化配列の上流に挿入している。細菌溶解後、この組換え細菌タンパク質は、はじめ不溶性の膜画分に分配された。

塩酸グアニジンを用いて膜画分を可溶化し、そしてIMACカラム上に添加した。示されたように、イミダゾールの濃度を上昇して段階的にタンパク質を溶出した。記載の通り、溶出したタンパク質を再フォールディング(refold)し、そしてトロンビンで処理してHis-tagを除去した。可溶性タンパク質の最終収量は、45ng/ml細菌培養物であった。

【図28A】図28は、OBタンパク質の生物学的効果を示す。食物摂取(パネルA〜C)および体重(パネルD〜F)の時間的経過。10匹の動物の群が、5mg/kg/日用量でのOBタンパク質の連日腹腔内注入(黒四角)、PBSの連日注入(黒丸)、または未処置(黒三角)のいずれかを受けた。処置グループは、C57Bl/6J ob/obマウス(パネルAおよびD)、C57Bl/Ks db/dbマウス(パネルBおよびE)、およびCBA/J+/+マウス(パネルCおよびF)を含んだ。示した通り、マウスの食物摂取を、連日測定し、そして3〜4日間の間隔で記録した。(グラム標示の体重のスケールは、野生型マウス対obおよびdbマウスで異なる。)タンパク質を受けたobマウスの食物摂取は、最初の注入後に減少し、そして4日目には、疑似(sham)注入したグループで認められたレベルの約40%のレベルで安定化した($p < .001$)。これらの動物の体重は平均1.3グラム/日減少し、そして3週間後、開始時の体重の約60%のレベルで安定化した($p < .0001$)。dbマウスでは、このタンパク質の効果は示されなかった。早期の2つの時点でCBA/Jマウスに、体重に対して少ないが有意な効果が観察された($p < .02$)。画測定値の標準誤差をバーで示し、そしてこの結果の統計的有意性を表1に示す。

【図28B】図28は、OBタンパク質の生物学的効果を示す。食物摂取(パネルA〜C)および体重(パネルD〜F)の時間的経過。10匹の動物の群が、5mg/kg/日用量でのOBタンパク質の連日腹腔内注入(黒四角)、PBSの連日注入(黒丸)、または未処置(黒三角)のいずれかを受けた。処置グループは、C57Bl/6J ob/obマウス(パネルAおよびD)、C57Bl/Ks db/dbマウス(パネルBおよびE)、およびCBA/J+/+マウス(パネルCおよびF)を含んだ。示した通り、マウスの食物摂取を、連日測定し、そして3〜4日間の間隔で記録した。(グラム標示の体重のスケールは、野生型マウス対obおよびdbマウスで異なる。)タンパク質を受けたobマウスの食物摂取は、最初の注入後に減少し、そして4日目には、疑似(sham)注入したグループで認められたレベルの約40%のレベルで安定化した($p < .001$)。これらの動物の体重は平均1.3グラム/日減少し、そして3週間後、開始時の体重の約60%のレベルで安定化した($p < .0001$)。dbマウスでは、このタンパク質の効果は示されなかった。早期の2つの時点でCBA/Jマウスに、体重に対して少ないが有意な効果が観察された($p < .02$)。画測定値の標準誤差をバーで示し、そしてこの結果の統計的有意性を表1に示す。

【図28C】図28は、OBタンパク質の生物学的効果を示

す。食物摂取(パネルA〜C)および体重(パネルD〜F)の時間的経過。10匹の動物の群が、5mg/kg/日用量でのOBタンパク質の連日腹腔内注入(黒四角)、PBSの連日注入(黒丸)、または未処置(黒三角)のいずれかを受けた。処置グループは、C57Bl/6J ob/obマウス(パネルAおよびD)、C57Bl/Ks db/dbマウス(パネルBおよびE)、およびCBA/J+/+マウス(パネルCおよびF)を含んだ。示した通り、マウスの食物摂取を、連日測定し、そして3〜4日間の間隔で記録した。(グラム標示の体重のスケールは、野生型マウス対obおよびdbマウスで異なる。)タンパク質を受けたobマウスの食物摂取は、最初の注入後に減少し、そして4日目には、疑似(sham)注入したグループで認められたレベルの約40%のレベルで安定化した($p < .001$)。これらの動物の体重は平均1.3グラム/日減少し、そして3週間後、開始時の体重の約60%のレベルで安定化した($p < .0001$)。dbマウスでは、このタンパク質の効果は示されなかった。早期の2つの時点でCBA/Jマウスに、体重に対して少ないが有意な効果が観察された($p < .02$)。画測定値の標準誤差をバーで示し、そしてこの結果の統計的有意性を表1に示す。

【図28D】図28は、OBタンパク質の生物学的効果を示す。食物摂取(パネルA〜C)および体重(パネルD〜F)の時間的経過。10匹の動物の群が、5mg/kg/日用量でのOBタンパク質の連日腹腔内注入(黒四角)、PBSの連日注入(黒丸)、または未処置(黒三角)のいずれかを受けた。処置グループは、C57Bl/6J ob/obマウス(パネルAおよびD)、C57Bl/Ks db/dbマウス(パネルBおよびE)、およびCBA/J+/+マウス(パネルCおよびF)を含んだ。示した通り、マウスの食物摂取を、連日測定し、そして3〜4日間の間隔で記録した。(グラム標示の体重のスケールは、野生型マウス対obおよびdbマウスで異なる。)タンパク質を受けたobマウスの食物摂取は、最初の注入後に減少し、そして4日目には、疑似(sham)注入したグループで認められたレベルの約40%のレベルで安定化した($p < .001$)。これらの動物の体重は平均1.3グラム/日減少し、そして3週間後、開始時の体重の約60%のレベルで安定化した($p < .0001$)。dbマウスでは、このタンパク質の効果は示されなかった。早期の2つの時点でCBA/Jマウスに、体重に対して少ないが有意な効果が観察された($p < .02$)。画測定値の標準誤差をバーで示し、そしてこの結果の統計的有意性を表1に示す。

【図28E】図28は、OBタンパク質の生物学的効果を示す。食物摂取(パネルA〜C)および体重(パネルD〜F)の時間的経過。10匹の動物の群が、5mg/kg/日用量でのOBタンパク質の連日腹腔内注入(黒四角)、PBSの連日注入(黒丸)、または未処置(黒三角)のいずれかを受けた。処置グループは、C57Bl/6J ob/obマウス(パネルAおよびD)、C57Bl/Ks db/dbマウス(パネルBおよびE)、およびCBA/J+/+マウス(パネルCおよびF)を含んだ。示した通り、マウスの食物摂取を、連日測定し、そして3〜4日間の間隔で

記録した。(グラム標示の体重のスケールは、野生型マウス対obおよびdbマウスで異なる。)タンパク質を受けたobマウスの食物摂取は、最初の注入後に減少し、そして4日目には、疑似(sham)注入したグループで認められたレベルの約40%のレベルで安定化した($p < .001$)。これらの動物の体重は平均1.3グラム/日減少し、そして3週間後、開始時の体重の約60%のレベルで安定化した($p < .0001$)。dbマウスでは、このタンパク質の効果は示されなかった。早期の2つの時点でCBA/Jマウスに、体重に対して少ないが有意な効果が観察された($p < .02$)。画測定値の標準誤差をバーで示し、そしてこの結果の統計的有意性を表1に示す。

【図28F】図28は、OBタンパク質の生物学的効果を示す。食物摂取(パネルA~C)および体重(パネルD~F)の時間的経過。10匹の動物の群が、5 mg/kg/日用量でのOBタンパク質の連日腹腔内注入(黒四角)、PBSの連日注入(黒丸)、または未処置(黒三角)のいずれかを受けた。処置グループは、C57Bl/6J ob/obマウス(パネルAおよびD)、C57Bl/Ks db/dbマウス(パネルBおよびE)、およびCBA/J+/+マウス(パネルCおよびF)を含んだ。示した通り、マウスの食物摂取を、連日測定し、そして3~4日間の間隔で記録した。(グラム標示の体重のスケールは、野生型マウス対obおよびdbマウスで異なる。)タンパク質を受けたobマウスの食物摂取は、最初の注入後に減少し、そして4日目には、疑似(sham)注入したグループで認められたレベルの約40%のレベルで安定化した($p < .001$)。これらの動物の体重は平均1.3グラム/日減少し、そして3週間後、開始時の体重の約60%のレベルで安定化した($p < .0001$)。dbマウスでは、このタンパク質の効果は示されなかった。早期の2つの時点でCBA/Jマウスに、体重に対して少ないが有意な効果が観察された($p < .02$)。画測定値の標準誤差をバーで示し、そしてこの結果の統計的有意性を表1に示す。

【図29A】図29は、obマウスのペアフィーディングの結果を示す。(A)4匹のC57Bl/6J ob/obマウスの群に、組換えタンパク質を受けたobマウスの群が消費した量に等しい量の食物を与えた。両グループに対する重量の消失を、5、8、および12日後に算出した。食物制限されたマウス(斜線バー)は、タンパク質を受けたobマウス(黒色バー)よりも少ない重量を消失した($p < .02$)。この結果は、OBタンパク質の体重減少効果が、食物摂取およびエネルギー消費両者に対する効果の結果であることを示す。(B)処置されたobマウスの写真。2匹のC57Bl/6J ob/obマウスを示す。左側のマウスはPBSを受け、体重65グラム(開始時の重量)であった。右側のマウスは、組換えOBタンパク質の連日注入を受けた。この動物の開始時の重量も65グラムで、そしてタンパク質処理の3週間後の重量は38グラムであった。(C)処理および未処理obマウス由来の肝臓。処理および未処理のC57Bl/6J ob/obマウス由来の肝臓を示す。PBSを受けたマウス由来の肝臓

は、脂肪過多肝臓の肉眼的な外観を有し、そして重量は5.04グラムであった。組換えobタンパク質を受けたマウスは、正常な外観を有し、そして重量は2.23グラムであった。

【図29B】図29は、obマウスのペアフィーディングの結果を示す。(A)4匹のC57Bl/6J ob/obマウスの群に、組換えタンパク質を受けたobマウスの群が消費した量に等しい量の食物を与えた。両グループに対する重量の消失を、5、8、および12日後に算出した。食物制限されたマウス(斜線バー)は、タンパク質を受けたobマウス(黒色バー)よりも少ない重量を消失した($p < .02$)。この結果は、OBタンパク質の体重減少効果が、食物摂取およびエネルギー消費両者に対する効果の結果であることを示す。(B)処置されたobマウスの写真。2匹のC57Bl/6J ob/obマウスを示す。左側のマウスはPBSを受け、体重65グラム(開始時の重量)であった。右側のマウスは、組換えOBタンパク質の連日注入を受けた。この動物の開始時の重量も65グラムで、そしてタンパク質処理の3週間後の重量は38グラムであった。(C)処理および未処理obマウス由来の肝臓。処理および未処理のC57Bl/6J ob/obマウス由来の肝臓を示す。PBSを受けたマウス由来の肝臓は、脂肪過多肝臓の肉眼的な外観を有し、そして重量は5.04グラムであった。組換えobタンパク質を受けたマウスは、正常な外観を有し、そして重量は2.23グラムであった。

【図29C】図29は、obマウスのペアフィーディングの結果を示す。(A)4匹のC57Bl/6J ob/obマウスの群に、組換えタンパク質を受けたobマウスの群が消費した量に等しい量の食物を与えた。両グループに対する重量の消失を、5、8、および12日後に算出した。食物制限されたマウス(斜線バー)は、タンパク質を受けたobマウス(黒色バー)よりも少ない重量を消失した($p < .02$)。この結果は、OBタンパク質の体重減少効果が、食物摂取およびエネルギー消費両者に対する効果の結果であることを示す。(B)処置されたobマウスの写真。2匹のC57Bl/6J ob/obマウスを示す。左側のマウスはPBSを受け、体重65グラム(開始時の重量)であった。右側のマウスは、組換えOBタンパク質の連日注入を受けた。この動物の開始時の重量も65グラムで、そしてタンパク質処理の3週間後の重量は38グラムであった。(C)処理および未処理obマウス由来の肝臓。処理および未処理のC57Bl/6J ob/obマウス由来の肝臓を示す。PBSを受けたマウス由来の肝臓は、脂肪過多肝臓の肉眼的な外観を有し、そして重量は5.04グラムであった。組換えobタンパク質を受けたマウスは、正常な外観を有し、そして重量は2.23グラムであった。

【図30】図30は、脂肪組織に対するobのインサイチュハイブリダイゼーションを示す。センスおよびアンチセンスOB RNAを、Sp6およびT7ポリメラーゼおよびジゴキシゲニン(digoxigenin)を用いて、インビトロで標識し

た。標識したRNAを、8週齢のC57Bl/Ksマウス(野生型と標示)およびC57Bl/Ks db/dbマウス(dbと標示)の副睾丸の脂肪パッド由来の脂肪組織のパラフィン埋包切片にハイブリダイズした。この図では、脂質小滴が細胞内の非染色空胞として認められる。細胞質は細胞周縁部の薄い縁であり、そして細胞膜と区別できない。アンチセンスプローブを用いた場合のみ、この範囲におけるすべての脂肪細胞に対するハイブリダイゼーションが、野生型切片において検出され、そしてdb/db動物由来の組織切片において、かなり増加したレベルが認められた。

【図31】図31は、OB RNAが、インビボおよびインビトロで発現されることを示す。いくつかの異なる供給源由来の全RNA(10マイクログラム)を電気泳動してプロットし、obプローブに対してハイブリダイズした。まず、コラゲナーゼ消化後、細胞浮力の差を利用して脂肪細胞を精製した。OB RNAは脂肪細胞画分にのみ存在した。レーンSは、間質血管画分を示し、そしてレーンAは脂肪細胞画分を示す。さらに、未分化の3T3-442前脂質細胞ではOB RNAは発現されなかった(レーンU)。これらの細胞系統由来の分化脂質細胞は、明らかに検出可能なレベルのOB mRNAを発現した(レーンD)。

【図32A】図32は、すべての脂肪組織貯蔵所(depot)においてOB RNAが発現されたことを示す。試験したすべての脂肪組織貯蔵所がob RNAを発現した。鼠蹊脂肪パッドは、若干低いRNAを発現したが、種々の実験においてシグナルレベルの多様性が認められた(図31A)。レーン(1)副睾丸脂肪パッド、(2)鼠蹊脂肪パッド、(3)腹部脂肪パッド、(4)傍子宮脂肪パッド。褐色脂肪も低レベルのOB RNAを発現した(図31B)。褐色脂肪中のOB発現レベルは、4℃で1週間飼育された動物では変化しなかったが、褐色特異的UCP RNAの量(低温誘導性で知られる)は5倍に増加した。

【図32B】図32は、すべての脂肪組織貯蔵所(depot)においてOB RNAが発現されたことを示す。試験したすべての脂肪組織貯蔵所がob RNAを発現した。鼠蹊脂肪パッドは、若干低いRNAを発現したが、種々の実験においてシグナルレベルの多様性が認められた(図31A)。レーン(1)副睾丸脂肪パッド、(2)鼠蹊脂肪パッド、(3)腹部脂肪パッド、(4)傍子宮脂肪パッド。褐色脂肪も低レベルのOB RNAを発現した(図31B)。褐色脂肪中のOB発現レベルは、4℃で1週間飼育された動物では変化しなかったが、褐色特異的UCP RNAの量(低温誘導性で知られる)は5倍に増加した。

