

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2005-143508

(P2005-143508A)

(43) 公開日 平成17年6月9日(2005.6.9)

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	Z N A A 2 G O 4 5
A O 1 K 67/027	A O 1 K 67/027	4 B O 2 4
C O 7 K 14/705	C O 7 K 14/705	4 B O 6 3
C O 7 K 16/28	C O 7 K 16/28	4 B O 6 5
C 1 2 N 1/15	C 1 2 N 1/15	4 C O 8 4
審査請求 未請求 請求項の数 24 O L (全 83 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2004-355464 (P2004-355464)	(71) 出願人	504029617
(22) 出願日	平成16年12月8日 (2004.12.8)		セローノ ジェネティクス インスティテ
(62) 分割の表示	特願平11-511920の分割		ュート ソシエテ アノニム
原出願日	平成10年8月6日 (1998.8.6)		フランス国, 91000 エブリー, ルー
(31) 優先権主張番号	97/10088		ト ナショナル 7
(32) 優先日	平成9年8月6日 (1997.8.6)	(71) 出願人	500025477
(33) 優先権主張国	フランス (FR)		アンスティテュ、ナショナル、ド、ラ、サ
(31) 優先権主張番号	98/05032		ント、エ、ド、ラ、ルシェルシュ、メディ
(32) 優先日	平成10年4月22日 (1998.4.22)		カル (アンセルム)
(33) 優先権主張国	フランス (FR)		INSTITUT NATIONAL D
			E LA SANTE ET DE LA
			RECHERCHE MEDIC
			AL (INSERM)
			フランス国パリ、リュ ド トルビアク、
			101
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 LSR受容体、その活性、そのクローニングならびにその肥満および関連する危険性または合併症の診断、予防および／または治療への応用

(57) 【要約】

【課題】 リポタンパク質クリアランス活性のある新規複合受容体ポリペプチドLSR(Lipolysis Stimulated Receptor)を提供する。

【解決手段】 精製または組換えLSR受容体ポリペプチド、それをコードする核酸、並びに、これらのポリペプチドまたは核酸を使用することによる、肥満関連障害または疾患の検査方法およびその治療または予防に有用な化合物の選択方法。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 2、4、6、8、10、12、16、17 及び 18 のアミノ酸配列で示されるポリペプチドの少なくとも 5 個の連続するアミノ酸を有する生物学的に活性な断片から選択されるアミノ酸配列を有する、LSR 受容体の精製または組換えポリペプチド。

【請求項 2】

上記生物学的に活性な断片が、脂肪酸結合部位、クラスリン結合部位、サイトカイン結合部位、アポタンパク質リガンド結合部位、LI/LLモチーフ、RSRSモチーフおよび疎水性領域から選択されるものであることを特徴とする、請求項 1 記載の精製または組換えポリペプチド。

10

【請求項 3】

請求項 1 または 2 記載のポリペプチドを特異的に認識することができることを特徴とする、抗体。

【請求項 4】

請求項 1 または 2 記載のポリペプチドを特異的に認識することができるモノクローナル抗体を発現することを特徴とする、ハイブリドーマ。

【請求項 5】

請求項 1 または 2 記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードすることを特徴とする、精製または単離核酸。

【請求項 6】

請求項 5 記載の核酸の相補的な配列を含むことを特徴とする、精製または単離核酸。

20

【請求項 7】

請求項 5 または 6 記載の核酸を含むことを特徴とする、組換えベクター。

【請求項 8】

請求項 1 または 2 記載の組換えポリペプチドを発現することを特徴とする、組換え細胞。

【請求項 9】

請求項 5 または 6 記載の核酸を含むことを特徴とする、組換え細胞。

【請求項 10】

請求項 7 記載の組換えベクターを含むことを特徴とする、組換え細胞。

30

【請求項 11】

請求項 5 または 6 記載の核酸あるいは請求項 7 記載の組換えベクターを含むことを特徴とする、ヒト以外の哺乳動物。

【請求項 12】

LSR 受容体ポリペプチドの発現を検出する方法であって、
a) 生物学的サンプルに、請求項 1 または 2 記載のポリペプチドを特異的に認識することができる抗体を接触させること；および
b) 前記発現の検出手段として、前記抗体と前記ポリペプチドとの免疫複合体を検出すること、
を含むことを特徴とする、前記方法。

40

【請求項 13】

肥満関連障害または疾患を検査する方法であって、
a) 生物学的サンプルに、請求項 1 または 2 記載のポリペプチドを特異的に認識することができる抗体を接触させること、
b) 前記障害または疾患の検査手段として、前記抗体と前記ポリペプチドとの免疫複合体を検出すること、および
c) 対応する標準レベルと比較して、前記免疫複合体のレベルが低減した場合に、肥満関連障害または疾患があると評価すること、
を含むことを特徴とする、前記方法。

【請求項 14】

50

肥満関連障害または疾患を検査する方法であって、

a)生物学的サンプルに、請求項 5 または 6 記載の核酸を接触させること；および

b)前記障害または疾患の検査手段として、前記生物学的サンプルの核酸における突然変異を検出すること、
を含むことを特徴とする、前記方法。

【請求項 1 5】

上記生物学的サンプルが哺乳類に由来することを特徴とする、請求項 1 2 ～ 1 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 6】

上記哺乳類がヒトであることを特徴とする、請求項 1 5 記載の方法。

10

【請求項 1 7】

肥満関連障害または疾患の治療または予防に有用な化合物を選択する方法であって、

a)請求項 1 または 2 記載のポリペプチドを候補化合物と接触させること；および

b)肥満関連障害または疾患の治療または予防に有用な前記化合物の選択手段として、前記候補化合物と前記ポリペプチドとの複合体を検出すること、
を含むことを特徴とする、前記方法。

【請求項 1 8】

肥満関連障害または疾患の治療または予防に有用な化合物を選択する方法であって、

a)請求項 8 または 9 記載の組換え細胞を候補化合物と接触させること；および

b)肥満関連障害または疾患の治療または予防に有用な前記化合物の選択手段として、前記候補化合物と前記組換え細胞との相互作用、LSR受容体の活性のモジュレーションおよび LSR受容体の発現のモジュレーションから選択される結果を検出すること、
を含むことを特徴とする、前記方法。

20

【請求項 1 9】

上記接触が、LSR受容体のリガンドの存在下で行われることを特徴とする、請求項 1 7 または 1 8 記載の方法。

【請求項 2 0】

上記リガンドが、サイトカイン、オレイン酸、LDLおよび gC1qR からなる群より選択されるものであることを特徴とする、請求項 1 9 記載の方法。

【請求項 2 1】

上記サイトカインがレプチンであることを特徴とする、請求項 2 0 記載の方法。

30

【請求項 2 2】

上記活性が、リポタンパク質の結合、細胞内取り込みおよび分解、ならびにレプチンの結合、細胞内取り込みおよび分解から選択されるものであることを特徴とする、請求項 1 8 記載の方法。

【請求項 2 3】

上記候補化合物が、ペプチド、脂肪酸、リポタンパク質、医薬および小分子量化合物から選択されるものであることを特徴とする、請求項 1 7 または 1 8 記載の方法。

【請求項 2 4】

上記肥満関連障害または疾患が、肥満、食欲不振、悪液質、心不全、冠状動脈不全、脳血管障害、アテローム性疾患、アテローム性動脈硬化症、動脈性高血圧症、非インスリン依存性糖尿病、高脂肪血症および高尿酸血症からなる群より選択されるものであることを特徴とする、請求項 1 3、1 7 および 1 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、その機能的活性、多量体複合体の各サブユニットをコードするメッセンジャー RNA に相補的な cDNA のクローニング、ベクターおよび形質転換細胞、ならびに肥満や食欲不振、高脂肪血症、アテローム性動脈硬化症、糖尿病、高血圧症などの病状および／または病因、さらに一般にはサイトカイン類の代謝における異常性に関連する種々の

50

病状の予防および／または治療用医薬として使用できる化合物の診断法ならびに選択法により特徴づけられる、新規複合受容体ポリペプチドLSR (Lipolysis Stimulated Receptor) に関する。

【背景技術】

【0002】

肥満は工業国において重大かつ広く蔓延した国民的な健康問題であり、人口の3分の1の人が理想体重よりも少なくとも20%体重を超過している。この現象は、一般には太平洋諸島などの経済が近代化している地球上の領域においてさらに悪化し続けている。米国においては、肥満人口が70年代の終わりには25%を超え、90年代の初めには33%に達している。

【0003】

肥満は、心臓血管病または代謝病を進行させる危険性を著しく増加させる。全人口が理想体重であるとしたら、冠状動脈不全の危険性は25%まで減少し、心不全および脳血管障害の危険性は35%まで減少するであろうと見積もられている。冠状動脈不全、アテローム性疾患および心不全は、肥満によって誘発される心臓血管合併症の中心となっている。30%以上の体重超過では、冠状動脈性疾患の発生率が50歳未満の患者においては2倍である。他の病気に対して行われた研究が同じことをよく表現している。20%の体重超過では、高血圧の危険性が2倍である。30%の体重超過では、非インスリン依存性糖尿病を発症させる危険性が3倍である。高脂肪血症の危険性は6倍である。

【0004】

その徴候が肥満によって促進される病気は非常に多く、高尿酸血症（全人口中3.4%であるのに対して肥満患者では11.4%）、消化器疾患、肝機能の異常、およびある種の癌さえも含まれる。

【0005】

肥満における生理学上の変化は、脂肪細胞数の増加によって、またはそれぞれの脂肪細胞中に貯えられたトリグリセリド量の増加によって、またはそれらの双方によって特徴づけられており、この体重超過は摂取したカロリー量と身体が使ったカロリー量との間の不均衡に主として起因している。この不均衡の原因に関する研究が多方面から行われている。あるものは食物の吸収メカニズム、それゆえ食物摂取を制御する分子および満腹感の研究に焦点を合わせている。他の研究は、基礎代謝、すなわち身体が摂取したカロリーを使う様式に関連している。

【0006】

提案されている肥満の治療には4つのタイプがある。食餌制限が最も頻繁に用いられている。肥満患者たちには摂取カロリーを減らすために食餌習慣を変えるよう忠告する。この種の治療は短期間で効果がある。しかしながら、再発率が非常に高い。運動によるカロリー使用の増加もまた提案されている。この治療は単独で用いる場合には効果的でないが、しかしながら低カロリー食餌療法中の患者の減量に役立つ。摂取カロリーの吸収を低下させる胃腸の手術は効果的であるが、それが引き起こす副作用のために実際には断念されている。医薬的アプローチは、中枢神経系のレベルで関与している分子の食欲不振作用の効果、または発熱を増すことによってエネルギー使用を増加させる分子の効果のいずれかを使用するものである。この種の分子の原形は、ミトコンドリア呼吸鎖の酸化的リン酸化の連結を解く甲状腺ホルモンである。この種の治療の副作用および毒性によって、それらの使用は危険なものとなる。消化管の管腔中でそれらを封鎖することによって食餌療法脂質の吸収を減らすことを目的とするアプローチもまた適切である。

【0007】

しかしながら、それは許容することが困難な生理学的不均衡：脂溶性ビタミンの吸収の欠乏、鼓腸、脂肪便を誘発する。予想された治療アプローチが何であれ、肥満の治療は総て極めて高い再発率によって特徴づけられる。

【0008】

ヒトにおける肥満の原因となる分子メカニズムは複雑であり、遺伝的および環境的因子が関与している。現在までにわかっている治療の効率が低いことから、よりよい標的医薬

10

20

30

40

50

の開発を可能とするために、肥満を決定する遺伝メカニズムを定義する必要性に迫られている。

【0009】

可能性のある候補として20を超える遺伝子が研究されているが、その理由としてはそれらが肥満が臨床兆候の1つであるような疾病に関係しているか、またはそれらが動物モデルにおける肥満に関与している遺伝子の相同体であるかのいずれかだからである。7q31染色体領域中に位置しているOB遺伝子が最も広く研究されているものの1つである。その生成物であるレプチンは満腹のメカニズムに関与している。レプチンは種々の刺激の作用下で脂肪細胞により産生された16kDaの血漿タンパク質である。ob/ob型の肥満マウスはレプチン遺伝子の欠損を示し；このタンパク質はこれらの動物の血漿中では検出できない。遺伝子工学によって得られたレプチンをob/obマウスに投与することによって、それらの関連過食症を修正し、それらの体重の標準化が可能になる。このレプチンの食欲不振作用が、中枢神経系の受容体、すなわちクラス1のサイトカイン受容体ファミリーに属するob受容体が作用し始める。このob受容体はdb/db系統の肥満マウスでは欠損している。レプチンをこれらのマウスに投与することによって、それらの食物摂取に何の効果も生じず、それらの体重を実質的に減少させることもない。ob受容体が満腹のシグナルを伝達するメカニズムは正確にはわかっていない。神経ペプチドYがこのシグナリング経路に関与している可能性がある。ob受容体が食欲の唯一のレギュレーターではないということをこの段階で明記することは重要である。この受容体を欠損させたマウスは肥満であることから、メラノコルチン4受容体もまた関与している(Gura, 1997)。

10

20

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

レプチンおよび中枢神経系のレベルでのレプチン受容体の特徴の発見によって、肥満に対する医薬を検索するための新しい道が開かれた。しかしながら、このモデルは早くに期待外れであることが判明した。実に、唯一の例外を除いて(Montague et al., 1997)、レプチンまたはそのob受容体をコードする遺伝子が、ヒト肥満患者においては通常であることが判明した。さらに逆説的に言えば、満腹ホルモン、レプチンの血漿濃度は、ほとんどのヒト肥満患者において異常に高い。この方向での治療研究努力のほとんどが、中枢神経系のレベルでのレプチンの作用の特徴づけに集中している。

30

【課題を解決するための手段】

【0011】

本発明は、レプチン排出のメカニズムの発見に研究努力を集中させることにより成り立つものである。最も広く許容された研究仮説は、肥満患者においてレプチンの血漿レベルが高いのは、このホルモンが脂肪組織によって産生され、脂肪量が肥満患者において増加するからであるということである。本発明者は異なる仮説を系統立て、肥満患者においてレプチン濃度が増加するのはこのホルモンのクリアランスが減少するからであると仮定した。この欠損はレプチン耐性症候群を引き起こし、肥満患者は高濃度のレプチンへの適切な応答を発現させる。この展望において、肥満患者の治療はレプチンレベルの増加にあるとすべきではなく、その正常化にあるとすべきである。ここで、ob型受容体がシグナリング型受容体であることを思い起こすことが必要である。これらの受容体は原形質膜のレベルでレプチンと結合することができるが、タンパク質を細胞内に入り込ませてそこで分解することはできない。ob受容体はエンドサイトーシス受容体ではない。

40

【0012】

LSR受容体

本発明者らは、受容体、特に、その活性が2倍である肝臓のLSRと呼ばれる受容体を同定した。一方で、LSR受容体は遊離脂肪酸によって活性化されるとリポタンパク質のエンドサイトーシスを可能にし、かくして、リポタンパク質のクリアランスのための経路として働く。この経路は、独占的ではないが、主に腸起源の高トリグリセリド粒子のクリアランスに対してよく働く(Mann et al., 1995)。この活性は、肝臓レベルで最も著しく発現し

50

、受容体と結合することによってこの複合体のコンホメーションに可逆変化を引き起こし、それをアポタンパク質Bまたはアポタンパク質Eを含有するものなど種々のクラスのリポタンパク質と高い親和性をもって結合させる遊離脂肪酸の存在に依存する。

【0013】

他方で、正常状態の下、遊離脂肪酸の不在下では、複合受容体LSRはリポタンパク質と結合しないが、サイトカイン、特にレプチンと結合することができ、次いでそれを取り込んで（インターナライズして）、分解することができる。

【0014】

従って、本発明は、遊離脂肪酸の存在下ではリポタンパク質と結合でき、遊離脂肪酸の不在下ではサイトカイン、好ましくはレプチンと結合できることを特徴とする、特に肝細胞の精製LSR受容体に関する。

10

【0015】

本発明によれば、このLSR受容体はさらに、結合したリポタンパク質または結合したサイトカインが細胞内へ取り込まれ、次いで分解され、その結合リポタンパク質が特にアポタンパク質BまたはEを含有することを特徴とする。

【0016】

本発明は天然形態のLSR受容体に関するものではなく、すなわちそれらは自然環境において採取されるものではなく、自然の供給源からの精製によって得られるか、またはそうでなければ、遺伝子組換えによって得られるか、またはそうでなければ、化学合成によって得られるが、この場合には以下に記載しているように非天然アミノ酸を含有し得ることが理解されるべきである。組換えLSR受容体の製造は、本発明のヌクレオチド配列の1つを用いて行ってもよく、それにより高レベルの純度の受容体を得ることができるために特に有利である。

20

【0017】

さらに具体的には、本発明は、約66kDaの分子量を有するサブユニットおよび約58kDaの分子量を有するサブユニットの少なくとも1つを含んでなる、精製ラットLSR受容体に関する。

【0018】

好ましくは、本発明の精製ラットLSR受容体は、配列番号2のアミノ酸配列もしくはそれと相同な配列を含んでなる α サブユニット、または配列番号4のアミノ酸配列もしくはそれと相同な配列を含んでなる α' サブユニット、および配列番号6のアミノ酸配列もしくはそれと相同な配列を含んでなる1つ、好ましくは3つの β サブユニットを含むことを特徴とする。

30

【0019】

本発明はまた、約66kDaの分子量を有するサブユニットおよび約58kDaの分子量を有するサブユニットの少なくとも1つを含んでなる、精製マウスLSR受容体に関する。