【図33】図33は、db/dbおよび金チオグルコース処理マウスにおけるOB RNAの発現を示す。金チオグルコース(GTG)およびdb/db処理マウスの傍子宮脂肪パッド由来の全RNAを電気泳動およびノーザンブロットした。単回用量として投与されたGTGは、特異的な視床下部の損傷を誘導することによって、肥満症を引き起こすことが知られている。(A) 1月齢CBA雌性マウスをGTG(.2mg/g)で処

理したところ、コントロール動物(<5gの増加)に比較して、処理動物では>20gの増加が得られた。(B)db/dbおよびGTG処理マウス由来のRNAに対するOBプローブのハイブリダイゼーションは、コントロールRNA(アクチンまたはGAPDH)に比較して20倍増加量のob RNAを示した。

【図34A】図34は、ヒトRNAのノーザンブロット分析を示す。ヒト脂肪組織(FAT、パネルA)由来の全RNA10mgおよびヒト以外の組織(パネルB)由来のポリA+RNA 2mgを含むノーザンブロットを、示されたヒトobプローブまたはヒトβ-アクチンプローブにハイブリダイズした。脂肪組織全RNAについて、約4.5kbでの強度のシグナルが認められた。ポリA+RNAに対するハイブリダイゼーションは、心臓(HE)および胎盤(PL)において検出可能なシグナルを示したが、脳(BL)、肺(LU)、肝臓(LI)、骨格筋(SM)、腎臓(KI)、および脾臓(PA)ではOB RNAは検出されなかった。各場合における、オートラジオグラフィ暴露の長さを示す。注:胎盤RNAに認められる低分子の方のバンドの起源(例えば、オルタネートスプライシング(alternate splicing)、RNA分解)については知られていない。

【図34B】図34は、ヒトRNAのノーザンブロット分析を示す。ヒト脂肪組織(FAT、パネルA)由来の全RNA10mgおよびヒト以外の組織(パネルB)由来のポリA+RNA 2mgを含むノーザンブロットを、示されたヒトobプローブまたはヒトβ-アクチンプローブにハイブリダイズした。脂肪組織全RNAについて、約4.5kbでの強度のシグナルが認められた。ポリA+RNAに対するハイブリダイゼーションは、心臓(HE)および胎盤(PL)において検出可能なシグナルを示したが、脳(BL)、肺(LU)、肝臓(LI)、骨格筋(SM)、腎臓(KI)、および脾臓(PA)ではOB RNAは検出されなかった。各場合における、オートラジオグラフィ暴露の長さを示す。注:胎盤RNAに認められる低分子の方のバンドの起源(例えば、オルタネートスプライシング(alternate splicing)、RNA分解)については知られていない。

【図35A】図35は、ヒトOB遺伝子および8個のマイクロサテライトマーカーを含むYACコンティグを示す。ヒトOB遺伝子を含む第7染色体領域のYACに基づくSTS含有地図を示し、これは、SEGMAP/バージョン3.29[Greenら、PCR Methods Applic.,1:77-90(1991)]から推定した。19個の独特な順に配列したSTS(表3を参照のこと)を上部に示す。8個のマイクロサテライト特異的STSを星印で示す(表4を参照のこと)。Pax4およびOB遺伝子、ならびにコンティグに対して相対的なセントロメア(CEN)およびテロメア(TEL)の予想された位置も示す。各43のYACクローンを、水平の線で示し、左側に名称を付し、そして括弧内に推定YACのサイズ(kbで、パルスフィールドゲル電気泳動により測定された)を示す。各YACにおけるSTSの存在を適切な位置に黒丸で示す。STSがYACの挿入末端に対応する場合は、対応する円の周囲(上部(STSの名

称付近)およびSTSが誘導されるYACの末端の両方)に四角を置いた。下部(水平破線の下)の5つのYACについては、(確立されたSTSの順番に基づいて)存在が予想される1つまたはそれ以上のSTSは検出されず(対応するSTS-特異的PCRアッセイで少なくとも2回、個々のYACを試験することによって評価した)、そしてこれらを適切な位置で白丸で示す。ほとんどのYACをヒト-ハムスターハイブリッド細胞由来ライブラリー[Greenら、Genomics, 25:170-183(1995)]から単離し、示された通り元の名称を付した。残りのYACを全ヒトゲノムライブラリーから単離し、そして元のライブラリーの位置を表3に示す。7q31.3に対してFISH分析によってマップすることが見出された3つのYAC(yWSS691、yWSS999、およびyWSS2935)の名称の周囲に枠を置く。コンティグは「未計算の」形態で表し、YACのサイズを用いてはクロンの重複またはSTSスペーシングを概算せず、従ってすべてのSTSを等間隔で配置した。「計算された」形態では、YACのサイズを用いて隣接するSTSの各対を隔てる相対的距離およびクロンの重複の範囲が概算され、総YACコンティグは全長が2 Mbを若干超えるようである。

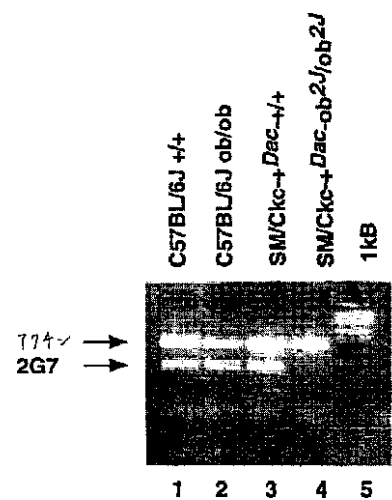
【図35B】図35は、ヒトOB遺伝子および8個のマイクロサテライトマーカを含むYACコンティグを示す。ヒトOB遺伝子を含む第7染色体領域のYACに基づくSTS含有地図を示し、これは、SEGMAP/バージョン3.29[Greenら、PCR Methods Applic., 1:77-90(1991)]から推定した。19個の独特な順に配列したSTS(表3を参照のこと)を上部に示す。8個のマイクロサテライト特異的STSを星印で示す(表4を参照のこと)。Pax4およびOB遺伝子、なら *

*びにコンティグに対して相対的なセントロメア(CEN)およびテロメア(TEL)の予想された位置も示す。各43のYACクローンを、水平の線で示し、左側に名称を付し、そして括弧内に推定YACのサイズ(kbで、パルスフィールドゲル電気泳動により測定された)を示す。各YACにおけるSTSの存在を適切な位置に黒丸で示す。STSがYACの挿入末端に対応する場合は、対応する円の周囲(上部(STSの名称付近)およびSTSが誘導されるYACの末端の両方)に四角を置いた。下部(水平破線の下)の5つのYACについては、(確立されたSTSの順番に基づいて)存在が予想される1つまたはそれ以上のSTSは検出されず(対応するSTS-特異的PCRアッセイで少なくとも2回、個々のYACを試験することによって評価した)、そしてこれらを適切な位置で白丸で示す。ほとんどのYACをヒト-ハムスターハイブリッド細胞由来ライブラリー[Greenら、Genomics, 25:170-183(1995)]から単離し、示された通り元の名称を付した。残りのYACを全ヒトゲノムライブラリーから単離し、そして元のライブラリーの位置を表3に示す。7q31.3に対してFISH分析によってマップすることが見出された3つのYAC(yWSS691、yWSS999、およびyWSS2935)の名称の周囲に枠を置く。コンティグは「未計算の」形態で表し、YACのサイズを用いてはクロンの重複またはSTSスペーシングを概算せず、従ってすべてのSTSを等間隔で配置した。「計算された」形態では、YACのサイズを用いて隣接するSTSの各対を隔てる相対的距離およびクロンの重複の範囲が概算され、総YACコンティグは全長が2 Mbを若干超えるようである。

【図1A】

GGATCCCTGCTCCAGCAGCTGCAAGGTGCAAGAAGAAGAAGATCCCAGGGAGGAAAATGTG	61
<u>M C</u>	2
CTGGAGACCCCTGTGTGCGTTCCTGTGGCTTTGGTCCTATCTGTCTTATGTTCAAGCAGT	121
<u>W R P L C R F L W L W S Y L S Y V Q A V</u>	22
GCCTATCCAGAAAGTCCAGGATGACACCAAAACCCTCATCAAGACCATTGTCCACAGGAT	181
<u>P I Q K V Q D D T K T L I K T I V T R I</u>	42
CAATGACATTTACACACGCGAGTCGGTATCCGCCAAGCAGAGGGTCACTGGCTTGGACTT	241
<u>N D I S H T Q S V S A K Q R V T G L D F</u>	62
CATTCTGGGCTTCACCCATTCTGAGTTTGCCAAGATGGACCAGACTCTGGCAGTCTA	301
<u>I P G L H P I L S L S K M D Q T L A V Y</u>	82
TCAACAGGTCTCTACCAGCCTGCCTTCCAAAATGTGCTGCAGATAGCCAATGACCTGGA	361
<u>Q Q V L T S L P S Q N V L Q I A N D L E</u>	102
GAATCTCCGAGACCTCTCCATCTGCTGGCCTTCTCCAAGAGCTGCTCCCTGCCTCAGAC	421
<u>N L R D L L H L L A F S K S C S L P Q T</u>	122
CAGTGGCTGCGAAGCCAGAGAGCCTGGATGGCGTCTGGAAGCCTCACTCTACTCCAC	481
<u>S G L Q K P E S L D G V L E A S L Y S T</u>	142

【図12A】



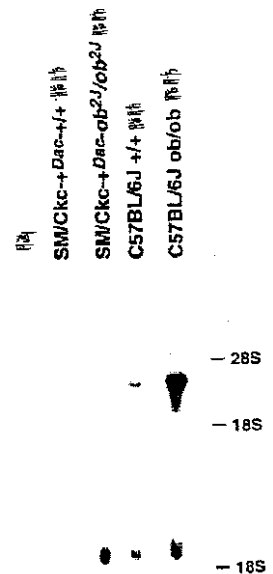
【図1 B】

AGAGGTGGTGGCTTTGAGCAGGCTGCAGGGCTCTCTGCAGGACATTCTTCAACAGTTGGA 541
 E V V A L S R L Q G S L Q D I L Q Q L D 162
 TGTTAGCCCTGAATGCTGAAGTTTCAAAGGCCACCAGGCTCCAAGAATCATGTAGAGGG 601
 V S P E C * 167
 AAGAAACCTTGGCTTCCAGGGGTCTTCAGGAGAAGAGAGCCATGTGCACACATCCATCAT 661
 TCATTTCTCTCCCTCCTGTAGACCACCCATCCAAGGCATGACTCCACAATGCTTGACTC 721
 AAGTTATCCACACAACCTTCATGAGCACAAGGAGGGGCCAGCTGCAGAGGGGACTCTCAC 781
 CTAGTTCTTCAGCAAGTAGAGATAAGAGCCATCCCATCCCCTCCATGTCCCACCTGCTCC 841
 GGGTACATGTTCTCCGTGGGTACACGCTTCGCTGCGGCCAGGAGAGGTGAGGTAGGGA 901
 TGGGTAGAGCCTTTGGGCTGTCTCAGAGTCTTTGGGAGCACCCTGAAGGCTGCATCCACA 961
 CACAGCTGGAACTCCCAAGCAGCACAGATGGAAGCACTTATTTATTTATTTCTGCATTTC 1021
 TATTTTGGATGGATCTGAAGCAAGGCATCAGCTTTTTCAGGCTTTGGGGGTGAGCCAGGA 1081
 TGAGGAAGGCTCCTGGGGTGTCTGCTTCAATCCTATTGATGGGTCTGCCCGAGGCAAACC 1141

2G7

774v

【図1 2 B】



【図1 C】

TAATTTTGGAGTGAAGGAAGGTTGGGATCTTCAAACAAGAGTCTATGCAGGTAG 1201
 CGCTCAAGATTGACCTCTGGTGACTGGTTTTGTTTCTATTGTGACTGACTCTATCCAAAC 1261
 ACGTTTGCAGCGGCATTGCCGGGAGCATAGGCTAGGTTATTATCAAAGCAGATGAATTT 1321
 TGTCAAGTGTAATATGTATCTATGTGCACCTGAGGGTAGAGGATGTGTTAGAGGGAGGGT 1381
 GAAGGATCCGGAAGTGTTCTCTGAATTACATATGTGTGGTAGGCTTTTCTGAAAGGGTGA 1441
 GGCATTTTCTTACCTCTGTGCCCACATAGTGTGGCTTTGTGAAAAGGACAAAGGAGTTGA 1501
 CTCTTTCCGGAACATTTGGAGTGTACCAGGCACCCTTGAGGGGGCTAAAGCTACAGGCCT 1561
 TTTGTTGGCATATTGCTGAGCTCAGGGAGTGAGGGCCCCACATTTGAGACAGTGAGCCCC 1621
 AAGAAAAGGGTCCCTGGGTAGATCTCCAAGGTTGTCCAGGGTTGATCTCACAATGCGTT 1681
 TCTTAAGCAGGTAGACGTTTGCATGCCAATATGTGGTTCTCATCTGATTGGTTCATCAA 1741
 AGTAGAACCTGTCTCCACCCATTCTGTGGGGAGTTTTGTTCCAGTGGGAATGAGAAAT 1801
 CACTTAGCAGATGGTCTGAGCCCTGGGCCAGCACTGCTGAGGAAGTGCCAGGGCCCCAG 1861

【図1 E】

GGGTTTTGGAGCAGTTTGGATCTTGGGTTTTCTGTAAAGAGATGGTTAGCTTATACCTAA 2641
 AACCATATGGCAAACAGGCTGCAGGACCAGACTGGATCCTCAGCCCTGAAGTGTGCCCT 2701
 TCCAGCCAGGTCATACCCTGTGGAGGTGAGCGGGATCAGGTTTTGTGGTGCTAAGAGAGG 2761
 AGTTGGAGGTAGATTTTGGAGGATCTGAGGGC 2821

【図1D】

GCCAGGCTGCCAGAATTGCCCTTCGGGCTGGAGGATGAACAAAGGGGCTTGGGTTTTTCC 1921
 ATCACCCCTGCACCCTATGTCAACATCAAACCTGGGGGGCAGATCAGTGAAGGACACTTG 1981
 ATGGAAAGCAATACACTTTAAGACTGAGCACAGTTTCGTGCTCAGCTCTGTCTGGTGCTG 2041
 TGAGCTAGAGAAGCTCACCACATACATATAAAAATCAGAGGCTCATGTCCCTGTGGTTAG 2101
 ACCCTACTCGCGGGCGGTGTACTCCACCACAGCAGCACC6CACCGCTGGAAGTACAGTGCT 2161
 GTCTTCAACAGGTGTGAAAGAACCTGAGCTGAGGGTGACAGTGCCAGGGGAACCTGCT 2221
 TGCAGTCTATTGCATTTACATACCGCATTTTCAGGGCACATTAGCATCCACTCCTATGGTA 2281
 GCACACTGTTGACAATAGGACAAGGGATAGGGGTTGACTATCCCTTATCCAAAATGCTTG 2341
 GGACTAGAAGAGTTTTGGATTTTAGAGTCTTTTCAGGCATAGGTATATTTGAGTATATAT 2401
 AAAATGAGATATCTTGGGGATGGGGCCCAAGTATAAACATGAAGTTCATTTATATTTTAT 2461
 AATACCGTATAGACACTGCTTGAAGTGTAGTTTTATACAGTGTTTTAAATAACGTTGTAT 2521
 GCATGAAAGACGTTTTTACAGCATGAACCTGTCTACTCATGCCAGCACTCAAAAACCTTG 2581