【0020】

好ましくは、本発明の精製マウスLSR受容体は、配列番号16のアミノ酸配列もしくはそれと相同な配列を含んでなる α サブユニット、または配列番号17のアミノ酸配列もしくはそれと相同な配列を含んでなる α' サブユニット、および配列番号18のアミノ酸配列もしくはそれと相同な配列を含んでなる1つ、好ましくは3つの β サブユニットを含むことを特徴とする。

40

【0021】

本発明はまた、約72kDaの分子量を有するサブユニットおよび約64kDaの分子量を有するサブユニットの少なくとも1つを含んでなる、精製ヒトLSR受容体に関する。

【0022】

好ましくは、本発明の精製ヒトLSR受容体は、配列番号8のアミノ酸配列もしくはそれと相同な配列を含んでなる α サブユニット、または配列番号10のアミノ酸配列もしくはそれと相同な配列を含んでなる α' サブユニット、および配列番号12のアミノ酸配列もしくはそれと相同な配列を含んでなる1つ、好ましくは3つの β サブユニットを含むことを特徴

50

とする。

【0023】

本発明のLSR受容体の特に好ましい具体例は、組換え宿主内で本発明の1以上のヌクレオチド配列を発現させることによって得られる組換えLSR受容体である。この好ましい組換え受容体は、ヒトLSR受容体の α または α' サブユニットおよび1つ、好ましくは3つの β サブユニット、特に α または α' サブユニットおよび3つの β サブユニットからなる。

【0024】

LSRのポリペプチド配列

本発明は、本発明のLSR受容体からなるポリペプチドに関する。

【0025】

本発明は天然形態のポリペプチドに関するものではなく、すなわちそれらは自然環境で採取されるものではないということが理解されるべきである。実際に本発明は、天然の供給源からの精製によって得られ、またはそうでなければ、遺伝子組換えによって得られるか、またはそうでなければ、化学合成によって得られるペプチドに関し、この場合には以下に記載しているように非天然アミノ酸を含有し得る。組換えポリペプチドの製造は、本発明のヌクレオチド配列の1つまたはこれらの配列の1つの断片を用いて行ってもよく、それにより高レベルの純度の所望のポリペプチドを得ることができるために特に有利である。

【0026】

従って本発明は、LSR受容体の少なくとも5、好ましくは少なくとも10~15の連続するアミノ酸配列、ならびに該ポリペプチドの相同体、等価体または変異体、あるいはそれらの断片の1つを含んでなる精製、単離または組換えポリペプチドに関する。好ましくは、LSR受容体の少なくとも10~15のアミノ酸配列は、LSR受容体の生物学的に有効な断片である。

【0027】

さらに具体的には、本発明は、ラットLSR受容体、マウスLSR受容体またはヒトLSR受容体の少なくとも10~15のアミノ酸配列を含んでなる精製、単離または組換えポリペプチドに関する。

【0028】

本明細書において、ポリペプチドとは、タンパク質またはペプチドを示すためにも用いられる。

【0029】

LSRのヌクレオチド配列

本発明の主題はまた、本発明のLSR受容体またはポリペプチドをコードする、精製核酸配列にある。

【0030】

本発明は、LSR受容体のゲノム、cDNAまたはRNA配列、ならびにこの核酸と相補的な核酸配列のポリヌクレオチドの少なくとも8、好ましくは少なくとも10およびさらに特には少なくとも15の連続するヌクレオチドを含んでなることを特徴とする精製核酸に関する。

【0031】

さらに具体的には、本発明は、マウスLSR受容体またはヒトLSR受容体の核配列のポリヌクレオチドの少なくとも8、好ましくは少なくとも10およびさらに特には少なくとも15の連続するヌクレオチドを含んでなる精製、単離または組換え核酸に関する。

【0032】

本発明はまた、本発明の核配列の変異、突然変異、等価または相同核酸配列、あるいはそれらの断片の1つに関する。それは最終的には、本発明の核酸配列と特異的にハイブリダイズできる配列に関する。

【0033】

従って本発明はまた、LSR受容体、特に該遺伝子の各エキソンまたは該遺伝子のエキソ

10

20

30

40

50

ンの組み合わせ、あるいはそうでなければ1以上のエキソン部分にわたって延びるポリヌクレオチドをコードする遺伝子に含まれる核酸配列に関する。好ましくは、これらの核酸は、ヒトLSR受容体の1以上の生物学的に有効な断片をコードする。

【0034】

本発明はまた、LSR遺伝子の発現を調節する1以上のエレメントをコードする精製核酸配列に関する。本発明にはまた、本発明の受容体、またはそれらの対立遺伝子変異体、突然変異、等価、もしくは相同配列、またはそれらの断片の1つをコードする遺伝子のプロモーターおよび／またはレギュレーターの核酸配列が含まれる。

【0035】

本発明はまた、本発明の核配列と特異的にハイブリダイズできる、少なくとも8のヌクレオチドを含んでなるハイブリダイゼーションのための精製核酸配列に関する。

10

【0036】

好ましくは、配列として本発明のヌクレオチド配列を有する核酸断片またはオリゴヌクレオチドを、プローブまたはプライマーとして用いることができる。

【0037】

本発明はまた、本発明の核配列を使用することを特徴とする、cDNAおよびゲノムDNAライブラリーのスクリーニング方法、本発明の受容体、およびそれらのプロモーターおよび／またはレギュレーターをコードする単離cDNAおよび／または遺伝子のクローニング方法を含んでなる。

【0038】

本発明の前記方法の1つまたは該配列とハイブリダイズすることができる配列によって得ることができる核酸配列は、本発明の一部をなす。

20

【0039】

ベクター、宿主細胞およびトランスジェニック動物

本発明はまた、本発明の核酸配列を含有するクローニングおよび／または発現ベクターを含んでなる。

【0040】

宿主細胞において該配列の発現および／または分泌を可能にするエレメントを含んでなることを特徴とする本発明のベクターもまた、本発明の一部をなす。

【0041】

本発明はさらに、本発明のベクターで形質転換された宿主細胞、特に真核細胞および原核細胞、ならびに本発明の形質転換細胞の1つを含んでなるヒトを除いた哺乳類を含んでなる。

30

【0042】

本発明の哺乳類のうち、本発明のポリペプチド、正常または変異LSR受容体、特にヒト由来の突然変異LSR受容体に相当する表現型を発現するマウス、ラットまたはウサギなどの動物が好ましい。

【0043】

これらの細胞および動物は本発明の組換えポリペプチドの製造方法に使用でき、また分析およびスクリーニングのためのモデルとしても用いられる。

40

【0044】

本発明はまた、本発明の受容体の発現および活性、該受容体と、該受容体の活性に関与し得る化学または生化学化合物との間の直接的、または間接的相互作用を試験するための、本発明の細胞、哺乳類またはポリペプチドの使用に関する。

【0045】

本発明はまた、本発明の受容体と直接的または間接的に相互作用が可能であり、および／または該受容体の発現および活性の調整が可能である化学または生化学化合物をスクリーニングするための、本発明の細胞、哺乳類またはポリペプチドの使用に関する。

【0046】

LSR受容体から誘導されるポリペプチドの製造

50

本発明はまた、本発明の合成または組換えポリペプチドの合成、特に化学合成によるかまたは本発明の核酸配列を用いる合成に関する。

【0047】

化学合成によって得られ、該組換えポリペプチドに相当する非天然アミノ酸を含んでなり得るポリペプチドもまた、本発明中に含まれる。

【0048】

組換え型での本発明のポリペプチドの製造方法はそれ自体本発明に含まれ、形質転換細胞を本発明のポリペプチド配列を有する組換えポリペプチドの発現を可能にする条件下で培養し、その組換えポリペプチドを回収することの特徴とする。

【0049】

この製造方法によって得ることができる組換えポリペプチドもまた、本発明の一部をなす。

【0050】

抗体

本発明のポリペプチドまたは受容体の特異的に認識することができる、モノ - もしくはポリクローナル抗体、またはそれらの断片、キメラまたは免疫結合抗体は、本発明の一部をなす。

【0051】

特に本発明の生物学的に有効な特定のポリペプチド、変異体または断片を特異的に認識する抗体の利点が特に注目されよう。

【0052】

本発明はまた、本発明の抗体を使用する、本発明のポリペプチドの検出および／または精製方法に関する。

【0053】

本発明はさらに、本発明の方法によって得られる、精製ポリペプチドを含んでなる。

【0054】

さらに、ポリペプチドの精製にそれらを使用することに加えて、本発明の抗体、特にモノクローナル抗体を、生物サンプル中のこれらのポリペプチドの検出に使用してもよい。

【0055】

さらに一般には、正常または変異したLSR受容体のポリペプチドの正常または異常な発現が見られることを必要とするいずれの状況においても、本発明の抗体は有利に使用することができる。

【0056】

対立遺伝子の変異性の検出および診断

本発明の核酸配列または抗体を使用することの特徴とする、対立遺伝子の変異性、突然変異、欠失、異型接合性の欠如、または遺伝子の異常性の同定方法もまた本発明の一部をなす。

【0057】

これらの方法は、患者由来の生物学的サンプルにおいて前記の少なくとも1つの配列における突然変異の存在を同定することによって、例えば肥満、その関連する危険性、またはサイトカイン類の代謝異常に関連する疾病素質を診断する方法に関する。分析する核酸配列は、ゲノムDNA、cDNAまたはmRNAのいずれであってもよい。

【0058】

本発明に基づく核酸または抗体を用いて、独立して採られた患者における陽性および示差診断、または危険性を持つ患者、特に家族履歴を有する患者において前症状診断を行うこともできる。

【0059】

さらに、特異的な突然変異の検出を、特に症状の強さ、またはそれが出現しそうな期間に関して、さらなる診断を行ってもよい。

【0060】

10

20

30

40

50

目的化合物のスクリーニング

本発明の受容体またはポリペプチドまたはヌクレオチド配列と直接的または間接的に相互作用することができ、および／またはLSR受容体の発現または活性を調整させることができる化学または生化学化合物を選択する方法もまた、本発明に含まれる。

【0061】

本発明は、特にLSR受容体をコードする遺伝子に含まれる核酸配列と相互作用可能な化学または生化学化合物を選択する方法に関し、該方法は、LSR受容体または該受容体の断片を発現する宿主細胞を該核酸配列の発現または発現の調節を修飾することができる候補化合物と接触させ、LSR受容体の発現または活性の修飾を直接的または間接的に検出することを含んでなる。

10

【0062】

本発明はまたLSR受容体と相互作用可能な化学または生化学化合物を選択する方法に関し、該方法は、LSR受容体または該受容体の断片、あるいはLSR受容体または該受容体の断片を発現する宿主細胞をLSR活性を修飾することができる候補化合物と接触させ、LSR受容体活性の修飾または候補化合物と該LSR受容体または該ポリペプチドとの間の複合体の形成を直接的または間接的に検出することを含んでなる。

【0063】

本発明はまた、LSR受容体と相互作用可能な化学または生化学化合物の選択方法に関し、該方法は、LSR受容体もしくは該受容体の断片、またはLSR受容体もしくは該受容体の断片を発現する宿主細胞を、LSR活性を修飾できる候補化合物に接触させ、次いで、LSR受容体の活性の修飾、または候補化合物と、該LSR受容体または該ポリペプチドの間の複合体の形成を直接的、または間接的に検出することを含んでなる。

20

【0064】

本発明は、LSR受容体と直接的または間接的に相互作用可能な化合物、ならびにLSR受容体の1以上の核酸配列と相互作用可能な化合物を含んでなる。それはまた、本発明の受容体の発現または活性を調整させる化学または生化学化合物を含んでなる。本発明の1つの方法によって選択される化合物はまた、本発明の一部をなす。

【0065】

特に、本発明のこれらの化合物のうち、本発明の抗体、本発明のポリペプチド、本発明の核酸、オリゴヌクレオチドおよびベクター、またはレプチンもしくはその誘導化合物の1つ、好ましくはそのタンパク質変異体、または化学的に修飾されるか、もしくは遺伝子組換えによって得られるレプチン、またはタンパク質gC1qRもしくはその類似体の1つ、またはそれらの断片の1つが好ましい。

30

【0066】

本発明は最終的には、肥満および食欲不振、高脂肪血症、アテローム性動脈硬化症、糖尿病、高血圧症などの病状および／または病因、およびさらに一般にはサイトカイン類の代謝異常に関連する種々の病状の予防用医薬として、本発明の受容体の発現または活性を調整させることができる化合物を含んでなる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0067】

40

LSR受容体

本発明は、少なくとも1つの α または α' サブユニットおよび少なくとも1つの β サブユニットからなる精製LSR受容体(Lipolysis Stimulated Receptor)、好ましくは肝臓の精製LSR受容体に関する。 α サブユニットは、ラットおよびマウスにおいては約66kDaの分子量を有し、ヒトにおいては約72kDaの分子量を有する。 α' サブユニットは、ラットおよびマウスにおいては約64kDaの分子量を有し、ヒトにおいては約70kDaの分子量を有する。 β サブユニットは、ラットおよびマウスにおいては約58kDaの分子量を有し、ヒトにおいては約64kDaの分子量を有する。

【0068】

本発明者らは、最も豊富で、おそらくは最も活性が高いということにより、LSR受容体

50

の形態がその中に α または α' サブユニットおよび3つの β サブユニットが存在するものであるという仮説を立てた。しかしながら、一方では α および α' サブユニット、また他方で β サブユニットが異なる生物学的作用を有し、細胞の中では、その3つの作用は受容体の形態においてそれらの集合体とは独立に細胞の中で働いている可能性がある。

【0069】

本発明者らはまた、LSR受容体と約33kDaの分子量を有するgClqR受容体、または相同タンパク質との間に複合体が形成し得ることを認めた。gClqR受容体は一時的にLSR受容体と結合しており、Clqタンパク質または相同タンパク質の存在によってgClqRがLSR受容体から解離するだけでなく、脂肪酸の不在下を含めて、LSR受容体を活性化することを可能にする。

10

【0070】

LSR受容体の活性および応用

従って、本発明は、遊離脂肪酸の存在下でリポタンパク質と結合し、遊離脂肪酸の不在下でサイトカイン、好ましくは結合レプチン、リポタンパク質およびサイトカインと結合して、細胞によって取り込まれ、次いで分解されることができ、また該受容体がさらにgClqRタンパク質またはその類似タンパク質の1つと結合することができることを特徴とする受容体、特に肝細胞の受容体に関する。

【0071】

リポタンパク質のクリアランス

LSR受容体は腸起源のリポタンパク質および高トリグリセリド粒子、特にVLDLおよびカイロミクロンの排出の主要経路を表す。LSR受容体はまた、LDL、高コレステロール粒子の排出経路として役立ち、それらはたいていLDL受容体経路によって除去されるが、それらの約30%がLDL受容体とは異なる経路によって肝臓レベルで排出されている。

20

【0072】

本発明者らは実際に、LSR受容体がリポタンパク質、特に高トリグリセリド粒子と結合し、次いでそれらを取り込み、分解することができることを実証した。受容体によるこのリポタンパク質クリアランス活性は、遊離脂肪酸、例えばオレイン酸塩の存在を必要とし、LSRに、またはLSR由来のペプチドに向けられた抗体の存在下で阻害される。

【0073】

サイトカインのクリアランス

本発明者らはまた、遊離脂肪酸、例えばオレイン酸塩の不在下でLSR受容体がサイトカイン類、好ましくはレプチンと結合することができることを実証した。しかしながら、レプチンのクリアランス作用は、肝臓リパーゼにより、または脂肪組織のホルモン感受性リパーゼによって産生された脂肪酸と結合していない場合にのみ起こり得る。一度サイトカイン類が結合すれば、LSR受容体はそれらを取り込んで分解する。このサイトカイン、好ましくはレプチンの分解活性は、LSRに、またはLSR由来のペプチドに向けられた抗体によって阻害される。

30

【0074】

本発明者らは、それがサイトカイン類、好ましくはレプチンの結合に特に最も関与しているLSR受容体の α サブユニットであることを示した。

40

【0075】

さらに本発明者らは、マウスによってin vivoにおいてLSR受容体がサイトカイン類、好ましくはレプチンの肝臓取り込みを行うことを示した。

【0076】

総てのヒト肥満患者においてレプチンが高レベルであることは、レプチンの肝臓クリアランスを低下させることができるいくつかの分子メカニズムによって説明することができる、特に以下を含む：

- LSRの1以上の遺伝子、および／またはそれらのプロモーターの改変、
- 転写後修飾によるサイトカイン競合コンホメーションからリポタンパク質受容体コンホメーションへ移行させるアロステリック再編成の促進、

50

- c)原形質膜からの、または原形質膜に向ってのLSRを含有する小胞の輸送の不全（この機能は細胞骨格の完全性に依存する）、
d)LSRの分解の増加、
e)受容体をリポタンパク質のクリアランスへと転換することにより、レプチンを分解能を部分的に低下させる脂肪カロリー比率の増加。

【0077】

サイトカイン類によるLSR活性の制御

最終的に本発明者らは、サイトカイン類、好ましくはレプチンが遊離脂肪酸の存在下でLSR受容体の活性を調整するということを実証した。さらに詳しくは、サイトカイン類はLSR受容体のリポタンパク質クリアランス活性、より正確にはVLDLおよびLDLの結合、取り込みおよび分解を増強させる。このLSR活性の増強は、エンドサイトーシス小胞の起動に次いでタンパク質合成が増加し、次いで細胞表面でLSR受容体の見掛けの数が増加した結果であろう。さらに本発明者らは、マウスによって、*in vivo*でサイトカイン類、好ましくはレプチンが食後の脂肪血応答を低下させることが可能なことを示した。

10

【0078】

従って、レプチン、およびおそらく他のサイトカイン類は、LSR活性のレギュレーターである。レプチン、または他のサイトカイン類に対する耐性症候群は、恒常的かまたは食後状態に限定される高トリグリセリド血症をもたらす可能性がある。

【0079】

肥満の治療

レプチンのクリアランスにおいてLSRが果たす役割によって、肥満の治療に用いる計画の修正を必要とする生理病理学的モデルを組み立てることが可能となる。実際には、このホルモンの生理学的変動を回復させるためにヒト肥満患者においてレプチン濃度を低下させることが不可欠である。

20

【0080】

従って、肥満の治療用化合物を用いて、LSR受容体の数、それらの再生速度、またはそれらのコンホメーションの変化の調整を可能にし、および／または特に、

- 1.レプチン血症、それゆえの満腹感および空腹感の制御、
 - 2.正常なレプチン濃度の回復、ならびに空腹感および満腹感の正常な認知による食餌習慣の正常な調節、
 - 3.トリグリセリド血症の制御、
 - 4.カイロミクロン残留物、高アテローム性粒子の血漿濃度の調節、
- を可能にすることを予想することができる。

30

【0081】

腸領域リポタンパク質の肝臓クリアランスにおいてLSR受容体が果たす役割によって、末梢組織、特に脂肪組織と肝臓との間での食餌起源の脂肪の分配を調整するために、LSRの発現および／または活性を調整することができる化合物を使用することが考えられるようになる。肥満の治療は、リポタンパク質の肝臓での分解を促進し、それによって脂肪組織中へのそれらの貯蔵を減じ、かつ、それらの血漿濃度を調節することからなる。後者の作用によって、肥満に関連する危険性、特にアテローム発生の危険性を低減するために、かかる化合物を使用することが考えられるようになる。

40

【0082】

食欲不振および悪液質の治療

LSRの活性を調節する方法を用いて神経性食欲不振を特徴付ける悪循環を克服することを可能とする治療の導入が考えられるようになる。受容体の数を減じることによって、食欲不振または栄養不良患者における体重増加を促進することができるはずである。

【0083】

これらの状況の下では、LSRの合成、またはレプチンおよび／またはリポタンパク質と結合する能力の阻害、またはそうでなければ受容体の異化作用の増加のいずれかを減少させる合成ペプチドまたは薬剤分子の使用によって、レプチンのクリアランスを選択的に阻

50

害することが有利である。

【0084】

サイトカイン類の代謝異常の治療

以下に記載するように、LSRの α サブユニットの一次構造の解析によって、それらの受容体上に存在するサイトカイン結合部位に相同な部位、ならびにリソゾーム中でのエンドサイトーシスおよびリガンドの急速分解を可能にする2つのルーティングシグナルが示される。この観察は、サイトカイン受容体がリガンドの取り込み（インターナリゼーション）および分解を可能にするわけではないという点で新しい。これらの受容体はそれらの細胞内シグナリング特性に基づいて特徴づけられている。

【0085】

従って、それがリポタンパク質およびレプチンのタンパク質分解を可能にする特性を有することに加えて、LSR受容体もまた他のサイトカイン類の分解を行う可能性が高い。この機能は、抗LSR抗体および実施例4に記載のLSRの α サブユニットを発現するトランスフェクトされたCHO細胞により研究することができる。サイトカイン類のクリアランスにおけるLSRの関与は、これらの分子が脂質代謝の調節、グルコース代謝の調節、ならびに食物摂取および体重増加の調節において重要な役割を果たしているため、不可欠なものである。

【0086】

サイトカイン類が肥満およびその合併症に關与する生理学的機能を調整する分子メカニズムは多数あり、かつ複雑である。しかしながら、サイトカイン類の代謝異常が、ウイルス、細菌または原生動物感染をしばしば伴う高トリグリセリド血症に關与しているという事実には注目する価値がある。さらに、サイトカイン類、より詳しくは、腫瘍壊死因子(Tumor Necrosis Factor)(TNF)は、肥満関連糖尿病のある型において観察されるものと類似する一時的な高トリグリセリド血症を誘発する。

【0087】

肥満マウスの肝臓において発現したLSR受容体数の減少により、いくつかのサイトカイン類の排出不全を説明することができ、この不全が肥満においてみられるような代謝障害を引き起こす。培養肝細胞および以下に引用した肥満動物の種々のモデルの使用によって、総てのサイトカイン類、より詳しくは、体重減少を誘発するもの(IL-6、LIF、OSM、CNTF、IL-11、IL-12 α 、ならびにTNF α およびTNF β)のうち、LSRの発現および／または活性を調整するものを同定することが可能となるであろう。かかるサイトカイン類の同定は、例えば実施例4~6に示されたような方法を用いて行うことができる。

【0088】

最後に、 α LSRの一次構造の解析により、可能性あるリン酸化部位が明らかとなる。このことによって、LSR受容体による細胞活性の調節の展望が開かれる。特に重要な例としては、サイトカイン類をはじめとする種々の刺激の起動力の下での、急性期タンパク質(Acute Phase Proteins)の産生調節へのLSRの関与が挙げられよう。

【0089】

さらに、サイトカイン類のクリアランスおよび分解へのLSRの関与は肝臓に限定されるものではない。実際には、LSRの発現は肝臓に優先的であることが実証されているものの、この受容体の発現がこの器官に限定されるものではないことも確かである。種々のヒト組織での予備的ノーザンブロット解析により、肝臓生成物に加えて、腎臓および睪丸における発現生成物を明らかにすることができた。さらに解析を通じて、ヒトにおいてLSRを発現する種々の組織を示すことができるであろう。この展望において、LSRは肝臓レベルだけではなく、末梢組織のレベルにおいてもサイトカイン類の分解に關与している可能性がある。この活性の欠損は、自己免疫疾患、多発性硬化症および関節リウマチの病因に關与している可能性がある。これらの疾病の病因においては、サイトカイン類の蓄積がしばしば見られる。

【0090】

LSR受容体のポリペプチド配列

本発明は、本発明のLSR受容体のエレメントであるポリペプチドに関する。本発明は、より詳しくは、LSR受容体の α 、 α' または β サブユニットを構成するポリペプチドに関する。

【0091】

本発明は、さらに詳しくは、LSR受容体、ならびに該ポリペプチドの相同体、等価体または変異体、またはそれらの断片の1つの、少なくとも5、好ましくは少なくとも10~15の連続するアミノ酸配列を含んでなる、精製、単離または組換えポリペプチドに関する。好ましくは、LSR受容体の少なくとも10~15のアミノ酸配列は、LSR受容体の生物学的に有効な断片である。

【0092】

好ましくは、本発明は、ラットLSR受容体、マウスLSR受容体またはヒトLSR受容体の少なくとも10~15のアミノ酸配列を含んでなる、精製、単離または組換えポリペプチドに関する。

【0093】

本発明の第1の好ましい具体例では、ポリペプチドは、配列番号2、配列番号4および配列番号6の配列、ならびにこのポリペプチドの変異体、等価体もしくは相同体、またはそれらの断片の1つからなる群より選択される配列の少なくとも10~15の連続するアミノ酸配列を含んでなることを特徴とする。好ましくは、このポリペプチドは前記配列の1つの相同体または生物学的に有効な断片である。

【0094】

本発明の第2の好ましい具体例では、ポリペプチドは、配列番号16、配列番号17および配列番号18の配列、ならびにこのポリペプチドの変異体、等価体もしくは相同体、またはそれらの断片の1つからなる群より選択される配列の少なくとも10~15の連続するアミノ酸配列を含んでなることを特徴とする。好ましくは、このポリペプチドは前記配列の1つの相同体または生物学的に有効な断片である。

【0095】

本発明の第3の好ましい具体例では、ポリペプチドは、配列番号8、配列番号10および配列番号12の配列、ならびにこのポリペプチドの変異体、等価体もしくは相同体、またはそれらの断片の1つからなる群より選択される配列の少なくとも10~15の連続するアミノ酸配列を含んでなることを特徴とする。好ましくは、このポリペプチドは前記配列の1つの相同体または生物学的に有効な断片である。

【0096】

本発明の好ましいポリペプチドのうち、配列番号8、配列番号10または配列番号12のヒト配列を有するポリペプチド、ならびに配列番号2、配列番号4または配列番号6のラット配列を有するもの、あるいは配列番号16、配列番号17または配列番号18のマウス配列を有するものが特に注目されよう。図1~6に表されたドメインに相当する断片は、表1、3および4に示されており、その配列上の位置は、配列番号2、8または16と対応している。

【0097】

最後に、本発明はまた、配列番号29および配列番号30のポリペプチドに関する。

【0098】

本発明はまた、前記のポリペプチド、ならびにそれらの相同、等価または変異ポリペプチド、ならびに該ポリペプチドの断片、好ましくは生物学的に有効な断片を含んでなるポリペプチドに関する。

【0099】

本発明のポリペプチドのうち、該ポリペプチドが本発明の受容体のエレメントであることを特徴とする、前記のアミノ酸配列から選択されるアミノ酸配列を含んでなるか、またはそれからなるポリペプチドもまた好ましい。

【0100】

LSR受容体の α 、 α' および β サブユニットのポリペプチド配列の解析

本出願に記載の3個体のラットcDNAの生成物の系統的な解析は図1に示されている

10

20

30

40

50

。ラットLSR受容体の α サブユニット、より長いcDNA(LSR-Rn-2097)によりコードされたタンパク質は以下の特徴を有する。

【0101】

可能性のあるグリコシル化部位は、12~14および577~579位に認められる。グルコサミノグリカンの可能性のある結合部位は14~17位に認められる。

【0102】

いくつかのリン酸化部位はNH₂末端のレベルに局在化しており(193~196、597~600、169~171、172~174、401~403、424~426、464~466、467~469、185~188、222~225、436~439、396~399、504~507、530~533、624~627、608~615)、このことは、後者が細胞内領域へと向かっていることを示唆している。

10

【0103】

さらに、このタンパク質はNH₂末端に、2つのアームが疎水性アミノ酸からなるヘアピン構造を誘導する2つのアミノ酸により2つの部分に分けられる疎水性アミノ酸配列を有する。この領域がLSRの脂肪酸結合部位を表すと推定するのは理にかなったことである。かくして生成されたこのグローブフィンガー構造は、脂肪族炭化水素鎖を供給することができる。より厳密には、この2個のアミノ酸はラットLSRの場合、 α サブユニットのポリペプチド配列の31および33位に位置する2個のプロリンである。

【0104】

さらにNH₂末端部位は、コーティングされたピット (coated pits) の内表を覆うタンパク質、クラスリンに結合するための共通配列である(Chen et al., 1990)。原形質膜のこれらの特異的領域は、膜タンパク質の急速なエンドサイトーシスを可能にする。かかる共通配列は、GRAMのLRP- α_2 -マクログロブリン受容体およびLDL受容体レベルにおいて認められる(Herz et al., 1988; Lee et al., 1990; Goldstein et al., 1995)。このレベルにおける突然変異の結果は、LDL類のインターナリゼーションの実質的な遅延であり、家族性高コレステロール血症を誘発する(Davis et al., 1986)。

20

【0105】

次いでこの受容体は、可能性のあるトランスメンブランダメインを構成する疎水性アミノ酸配列を有する。このセグメントの長さは、リン脂質二重層の通過を一度だけ可能にする(Brendel et al., 1992)。

【0106】

このクラスリン結合シグナルと単一トランスメンブランセグメントに相当する疎水性鎖の間には、LIとLLの2つのモチーフがある(Letourneur et al., 1992)。これら2つのモチーフは以下のタンパク質において見出される: glut 4グルコース担体(Verhey et al., 1994); 非変異鎖および組織適合性複合体クラスII(Zhong et al., 1997; Parra-Lopez et al., 1997)。これらのシグナルは、周縁膜系におけるタンパク質のエンドサイトーシスおよび細胞内への接近を制御する。

30

【0107】

また、C末端部位には、サイトカイン受容体と相同性を示すシステイン豊富領域が存在し、より詳しくは: TNF1および2(腫瘍壊死因子1および2)受容体; 低親和性NGF(神経成長因子)受容体; ショーブ繊維腫ウイルスTNF可溶性受容体; CD40、CD27およびCD30、サイトカインCD40L、CD27LおよびCD30Lの受容体; T細胞タンパク質4-1BB、推定サイトカイン4-1BBLの受容体、FAS抗原(AP0 1)、アポトーシスに関与するFASLタンパク質の受容体、T細胞OX40抗原、サイトカインOX40L受容体、およびワクシニアウイルスA53タンパク質(サイトカイン類およびそれらの受容体、1996; Barmer et al., 1993)である。

40

【0108】

このシステインリッチセグメントに加えて、選択的に+および-の荷電を持つアミノ酸領域が存在する(Brendel et al., 1992)。この領域はアポタンパク質リガンドApoBおよびApoEの可能性のある結合部位を提供する。

【0109】

この領域は、さらにラミン(Sios et al., 1994)およびSF2'(Krainer et al., 1991)に

50

において認められるRSRSモチーフを含有する。

【0110】

LSR-Rn-2040 cDNAによりコードされるこのLSR α' 型は、そのロイシン重複が選択的スプライシングにより除去されたLI/LLエレメントを除き、LSR-Rn-2097 cDNAによりコードされるLSR α 配列に基づく前記の総てのドメインを有する。従って、非常によく似た配列は有するものの、LSR-Rn-2097によりコードされる α サブユニットおよびLSR-Rn-2040によりコードされる α' は、それらの再生速度および接近が異なる。LSR-Rn-1893によりコードされる β 型はトランスメンブランドメインまたはシステインリッチ領域を持たず、かつ、サイトカイン受容体と相同である。しかしながら、それはNH₂末端レベルにおいてプロリンの反復により分断される、荷電アミノ酸およびRSRSモチーフが豊富な疎水性領域を有する。このエレメントは、おそらくそれがジスルフィド結合を介してLSR-Rn-2040の生成物またはLSR-Rn-2097の生成物のいずれかと結合している場合は、完全に細胞外に位置している。

【0111】

以下の表1は、前記の種々のドメインまたはモチーフを挙げており、それらがLSR受容体の各サブユニットに属しているか否か、ならびに該ドメインまたはモチーフの開始および終了位置、または配列番号2の配列に示されているようなドメインまたはモチーフを有する領域の位置を示している。

【表1】

表1

ドメインまたはモチーフ	配列番号2の位置		存 在		
	開始	終了	α	α'	β
可能性のある脂肪酸結合部位	23	41	X	X	X
可能性のあるクラスリン結合部位	104	107	X	X	X
輸送に関するシグナル: LI LL	183	184	X	X	X
	195	196	X		
トランスメンブランドメイン	204	213	X	X	
可能性のあるサイトカイン受容体部位	214	249	X	X	
RSRSモチーフ	470	473	X	X	X
可能性のあるリポタンパク質リガンド結合部位	544	557	X	X	X

【0112】

ラット、マウスおよびヒトにおけるLSR受容体のポリペプチド配列の比較

ラット、マウスおよびヒトにおける、本発明の3種のLSR受容体サブユニットのポリペプチド配列の長さ、ならびに一覧表にはそれらの典型的な配列の配列番号を含めて以下の表2aに示す。

【表 2 a】

表2a

ポリペプチド	ラット	マウス	ヒト
α サブユニット	593 aa (配列番号2)	594 aa (配列番号16)	649 aa (配列番号8)
α' サブユニット	574 aa (配列番号4)	575 aa (配列番号17)	630 aa (配列番号10)
β サブユニット	525 aa (配列番号6)	526 aa (配列番号18)	581 aa (配列番号12)

10

【0113】

これらのポリペプチド配列はラット、マウス、ヒトの相当するcDNA配列の3種各々から得たものであり、後に詳細が記載される。これらのcDNA配列を設計するために使用される命名法は、それらのヌクレオチド長、ならびに一覧表にはそれらの典型的な配列の配列番号を含めて反映しており、以下の表2bに示されている。

20

【表 2 b】

表2b

cDNAc	ラット	マウス	ヒト
α サブユニット	LSR-Rn-2097 (配列番号1)	LSR-Mm-1886 (配列番号13)	LSR-Hs-2062 (配列番号7)
α' サブユニット	LSR-Rn-2040 (配列番号3)	LSR-Mm-1829 (配列番号14)	LSR-Hs-2005 (配列番号9)
β サブユニット	LSR-Rn-1893 (配列番号5)	LSR-Mm-1682 (配列番号15)	LSR-Hs-1858 (配列番号11)

30

【0114】

LSR-Hs-2062配列から推定されるLSR受容体の α サブユニットに相当するタンパク質配列は649アミノ酸の長さである。これはLSR-Mm-1886から推定されるアミノ酸長594のタンパク質配列と、LSR-Rn-2097から推定されるアミノ酸長593のタンパク質配列とを整列させたものである(図2)。タンパク質配列の保存性は極めて高い(それぞれ591および590個の重複アミノ酸について80.2%および82.2%の一致)。ラットLSR α のタンパク質配列において同定された機能的ドメインは、ヒトLSR α 配列ならびにネズミLSR α においても見られる(図2)。

40

【0115】

LSR-Hs-2005(α')およびLSR-Hs-1858(β)型に相当するヒトタンパク質は、それぞれ630および581アミノ酸の大きさであると推定されている。LSR-Rn-2040(α')およびLSR-Rn-18