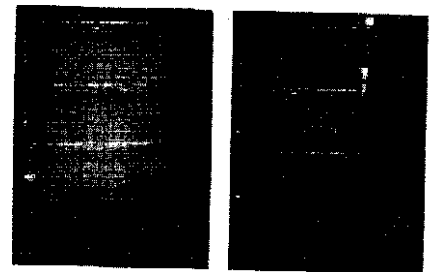
【図2A】

---G--GTTG CAAGGCCCAA GAAGCCCA-- -TCCTGGGAA GGAAATGCA 50
 TTGGGGAACC CTGTGCGGAT TCTTGTGGCT TTGGCCCTAT CTTTTCTATG 100
 TCCAAGCTGT GCCCATCCAA AAAGTCCAAG ATGACACCAA AACCTCATC 150
 AAGACAATTG TCACCAGGAT CAATGACATT TCACACACGC AGTCAGTCTC 200
 CTCCAAACAG AAAGTCACCG GTTTGGACTT CATTCTGGG CTCCACCCCA 250
 TCCTGACETT ATCCAAGATG GACCAGACAC TGGCAGTCTA CCAACAGATC 300
 CTCACCACTA TGCCTTCCAG AAACGTGATC CAAATATCCA ACGACCTGGA 350
 GAACCTCCGG GATCTTCTTC ACGTGCTGGC CTTCTCTAAG AGCTGCCACT 400
 TGGCCTGGGC CAGTGGCCTG GAGACCTTGG ACAGCCTGGG GGGTGTCTTG 450
 GAAGCTTCAG GCTACTCCAC AGAGGTGGTG GCCCTGAACA GCTGCAAGG 500
 GTCTCTGCAG GACATGCTGT GGCAGCTGGA CCTCAGCCCT GGGTGTCTGAG 550

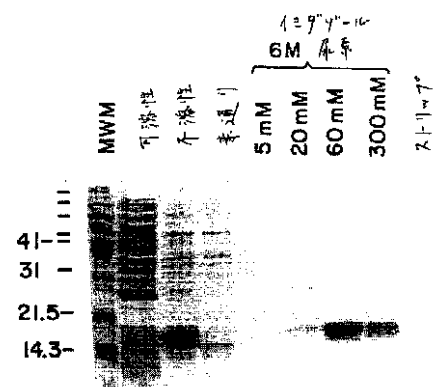
【図2B】

GCCTTGAAGG TCACTCTTCC TGCAAGGACT -ACGTTAAGG GAAGGAACTC 600
 TGGTTTCCAG GTATCTCCAG GATTGAAGAG CATTGCATGG ACACCCCTTA 650
 TCCAGGACTC TGTCAATTTT CCTGACTCCT CTAAGCCACT CTTCCAAAGG 700

【図8】



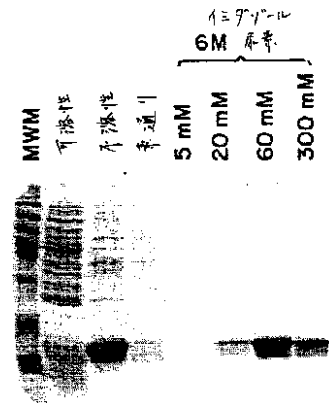
【図18A】



【図3】

1 MET HIS TRP GLY THR LEU CYS GLY PHE LEU TRP LEU TRP PRO TYR
 16 LEU PHE TYR VAL GLN ALA VAL PRO ILE GLN LYS VAL GLN ASP ASP
 31 THR LYS THR LEU ILE LYS THR ILE VAL THR ARG ILE ASN ASP ILE
 46 SER HIS THR GLN SER VAL SER SER LYS GLN LYS VAL THR GLY LEU
 61 ASP PHE ILE PRO GLY LEU HIS PRO ILE LEU THR LEU SER LYS MET
 76 ASP GLN THR LEU ALA VAL TYR GLN GLN ILE LEU THR SER MET PRO
 91 SER ARG ASN VAL ILE GLN ILE SER ASN ASP LEU GLU ASN LEU ARG
 106 ASP LEU LEU HIS VAL LEU ALA PHE SER LYS SER CYS HIS LEU PRO
 121 TRP ALA SER GLY LEU GLU THR LEU ASP SER LEU GLY GLY VAL LEU
 136 GLU ALA SER GLY TYR SER THR GLU VAL VAL ALA LEU SER ARG LEU
 151 GLN GLY SER LEU GLN ASP MET LEU TRP GLN LEU ASP LEU SER PRO
 166 GLY CYS END

【図18B】



【図23B】

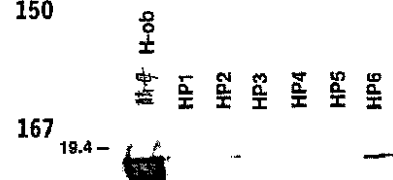
1 2 3 4 5



【図4】

マウス MCWRPLCRFL WLNSYLSYVQ AVPIQKVQDD TKTLIKTIYT RINDISHTQS
 ヒト MHWGTLGFL WLNPYLFYVQ AVPIQKVQDD TKTLIKTIYT RINDISHTQS
 マウス VSAKQRTVL DFIPGLHPIL SLSKMDQTLA VYQVLTSLP SQNVLQIAND
 ヒト VSSKQKVTGL DFIPGLHPIL TLSKMDQTLA VYQVLTSLP SRNVIQISND
 マウス LENLRDLLHL LAFSKSCSLP QTSGLQKPES LDGVLEASLY STEVVALSRL
 ヒト LENLRDLLHV LAFSKSCHLP WASGLTLDLDS LGGVLEASGY STEVVALSRL
 マウス QGSLODILQQ LDVSPCC
 ヒト QGSLODMLWQ LDLSPGC

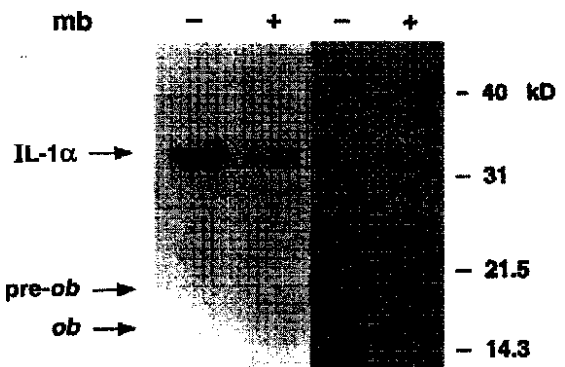
【図25A】



【図10】

GTGCAAGAAG AAGAAGATCC CAGGGCAGGA AAATGTGCTG GAGACCCCTG
 CACGTTCTTC TTCTTCTAGG GTCCCGTCCT TTACACGAC CTCTGGGGAC
 TGTCGGGTCC NGTGGNITTG GTCCTATCTG TCTTATGTNC AAGCAGTGCC
 ACAGCCCAGG NCACCNAAAC CAGGATAGAC AGAATACANG TTCGTACCG
 TATCCAGAAA GTCCAGGATG ACACCAAAAG CCTCATCAAG ACCATTGTCA
 ATAGGTCTTT CAGGTCCTAC TGTGGTTTTC GGAGTAGTTC TGGAACAGT
 NCAGGATCAC TGANATTTC CACACG
 NGTCCTAGTG ACTNTAAAGT GTGTGC

【図19A】



【図5】

```

1   MET CYS TRP ARG PRO LEU CYS ARG PHE LEU TRP LEU TRP SER TYR
16  LEU SER TYR VAL GLN ALA VAL PRO ILE GLN LYS VAL GLN ASP ASP
31  THR LYS THR LEU ILE LYS THR ILE VAL THR ARG ILE ASN ASP ILE
46  SER HIS THR SER VAL SER ALA LYS GLN ARG VAL THR GLY LEU ASP
61  PHE ILE PRO GLY LEU HIS PRO ILE LEU SER LEU SER LYS MET ASP
76  GLN THR LEU ALA VAL TYR GLN GLN VAL LEU THR SER LEU PRO SER
91  GLN ASN VAL LEU GLN ILE ALA ASN ASP LEU GLU ASN LEU ARG ASP
106 LEU LEU HIS LEU LEU ALA PHE SER LYS SER CYS SER LEU PRO GLN
121 THR SER GLY LEU GLN LYS PRO GLU SER LEU ASP GLY VAL LEU GLU
136 ALA SER LEU TYR SER THR GLU VAL VAL ALA LEU SER ARG LEU GLN
151 GLY SER LEU GLN ASP ILE LEU GLN GLN LEU ASP VAL SER PRO GLU
166 CYS END

```

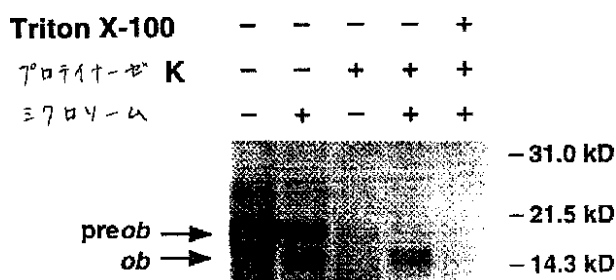
【図6】

```

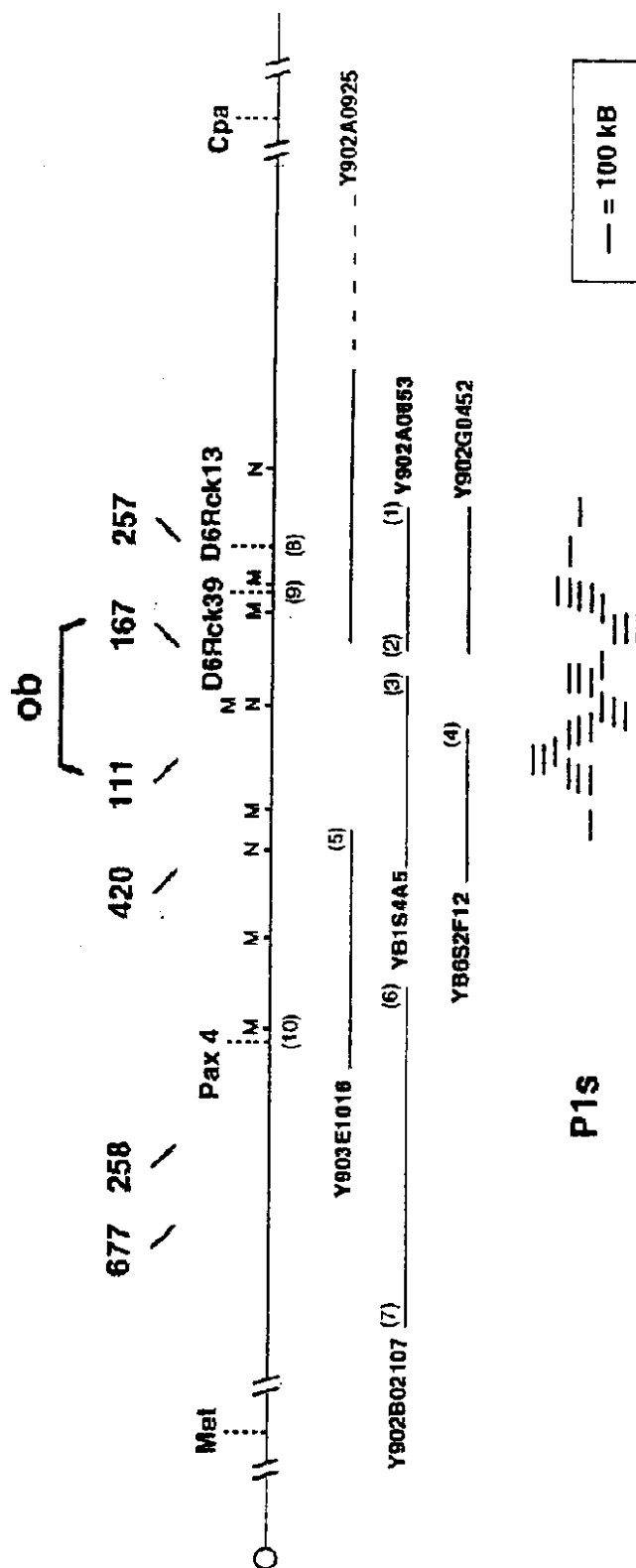
1   MET HIS TRP GLY THR LEU CYS GLY PHE LEU TRP LEU TRP PRO TYR
16  LEU PHE TYR VAL GLN ALA VAL PRO ILE GLN LYS VAL GLN ASP ASP
31  THR LYS THR LEU ILE LYS THR ILE VAL THR ARG ILE ASN ASP ILE
46  SER HIS THR SER VAL SER SER LYS GLN LYS VAL THR GLY LEU ASP
61  PHE ILE PRO GLY LEU HIS PRO ILE LEU THR LEU SER LYS MET ASP
76  GLN THR LEU ALA VAL TYR GLN GLN ILE LEU THR SER MET PRO SER
91  ARG ASN VAL ILE GLN ILE SER ASN ASP LEU GLU ASN LEU ARG ASP
106 LEU LEU HIS VAL LEU ALA PHE SER LYS SER CYS HIS LEU PRO TRP
121 ALA SER GLY LEU GLU THR LEU ASP SER LEU GLY GLY VAL LEU GLU
136 ALA SER GLY TYR SER THR GLU VAL VAL ALA LEU SER ARG LEU GLN
151 GLY SER LEU GLN ASP MET LEU TRP GLN LEU ASP LEU SER PRO GLY
166 CYS END