50

93(β)型に相当するラットタンパク質はそれぞれ574および525アミノ酸の大きさであると推定されている。LSR-Mm-1829(α')およびLSR-Mm-1682(β)型に相当するネズミタンパク質はそれぞれ575および526アミノ酸の大きさであると推定されている。3つのヒト型(図3)、ラットで推定される3つの型(図4)、マウスで推定される3つの型(図5)の並び方は、この3種において総てのタンパク質型がクラスリンおよびRSRSモチーフに結合するためのNPGYシグナルを保存していることを示している。ヒト(LSR-Hs-2062生成物)、ラット(LSR-Rn-2097生成物)、およびマウス(LSR-Mm-1886生成物)の長い型(α)は、LSRの総ての機能的特性を示す。3つの短い型(β)(それぞれLSR-Hs-1817、LSR-Rn-1893、およびLSR-Mm-1682の生成物)はリソソーム接近のためのジ-ロイシンドメイン、トランスメンブランドメインおよびサイトカイン受容体サインを欠いている。また、3つの中間型(α')(LSR-Hs-2005、LSR-Rn-2040、およびLSR-Mm-1829[sic]の生成物)はジ-ロイシンドメイン、トランスメンブランドメインを欠き、かつ、サイトカイン受容体サインに相当するドメインは保存されていることが観察できる(図3、4および5)。最後に、図6はヒトにおいて同定された3つのcDNA型由来のタンパク質および、各々を誘導するスプライシングの結果としてそれら各々により保持されるモチーフを示している。

【0116】

以下の表3は、前記の種々のドメインまたはモチーフ、ならびにそのドメインまたはモチーフの開始および終了位置、またはマウス配列番号16配列に示されたようなそのドメインまたはモチーフを有する領域を挙げたものである。

【表3】

表3

ドメインまたはモチーフ	配列番号16の位置		存 在		
	開始	終了	α	α'	β
可能性のある脂肪酸結合部位	23	41	X	X	X
可能性のあるクラスリン結合部位	104	107	X	X	X
輸送に関するシグナル: LI LL	183	184	X	X	X
	195	196	X		
トランスメンブランドメイン	204	213	X	X	
可能性のあるサイトカイン受容体部位	214	249	X	X	
RSRSモチーフ	470	473	X	X	X
可能性のあるリポタンパク質リガンド結合部位	544	558	X	X	X

【0117】

以下の表4は、前記の種々のドメインまたはモチーフ、ならびにそのドメインまたはモチーフの開始および終了位置、またはヒト配列番号8配列に示されたようなそのドメインまたはモチーフを有する領域を挙げたものである。

【表 4】

表4

ドメインまたはモチーフ	配列番号8の位置		存在		
	開始	終了	α	α'	β
可能性のある脂肪酸結合部位	76	94	X	X	X
可能性のあるクラスリン結合部位	157	160	X	X	X
輸送に関するシグナル：LI LL	236	237	X	X	X
	248	249	X		
トランスメンブランドメイン	257	266	X	X	
可能性のあるサイトカイン受容体部位	267	302	X	X	
RSRSモチーフ	527	530	X	X	X
可能性のあるリポタンパク質リガンド 結合部位	601	613	X	X	X

10

20

【0118】

結論として、前記のLSRの配列および構造の類似性により、ラットおよび／またはマウスでなされた観察をヒトへ外挿することが可能となる。

【0119】

相同ポリペプチドは、天然ポリペプチドと比較して、特に欠失や切断、伸長、キメラ融合および／または突然変異、特に点突然変異といったある種の修飾を呈するポリペプチドを意味するものと理解されよう。相同なポリペプチドのうち、本発明のポリペプチドのアミノ酸配列と少なくとも80%、好ましくは90%の相同性を示すアミノ酸配列が好ましい。

30

【0120】

等価ポリペプチドは、LSR受容体の活性の内の少なくとも1つ、特にリポタンパク質またはカイロミクロンの受容体の活性、サイトカイン、特にレプチンの受容体の活性、またはgC1q-Rタンパク質またはその類似タンパク質の受容体の活性を有するポリペプチドを意味するものと理解されよう。また、等価ポリペプチドは本発明のポリペプチドをコードするゲノム核配列の選択的スプライシングの結果得られるいずれのポリペプチドをも意味するものと理解されよう。

【0121】

変異ポリペプチド（またはタンパク質変異体）は、特にヒトにおいて存在し得る変異したポリペプチドの総てを意味するものと理解され、それは特に切断、欠失および／またはアミノ酸残基の付加、置換または突然変異、特に点突然変異に相当し、同様に、人工突然変異ポリペプチドもやはり変異ポリペプチドと呼ばれるであろう。この場合、変異ポリペプチドは特に部分的に肥満または食欲不振の発症および進展に関連するであろう。それらまた、特に心血管系レベルの肥満に関与する危険性または合併症、および／またはサイトカイン類の代謝異常に関与する病状の発症および／または進展に関連するであろう。

40

【0122】

ポリペプチド断片とは、最低15個のヌクレオチドまたは塩基、好ましくは20塩基または30塩基を含んでなる核配列によりコードされるポリペプチドまたはペプチドを意味するも

50

のと理解される。これらの断片は、正常ポリペプチド配列と比較して特に点突然変異を有してなってもよいし、また、特に肥満または前記の病状につながる多型性に結びつくもののような人工的またはヒトに存在する変異ポリペプチドの特定のアミノ酸配列に相当してもよい。

【0123】

生物学的に活性な断片とは、特に：

LSR受容体活性の少なくとも1つ、特にリポタンパク質受容体活性、またはサイトカイン、特にレプチン受容体活性および／または細胞シグナリング活性を示し、および／または、

本発明の受容体に特異的な抗体により認識されることが可能であり、および／または、
例えば、その受容体に特異的なリガンドの結合を無効にすることにより、LSR受容体活性を調整することができる化合物により認識されることが可能であり、および／または、
LSR受容体の接近および／または細胞内局在の調整が可能であり、および／または、
より一般的には、LSR受容体の生物学的に有効なドメインまたはモチーフからなるポリペプチドのアミノ酸配列の断片を意味するものと理解されよう。

【0124】

本発明の好ましい生物学的に活性な断片には、特に：

クラスリン結合部位を含んでなる断片、

脂肪酸結合部位、特にそのアームが疎水性アミノ酸からなるヘアピン構造を誘導する2個の隣接するプロリンにより、2つの部分に分けられる疎水性アミノ酸配列を含んでなる脂肪酸結合部位を含んでなる断片、

トランスメンブランドメインを構成する疎水性領域を含んでなる断片、

周縁膜系においてタンパク質のエンドサイトーシスおよび細胞内接近を制御することのできる領域を含んでなる断片、特にLIおよびLLモチーフ含有部位を含んでなる断片、

サイトカイン結合部位、特にシステイン豊富領域を含む部位を含んでなる断片、

ApoBおよびApoEなどのリポタンパク質リガンドのための可能性のある結合部位を規定する領域、特に選択的に+および-の荷電を持つアミノ酸配列を含んでなる領域を含んでなる断片、および

RSRSモチーフを含んでなる断片

が存在する。

【0125】

これらの断片には、特に、表1,2および4に定義されたポリペプチド、またはそのポリペプチドを含んでなる配列番号2,8または16のヌクレオチド断片のいずれか、およびいずれかの等価、相同、または変異断片がある。

【0126】

他の好ましい断片には、配列番号29および30の配列を有するものなどの抗原ペプチドが含まれる。

【0127】

LSR受容体のヌクレオチド配列

本発明の主題は、本発明のLSR受容体またはポリペプチドをコードする単離核酸配列にある。

【0128】

さらに具体的には、本発明は配列番号19のポリペプチドの、少なくとも8、好ましくは少なくとも10、さらに特には少なくとも15の連続するヌクレオチドを含んでなることを特徴とする、精製核酸、ならびにこの核酸に相補的な核酸配列に関する。

【0129】

本発明はまた、配列番号41のポリペプチドの、少なくとも8、好ましくは少なくとも10、さらに特には少なくとも15の連続するヌクレオチドを含んでなることを特徴とする、精製核酸、ならびにこの核酸に相補的な核酸配列に関する。

【0130】

本発明はまた、配列番号19のヌクレオチド1898～21094、特にヌクレオチド2001～20979、さらに特にヌクレオチド2145～20979に相当する核酸配列を含んでなることを特徴とする、ヒトLSR受容体をコードする精製核酸、ならびにこの核酸に相補的な核酸配列に関する。

【0131】

本発明はまた、ヒトLSR受容体をコードする遺伝子に含まれる核酸配列、特にその遺伝子のエキソンの各々、またはその遺伝子のエキソンの組み合わせ、またはそうでなければ1以上のエキソン部分にわたって伸びるポリヌクレオチドに関する。好ましくは、これらの核酸はヒトLSR受容体の1以上の生物学的に有効な断片をコードする。

【0132】

本発明はまた、配列番号19のヌクレオチド1～1897に相当するヌクレオチド配列を含んでなることを特徴とする、精製核酸、ならびにこの核酸に相補的な核酸配列に関する。

【0133】

本発明はまた、配列番号19のヌクレオチド21095～22976に相当するヌクレオチド配列を含んでなることを特徴とする、精製核酸、ならびにこの核酸に相補的な核酸配列に関する。

【0134】

本発明はまた、配列番号7、配列番号9、および配列番号11の配列からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含んでなることを特徴とする、精製核酸、ならびにこの核酸に相補的な核酸配列に関する。

【0135】

本発明はまた、配列番号1、配列番号3、および配列番号5の配列からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含んでなることを特徴とする、精製核酸、ならびにこの核酸に相補的な核酸配列に関する。

【0136】

本発明はまた、配列番号13、配列番号14、および配列番号15の配列からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含んでなることを特徴とする、精製核酸、ならびにこの核酸に相補的な核酸配列に関する。

【0137】

本発明はまた、配列番号19のヌクレオチド1898～2001に相当するヌクレオチド配列または、好ましくは配列番号19のヌクレオチド1898～2144を含んでなることを特徴とする、精製核酸、ならびにこの核酸に相補的な核酸配列に関する。

【0138】

本発明はまた、配列番号19のヌクレオチド20980～21094に相当するヌクレオチド配列を含んでなることを特徴とする、精製核酸、ならびにこの核酸に相補的な核酸配列に関する。

【0139】

本発明の核酸のうち、配列番号7、配列番号9および配列番号11の配列、配列番号1、配列番号3および配列番号5の配列、ならびに配列番号13、配列番号14および配列番号15の配列からなる群より選択されるヌクレオチド配列を有する核酸、ならびにそれらの相補的配列が好ましい。

【0140】

本発明の配列の変異、突然変異、等価または相同配列、ならびに本発明の配列と特異的にハイブリダイズできる、それらの断片および核酸配列も本発明の一部をなす。

【0141】

ヒトゲノム配列

従って本発明は、ヒトLSR受容体のゲノム配列、好ましくは配列番号19の配列、ならびにそれらの相補的配列またはそれらの対立遺伝子変異体、突然変異、等価または相同配列またはそれらの断片の1つに関する。

【0142】

10

20

30

40

50

ヒトLSR遺伝子(配列番号19)は、21094bpにわたって分布する10のエキソンを含んでなる。エキシンのサイズはそれぞれ：356,345,120,57,147,174,60,132,626および141bp(表5)である。

【表5】

表5

エキソン	開始	終了	5' SPLIC.	BL 5'	3' SPLIC.	BL 3'
Ex1	1898	2253	---	---	GTACGG	+2
Ex2	3437	3781	CAG	+1	GTATGT	+1
Ex3	12067	12186	CAG	+2	GTGAGT	+1
Ex4	15047	15103	CAG	+2	GTACGG	+1
Ex5	15668	15814	CAG	+2	GTAAGT	+1
Ex6	19481	19654	CAG	+2	GTGAGG	+1
Ex7	19801	19860	CAG	+2	GTGAGA	+1
Ex8	19958	20089	TAG	+2	GTAAGC	+1
Ex9	20231	20856	CAG	+2	GTGAGG	0
Ex10	20946	21094	CAG	0	-----	

10

20

【0143】

エキソンのカラムは、ゲノム配列上におけるそれらの位置を5'-3'順で、1~10に番号付けされたエキソンを表す。開始および終了の列は、それぞれ問題のエキソンの最初および最後のヌクレオチドの位置を表す。5'および3'においてエキソンに隣接するスプライシング部位の配列は、5'SPLICおよび3'SPLICの列に示されている。BL5'およびBL3'の列は、それぞれスプライシングの後のみにメッセンジャーのリーディングフレームにおいて使用されるであろうエキソンの5'および3'における塩基数を示している。例えば；エキソン7は3'に遊離塩基を有しているので、このエキソンはその5'に2つの遊離塩基を有するエキソン8の5'末端に結合できる。1塩基+2塩基の組み合わせは、ゲノム配列内でイントロンにより損なわれるコドン構成する。エキソン7はその3'末端において5'に2つの遊離塩基を有するいずれのエキソンに結合されてもよい；新しく作出されたコドンが停止コドンに相当しなければ、オープンリーディングフレームは保存されるであろう。

30

【0144】

エキソン1および2、ならびに9および10は必然的に同時にスプライスされ、従って、エキソン1および2に相当する5'ブロックおよびエキソン9および10に相当する3'ブロックを形成する。従って、これら4つのエキソンの生成物に相当する機能性最小メッセンジャーは、約1331bpのサイズを有する可能性がある。他のエキソンについては、可能性のある組み合わせは総て、オープンリーディングフレームの保存を可能にする。

40

【0145】

5'における非コーディングエキソンのサイズを正確に測定することはできなかった。実際、ラット5'UTR配列は、これらの配列の解析を完成させ、実際のヒトLSR cDNAの5'末端を同定するにはヒトにおけるそれらとあまりにも違っている。これは、発明者らにより開発された5'末端キャプチャー法(WO 96/34981)により、ヒトLSRメッセンジャーの5'末端

50

を同定することによって行うことができる。以下に記載するポリアデニル化部位は、唯一USF2遺伝子の前に存在するものであり、ヒトLSR遺伝子の3'に位置する。従って、おそらくこの遺伝子の非翻訳3'領域は極めて短い（推定サイズ約100bp）。従って、ヒトLSR cDNA分子に関して示される総てのサイズは、非翻訳5'末端のサイズによって調整されるべきであろう。ゲノム配列の解析から推定される総てのエキソンを考慮にいて得られたヒト cDNA 配列のサイズは2158bpである。この形態はLSR-Rn-2097型に相当し得る。

【0146】

配列番号19のヌクレオチド配列の発現のためのいくつかのシグナルの局在を、以下の表6に示す。

【表6】

10

表6

シグナル	開始	終了
好ましいATG	2145	2147
他の可能性があるATG	2001	2003
停止	20977	20979
ポリAd	21065	21070

20

【0147】

メッセンジャーRNA分子の特徴的なエレメントがシグナルのカラムに記載されている：翻訳の開始(ATG)、翻訳の停止(STOP)およびポリアデニル化シグナル(ポリAd)。開始および終了の列は、配列番号19のゲノム配列上のこれらのシグナルの開始および終了に関するヌクレオチドとしての位置を示している。翻訳の開始のためのATGシグナルは、別のものが開始のためにより適切な環境を提供するため、それが望ましい。

30

【0148】

本発明はまた、ヒトLSR遺伝子の発現を調節するための1以上のエレメントをコードする精製核酸配列に関する。また、本発明には、本発明の受容体をコードする遺伝子のプロモーターおよび／またはレギュレーターの核酸配列、またはそれらの対立遺伝子変異体、突然変異、等価または相同配列、またはそれらの断片の1つが含まれる。

【0149】

本発明はさらに具体的には、LSR遺伝子のコーディング配列の5'に位置する精製核酸に関する。この核酸は配列番号19のヌクレオチド1～1897に相当するヌクレオチド配列、ならびにこの核酸に相補的な核酸配列を含んでなることを特徴とする。

【0150】

40

この核酸のより短い断片もまた、LSR遺伝子の発現または異種ポリペプチドをコードする他のいずれの配列の発現のためのプロモーターとして使用してもよい。

【0151】

本発明はまた、LSR遺伝子の転写配列の3'に位置する精製核酸に関する。この核酸は配列番号19のヌクレオチド21095～22976に相当するヌクレオチド配列、ならびにこの核酸に相補的な核酸配列を含んでなることを特徴とする。この核酸のより短い断片もまた、遺伝子の発現を調節するエレメントとして使用できる。

【0152】

最後に、本発明はまた、ヒトLSR受容体のゲノム配列、好ましくは配列番号41の配列、ならびにそれらの相補配列、またはそれらの対立遺伝子変異体、突然変異、等価または相

50

同配列の1つ、またはそれらの断片の1つに関する。

【0153】

ヒト、ラットおよびマウスにおけるゲノム構成の比較

USF2のすぐ近傍のLisch7遺伝子が局在するマウス第7染色体領域と、LSRを有するヒト第19染色体領域19q13間のシンテニー（syntheny）（種間の、ある染色体領域の構成の保存）がよく記載されていることに着目することは有益である。2つのLisch7/LSRおよびUSF2遺伝子の構成は種間で保存されている。同様に、これらの遺伝子と比較して、より動原体よりに位置するApo Eは、マウスおよびヒトの双方に存在する。LSRリポタンパク質受容体およびそれらのリガンドの1つであるApoEは、同じ染色体領域に存在することは注目すべきである。実際、受容体およびリガンドはしばしば同時に調節される。かかる状況は、マウスにおいて観察された現象をヒトにも当てはめられることを予見することを可能にするであろう。

10

【0154】

ヒト、ラットおよびマウスのcDNA配列

さらに本発明は、選択的スプライシングによりLSR受容体遺伝子に由来する3種の異なるcDNAに関する。これらの3種のcDNAはヒト、ラットおよびマウスで同定されている(表2b)。それらは3種のLSR受容体サブユニットである α （長種）、 α' （中間種）および β （短種）をコードしている。一番長いcDNAは合計10の遺伝子のエキソンを含んでいる。中間の長さのcDNAはエキソン4を含まない。最後に一番短いcDNAはエキソン4および5を含まない。

20

【0155】

LSR受容体の α サブユニットをコードするヒトLSR-Hs-2062cDNAヌクレオチド配列およびラットLSR-Rn-2097 cDNAヌクレオチド配列は78.6%一致し、1955bpにわたって重複している。ネズミLSR-Mm-1886配列（長種）がヒト配列とともに並んでいる場合、これらの数値はそれぞれ78.8%および1851bとなる。これは、種間における核酸配列の極めて高い保存を反映している。最も高いレベルの相違は、非翻訳5'末端（配列が利用可能な場合）で、第1のコーディングエキソンで、また非翻訳3'末端(図7)で観察される。

【0156】

従って本発明はまた、配列番号7、配列番号9、および配列番号11の配列、配列番号1、配列番号3および配列番号5の配列、ならびに配列番号13、配列番号14および配列番号15の配列からなる群から選択されることを特徴とする精製核酸、ならびにこの核酸に相補的な核酸配列、またはそれらの対立遺伝子変異体、突然変異、等価または相同配列、またはそれらの断片の1つに関する。

30

【0157】

翻訳の開始および停止のためのコドン間の、前記核酸のコーディングフレームを構成する核酸もまた本発明の一部をなす。

【0158】

本発明のポリペプチド断片をコードする核酸もまた本発明の一部をなす。特に、表1,3および4に記載の断片をコードする核酸は注目されるであろう。

【0159】

このように、表7は配列番号7のヒト配列の、かかる核酸断片の位置を記載している。

40

【表 7】

表7

ドメインまたはモチーフ	配列番号7のcDNAにおける位置	
	開始	終了
可能性のある脂肪酸結合部位	329	385
可能性のあるクラスリン結合部位	572	583
輸送に関するシグナル: LI LL	809	814
	845	850
トランスメンブランダメイン	872	901
可能性のあるサイトカイン受容体部位	902	1009
RSRSモチーフ	1682	1693
可能性のあるリポタンパク質リガンド結合部位	1904	1942

10

20

【0160】

本発明はまた、ヒトLSR受容体をコードするcDNAの5'UTRの配列に相当する精製核酸に関する。この核酸は配列番号19のヌクレオチド1898～2001、好ましくは配列番号19のヌクレオチド1898～2144に相当する核酸配列、ならびにこの核酸と相補的な核酸配列を含んでなることを特徴とする。この核酸のより短い断片もまた使用することができる。

【0161】

本発明はまた、LSR受容体をコードするcDNAの3'UTRの配列に相当する精製核酸に関する。この核酸は配列番号19のヌクレオチド20980～21094に相当する核酸配列、ならびにこの核酸と相補的な核酸配列を含んでなることを特徴とする。この核酸のより短い断片もまた使用することができる。

30

【0162】

本発明はまた、ラットまたはマウスLSR受容体をコードするcDNAのそれぞれ5'UTRまたは3'UTRの配列に相当する精製核酸に関する。この核酸のより短い断片もまた使用することができる。

【0163】

5'UTRおよび3'UTRは転写および翻訳の調節に関与するエレメント（応答エレメントおよびエンハンサー）を含んでもよい。これらの領域は特にmRNAの安定性において役割を持つ。さらに、5'UTRはmRNAの翻訳のために不可欠なシャイン・ダルガルノ(Shine-De 40 lgarno)モチーフを含んでなる。

【0164】

核酸、核配列または核酸配列とは、正確なヌクレオチド連続を示す、修飾された、またはそうでなければ核酸の断片、セグメントまたは領域の定義が可能な非天然ヌクレオチドを含む、単離天然または合成DNAおよび／またはRNA断片を意味するものと理解される。

【0165】

等価核酸配列とは、遺伝子コード、相補的DNA配列および相当するRNA配列ならびに等価ポリペプチドをコードする核酸の縮重を考慮にいたした本発明のポリペプチドをコードする核酸配列を意味するものと理解される。

50

【0166】

相同ポリペプチドとは、相同ポリペプチドをコードする核酸配列および／または少なくとも80%、好ましくは90%の相同レベルを示す核酸配列を意味するものと理解される。本発明によれば、相同性は唯一の統計学的類型であり、これはその配列が最少80%、好ましくは90%の核酸を共通に持つことを意味する。それらは好ましくは本発明の配列と特異的にハイブリダイズできる配列である。好ましくは、特異的ハイブリダイゼーション条件は、実施例に見出されるようなものであるか、または少なくとも95%の相同性が保証されるものである。

【0167】

ハイブリダイゼーションのためのこれら核酸の長さは8,10,15,20または30~200ヌクレオチドと様々であってよく、特に20~50ヌクレオチド、さらに特には20~30ヌクレオチドである。 10

【0168】

対立遺伝子または対立遺伝子変異体とは、ヒトに存在する多型性、特に肥満または食欲不振の発症および／または進展につながる可能性のある多型性に当たる天然の突然変異配列を意味するものと理解されよう。これらの多型性はまた、特に心血管系レベルにおいて肥満に関与する危険性または合併症、および／またはサイトカインの代謝異常に関与する病状の発症および／または進展につながる可能性がある。

【0169】

突然変異核配列とは、正常配列と比較して、少なくとも1つの点突然変異を含んでなる核配列を意味するものと理解される。 20

【0170】

本発明の配列は一般に正常配列であるが、それらは少なくとも1つの点突然変異および、好ましくは正常配列と比較して多くとも10%の突然変異を含んでなるので、突然変異配列でもある。

【0171】

好ましくは、本発明は、突然変異がサイレントではない、すなわち正常配列に関してコードされたアミノ酸の修飾をもたらす突然変異核配列に関する。いっそう好ましくは、これらの突然変異はLSR複合体および／または受容体または相当するそれらのドメインおよび断片を構成するアミノ酸に作用する。これらの突然変異はまた、リポタンパク質またはサイトカイン類、特にレプチンの受容体部位、あるいは補因子、特に遊離脂肪酸の結合部位、またはそうでなければ、リン酸化部位に相当する領域が有するアミノ酸に作用する。これらの突然変異はまた、LSRの輸送、接近および膜固定に関与する配列に作用する。 30

【0172】

概して本発明は、正常LSRポリペプチド、突然変異LSRポリペプチドならびにそれらの断片および、相当するDNAおよびRNA配列、本発明の受容体のポリペプチドを示すLSRポリペプチドに関する。

【0173】

本発明によれば、核配列の断片は特に、前記で定義した機能的または生物学的活性を有する受容体のドメインおよびポリペプチドをコードし、コーディング配列の上流または下流に位置するドメインまたは領域を含み、LSR遺伝子の発現の調節のためのエレメントを含むか、またはそうでなければ、核配列の検出、同定または増幅法においてプローブまたはプライマーとしてのそれらの使用が可能な配列を有してもよい。これらの断片は好ましくは最少サイズが8、10塩基であり、20塩基の断片、好ましくは30塩基の断片が好ましい。 40

【0174】

特に診断のための注目され得る核断片のうち、例えば、特に正常または突然変異したイントロンおよびエキソン間の連結配列のようなLSR複合体の遺伝子のゲノムイントロン配列を記載すべきであろう。

【0175】

それらの配列が本発明の配列から選択されることを特徴とするオリゴヌクレオチドのセンスまたはアンチセンスとして使用することができる核酸配列もまた、本発明の一部をなす。

【0176】

従って、注目する核酸断片のうち、特にアンチセンスオリゴヌクレオチド、すなわち、標的配列とのハイブリダイゼーションにより、対応する生成物の発現の阻害が確実となるその構造を記載すべきである。また、対応する生成物の発現の調節に関与するタンパク質との相互作用により、この発現の阻害または活性化のいずれかを誘導すると考えられるセンスオリゴヌクレオチドも記載すべきである。

【0177】

LSR複合体の遺伝子のプロモーターおよび／またはレギュレーター配列に関与し、対応するタンパク質の発現、特にそれらの発現のレベルに作用し得る突然変異を有する配列もまた、本発明の前記配列の一部をなす。

【0178】

本発明の配列であることを特徴とする、プライマーまたはプローブとして使用可能な核酸配列もまた、本発明の一部をなす。

【0179】

本発明は、本発明のヌクレオチド配列から推定でき、かつ、特にPCR法のような増幅法またはそれに関連する方法を用いて、本発明のヌクレオチド配列、特に突然変異配列の検出を可能にする総てのプライマーに関する。

【0180】

本発明は、本発明のヌクレオチド配列、特にそれらとハイブリダイズ可能な配列から推定でき、かつ、本発明のヌクレオチド配列の検出、特に正常配列と突然変異配列の間の判別を可能にする総てのプローブに関する。

【0181】

本発明はまた、本発明の核酸配列の検出および／または増幅のための本発明の核酸配列のプローブまたはプライマーの使用に関する。

【0182】

本発明の総てのプローブおよびプライマーは、検出可能なおよび／または定量可能なシグナルを得るために、当業者に十分公知の方法により標識されてよい。

【0183】

本発明はまた、非天然ヌクレオチド、例えば特に硫黄含有ヌクレオチド、または α もしくは β 構造のヌクレオチドを含んでなくてもよいヌクレオチド配列に関する。

【0184】

本発明はもちろん、DNAおよびRNA配列双方、ならびにそれらとハイブリダイズする配列、ならびに相当する二重らせんDNAに関する。

【0185】

以下本明細書では、前記DNA配列は、それらが正常配列であっても異常配列であっても、LSR複合体の遺伝子と呼ばれる。

【0186】

本発明は、それらの天然の染色体環境、すなわち自然状態におけるゲノムヌクレオチド配列には関与しないと理解されるべきである。それらは単離された、すなわち直接的にまたは間接的に、例えば複写(cDNA)により採取された配列であり、それらの環境は少なくとも部分的に修飾されている。

【0187】

従ってこれはまた、部分的に修飾された、または本来それらを有している配列とは少なくとも部分的に異なる配列によって保有されているcDNAおよびゲノムDNAの双方であってもよい。

【0188】

これらの配列はまた非天然と称されてよい。

10

20

30

40

50

【0189】

本発明はまた、cDNAおよびゲノムDNAライブラリーのスクリーニング、単離cDNAおよび／または本発明の受容体、およびそれらのプロモーターおよび／レギュレーターをコードする遺伝子のクローニング方法であって、本発明の核酸を使用することを特徴とする方法を含んでなる。これらの方法のうち、特に：

本発明の核配列を用いるcDNAライブラリーのスクリーニングおよび単離cDNAのクローニング(Sambrook et al., 1989; Suggs et al., 1981; Woo et al., 1979)、

本発明の核配列に関する5'末端タグライブラリーのスクリーニング(WO 96/34981)、および完全なcDNAおよび相当するゲノムDNAライブラリー由来プロモーターのクローニングを可能にするタグの単離、

本発明の配列を用いるゲノムライブラリー、例えばBACsのスクリーニング(Chumakov et al., 1992; Chumakov et al., 1995)および所望により、単離および染色体位置決定、次いでLSR受容体をコードする遺伝子の完全な配列決定を可能にするFISHによる遺伝子解析(Cherif et al., 1990)

を記載し得る。

【0190】

また本発明は、本発明の受容体またはポリペプチドをコードする配列、特にゲノム配列または本発明の受容体またはポリペプチドをコードする遺伝子のプロモーターおよび／またはレギュレーターの核酸配列、またはそれらの対立遺伝子変異体、突然変異、等価または相同配列の1つ、またはそれらの断片の1つであって、本発明の前記方法の1つにより得られることを特徴とする配列、またはその配列とハイブリダイズすることができる配列を包含する。

【0191】

ベクター、宿主細胞およびトランスジェニック動物

本発明はまた、本発明の核酸配列を含有するクローニングおよび／または発現ベクターを含んでなる。

【0192】

宿主細胞においてその配列の発現および／または分泌を可能とするエレメントを含んでなることを特徴とする本発明のベクターもまた、本発明の一部をなす。

【0193】

本発明のプロモーターおよび／またはレギュレーター配列、または本発明の細胞接近のための配列、またはそれらの断片の1つを含んでなることを特徴とするベクターもまた、本発明の一部をなす。

【0194】

そのベクターは、好ましくはプロモーター、翻訳の開始および停止シグナルならびに転写調節のための適切な領域を含んでなるであろう。それらは細胞中で安定して維持できなければならない、所望により翻訳タンパク質の分泌を指定する特定のシグナルを有していてもよい。

【0195】

これら種々の制御シグナルは、使用される宿主細胞によって選択される。子の目的のために、本発明の核酸配列は、選択された宿主内の自己複製ベクター中、または選択された宿主の組み込み可能ベクター中に挿入されてよい。

【0196】

自己複製系のうち、宿主細胞により、プラスミドまたはウイルス型の系が好んで使用され、ウイルスベクターとしては、特にアデノウイルス(Perricaudet et al., 1992)、レトロウイルス、ポックスウイルスまたはヘルペスウイルス(Epstein et al., 1992)であり得る。これらの系のそれぞれに使用可能な技術は当業者に明らかであろう。

【0197】

宿主細胞の染色体への配列の組み込みが所望される場合には、例えばプラスミドまたはウイルス型の系が使用可能であろう；かかるウイルスとしては、例えばレトロウイルス(T

10

20

30

40

50

emin, 1986)またはAAV(carter, 1993)が挙げられる。

【0198】

かかるベクターは当業者により一般に使用されている方法に従って調製されるであろうし、結果としてそれらから得られたクローンは、例えばリポフェクション、エレクトロポレーションまたは熱ショックなどの標準的な方法により適切な宿主に導入されてよい。

【0199】

さらに本発明は、宿主細胞、特に本発明のベクターにより形質転換された真核および原核細胞、ならびに本発明の形質転換細胞の1つを含んでなる、ヒトを除くトランスジェニック動物を含んでなる。

【0200】

これらの目的のために使用可能な細胞のうち、もちろん細菌細胞(Olins and Lee, 1993)ばかりでなく酵母細胞(Buckholz, 1993)、ならびに動物細胞、特に哺乳類細胞培養物(Edwards and Aruffo, 1993)および特にチャイニーズハムスター卵巣細胞(CHO)、さらには例えばバキュロウイルスを用いる方法(Lucko, 1993)の使用が可能な昆虫細胞を記載してもよい。本発明のタンパク質の発現のために好ましい細胞宿主はCHO細胞からなる。

【0201】

本発明の哺乳動物のうち、表現型が正常または変異LSR受容体、特にヒト起源の突然変異に相当する、本発明のポリペプチドを発現するマウス、ラットまたはウサギのような動物が好ましい。

【0202】

ここで特に注目される動物モデルのうち、特に以下のものが挙げられる；

LSRの構成成分の1の欠損を示すトランスジェニック動物。それらは胎芽幹細胞の相同性組み換えを行い、これらの幹細胞を胚に移植し、生殖系のレベルで影響を受けたキメラを選択し、このキメラを増殖させることにより得られる。

【0203】

1以上のネズミおよび／またはヒト起源のLSR複合体の遺伝子を過剰発現するトランスジェニックマウス。このマウスは、偏在特性を持つもしくは組織、好ましくは肝臓のタイプ選択性を持つ強力なプロモーターの制御の下、LSR複合体の遺伝子の多重コピーのトランスフェクションにより得られる。

【0204】

LOXP/CRE組換え酵素系(Rohlmann et al., 1996)、または動物の正確な齢における遺伝子の発現の不活性化のための他のいずれかの系を用いる不活性化により、LSR複合体の1以上の遺伝子を欠失させたトランスジェニック動物（好ましくはマウス）。

【0205】

ウイルス転写または遺伝子治療後に、LSR複合体の1以上の遺伝子を過剰発現する動物（好ましくはラット、ウサギ、マウス）。

【0206】

LSRを欠損する動物（特にマウス）と、

LDL受容体(Herz et al., 1995; Ishibashi et al., 1993)

肝リパーゼ(Homanics et al., 1995; Kobayashi et al., 1996)

アポタンパク質B(Purcellhuynh et al., 1992; Huang et al., 1996)

アポタンパク質E(Plump et al., 1992; Zhang et al., 1992; Huang et al., 1996)

アポCIII(Aalto-Setälä et al., 1992; Ito et al., 1990; Maeda et al., 1994)

を欠損する、または過剰発現する動物との交配。

【0207】

トランスジェニック動物の作製およびウイルスまたは非ウイルストランスフェクションは、以下のラットおよびマウス系統において行われるのが好ましい：

Zuckerラット(fa/fa)(Iida et al., 1996)

AKR/Jマウス(West et al., 1992)

ob/obマウス(Zhang et al., 1994)

10

20

30

40

50

ob²j/ob²jマウス(同上)

tubbyマウス(Kleyn et al., 1996; Nobben-Traauth et al., 1996)

fat/fat(Heldin et al., 1995)

agoutiマウス(Lu et al., 1994; Manne et al., 1995)

db/dbマウス(Chen et al., 1996)。

【0208】

本発明の細胞および哺乳類は、以下に記載するように本発明のポリペプチドの製造方法に使用することができ、かつ、解析およびスクリーニングのためのモデルとして提供することもできる。