```

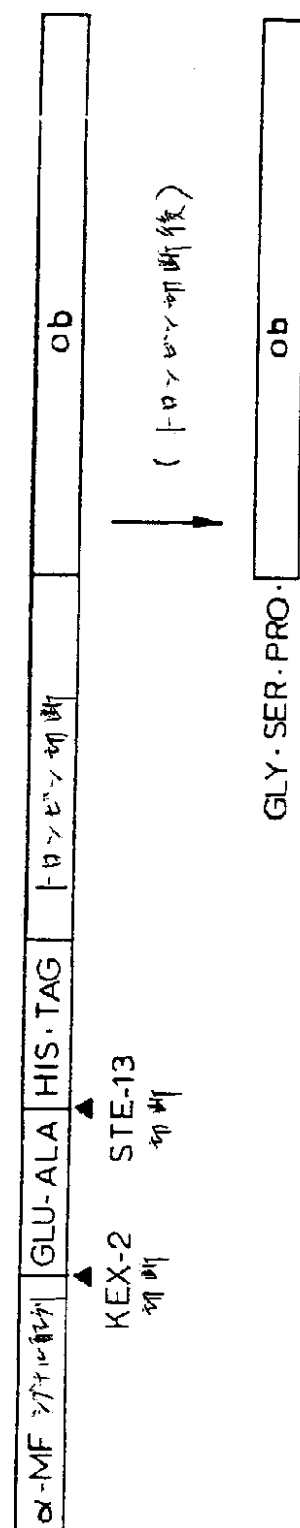
【図19B】



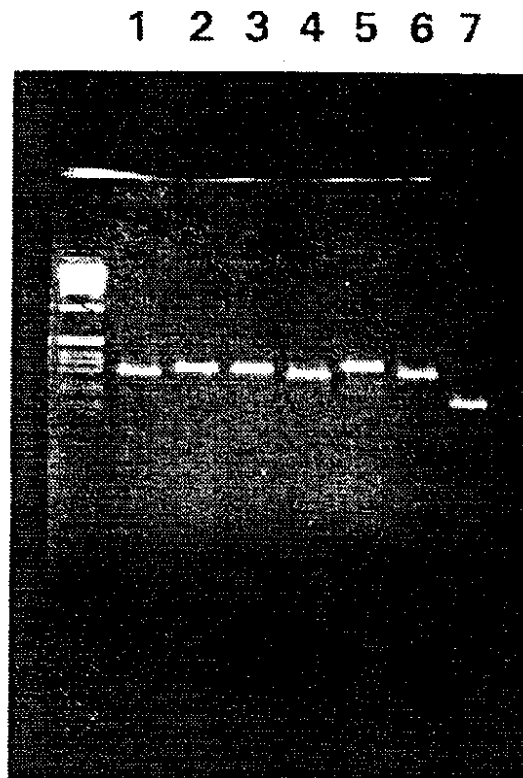
【図7】



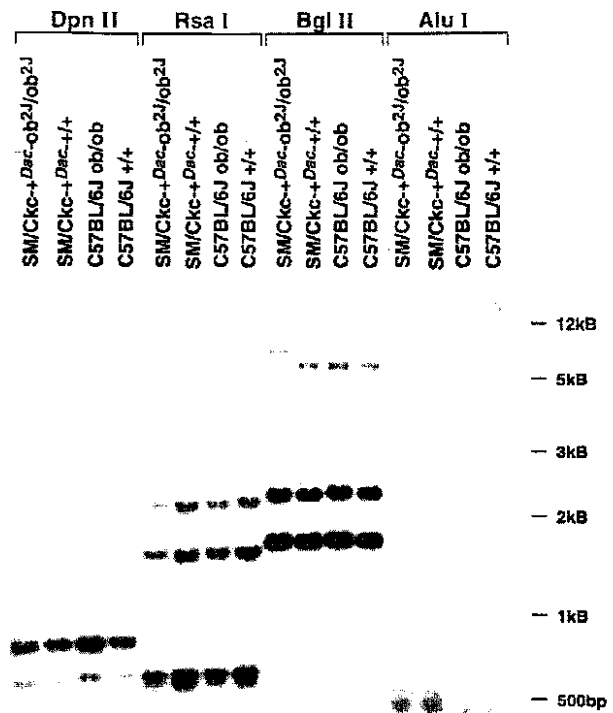
【図22B】



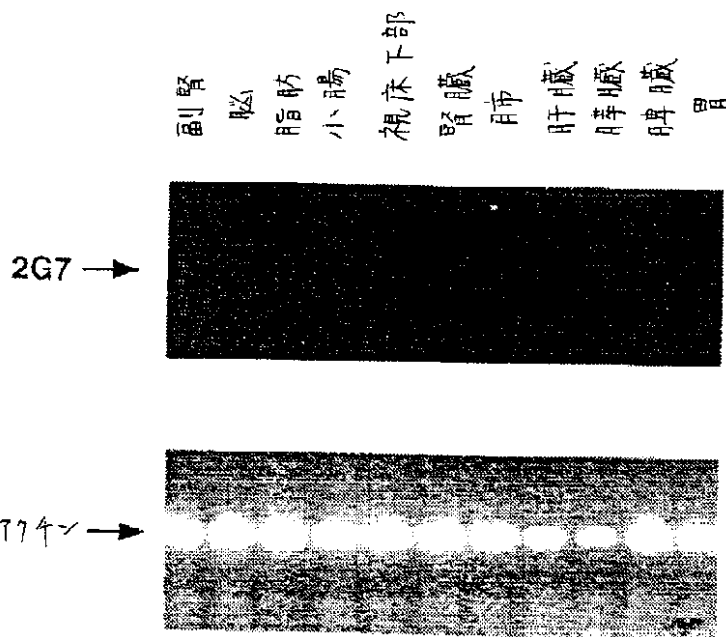
【図9】



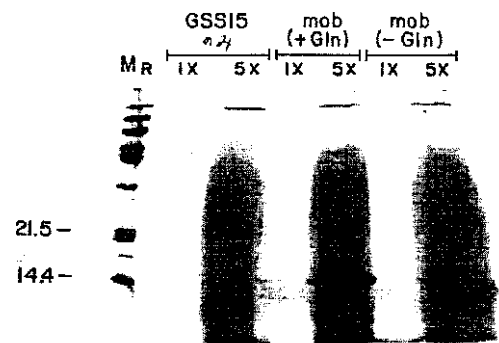
【図15A】



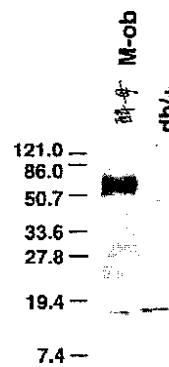
【図11A】



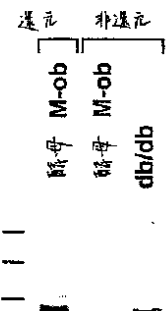
【図23A】



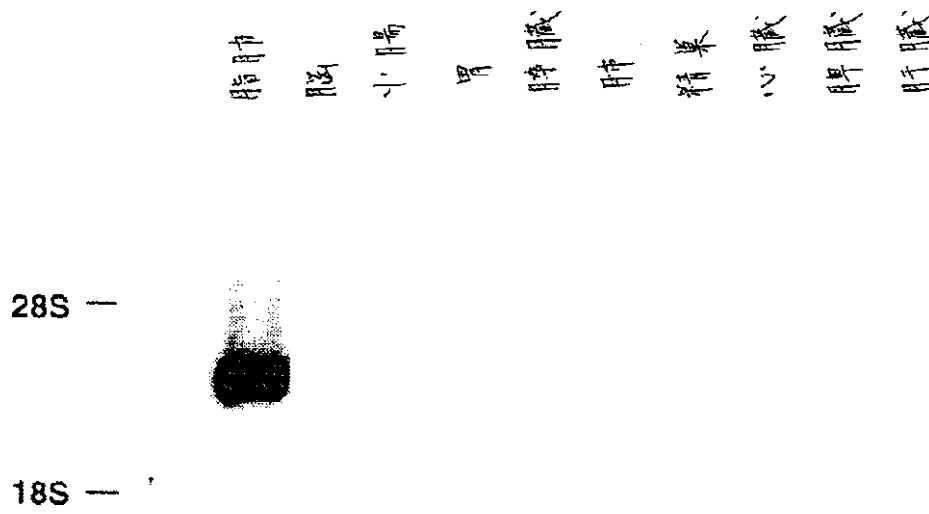
【図24A】



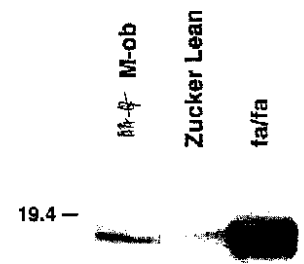
【図26A】



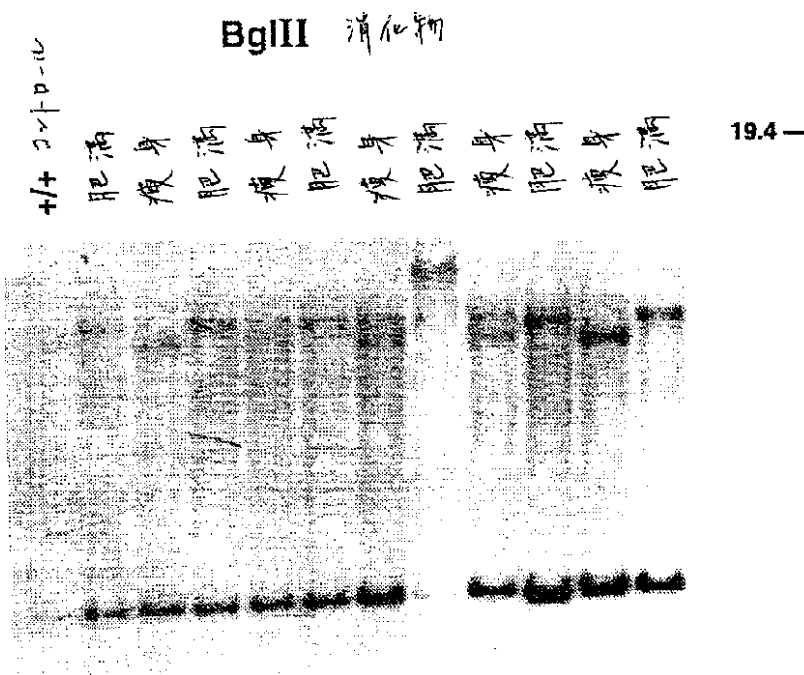
【図11B】



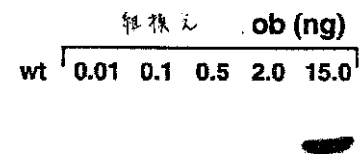
【図24B】



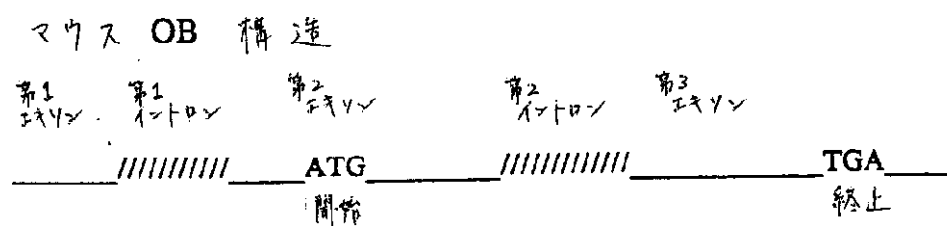
【図15B】



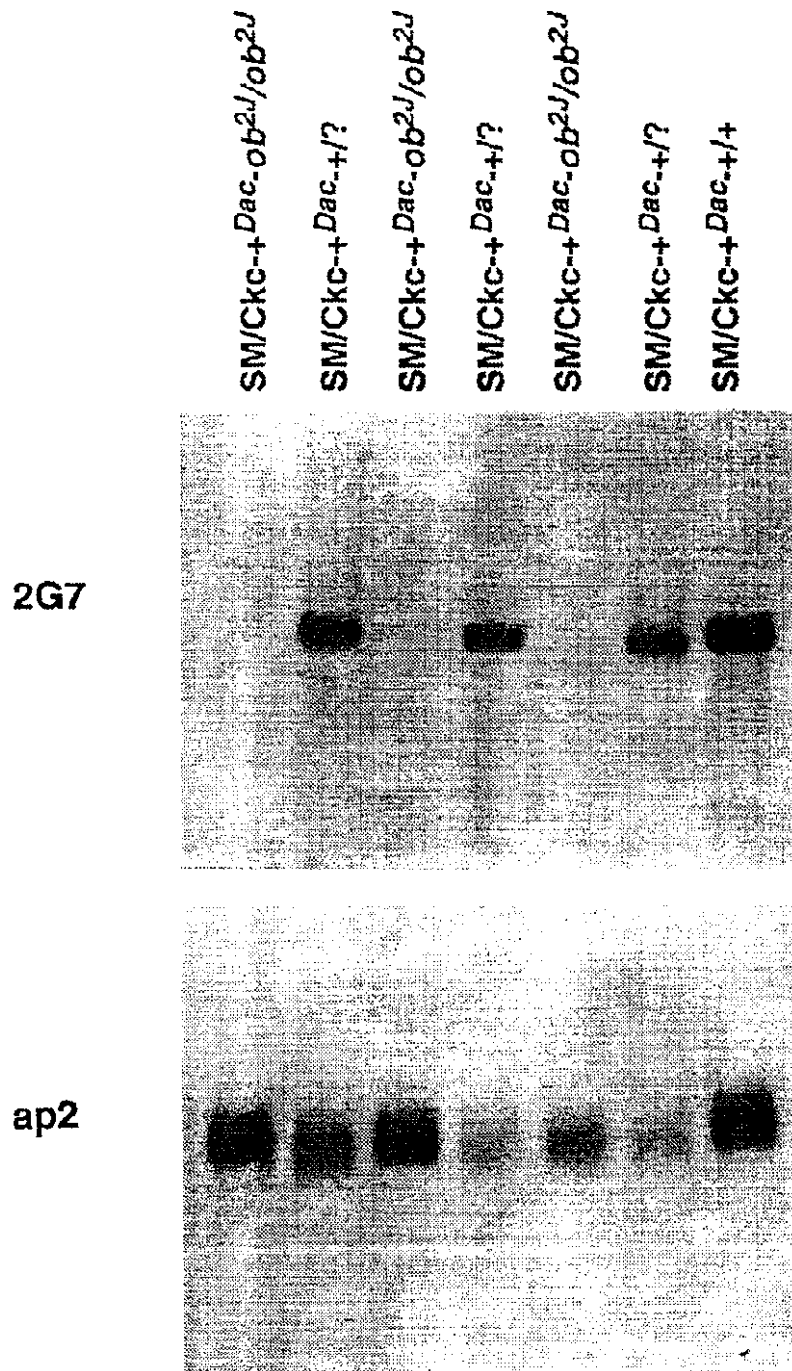
【図24C】



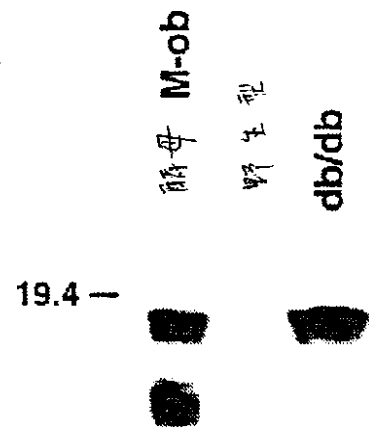
【図20F】



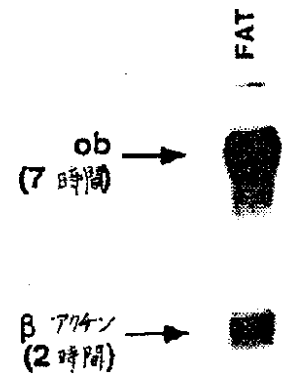
【図13】



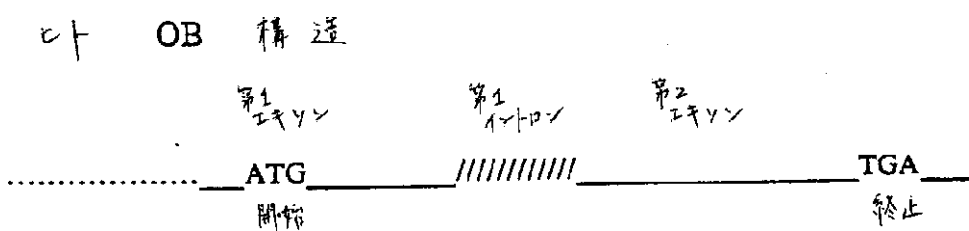
【図24D】



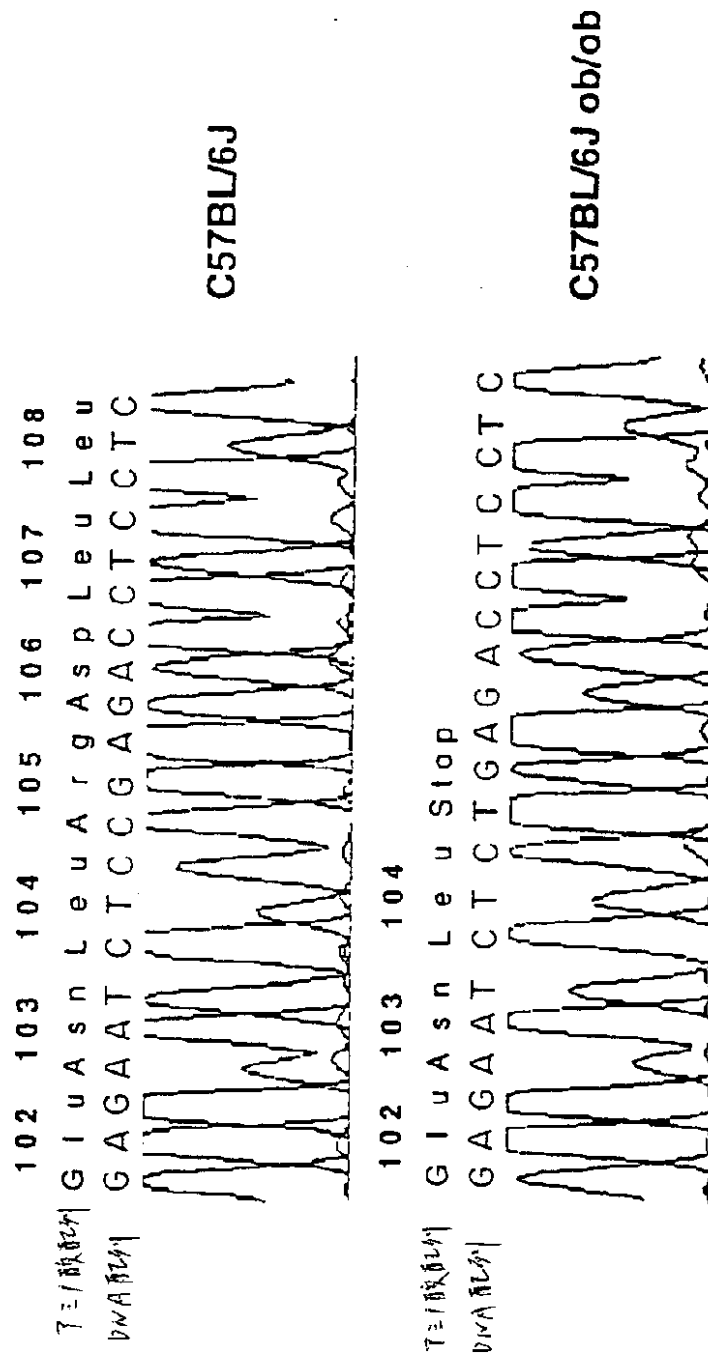
【図34A】



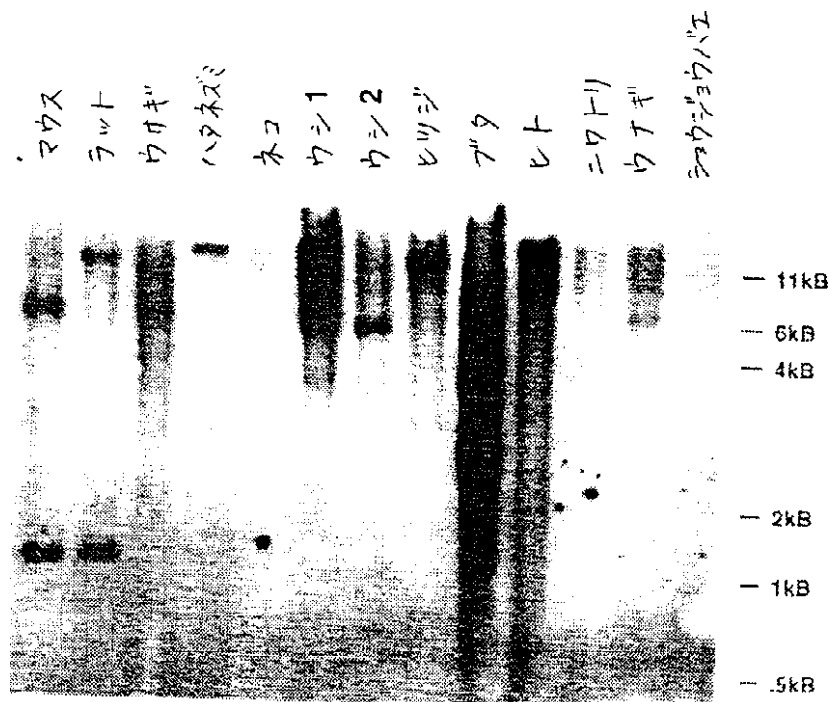
【図20G】



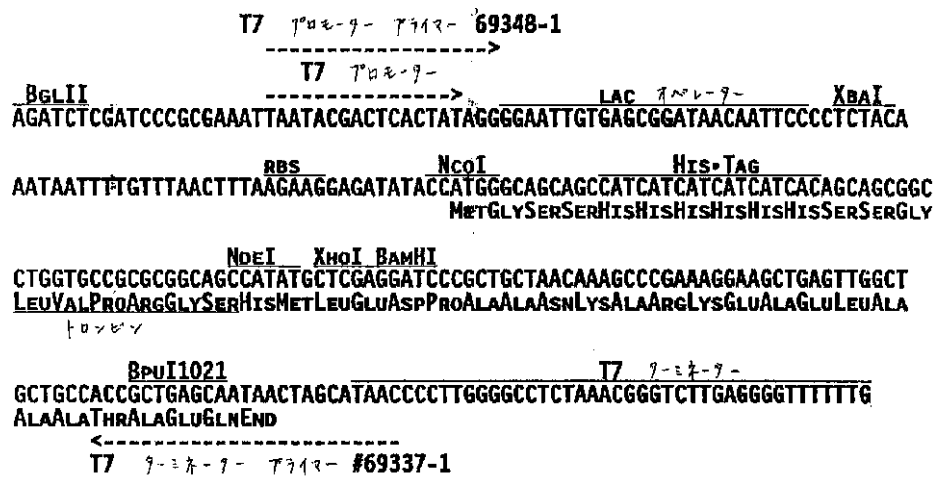
【図14】



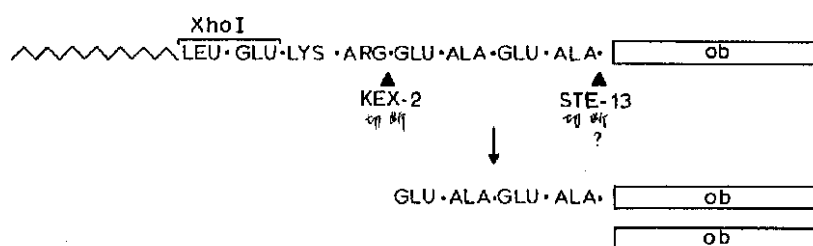
【図16】



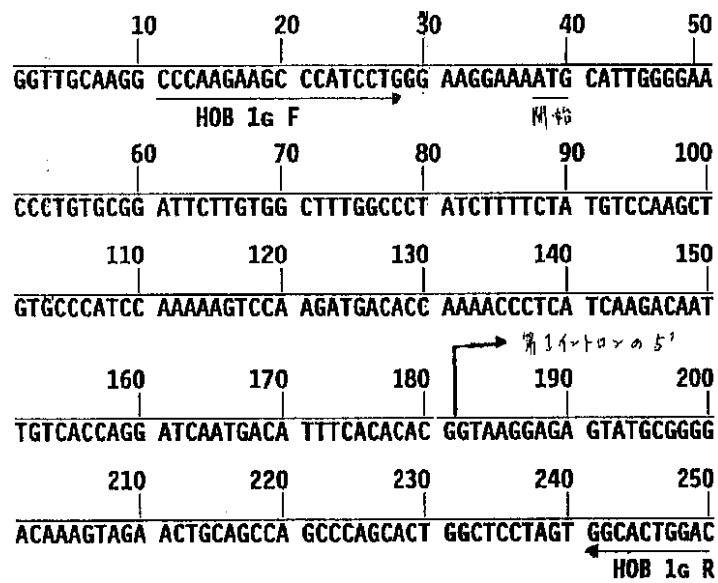
【図17】



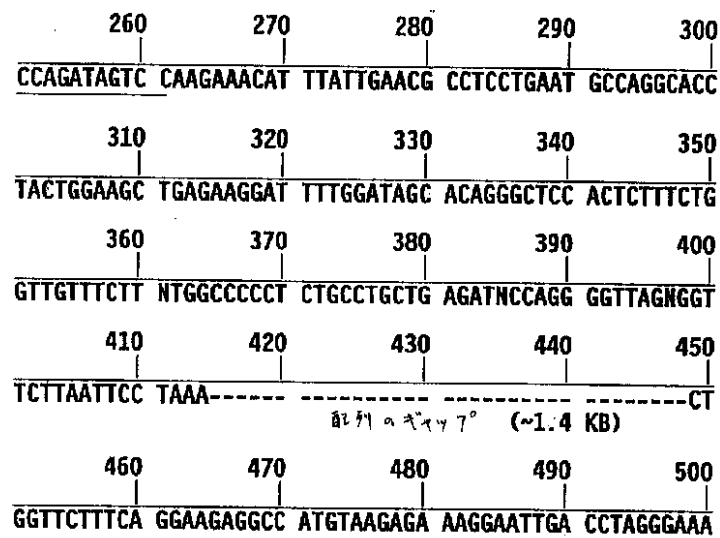
【図21B】



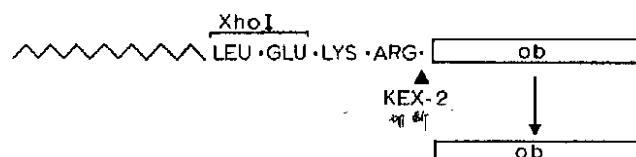
【図20A】



【図20B】



【図21C】



【図20C】

510	520	530	540	550
ATTGGCCTGG GAAGTGGAGG GAACGGATGG TGTGGGAAAA GCAGGAATCT				
560	570	580	590	600
CGGAGACCAG CTTAGAGGCT TGGCAGTCAC CTGGGTGCAG GANACAAGGG				
610	620	630	640	650
CCTGAGCCAA AGTGGTGGAG GAGGGTGGAA GGAGACAGCC CAGAGAATGA				
660	670	680	690	700
CCCTCCATGC CCACGGGGAA GGCAGAGGGC TCTGAGAGCG ATTCCTCCCA				
710	720	730	740	750
CATGCTGAGC ACTGTTCTC CCTCTCCTC CTNCATAGCA GTCAGTCTCC				

HOB 2g F

第1イントロンの3' ←

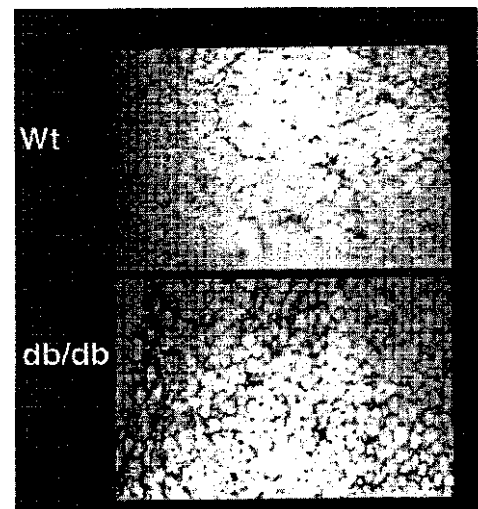
【図29C】



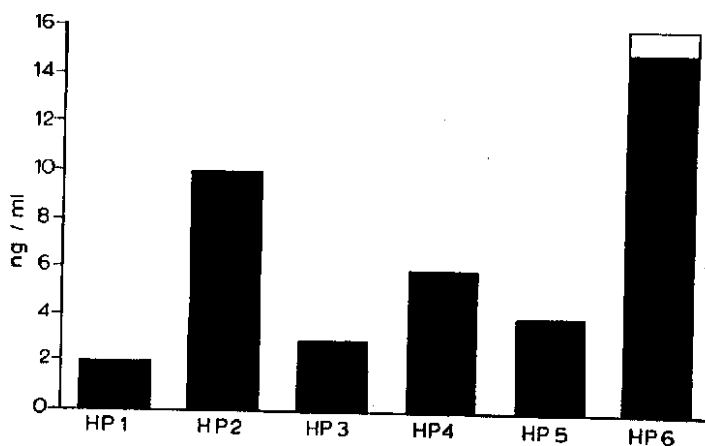
【図20D】

760	770	780	790	800
TCCAACAGA AAGTCACGG TTTGGACTTC ATTCCTGGG TCCACCCCAT				
810	820	830	840	850
CCTGACCTTA TCCAAGATGG ACCAGACACT GGCAGTCTAC CAACAGATCC				
860	870	880	890	900
TCACCAGTAT GCCTTCAGG AACGTGATCC AAATATCCAA CGACCTGGAG				
910	920	930	940	950
AACCTCCGGG ATCTTCTTCA CGTGCTGGCC TTCTCTAAGA GCTGCCACTT				
960	970	980	990	1000
GCCCTGGGCC AGTGGCCTGG AGACCTTGA CAGCCTGGG GGTGTCTCG				

【図30】



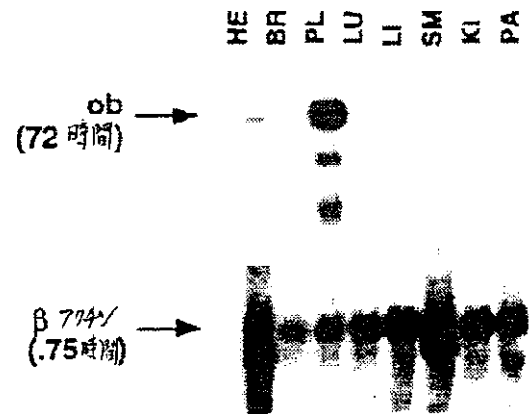
【図25C】



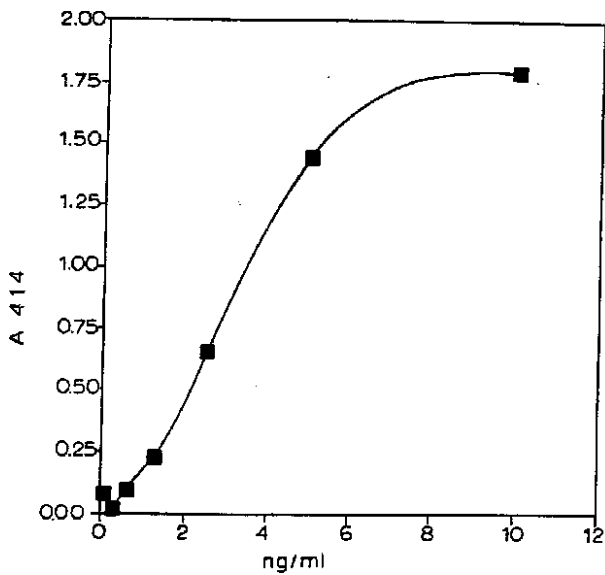
【図20E】

1010	1020	1030	1040	1050
AAGCTTCAGG	CTACTCCACA	GAGGTGGTGG	CCCTGAGCAG	GCTGCAGGGG
1060	1070	1080	1090	1100
TCTCTGCAGG	ACATGCTGTG	GCAGCTGGAC	CTCAGCCCTG	GGTGCTGAGG
1110	1120	1130	1140	1150
CCTTGAAGGT	CACTCTTCCT	GCAAGGACTA	CGTTAAGGGA	AGGAACTCTG
1160	1170	1180	1190	1200
GCTTTCAGG	TATCTCCAGG	ATTGAAGAGC	ATTGCATGGA	CACCCCTTAT
HOB 2g R				
1210	1220	1230	1240	1249
CCAGGACTCT	GTCAATTTC	CTGACTCCTC	TAAGCCACTC	TTCCAAAGG