【0209】

また、LSR複合体のポリペプチド間、これらとそれらのパートナーである、リポタンパク質受容体またはサイトカイン類、特にレプチンの受容体の活性に直接的または間接的に関与する化学化合物またはタンパク質化合物間の相互作用を検討するため、かつ活性のタイプまたは正常複合体が関与しているかどうか、または少なくとも1つのドメインが変異体である複合体によって作動を始める種々のメカニズムおよび相互作用を研究するために、前記の形質転換細胞または哺乳類をモデルとして使用することもできる。

【0210】

特にそれらは、LSR複合体またはその正常または変異ドメインの1つと相互作用する生成物の選択のために、補因子または阻害剤、特に競合的阻害剤もしくはLSR複合体におけるコンホメーション変化に対するアゴニストまたはアンタゴニスト活性を有する阻害剤として使用されてもよい。好ましくは、その形質転換細胞は特に肥満または前記の病状と戦うことを可能にする生成物の選択を可能とするモデルとして使用されるであろう。この細胞はまた、ある種の化合物により引き起こされる可能性のある危険性の検出のために供されてもよい。

【0211】

LSR受容体に由来するポリペプチドの製造

本発明はまた、本発明の合成または組換えポリペプチドの合成、特に化学合成または本発明の核酸配列の使用による合成に関する。

【0212】

本発明のポリペプチドは、多くの公知のペプチド合成法のいずれかを用いる化学合成法、例えば固相を用いる技術、または部分的固相を用いる技術により、断片の縮合により、または溶液中における通常の合成法により得ることができる。

【0213】

本発明の化合物が固相法により合成される場合、C末端アミノ酸を不活性な固体支持体に結合させ、α位においてそのアミノ基を保護する基を含んでなる（必要ならば、その機能的側基の保護）。

【0214】

この工程の最後に、このアミノ末端基を保護する基が除去され、次いで、これもまた保護の必要を含んでなる第二のアミノ酸が結合する。

【0215】

N末端保護基は、各アミノ酸が結合した後に除去される；一方、側鎖における保護はもちろん維持される。ポリペプチド鎖が完成した時、ペプチドはその支持体から切断され、保護側基が除去される。

【0216】

固相合成技術は、当業者に十分公知である。特に、Stewart et al. (1984)およびBodansky(1984)を参照。

【0217】

化学合成法により得られたポリペプチドも、相当する非天然アミノ酸を含んでなってよく、本発明に含まれる。

【0218】

10

20

30

40

50

組換え型の本発明のポリペプチドの製造法も、それ自身、本発明に包含され、形質転換細胞、特に本発明の細胞または哺乳動物が本発明の核酸配列によりコードされる組換えポリペプチドの発現を可能にする条件下で培養され、その組換えポリペプチドが回収されることを特徴とする。

【0219】

本発明のプロモーターおよび／または調節配列の少なくとも1つ、または本発明の細胞接近のための配列の少なくとも1つ、またはそれらの断片の1つを含むベクターまたは宿主細胞を使用することを特徴とする、異種ポリペプチドの製造法も本発明の一部をなす。

【0220】

この製造法により得ることができる組換えポリペプチドもまた本発明の一部をなす。

10

【0221】

前記のように得られた組換えポリペプチドは、グリコシル化または非グリコシル化形態の双方であってよく、天然の三次構造を有していてもよく、またそうでなくともよい。

【0222】

これらのポリペプチドは、当業者に公知の組換えポリペプチドの製造技術に従い、前記で定義された核酸配列から製造されてよい。この場合、使用される核酸配列は細胞宿主での発現を可能にするシグナルの制御下に置かれる。

【0223】

組換えポリペプチドの製造の有効な系は、本発明のベクターおよび宿主細胞を有する必要がある。

20

【0224】

これらの細胞は、前記で定義したように、ベクター中に挿入されたヌクレオチド配列を宿主細胞へ導入することにより得、次いで、トランスフェクトされたヌクレオチド配列の複製および／または発現を可能にする条件下で、その細胞を培養すればよい。

【0225】

用いられた組換えポリペプチドを精製する方法は当業者に公知である。組換えポリペプチドは、特異的モノまたはポリクローナル抗体などを用いて、分画、クロマトグラフィー法、免疫親和技術のような個々にあるいは組み合わせて使用される方法により、細胞溶解物および抽出物、培養培地上清から精製してよい。

【0226】

好ましい変異体は、「担体」タンパク質と融合させた組換えポリペプチドの生成にある（キメラタンパク質）。この系の有利な点は、組換え生成物のタンパク質分解における安定化および還元を可能にし、*in vitro*変性の際に溶解性を増し、および／または融合相手が特定のリガンドに親和性を有する場合には、精製の単純化が可能なことである。

30

【0227】

抗体

本発明のポリペプチドまたは受容体の特異的に認識することができるモノまたはポリクローナル抗体またはそれらの断片、キメラまたは免疫複合抗体もまた、本発明の一部をなす。

【0228】

特異的ポリクローナル抗体は、例えば：

例えば組換えレプチンの特異的リガンドとして使用するアフィニティークロマトグラフィーのような、当業者に十分公知の方法により、LSR受容体を有する細胞の膜から精製したLSR受容体、または

40

特に、慣習的な方法に従い、本発明の核酸配列から遺伝子組換えまたはペプチド合成により製造される本発明のポリペプチド
に対して免疫感作した動物の血清から得てもよい。

【0229】

特に生物学的に有効な本発明のある種のポリペプチド、変異体または断片を特異的に認識する抗体の優位性は注目されてよい。

50

【0230】

特異的モノクローナル抗体は、Kohler and Milstein, 1975により記載された従来のハイブリドーマ培養法に従って得てもよい。

【0231】

本発明の抗体には、例えばキメラ抗体、ヒト化抗体、FabまたはF(ab')²断片がある。それらはまた、検出可能な、および／または定量可能なシグナルを得るために免疫複合体または標識抗体の形態であってもよい。

【0232】

本発明はまた、本発明の抗体を用いることを特徴とする、本発明のポリペプチドの検出および／または精製のための方法に関する。

【0233】

さらに本発明は、本発明の方法により得られる精製ポリペプチドを含んでなる。

【0234】

さらに、ポリペプチド精製のためのそれらの使用に加えて、本発明の抗体、特にモノクローナル抗体もまた、生物学的サンプル中のこれらのポリペプチドの検出のために使用されてよい。

【0235】

このように、それらは例えば免疫蛍光、金標識、酵素学的免疫複合体による、特定の組織切片におけるLSR受容体のポリペプチドの発現の免疫細胞化学的または免疫組織化学的分析のための手段を構成する。

【0236】

それらは特に、生物学的組織またはサンプル中のそれらポリペプチドの異常な発現の検出を可能にし、そのことによりそれらをLSR受容体の異常な発現の検出、または予防もしくは治療法の進行を監視するために有用となる。

【0237】

さらに一般に、本発明の抗体は正常または変異したLSR受容体のポリペプチドの発現を観察する必要があるいかなる状況においても有利に使用され得る。

【0238】

対立遺伝子の変異性の検出および診断

本発明の核酸配列または抗体を使用することを特徴とする、対立遺伝子の変異性、突然変異、欠失、異型接合性の欠如、または遺伝子の異常性の同定方法もまた、本発明の一部をなす。

【0239】

これらの方法は、患者由来の生物学的サンプルにおいて、前記の配列の少なくとも1つにおける突然変異の存在を同定することによる、例えば肥満、それに伴う危険性、またはサイトカイン代謝異常を伴う病状の疾病素因の診断方法に関する。解析される核酸配列はゲノムDNA、cDNAまたはmRNAのいずれであってもよい。

【0240】

独立して取られた患者において陽性および示差診断を可能にするために、本発明に基づく核酸または抗体を使用することもまた可能であろう。この核酸配列は、特に家族既往歴を持つ、危険性のある患者における前症候性診断のために使用されるのが好ましいであろう。また、出生前診断を考えることも可能である。

【0241】

さらに、特定の突然変異の検出により、特に病状の強度またはその発症までのおよその時間に関しての発展的な診断も可能となるであろう。

【0242】

もちろん、天然遺伝子と比較して遺伝子における突然変異の検出を可能にする方法は極めて多い。それらは本質的に2つの大きなカテゴリーに分けられる。第一のタイプの方法は、突然変異配列とそれに対応する非突然変異天然配列との比較により突然変異の存在を検出し、第二タイプの方法は、例えば突然変異の存在による誤対合の証拠により、突然変

10

20

30

40

50

異の存在を間接的に検出する。

【0243】

これらの方法には、記載の本発明のプローブおよびプライマーを使用できる。それらは一般に、少なくとも8つのヌクレオチドを含んでなるハイブリダイゼーションのための精製核配列であり、配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7、配列番号9、配列番号11、配列番号13、配列番号14、配列番号15、配列番号19および配列番号41からなる群より選択される核配列と特異的にハイブリダイズできることを特徴とする。好ましくは、特定のハイブリダイゼーション条件は、実施例で定義されたようなものであるか、または、それらが少なくとも95%の相同性を保証するようなものである。ハイブリダイゼーションのためのこれら核配列の長さは、8、10、15、20または30～200ヌクレオチド、特に20～50ヌクレオチド、さらに特には20～30ヌクレオチドと様々であり得る。

【0244】

対立遺伝子変異性、突然変異、欠失、異型接合性の欠如、または遺伝子の異常性の同定方法のうち、本発明のヌクレオチド配列の一对のプライマーを用いて異常性を現わす可能性のある、本発明の標的配列の、いわゆるPCR（ポリメラーゼ連鎖反応）またはPCR様増幅のための少なくとも1つの段階を含んでなる方法が好ましい。増幅生成物は、標的精製物の検出またはアッセイを行う前に、適切な制限酵素を用いて処理されてよい。

【0245】

PCR様とは、直接的または間接的な核酸配列の再生を使用する総ての方法、またはそうでなければ、標識系が増幅される方法を意味するものと理解され、これらの技術はもちろん公知であり、一般にそれらはポリメラーゼによるDNAの増幅を含んでおり：元のサンプルがRNAの場合、先に逆転写を行うことが賢明である。現在、例えばいわゆるNASBA「核酸配列に基づく増幅(Nucleic Acid Sequence Based Amplification)」(Compton 1991)、TAS「増幅系に基づく転写(Transcription based Amplification System)」(Guatelli et al., 1990)、LCR「リガーゼ連鎖反応(Ligase Chain Reaction)」(Landegren et al., 1988)、「End Run Amplification」(ERA)、「環状プローブ反応(Cycling Probe Reaction)」(CPR)、およびSDA「Strand Displacement Amplification」(Walker et al., 1992)など、この増幅を可能にする極めて多くの方法があり、これらの方法は当業者に十分公知である。

【0246】

さらに本発明は、本発明のポリペプチドおよび／または受容体の異常発現に相関する病状および／または病因の診断方法であって、ポリペプチドおよび抗体の間で、特異的免疫学的複合体の形成を可能にする条件下で、本発明の抗体を試験する生物学的材料と接触させ、次いで、形成される可能性のある免疫学的複合体を検出することを特徴とする方法を含んでなる。

【0247】

LSR複合体の1以上の遺伝子における突然変異は、それらの生成物の種々の修飾にあずかる可能性があり、その修飾は診断方法に使用できる。実際、抗原性の修飾は特異的抗体の開発を可能にする。LSRの種々のコンホメーション間の識別は、これらの方法により達成することができる。これらの修飾は総て、例えばRIAまたはELISAなどの、正常ポリペプチドまたは突然変異体を認識するモノまたはポリクローナル抗体の使用に基づくいくつかの公知の方法により、診断のアプローチに用いられてよい。

【0248】

これらの診断方法もまた、本発明のモノクローナルまたはポリクローナル抗体特に標識され、変異ポリペプチドの総てもしくは一部に相当するものを用いるin vivoまたはex vivo画像解析による診断方法に関する（例えば、PET-走査型画像解析装置により検出可能な分子と結合した抗体を用いた画像解析）。

【0249】

目的化合物のスクリーニング

本発明の受容体と直接的、または間接的に相互作用することができ、および／またはそ

の受容体の発現または活性を調整することを可能にする化学または生化学化合物の選択方法であって、本発明の受容体、核酸、ポリペプチド、ベクター、細胞または哺乳類を使用することを特徴とする方法もまた、本発明に包含される。

【0250】

LSR受容体の活性を調整する化合物のスクリーニング

本発明は、LSR受容体の活性を調整する化合物のスクリーニング方法であって、LSR受容体活性を直接的または間接的に反映し、独立してまたは組み合わせて取られた種々のパラメータに対する候補化合物の作用の測定からなる方法に関する。

【0251】

リポタンパク質クリアランスのためのLSR活性を調整できる化合物のスクリーニングのために好ましい主要な作用とは、LSR受容体によるリポタンパク質の結合、取り込みおよび分解活性に対する化合物の作用である。

10

【0252】

この作用は、遊離脂肪酸またはリポタンパク質クリアランスに対するLSR活性を誘導もしくはは阻害することが知られている他のいずれかの薬剤の不在下または存在下、あるいはレプチン、またはサイトカインクリアランスに対するLSR機能を誘発または阻害することができる他のいずれかの薬剤の不在下または存在下で分析することができる。さらに、細胞内または細胞外いずれかのリパーゼ活性を促進または低下させることができる薬剤の不在下または存在下、ならびにリポタンパク質の分解の公知の代替経路の不在下または存在下で測定できる。

20

【0253】

以下のものを含む種々の間接的パラメーターもまた、測定することができる：

化合物の投与により誘導される体重変化

化合物の投与により誘導される食餌摂取

例えば高脂肪食の摂取前、摂取中または摂取後の化合物投与により誘導される食後脂肪血応答。

【0254】

血漿トリグリセリド濃度および／またはリポタンパク質または高トリグリセリド粒子の結合、インターナリゼーション、肝臓分解に影響し得る化合物の選択が好ましいであろう。

30

【0255】

サイトカイン類、特にレプチンのクリアランスのLSR活性を調整できる化合物のスクリーニングのために好ましい主要な作用とは、遊離脂肪酸の不存在下または存在下でLSR受容体によるサイトカイン類の結合、取り込みおよび肝臓分解活性に対する化合物の作用である。

【0256】

脂質またはサイトカイン類の結合、取り込みおよび／または分解の測定は、例えば、培養肝細胞または繊維芽細胞またはその表面にLSR受容体を発現する他のいずれの細胞においても行うことができる。この細胞は好ましくは、組換えLSR受容体を発現する細胞、さらに特には組換えLSR受容体発現する細胞であり、その内生LSR受容体は不活性であるか、または存在しないと考えられる。これらの細胞はLDL受容体を発現してもよいし、また発現しなくともよい。

40

【0257】

LSR活性を調整する化合物のスクリーニングには、本発明の細胞またはモデル動物、特にマウス、ラットまたはヒト、より好ましくは前記および以下に続く実施例に記載されたものを使用することが好ましい。

【0258】

LSR受容体の発現を調整する化合物のスクリーニング

スクリーニングは、LSRプロモーターに位置する転写因子の結合のための部位への競合的結合または転写因子への直接的結合のいずれかにより、LSR受容体の発現のレベルおよ

50

び／または特異性を調整することができる化合物を試験するために用いられてもよい。

【0259】

LSR受容体の発現レベルおよびその局在は、特許PCT W097/05277に示された大量プローブを用いる溶液中ハイブリダイゼーションにより解析でき、この開示は参照文献として引用されている。便宜には、LSR受容体のcDNAまたはゲノムDNA、もしくはそうでなければそれらの断片が、アンチセンスRNAを生成するために、バクテリオファージ(T3、T7またはSP6)RNAポリメラーゼプロモーターのすぐ下流に位置するクローニング部位に挿入される。好ましくはこの挿入断片は、LSR受容体のゲノム配列の少なくとも100の連続したヌクレオチド、または本発明のcDNAの1つ、さらに詳しくは配列番号9、配列番号11または配列番号13のcDNAの1以上を含んでなる。プラスミドは線状化され、ビオチン-UTPおよびジゴキシゲニン-UTPのような修飾リボヌクレオチドを含んでなるリボヌクレオチドの存在下で転写される。この標識RNAの過剰量を、注目する細胞または組織から単離されたmRNAと溶液中でハイブリダイズさせる。このハイブリダイゼーションはストリンジント条件下で行われる(80%ホルムアミドおよび0.4M NaCl、pH7~8を含有する溶液中で40~50℃にて16時間)。ハイブリダイズしていないプローブは、一本鎖RNAに特異的なリボヌクレアーゼによる消化によって除去する(CL3、T1、PhyM、U2またはARNアーゼ)。修飾ヌクレオチドビオチン-UTPの存在は、ストレプトアビジンを有するマイクロタイタープレート上でのハイブリッドの捕捉を可能にする。DIG修飾の存在により、アルカリ性ホスファターゼと結合した抗DIG抗体を用いるELISAによるハイブリッドの検出および定量が可能となる。

10

20

【0260】

LSR受容体の遺伝子発現の定量分析もまた、DNA鋳型を用いて行うことができる。DNA鋳型とは、それにハイブリダイズすることができるmRNAの発現の特異的検出を可能にするための十分な長さを有する多数の核酸の一次元、二次元、または多次元配列を示す。例えば、DNA鋳型は発現のレベルを評価することが所望される遺伝子由来の多数の核酸を含んでいてもよい。DNA鋳型はLSRのゲノム配列、本発明のcDNAのゲノム配列、さらに詳しくは、配列番号9、配列番号11または配列番号13の1以上のcDNA、それらに相補的な配列のいずれか、またはそれらのいずれかの断片を含んでもよい。好ましくは、この断片は、それらが由来する核配列の少なくとも15、少なくとも25、少なくとも50、少なくとも100または少なくとも500の連続するヌクレオチドを含んでもよい。