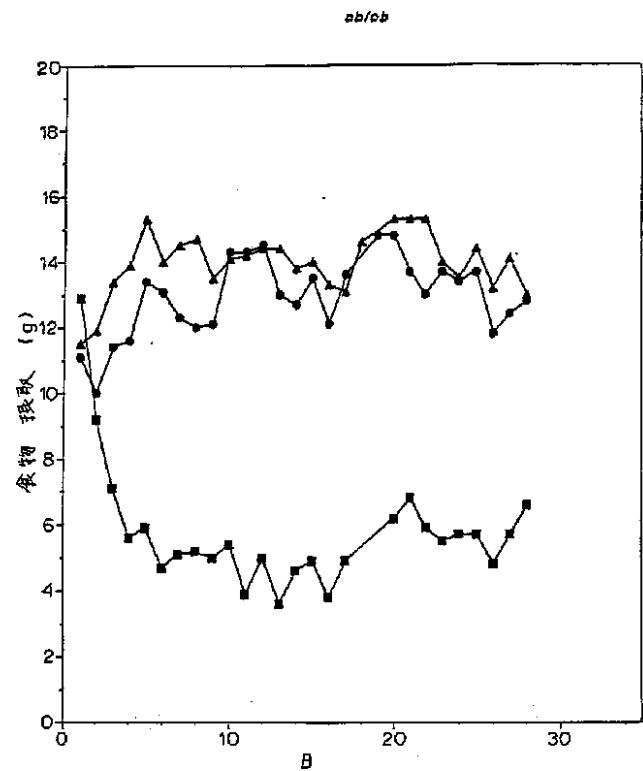
【図34B】



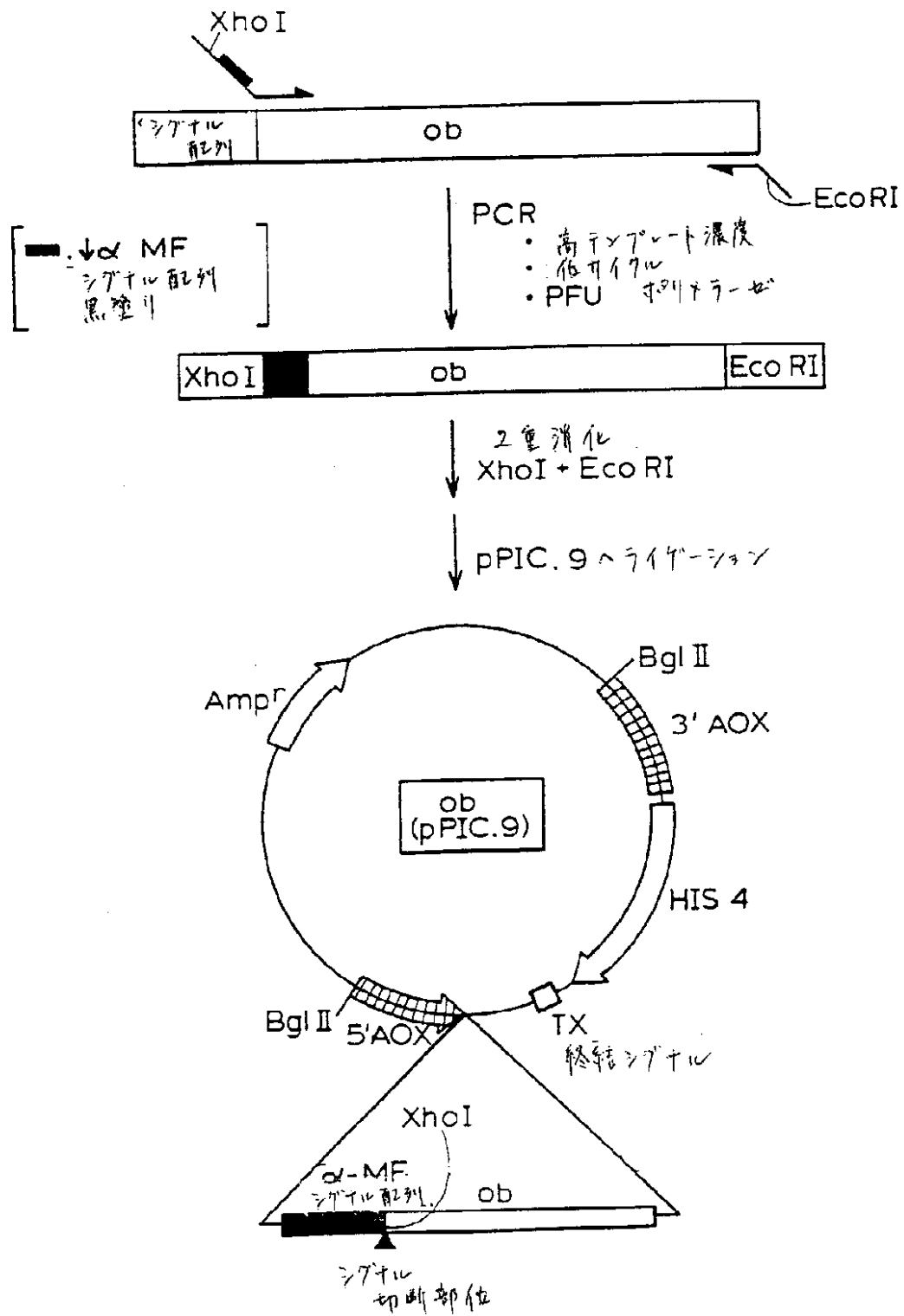
【図25B】



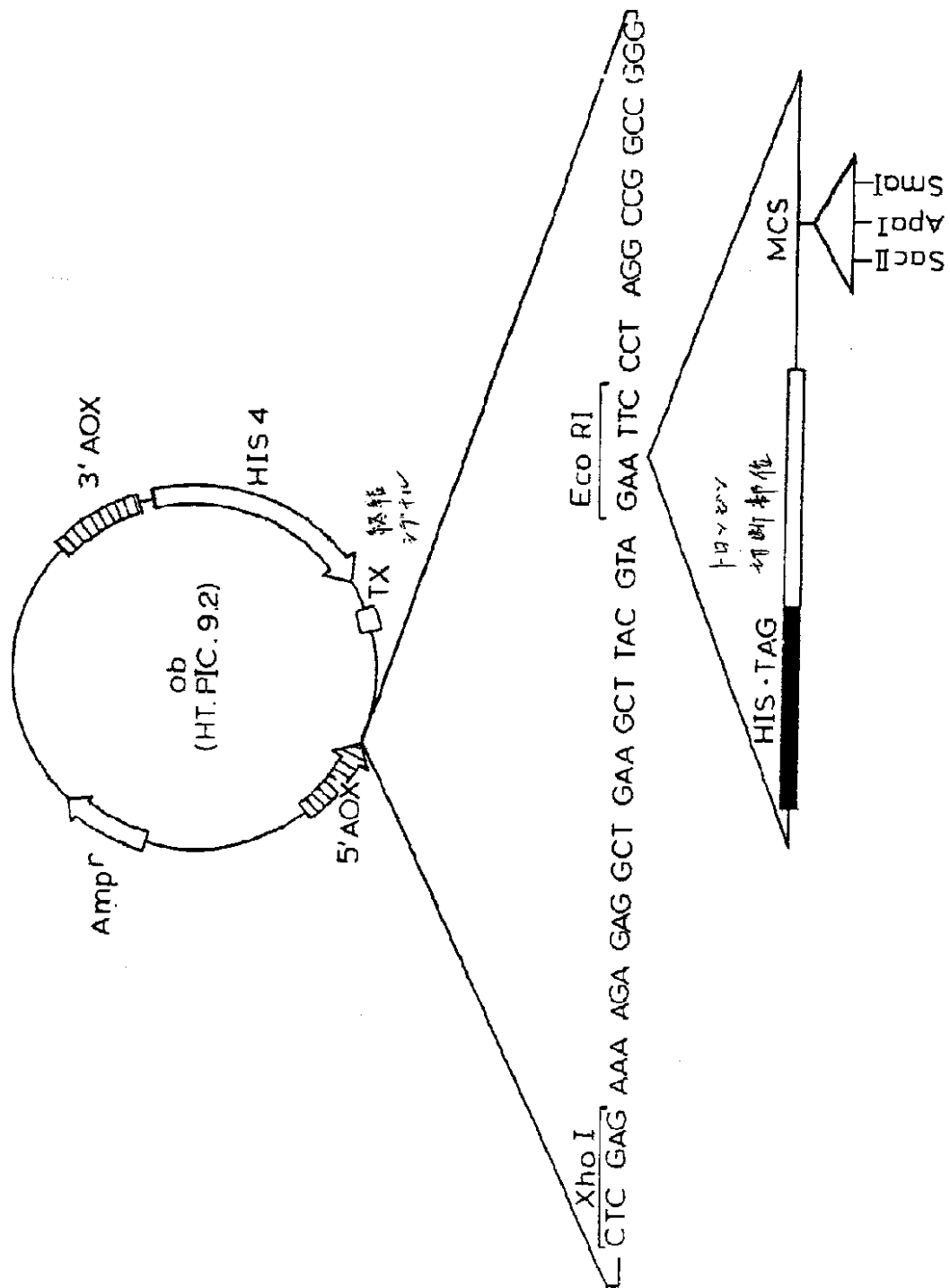
【図28A】



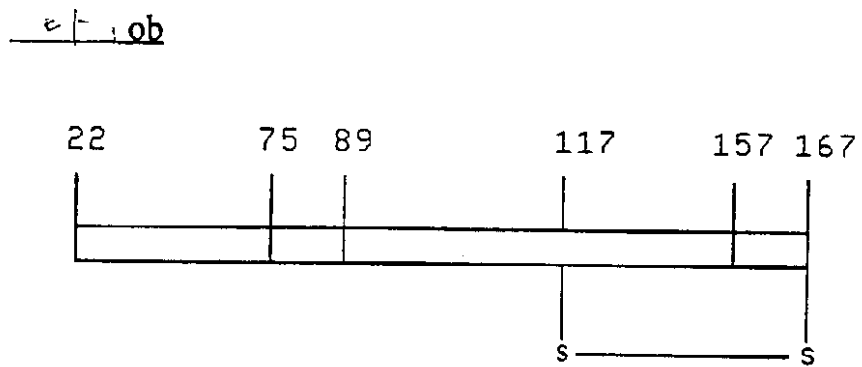
【図21A】



【図22A】

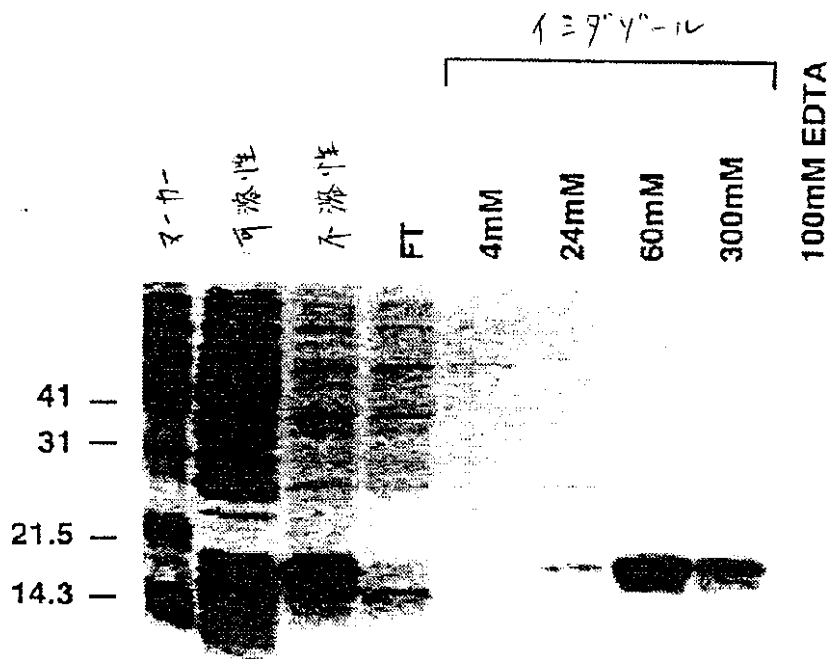


【図26B】

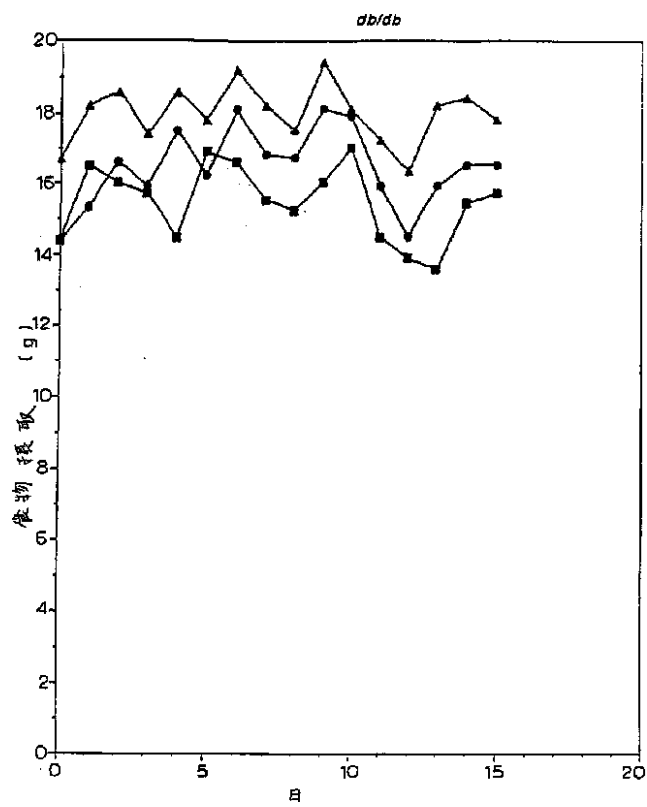


<u>ピーク</u>	<u>質量 (Da)</u>	
	期待値	実測値
22-167	16,024	16,024 ± 3
22-75	5936.9	5936.6 ± 1
76-89	1562.7	N.D.
90-167	8434.5	8435.6 ± 1
158-167	1131.9	N.D.

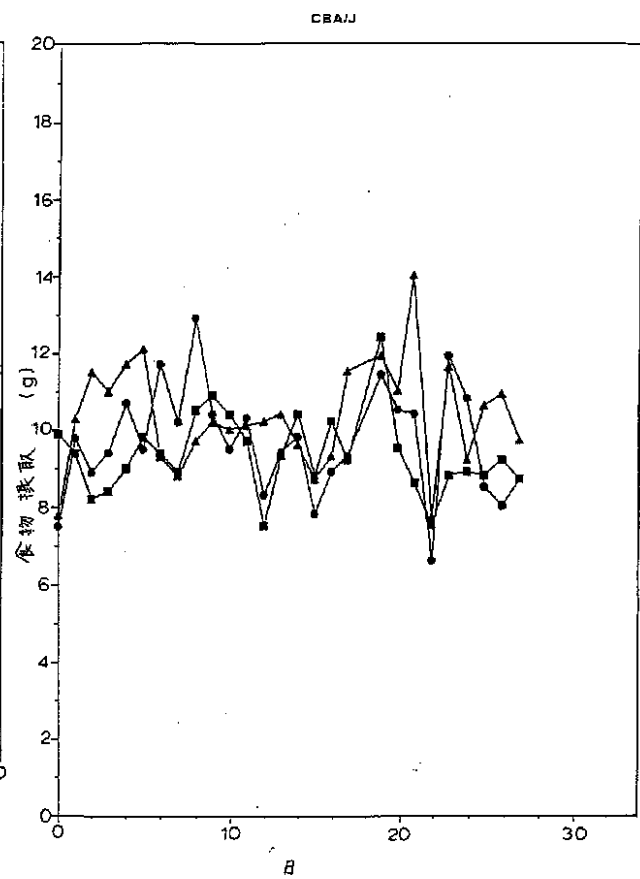
【図27】



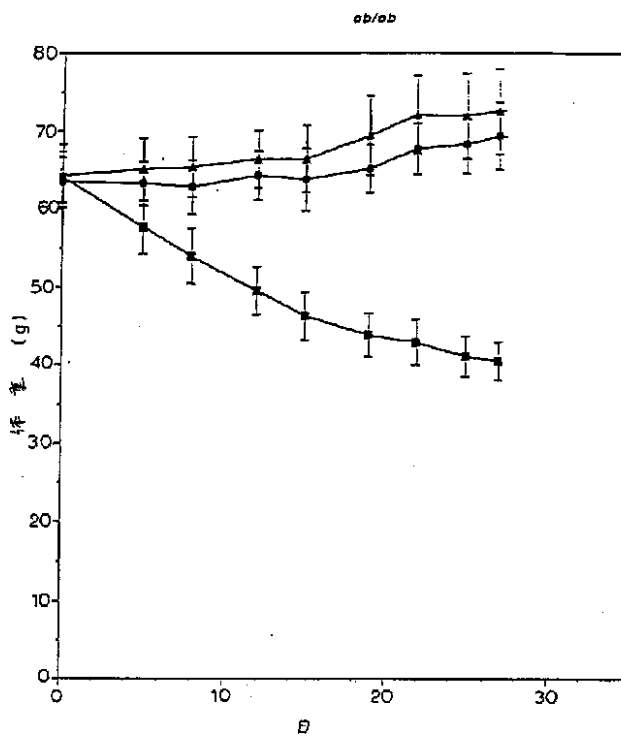
【図28B】



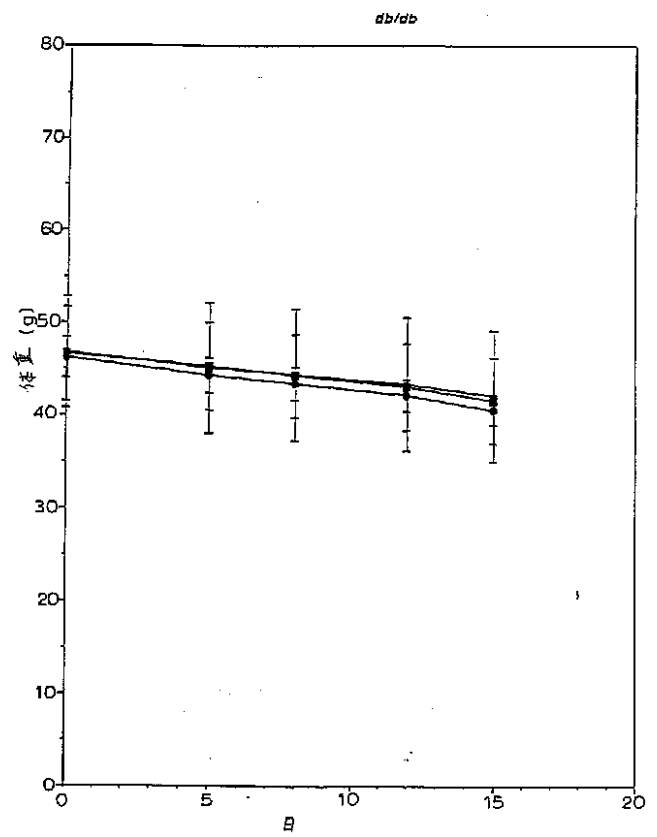
【図28C】



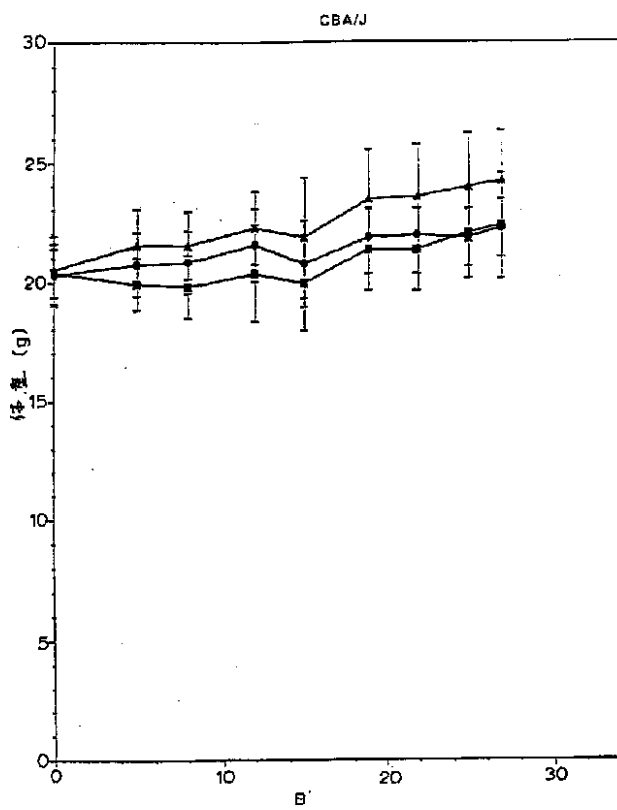
【図28D】



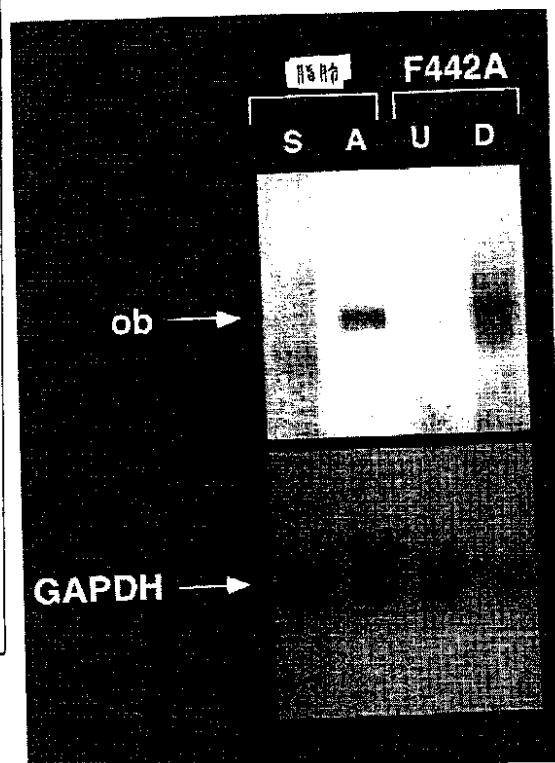
【図28E】



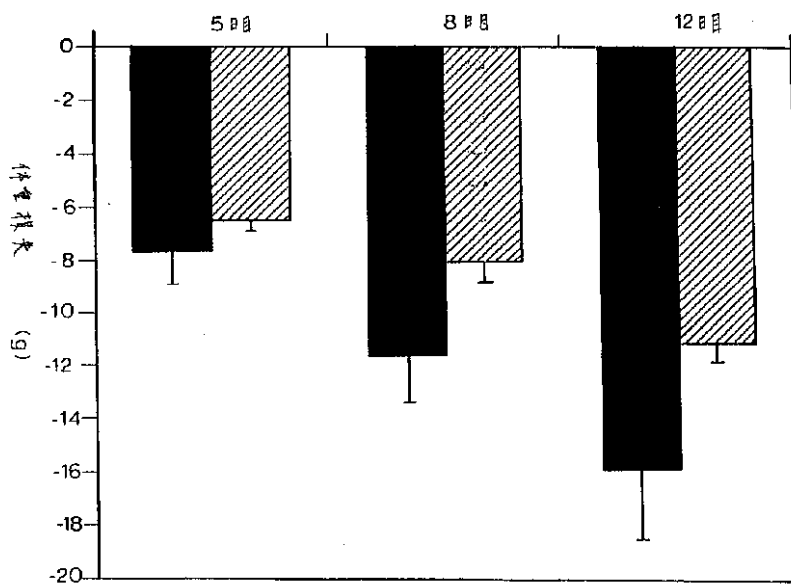
【図28F】



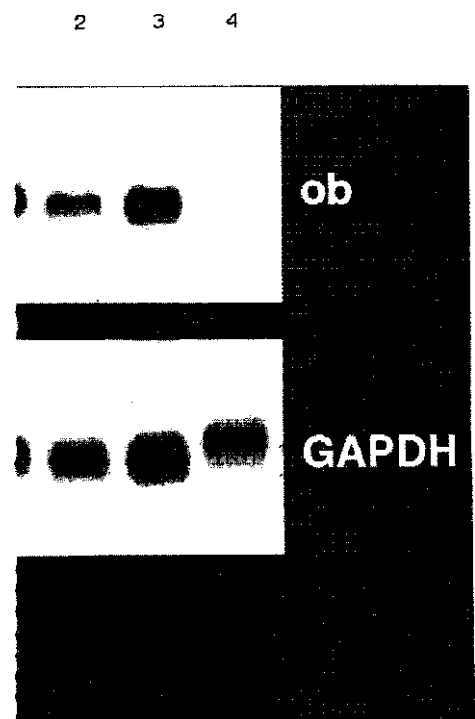
【図31】



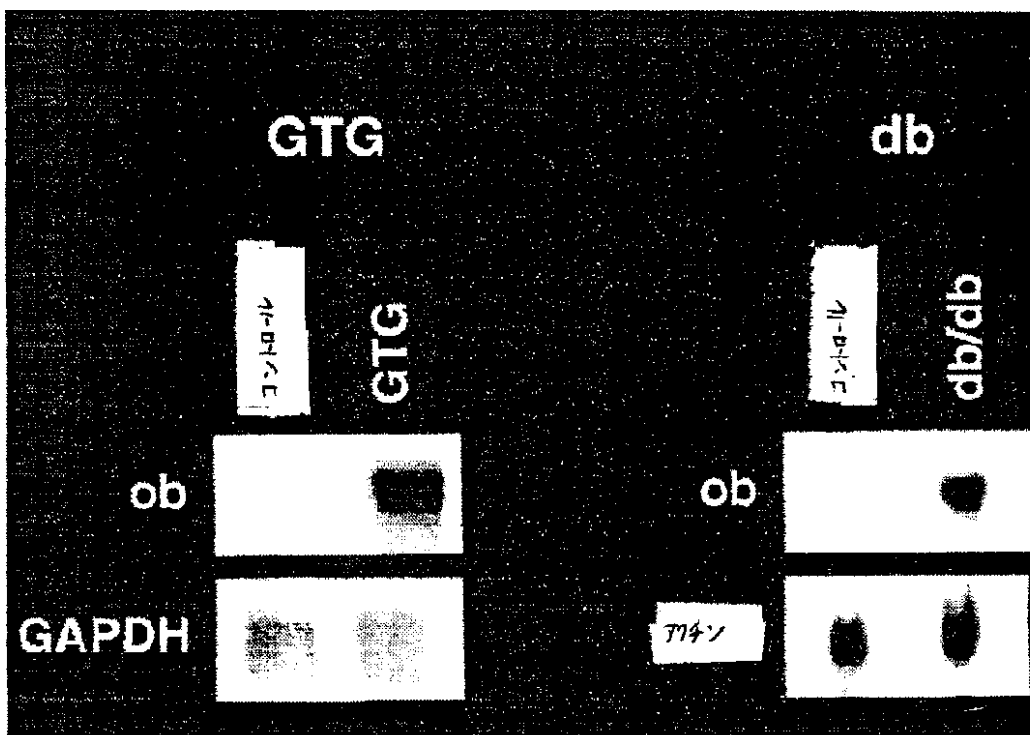
【図29A】



【図32A】



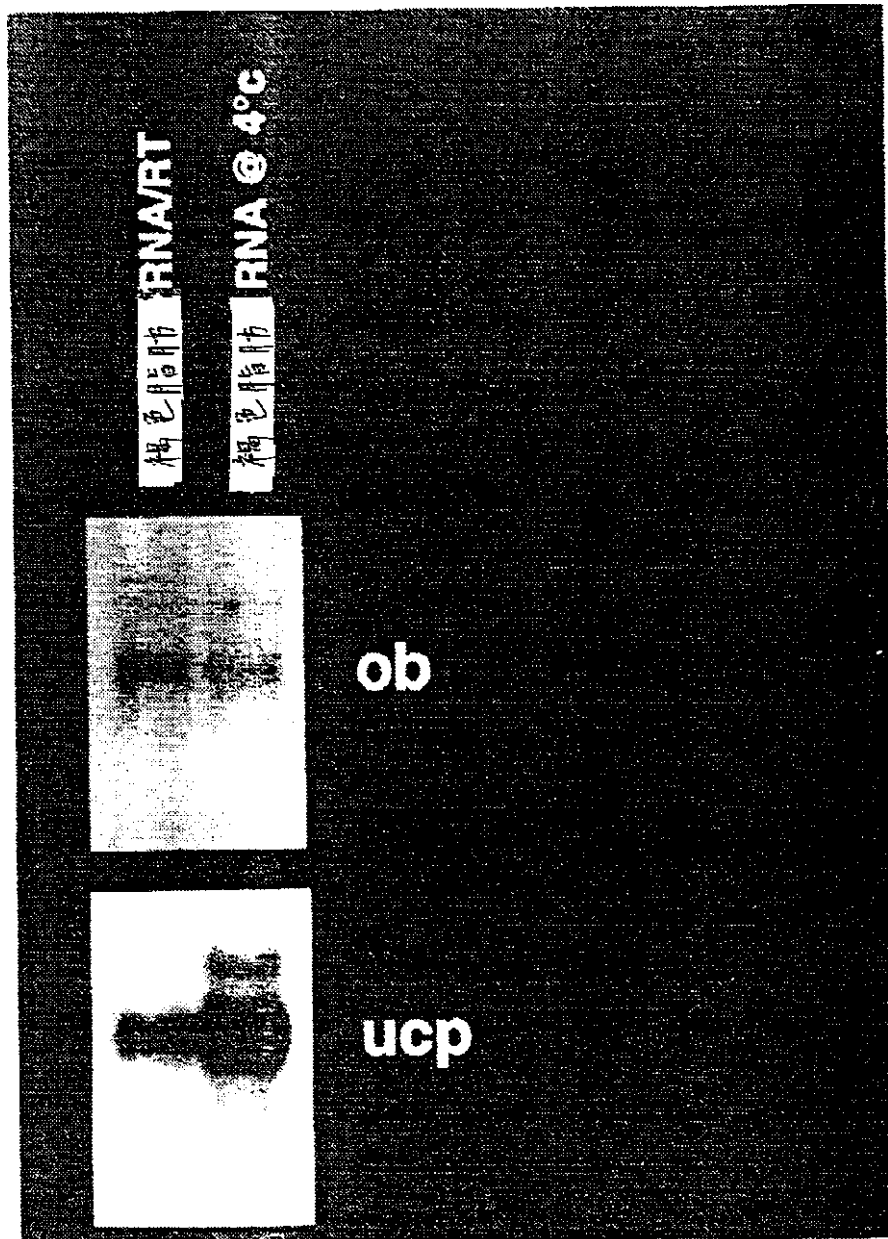
【図33】



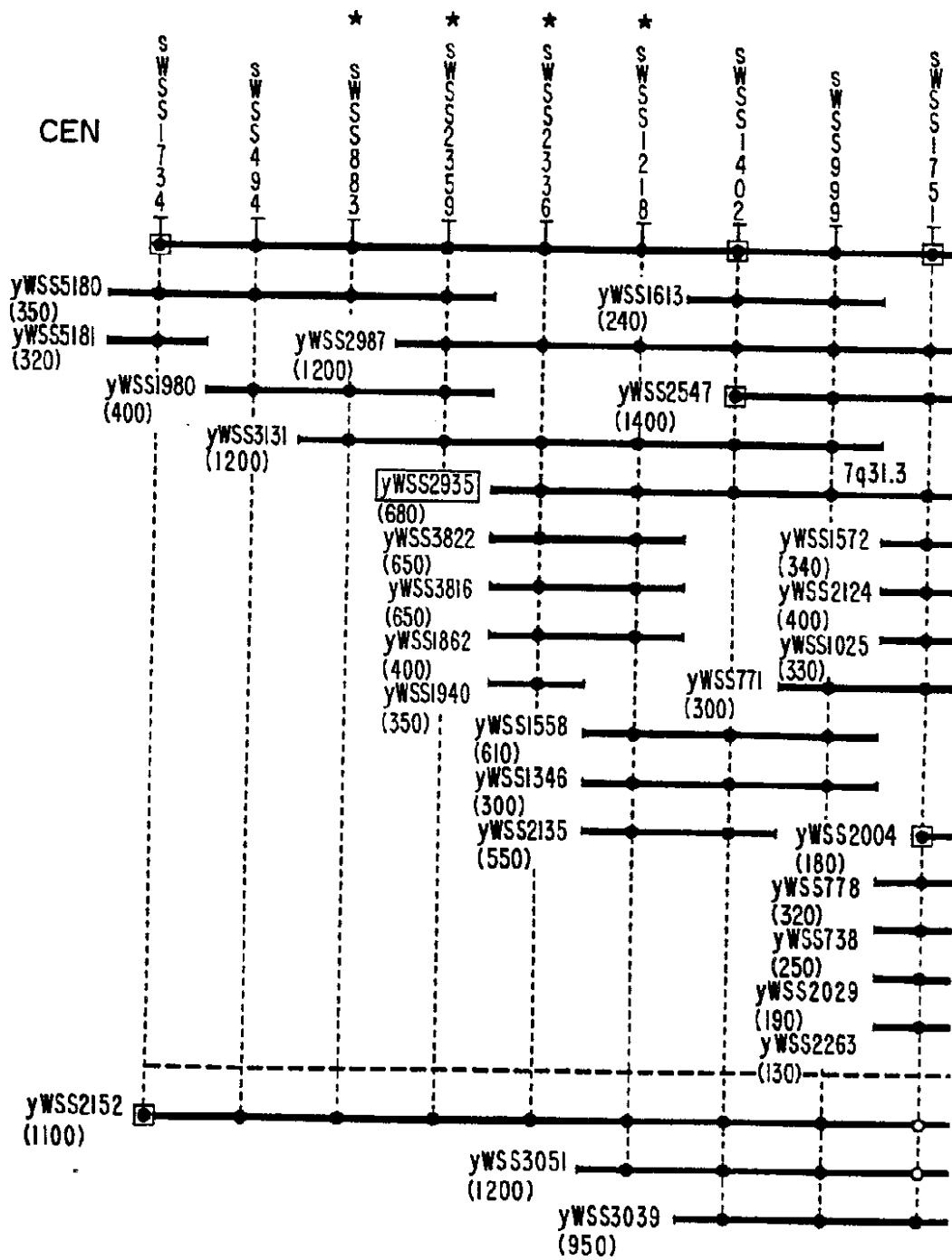
【図29B】



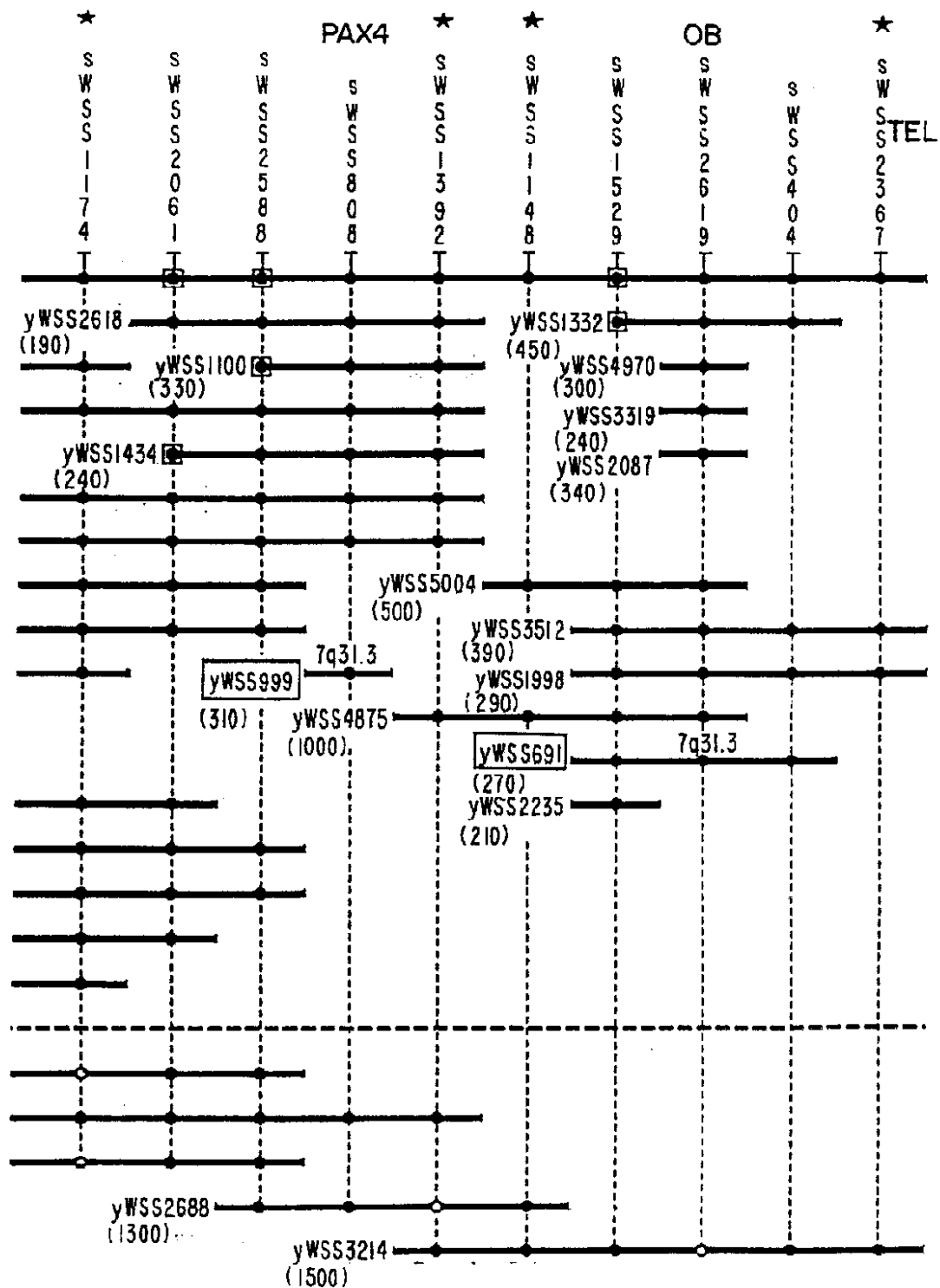
【図32B】



【図35A】



【図35B】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁷

A 6 1 K 48/00

A 6 1 P 3/04

3/06

識別記号

F I

A 6 1 P 3/06

3/10

9/12

テーマコード* (参考)

	3/10		C 0 7 K	14/47	
	9/12			16/18	
C 0 7 K	14/47		C 1 2 N	1/19	
	16/18			1/21	
C 1 2 N	1/19		C 1 2 P	21/02	C
	1/21			21/08	
	5/10		C 1 2 Q	1/68	A
C 1 2 P	21/02		(C 1 2 N	1/19	
	21/08		C 1 2 R	1:72)	
C 1 2 Q	1/68		(C 1 2 N	1/19	
//(C 1 2 N	1/19		C 1 2 R	1:85)	
C 1 2 R	1:72)		(C 1 2 N	1/19	
(C 1 2 N	1/19		C 1 2 R	1:19)	
C 1 2 R	1:85)		(C 1 2 N	1/19	
(C 1 2 N	1/19		C 1 2 R	1:07)	
C 1 2 R	1:19)		(C 1 2 N	1/21	
(C 1 2 N	1/19		C 1 2 R	1:465)	
C 1 2 R	1:07)		(C 1 2 N	1/21	
(C 1 2 N	1/21		C 1 2 R	1:38)	
C 1 2 R	1:465)			1:91)	
(C 1 2 N	1/21		(C 1 2 P	21/02	C
C 1 2 R	1:38)		C 1 2 R	1:19)	
(C 1 2 N	5/10		C 1 2 N	15/00	Z N A A
C 1 2 R	1:91)		A 6 1 K	37/02	
(C 1 2 P	21/02		C 1 2 N	5/00	B
C 1 2 R	1:19)				C
			C 1 2 R	1:91)	

(72)発明者 イイン ザン
 アメリカ合衆国 ニューヨーク 10010,
 ニューヨーク, ウォーターサイド プ
 レイス 30, アパートメント 27エフ

(72)発明者 リカード プロエンカ
 アメリカ合衆国 ニューヨーク 11102,
 アストリア, 30ティーエイチ ストリ
 ート 26-62

(72)発明者 マルガリータ マフェイ
 アメリカ合衆国 ニューヨーク 10021,
 ニューヨーク, イースト 63アールデ
 ィ ストリート 504, アパートメント
 36エス

(72)発明者 ジェフリー エル. ハラース
 アメリカ合衆国 ニューヨーク 10021,
 ニューヨーク, イースト 70ティーエ
 イチ ストリート 420, アパートメン
 ト 9ジェイ

(72)発明者 ケタン カジワラ
 アメリカ合衆国 ニューヨーク 10021,
 ニューヨーク, イースト 63アールデ
 ィ ストリート 500, アパートメント
 11エフ

(72)発明者 スティーブン ケイ. バーリー
 アメリカ合衆国 ニューヨーク 10021,
 ニューヨーク, イースト 63アールデ
 ィ ストリート 500, アパートメント
 20エイ

专利名称(译)	体重调节剂，相应的核酸和蛋白质，以及它们的诊断和治疗用途		
公开(公告)号	JP2001157591A	公开(公告)日	2001-06-12
申请号	JP2000301496	申请日	2000-09-29
[标]申请(专利权)人(译)	洛克菲勒大学		
申请(专利权)人(译)	洛克菲勒大学		
[标]发明人	ジェフリーエムフリードマン イインザン リカードプロエンカ マルガリータマフェイ ジェフリーエルハラス ケタンカジワラ スティーブンケイバーリー		
发明人	ジェフリー エム. フリードマン イイン ザン リカード プロエンカ マルガリータ マフェイ ジェフリー エル. ハラス ケタン カジワラ スティーブン ケイ. バーリー		
IPC分类号	G01N33/53 A61K31/70 A61K31/711 A61K38/00 A61K39/395 A61K45/00 A61K48/00 A61P1/00 A61P3/04 A61P3/06 A61P3/10 A61P9/12 C07H21/04 C07K7/08 C07K14/47 C07K16/18 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00 C12N5/10 C12N15/09 C12P21/02 C12P21/08 C12Q1/68 C12R1/07 C12R1/19 C12R1/38 C12R1/465 C12R1/72 C12R1/84 C12R1/85 C12R1/91		