30

【0261】

例えば、Schena et al.(1995 and 1996)に記載されたように、LSR受容体の発現の定量分析は、LSR受容体のcDNAを有するDNA鋳型を用いて行うことができる。LSR受容体のcDNAまたはそれらの断片はPCRにより増幅され、鋳型の形態で96ウェルマイクロプレートからシレート(sylated)顕微鏡スライドに高速自動機を用いて結合させる。このようにして作製されたこのDNA鋳型は、その再水和を行わせるため加湿チャンバーでインキュベートする。次いで0.2% SDS中で1分間1回、水中で1分間2回、さらにホウ化水素ナトリウム中で5分間1回のすすぐ。次いでこのテンプレートを95℃にて2分間湯中に沈め、0.2% SDS中に1分間移し、水で2回すすいで乾燥させ、25℃の暗所にて保存する。

40

【0262】

細胞および組織のmRNAは、単離するかまたは市販のもの、例えばClontech社から入手する。プローブは逆転写サイクルによって製造する。次いでこのプローブを1cm²のDNA鋳型と、14×14mmのガラスカバーガラスの下で60℃にて6~12時間ハイブリダイズさせる。この鋳型を25℃にて5分間、低ストリンジント洗浄緩衝液(1×SSC/0.2% SDS)中で洗浄し、次いで室温にて10分間、高ストリンジント緩衝液(0.1×SSC/0.2% SDS)中で洗浄する。この鋳型を0.1×SSC中で、適切なフィルターセットを備えたレーザー蛍光顕微鏡を用いて分析する。正確な示差発現の測定は、2つの独立したハイブリダイゼーション率の平均を取ることににより得られる。

【0263】

LSR受容体の発現の定量分析もまた、Pietu et al. (1996)の記載に従い、DNA鋳型上

50

でLSR受容体のcDNAまたはそれらの断片を用いて行うことができる。LSR受容体のcDNAまたはそれらの断片はPCRにより増幅し、膜に結合させる。種々の組織または細胞から得られたmRNAは放射性ヌクレオチドにより標識する。ハイブリダイゼーションおよび制御された条件下での洗浄の後に、ハイブリダイズしたmRNAをPhosphor Imagerを用いて、またはオートラジオグラフィーにより検出する。実験は2回行い、示差的に発現したmRNAの定量分析を行うことができる。

【0264】

別法として、Lockhart et al.(1996)and Sosnowski et al. (1997)により記載されたように、LSR受容体の発現の分析は、高密度でDNA鋳型を用いて行うことができる。LSR受容体のゲノムDNAまたはcDNAもしくはそれらの相補的配列から抽出された15~50ヌクレオチド、好ましくは約20ヌクレオチドのオリゴヌクレオチドはチップ上で直接合成するか、または合成した後にチップ上に置く。

10

【0265】

ビオチン、ジゴキシゲニンまたは蛍光分子のような適切な化合物で標識したLSRcDNAプローブはmRNA集団から合成し、平均50~100ヌクレオチドのオリゴヌクレオチドに切断する。このようにして得られたプローブを、次いでチップにハイブリダイズさせる。Lockhart et al.(1996)により記載されたように洗浄し、種々の電場をかけた後(Sosnowski et al. 1997)、標識化合物を検出、定量する。ハイブリダイゼーションは2回行う。種々のcDNAサンプルにおける同標的オリゴヌクレオチドに対するプローブにより生じるシグナルの強度の比較分析は、LSR受容体に対するmRNAの示差発現を示す。

20

【0266】

前記技術は、例えば誘導または非誘導といった種々の条件により、同細胞または同組織におけるLSR受容体の発現レベルの分析を可能にするだけでなく、これもまた多様である条件下でのこの発現の組織特異性の分析も可能にする。これらの技術により、LSR受容体のサブユニットのいずれか、より一般には、プローブを適切に規定することによる、選択的スプライシングから誘導された種々の形態の発現を分析することが可能となるであろう。

【0267】

このように、発現のレベルまたは特異性を調整するための候補となる化合物の作用、または種々の形態のLSR受容体のスプライシングの作用は、mRNAの供給源である細胞、特に、それらが自然にLSRを発現しようとも、それらが組換え細胞であろうとも、本発明のモデル細胞を、この候補化合物に曝すことにより、大きなスケールで分析することができる。

30

【0268】

LSR受容体と相互作用する化合物のスクリーニング

本発明のもう1つの態様は、LSR受容体と結合できる分子を同定する方法にある。かかる分子を用いて、LSR受容体の活性を調整することができる。例えば、かかる分子を用いて、リポタンパク質、好ましくは、トリグリセリド中に高いリポタンパク質、またはサイトカイン類、好ましくはレプチンの分解を刺激するまたは低下させることができる。また、かかる分子を用いて、LSR活性の、レプチンによる活性化または遊離脂肪酸による活性化を阻害することもできる。

40

【0269】

LSR受容体のリガンドの同定には、多くの方法が存在する。これらの方法の1つは米国特許第5,270,170号に記載され、この技術は本明細書の開示の一部とみなされる。便宜には、LSR受容体と結合するための候補であるペプチドと、lacI遺伝子によりコードされるLac受容体などのDNAと結合するタンパク質との間の融合体を各々コードする複数のベクターを含んでなる、ランダムペプチドからなるライブラリーを構築する。ランダムペプチドのためのベクターはまた、そのタンパク質がLacリプレッサーである場合は、LacO部位などのDNAに結合するタンパク質の結合部位を含む。ランダムペプチドライブラリーは宿主細胞に導入され、そこで融合タンパク質を発現する。次いで、この宿主細胞を、融合

50

タンパク質のベクター部位との結合が可能な条件下で溶解させる。

【0270】

融合タンパク質と結合したベクターを、ペプチドの特異的結合を可能にする条件下で、固定化LSR受容体、固定化LSR受容体のサブユニット、または固定化LSR受容体の断片と接触させる。例えば、LSR受容体、そのサブユニット、または少なくとも10、少なくとも20、少なくとも30、または30を超える連続するアミノ酸を含んでなるその断片を、プレートもしくはプラスチック粒子などの表面に結合させることにより固定化することができる。

【0271】

LSR受容体と結合できるペプチドをコードするベクターは、ペプチドとLSR受容体、受容体のサブユニット、またはその断片との間の相互作用により、特異的にその表面上に保持される。 10

【0272】

別法として、LSR受容体と相互作用可能な分子は、Matchmaker Two Hybrid System 2などのダブルハイブリッドシステムを用いて同定することもできる。その技術が出典明示して本明細書の一部とみなされる、Matchmaker Two Hybrid System 2（カタログ番号K1604-1、Clontech）添付のマニュアルの説明書に従い、LSR受容体、そのサブユニットまたは少なくとも10、少なくとも20、少なくとも30、または30を超える連続するアミノ酸を含んでなるその断片をコードする核酸を酵母GAL4の転写アクチベーターのDNA結合ドメインをコードするDNAとそれらが同じ位相になるように発現ベクターに挿入する。LSR受容体と相互作用可能なタンパク質またはペプチドをコードするライブラリーの核酸は、GAL4アクチベーターの活性化ドメインをコードするDNAと同じ位相になるように第2の発現ベクターに挿入する。この2つのプラスミドで酵母を形質転換し、それらを各ベクターに含まれるマーカーを発現する細胞、ならびにその発現がGAL4に依存するHIS3遺伝子を発現する細胞の選択が可能となる培地に置く。ヒスチジンフリー培地で増殖できる形質転換細胞を、GAL4依存条件下でのLacZの発現に関して分析する。ヒスチジン不在で増殖し、かつ、LacZを発現する細胞は、LSR受容体、そのサブユニットまたは少なくとも10、少なくとも20、少なくとも30、または30を超える連続するアミノ酸を含んでなるその断片と相互作用するタンパク質またはペプチドをコードするプラスミドを含んでいる。 20

【0273】

LSR受容体、そのサブユニットまたは少なくとも10、少なくとも20、少なくとも30、または30を超える連続するアミノ酸を含んでなるその断片の、結合化学により生成されたもののような小分子との相互作用を研究するためには、Wang et al.(1997)に記載のHPLC-接続微量透析(HPLC-coupled microdialysis)、またはBusch et al.(1997)に記載のアフィニティーキャピラリー電気泳動を使用することができ、これらの技術は本明細書の開示の一部とみなされる。 30

【0274】

他の方法では、LSR受容体、そのサブユニットまたは少なくとも10、少なくとも20、少なくとも30、または30を超える連続するアミノ酸を含んでなるその断片と相互作用可能なペプチドまたは小分子を、放射性、蛍光または酵素マーカーなどの検出可能なマーカーに結合させてもよい。これらの標識分子を、特異的相互作用を可能にする条件下で、固定化LSR受容体、その固定化サブユニット、または少なくとも10、少なくとも20、少なくとも30、または30を超える連続するアミノ酸を含んでなるその固定化断片と接触させる。特異的に結合していない分子を除去した後、結合分子を適当な方法により検出する。 40

【0275】

これらの方法は特に、脂肪酸またはLSR上の脂肪酸結合部位と結合可能な類似体、リポタンパク質またはLSR受容体上のリポタンパク質結合部位と結合可能な類似体、レプチン誘導体またはLSR上のレプチン結合と結合可能な類似体、およびgC1qR受容体の誘導体またはLSR上のgC1qR結合部位と結合可能な類似体の同定を可能にし得る。

【0276】

さらに、LSRと、好ましくは、脂肪酸、リポタンパク質、サイトカイン類、特にレプチ 50

ン、またはgClqRもしくはその類似タンパク質の1つのLSR受容体上の結合部位と結合するペプチドまたは小分子は、競合実験により同定することができる。かかる実験では、LSR受容体、そのサブユニットまたは少なくとも10、少なくとも20、少なくとも30、または30を超える連続するアミノ酸を含んでなるその断片を、プラスチック製支持体などの表面上に固定化する。受容体の標識リガンドの存在下で、固定化LSR受容体、その固定化サブユニット、または少なくとも10、少なくとも20、少なくとも30、または30を超える連続するアミノ酸を含んでなるその固定化断片と接触させるペプチドまたは小分子の量を増せば、このリガンドは、例えば、レプチン、オレイン酸塩LDLまたはgClqRであり得る。LSR受容体のリガンドは放射性、蛍光または酵素マーカーで標識されていてもよい。LSR受容体、そのサブユニットまたは少なくとも10、少なくとも20、少なくとも30、または30を超える連続するアミノ酸を含んでなるその断片と相互作用する供試分子の能力は、供試分子の存在下で結合した標識リガンドの量を測定することにより求められる。供試分子が存在する場合に結合リガンド量が低下すれば、後者がLSR受容体、そのサブユニットまたは少なくとも10、少なくとも20、少なくとも30、または30を超える連続するアミノ酸を含んでなるその断片と相互作用可能なのということが示される。

【0277】

これらの方法は特に、脂肪酸またはLSR上の脂肪酸結合部位と結合可能な類似体、リポタンパク質またはLSR受容体上のリポタンパク質結合部位と結合可能な類似体、レプチン誘導体またはLSR上のレプチン結合と結合可能な類似体、およびgClqR受容体の誘導体またはLSR上のgClqR結合部位と結合可能な類似体の同定を可能にする。

【0278】

かかる化合物、または他の候補化合物の、オレイン酸塩、リポタンパク質、レプチンまたはgClqRのLSRへの結合と競合する能力を特に測定することができる。

【0279】

また、BIACORE技術を用いてLSR受容体と相互作用可能な化合物のスクリーニングを行うこともできる。この技術はSzabo et al.(1995)およびEdward and Leartherbarrow(1997)に記載されており、この技術は本明細書の開示の一部とみなされ、標識を用いずに実時間で分子間の相互作用を検出することを可能にするものである。それはSPR（表面プラズモン共鳴surface plasmon resonance）の現象に基づくものである。便宜には、分析する分子を表面に結合させる（典型的には、カルボキシメチルデキストランマトリックスを用いる）。光線をサンプルを含まない表面に向け、その表面に反射させる。SPR現象は、角度および波長の特異的組み合わせにより反射光の強度に減衰をもたらす。分子の結合現象は、SPRシグナルの修飾として検出される、表面の屈折率に変化をもたらす。LSR受容体と相互作用可能な化合物のスクリーニングを行うためには、LSR受容体、そのサブユニットまたは少なくとも10、少なくとも20、少なくとも30、または30を超える連続するアミノ酸を含んでなるその断片を表面上に固定化する。この表面は、供試分子が通過する細胞のある面をなす。分子の、LSR受容体、そのサブユニットまたは少なくとも10、少なくとも20、少なくとも30、または30を超える連続するアミノ酸を含んでなるその断片との結合は、SPRシグナルの変化により検出する。供試分子はタンパク質、ペプチド、炭水化物、脂質または、例えば、結合化学により生成された小分子であってよい。候補タンパク質は、いずれの種から得られたいずれの組織から抽出されてもよい。また、それらの表面に内生または組換えLSR受容体を有する真核細胞または原核細胞または脂質小胞を固定化することにより、BIACORE技術を使用することもできる。

【0280】

この方法の主たる優位性の1つは、LSR受容体と相互作用分子の間で、会合常数の決定を可能にすることにある。従って、高いまたは低い会合常数で相互作用する分子を特異的に選択することができる。

【0281】

LSR受容体、そのサブユニットまたは少なくとも10、少なくとも20、少なくとも30、または30を超える連続するアミノ酸を含んでなるその断片と相互作用するタンパク質または

他の分子は、LSR受容体、そのサブユニットまたは少なくとも10、少なくとも20、少なくとも30、または30を超える連続するアミノ酸を含んでなるその断片を含むアフィニティークラムを用いて同定することができる。LSR受容体、そのサブユニットまたは少なくとも10、少なくとも20、少なくとも30、または30を超える連続するアミノ酸を含んでなるその断片は、アガロース、Affigel、または当業者に公知のマトリックスなどの適切なカラムマトリックスとの化学結合をはじめとする従来技術を用いてカラムに結合させればよい。本発明のもう1つの態様では、アフィニティークラムは、LSR受容体、そのサブユニットまたは少なくとも10、少なくとも20、少なくとも30、または30を超える連続するアミノ酸を含んでなるその断片を、例えば、グルタチオンS-トランスフェラーゼと融合させたキメラタンパク質を含んでもよい。次いで、前記の供試分子をカラム上に置く。LSR受容体、そのサブユニットまたは少なくとも10、少なくとも20、少なくとも30、または30を超える連続するアミノ酸を含んでなるその断片と相互作用する分子はカラムに保持され、次いで、溶出により単離することができる。供試分子がタンパク質である場合、それらはRamunen et al.(1997)に記載の2-D電気泳動ゲルで分析することができ、この技術は出典明示して本明細書の一部とみなされる。別法として、アフィニティークラムにより保持されたタンパク質または他の分子は、電気泳動により精製し、配列決定することができる。同様の方法を用いて、抗体を単離し、「ファージディスプレイ」産物またはヒト抗体由来の「ファージディスプレイ」をスクリーニングすることができる。

10

【0282】

LSR受容体のプロモーターおよび／またはレギュレーター配列と相互作用する化合物のスクリーニング

20

本発明はまた、LSR受容体のプロモーターおよび／またはレギュレーター配列と相互作用する化合物をスクリーニングする方法に関する。

【0283】

LSR受容体遺伝子のプロモーターおよび／またはレギュレーター配列と相互作用するタンパク質をコードする核酸、より詳しくは、配列番号19のヌクレオチド1～1897に相当するヌクレオチド配列またはその断片は、Clontech製のMatchmaker One-Hybrid System（カタログ番号K1603-1）添付のマニュアルに記載のようなシングルハイブリッドシステムを用いて同定することができ、この技術は本明細書の開示の一部とみなされる。便宜には、標的ヌクレオチド配列を選択可能なマーカー遺伝子上流にクローン化し、次いで、酵母ゲノムに組み込む。この組み込みマーカー遺伝子を含有する酵母を、LSR受容体の遺伝子のプロモーターおよび／またはレギュレーター領域と結合する候補タンパク質をコードするcDNAと、GAL4などのドメインを活性化する酵母転写因子との間の融合体を含むライブラリーにより形質転換する。この酵母を、マーカー遺伝子を発現する細胞の選択を可能にする培地に置く。選択された酵母は、プロモーターおよび／またはレギュレーター標的領域と結合できる融合タンパク質を含んでいる。次いで、この融合タンパク質をコードする遺伝子のcDNAを配列決定する。その後、相当する挿入断片をin vitroで発現または転写ベクター中へクローン化することができる。このようにコードされたポリペプチドのプロモーター標的配列との結合は、ゲルシフトまたはDNアーゼに対する保護実験をはじめとする当業者によく知られた技術により確認することができる。

30

40

【0284】

レギュレーターおよび／またはプロモーター配列と結合することによってLSR受容体の発現を修飾することができる化合物のスクリーニングはまた、「リポーター」遺伝子により行うことができる。例えば、LSR受容体のコーディング配列の5'に位置するゲノム領域、より詳しくは、配列番号19のヌクレオチド1～1897に相当するヌクレオチド配列またはその断片は、Clontechから入手可能なpSEAP-Basic、pSEAP-Enhancer、pβgal-Basic、pβgal-Enhancer、またはpEGFP-1などのベクター中へクローン化することができる。便宜には、これらのベクターの各々は、アルカリ性ホスファターゼ、β-ガラクトシダーゼまたはGFP（緑色蛍光タンパク質）などの容易に検出できるタンパク質をコードするマーカー遺伝子上流に位置する複数のクローニング部位を含んでいる。LSR受容体のコーディン