FI分类号	A61K31/711 A61K39/395.D A61K45/00 A61K48/00 A61P3/04 A61P3/06 A61P3/10 A61P9/12 C07K14/47 C07K16/18 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02.C C12P21/08 C12Q1/68.A C12R1/72 C12R1/85 C12R1/19 C12R1/07 C12R1/465 C12R1/38 C12R1/91 C12N15/00.ZNA.A A61K37/02 C12N5/00.B C12N5/00.C A61K38/00 A61K38/16 A61K38/17 C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A C12N5/00.102 C12N5/00.103 C12N5/16		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA01 4B024/BA41 4B024/CA04 4B024/CA07 4B024/CA09 4B024/CA12 4B024/DA01 4B024/DA02 4B024/DA03 4B024/DA05 4B024/DA12 4B024/EA04 4B024/FA17 4B024/GA03 4B024/GA11 4B024/HA01 4B024/HA03 4B024/HA13 4B024/HA15 4B063/QA01 4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QQ79 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR48 4B063/QR56 4B063/QR58 4B063/QR62 4B063/QS03 4B063/QS05 4B063/QS25 4B063/QS33 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QS38 4B063/QX02 4B064/AG01 4B064/AG27 4B064/CA02 4B064/CA03 4B064/CA04 4B064/CA06 4B064/CA10 4B064/CA11 4B064/CA19 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/CE11 4B064/CE12 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA01X 4B065/AA15X 4B065/AA26X 4B065/AA41X 4B065/AA50X 4B065/AA72X 4B065/AA73X 4B065/AA76X 4B065/AA77X 4B065/AA79X 4B065/AA82X 4B065/AA88X 4B065/AA90X 4B065/AA90Y 4B065/AB01 4B065/AB04 4B065/BA02 4B065/BA08 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA43 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA07 4C084/AA13 4C084/AA17 4C084/BA21 4C084/BA22 4C084/BA44 4C084/CA17 4C084/MA52 4C084/MA56 4C084/MA59 4C084/MA65 4C084/MA66 4C084/NA14 4C084/ZA42 4C084/ZA702 4C084/ZC332 4C084/ZC352 4C085/AA13 4C085/BB11 4C085/CC03 4C085/CC04 4C085/CC05 4C085/CC32 4C085/EE01 4C085/GG02 4C085/GG03 4C085/GG04 4C085/GG05 4C085/GG06 4C085/GG08 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/AA03 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/MA52 4C086/MA56 4C086/MA59 4C086/MA65 4C086/MA66 4C086/NA14 4C086/ZA42 4C086/ZA70 4C086/ZC33 4C086/ZC35 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/BA10 4H045/BA13 4H045/BA17 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/FA74 4H045/GA23 4H045/GA26		

優先権

08/347563 1994-11-30 US
08/438431 1995-05-10 US
08/483211 1995-06-07 US

其他公开文献

JP3816737B2

外部链接

Espacenet

摘要(译)

要解决的问题：提供一种能够与编码体重调节剂的DNA分子杂交的核酸，从而能够调节哺乳动物的脂肪积累和脂肪含量。 本发明提供了能够与编码OB多肽的DNA分子杂交的可检测标记的核酸分子和反义核酸分子，能够与OB核酸的非编码区杂交的核酸，和 提供了用于扩增编码OB多肽的人基因组DNA的寡核苷酸引物。

(図28A-E、表1)。db/dbマウスの3つ全て *20

動物 性別	処理 7 ^h L-7 ^h	体重変化				
		日	n	平均	標準誤差	p
ob/ob	7 ^h L7 ^h 質媒体	1-5	10	-6.38000000	0.47628190	<0.001
			9	-0.14444444	0.24444444	
	7 ^h L7 ^h 質媒体	1-12	10	-14.45000000	0.70793126	<0.001
			9	0.98888889	0.38058597	
	7 ^h L7 ^h 質媒体	1-27	6	-24.28333333	0.69924563	<0.0001
			5	4.30000000	0.79874902	
db/db	7 ^h L7 ^h 質媒体	1-5	10	-1.47000000	0.36939891	0.240
			10	-2.00000000	0.23142073	
	7 ^h L7 ^h 質媒体	1-12	10	-3.75000000	0.77348418	0.610
			10	-4.19000000	0.34655447	
CBA/J	7 ^h L7 ^h 質媒体	1-5	10	-0.48000000	0.17876117	0.006
			10	0.38000000	0.21489015	
	7 ^h L7 ^h 質媒体	1-12	10	-0.12000000	0.45748103	0.015
			10	1.20000000	0.18378732	
	7 ^h L7 ^h 質媒体	1-27	5	1.98000000	0.48723711	<0.651
			6	2.23333333	0.20763215	