50

グ配列の5'に位置するゲノム領域、より詳しくは、配列番号19のヌクレオチド1~1897に相当するヌクレオチド配列またはその断片の挿入後、マーカータンパク質の発現レベルを測定し、挿入を含まないベクターと比較する。LSRのレギュレーターおよび／またはプロモーター配列により生じる発現に対する候補化合物の効果は、このように評価できる。

【0285】

LSR受容体遺伝子のレギュレーターおよび／またはプロモーター領域と結合できる化合物のスクリーニングはまた、当業者に十分公知であり、Fried and Crothers(1981)、Garnier and Revzin(1981)およびDent and Latchman(1993)に記載のゲルシフト実験により行うことができ、この技術は本明細書の開示の一部とみなされる。これらの実験は、タンパク質に結合したDNA断片が、タンパク質を含まない同断片よりもより遅く移動するという原理に基づくものである。便宜には、標的ヌクレオチド配列が標識される。次いで、それを転写因子を含むように調製した核抽出物もしくは全細胞抽出物と、または種々の供試化合物のいずれかと接触させる。移動シフトによる電気泳動後、LSR受容体遺伝子のレギュレーターおよび／またはプロモーター領域と、転写因子または化合物の間の相互作用を検出する。

10

【0286】

化合物

発明の受容体の発現または活性の調整を可能にする化学または生化学化合物もまた本発明の一部をなす。

【0287】

発明の受容体と直接的、または間接的に相互作用可能な化学または生化学化合物もまた本発明の一部をなす。

20

【0288】

前記で定義された方法により選択される化学または生化学化合物もまた発明の一部をなす。

【0289】

特に、本発明のこれらの化合物のうち、レプチンまたはその誘導化合物の1つ、好ましくはそのタンパク質変異体の1つ、または化学的に修飾されているか、もしくは遺伝子組換えにより得られるレプチン、またはそれらの断片の1つが好ましい。

【0290】

受容体の発現または活性の調整を可能にする化合物は、特に本発明の受容体の数、再生速度および／またはコンホメーションにおける変化を減少、安定化または増強する、または全活性もしくはこの受容体のドメインの1つの活性を促進または阻害する、あるいはそうでなければ、例えば遺伝子異常が見られる場合には、この受容体の正常な発現の再確立を可能にする化合物を意味すると理解される。これらの化合物は例えば、該受容体、または補因子としての、または阻害剤、特に競合的阻害剤としての、またはそうでなければ複合体のコンホメーション変化におけるアゴニストまたはアンタゴニスト活性を有するドメインの1つに特異的なリガンドとして相互作用し得る。これらの化合物もまた、該受容体に特異的な天然リガンドを中和し、それにより、これらのリガンドに誘導される受容体活性を阻害することにより相互作用し得る。

30

40

【0291】

これらの化合物のうち、該受容体のポリペプチド数、その再生速度および／またはそれらの活性の選択性の調整を可能にする化合物が好ましい。

【0292】

本発明の受容体の総活性または発現における増強、および／または該受容体のサイトカイン類、特にレプチンのクリアランス活性の特異的増強、および／または該受容体のリポタンパク質のクリアランス活性の特異的増強を可能とする本発明の化合物もまた好ましい。

【0293】

本発明の受容体の総活性または発現における低減、および／または該受容体のサイトカ

50

イン類、特にレプチンクリアランス活性の特異的低減、および／または該受容体のリポタンパク質クリアランス活性の特異的低減を可能とする化合物もまた好ましい。

【0294】

サイトカイン類、特にレプチンの排出の調整、および／またはリポタンパク質、カイロミクロン残留物、および／またはトリグリセリドの排出の調整を可能にする化合物もまた好ましい。

【0295】

本発明はまた、サイトカイン類レベル、特にレプチン血症の調整、および／またはリポタンパク質、カイロミクロン残留物、および／またはトリグリセリドのレベルの調整を可能にする本発明の化合物を含んでなる。

10

【0296】

サイトカイン類レベル、特にレプチン血症の制御を可能にする発明の化合物は、さらに特に好ましい。

【0297】

なお好ましくは、本発明はリポタンパク質レベルの制御、好ましくは低減、カイロミクロン残留物の血漿濃度における低減、および／またはトリグリセリド血症の低減を可能にする本発明の化合物を含んでなる。

【0298】

最も好ましい化合物のうち：

- a. 本発明の抗体；
- b. 本発明のポリペプチド；
- c. 本発明の受容体の可溶型に相当する、本発明のポリペプチド；
- d. 本発明のベクター；
- e. その外表上に肝細胞の特異的認識部位を有する、本発明のベクター；
- f. そのベクターにより標的細胞中へ挿入された核酸の発現生成物が該形質転換標的細胞につなが留められるか、この形質転換標的細胞により放出される、本発明のベクター；
- g. 本発明のセンスまたはアンチセンスオリゴヌクレオチド；
- h. レプチン、またはそのタンパク質変異体の1つ、または化学修飾されているか、もしくは遺伝子組換えにより修飾されているレプチン、またはそれらの断片の1つ。

20

【0299】

本発明は最後に、医薬としての本発明の化合物に関する。

30

【0300】

本発明の化合物は、食餌習慣における障害に関連する病状および／または病因の予防および／または治療用の医薬として特に好ましい。

【0301】

本発明の化合物はまた、サイトカイン類の代謝障害に関連する病状および／または病因の予防および／または治療用の医薬としても好ましい。

【0302】

好ましくは、本発明はまた、肥満または食欲不振の予防または治療用医薬としての本発明の化合物に関する。

40

【0303】

本発明の化合物は、肥満に伴う、あるいは肥満により引き起こされる病状および／または病因の予防および／または治療用医薬として好ましい化合物である。

【0304】

特に、本発明の化合物は、心不全、冠状動脈不全、脳血管障害、アテローム性疾患、アテローム性動脈硬化症、高血圧症、非インスリン依存性糖尿病、高脂肪血症、および／または高尿酸血症の予防および／または治療用医薬として好ましい。

【0305】

最も好ましいのは、アテローム性疾患、および／またはアテローム性動脈硬化症の予防および／または治療用医薬としての本発明の化合物である。

50

【0306】

最後に、本発明は食餌習慣における障害に関連した病状および／または病因、肥満および／または肥満に伴う、あるいは肥満により引き起こされる病状および／または病因の遺伝子治療による予防および／または治療用の本発明の化合物を含んでなる。

【0307】

医薬の有効成分としての発明の化合物は、医薬上許容される賦形剤と組み合わせた可溶形態であることが好ましいであろう。

【0308】

医薬として使用可能なかかる化合物により、肥満または食欲不振のような食餌習慣における障害に関連した病状および／または病因、および関連の危険性および／または合併症を予防および／または治療する新しい試みが与えられる。 10

【0309】

好ましくは、これらの化合物は全身経路、特に静脈内経路、筋肉内経路または内皮経路または経口経路により投与されるであろう。

【0310】

投与形態、最適用量および生薬形態は、一般に、例えば患者の年齢または体重、その一般的な病状の重篤度、治療に対する耐性および認められる副作用などのような患者に適した治療の確立を考慮した基準に従い、決定することができる。

【0311】

前記のように、場合により、例えばこれらの遺伝子の少なくとも1つが発現されないか、十分に発現しないか、または発現生成物はその機能を果たさない異常形態で発現するか、またはこれとは反対にこれらの遺伝子の過剰発現または異常発現を抑制するという事実に起因する病理上の問題において、その遺伝子の発現を促進することにより、またはそれらの発現生成物の活性を増強することにより、LSR活性を増幅することが望ましいであろう。従って一般に、この遺伝子の発現生成物の欠損または過剰発現をLSR複合体の活性の増幅または減少させる、いわゆる「置換」治療によって補償することが望ましい。 20

【0312】

置換治療は遺伝子治療により、すなわち、例えば遺伝子の1つが十分に発現しない場合、またはそうでなければ、それが異常な形態で発現する場合、本発明の核酸配列および／またはin vivoにてそれらの発現させるエレメント伴う対応する遺伝子を導入することにより行えばよい。 30

【0313】

遺伝子治療の原理は公知である。本発明のウイルスベクターの使用が可能であり；非ウイルス性、すなわちウイルス配列を模擬するか、またはそうでなければ、特にVICAL社により開発された技術による裸のRNAまたはDNAからなる、合成ベクターを考えることもできる。

【0314】

ほとんどの場合において、肝臓に特異的な発現を確実にする標的エレメントを考える必要があり、その結果、レプチンおよびリポタンパク質のクリアランスに依然として関与するタンパク質の発現ゾーンの限定が可能となる。いくつかの場合において、一時的発現または少なくとも必要なときに遮断可能である制御発現用ベクターを有することはいっそう有利である。 40

【0315】

以下、実施例および以下にその説明を示す図面を用いて、本発明の他の特徴および利点を本明細書の残りの部分で明らかにする。

【実施例】

【0316】

実験方法材料

Na¹²⁵IはAmersham(Les Ulis, France)により提供される。オレイン酸、ウシ血清アルブ 50

ミン(A 2153)(BSA)およびTritonX100はSigma(St Quentin Fallavier, France)から入手される。ヒトラクトフェリン(Serva)およびヘパリンナトリウムは各々Biowhittaker(Fontenay sous Bois, France)およびChoaylaboratories(Gentilly, France)から提供される。トリグリセリド(TG)の同定用酵素キットは、Boehringer Mannheim(Meylan, France)から入手される。スラミンナトリウムは、CBC Chemicals(Woodburg, CT)から入手される。ダルベッコの修飾イーグル培地(Dulbecco's modified Eagle medium)(DMEM)、トリプシンおよびウシ胎児血清はLife Technologies, Inc.(Eragny, France)により提供される。

【0317】

動物

野生型C57BL/6Jマウス、C57BL/6J ob/ob、野生型C57BL/KsおよびC57BL/Ks db/dbはR. J 10
anvier Breeding Center(Le Genest St Isle, France)から入手される。

【0318】

細胞

正常繊維芽細胞(GM08333)およびHF(GM00486A、GM007001B、GM00488C)はNIGMS human genetic mutant cell repository(Camden, NJ)より提供される。この細胞は前記のように36mmのペトリ皿で平板培養し(ウェル当たり300,000正常繊維芽細胞、ウェル当たり150,000HF繊維芽細胞)、次いで、10%(正常繊維芽細胞)または20%(HF繊維芽細胞)ウシ胎児血清、2mMグルタミン、100U/mlのペニシリンおよび100U/mlのストレプトマイシンを含有するDMEM培地において、湿度調節炭酸ガスインキュベーターにて培養する。

【0319】

初代培養の肝細胞は前記の手法(Mann et al., 1995)により得られる。次いで、この細胞をウェル当たり900,000細胞または165cm²のフラスコ当たり22×10⁶細胞を平板培養する。この細胞は培養48時間後、研究に使用する。

【0320】

リポタンパク質の調製および放射性標識

VLDL($d < 1.006 \text{ G/ML}$)およびLDL($1.025 < d < 1.055 \text{ G/ML}$)はボランティアからの新鮮な血漿の一連の超遠心分離により単離し(BIHAIN AND YEN, 1992; GOLDSTEIN ET AL., 1983)、2週間までに使用する。リポタンパク質は放射性ヨウ素で処理し(BILHEIMER ET AL., 1972)、標識後1週間以内に使用する。＜SUP＞125I-LDLおよび¹²⁵I-VLDLは使用直前に濾過する(0.22μmメンブラン、Gelman)。

【0321】

マウス組換えレプチンの調製および放射性標識

レプチン cDNA はPCRにより、マウスC57BL/6Jの脂肪組織のmRNAから得られる。5'PCRプライマーは欠失されるシグナル配列後に開始コドン、またヘキサヒスチジン末端をコードする配列を導入する。ネズミレプチンをコードする修飾配列は発現ベクターpSE280(Invitrogen, France)中へクローン化し、大腸菌(E.coli)内で発現させる。プラスミドDNAの配列決定により、コーディング配列を確認する。細菌は37℃にて培養し、タンパク質合成は1mMのイソプロピルβ-D-チオガラクトピラノシドによって誘導される。穏やかな遠心分離後、回収した細菌を凍結融解により溶解し、次いでDNAをデオキシリボヌクレアーゼIで消化する。細胞膜は界面活性剤で抽出し、その封入体は遠心分離後に分離する。PBS中の1%デオキシコール酸ナトリウムで3回の洗浄をした後、その封入体を6Mグアニジン塩酸溶液に溶解する。組換えタンパク質の再生は、PBS中で1/100希釈することにより達成される。次いで、再生タンパク質を精製し、さらにニッケルをベースとしたキレート金属アフィニティークロマトグラフィーカラム(Probond, Invitrogen)上で濃縮する。溶出はイミダゾールで行う。組換えレプチンの純度はSDS-PAGE電気泳動によって、またその活性はC57BL/6J ob/obマウスにおいて25μgのレプチンの腹膜内投与後の満腹度の評価により調節する。次いで、製造者の推奨する方法により、ヨードビーズ(Pierce)を用いて組換えレプチンを放射性標識する。

【0322】

AdipoQ mRNA のクローニング、組換えAdipoQタンパク質の産生および単離

c D N A の発現ベクターへのクローニング

マウス脂肪組織はC57BL/6Jマウスから得、m R N A は磁気ビーズに結合させたpolydTs (Dynabeads, Dynal, France)により抽出する。c D N A ライブラリーは、供給者の説明書を用い、市販のキット (Superscript Life Technologies)を用いて、40℃での逆転写により、マウス脂肪組織から構築する。AdipoQに特異的なc D N A は以下の2つのプライマーを用いて増幅される：

5'CTACATGGATCCAGTCATGCCGAAGAT3' (配列番号37)

5'CGACAACGAGTCAGTTGGTATCATGG3' (配列番号38)。

【0323】

次いで、増幅生成物を制限酵素BamHIおよびXhoIで消化し、発現ベクターpTRCHisB (Invitrogen, France)の対応部位に挿入する。pTRCのB型は、エンテロキナーゼに対する認識部位および抗Xpress抗体に対するエピトープを有するヘキサヒスチジンペプチドの下流で異種配列の発現を可能にする。

【0324】細菌トランスフェクションおよびその構築体の確認

このようにして得られたプラスミドを大腸菌DII5αへとトランスフェクトする。さらにプラスミドD N A を抽出し、次いで、異種挿入断片を配列決定する。

【0325】組換えタンパク質の細胞培養、抽出および精製

組換え細菌細胞は、600nmにおけるODが0.2に達するまで、抗生物質を含有するLB培地で37℃にて培養する。次いで、培地へ1mMイソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシドを添加することにより、組換えタンパク質の産生を誘導する。細菌培養は16時間37℃で継続する。この細胞を遠心分離により回収する。細胞はNaCl、PMSFおよびデオキシコール酸ナトリウムの存在下、Tris緩衝液pH7.4中でリソザイムを用いて溶解する。D N A を音波処理により変性させる。遠心分離後、この組換えタンパク質をProbondカラム (Invitrogen, France)を用いて上清から分離する。このカラムはヘキサヒスチジンペプチドに対する親和性を有する帯電ニッケルを含有している。溶出はイミダゾールの存在下で行う。溶出産物を透析した後、タンパク質濃度をローリー法により評価する。得られたタンパク質の純度はSDS-PAGE電気泳動によって試験し、それは単一のバンドを示す。

【0326】

実施例1：LSR活性に関与するタンパク質複合体の同定：ポリクローナル抗体による部分精製および同定

リガンドプロットティングの技術を用いて、LSR活性に関与するタンパク質複合体を同定した。この技術はMarm et al., 1995によって詳細に記載されており、下記に詳述する。

【0327】リガンドプロットティング

この技術は、示差遠心 (Belcher et al., 1987)により、ラット肝臓膜を単離し、次いで、膜タンパク質を125mMオクチルグルコシド、20mM Trisおよび2mM EDTA、pH8を含有する溶液中に可溶化することにある。このようにして可溶化されたタンパク質は非変性条件下、4~12%ポリアクリルアミドの勾配 (ゲル当たり35-50mgのタンパク質)からなる分取SDSゲル (厚さ5mm)上で分離する。次いでゲルの一部について、タンパク質をニトロセルロース膜上へ電気転移 (セミドライ・トランスファー (semi-drytransfer), 21V, 45分, Biorad)させる。3%アルブミンを含有するPBS溶液中でこの膜の遊離部位をブロッキングした後、この膜を40 μg/mlの¹²⁵I-LDLとともに、0.8mMオレイン酸塩の存在下 (図8、レーン2) または不在下 (図8、レーン1) でインキュベートする。次いでこの膜を、0.5%(v/v) Triton X 100を含有するPBS中で10分間、5回洗浄し、さらにPhosphor Imager screenに感光させる。

【0328】

オレイン酸塩の存在下 (図8、レーン2) または不在下 (図8、レーン1) で得られた画像の解析では、LDLと結合した3つのメインバンドの存在が示されている。第1のバンドの見

10

20

30

40

50

かけの分子量は約240kDaであり、第2のバンドでは115kDa、第3のバンドでは90kDaである。これらの観察に基づき、2つの仮説が立てられる：一方では、LSR活性は数種の異なるタンパク質の存在と関連し；他方、同一タイプの画像についてはタンパク質複合体の多量体構造により説明可能である。

【0329】

この仮説を検証するために、発明者らは最も高い見かけの分子量(240kDa)を有するバンドの精製に着手した。「バンドA」と称するこのタンパク質の部分精製は、以下のように分取電気泳動により行われる。

【0330】

LSRの部分精製

この技術は、示差遠心(Belcher et al., 1987)により、ラット肝臓膜を単離し、次いで、膜タンパク質を125mMオクチルグルコシド、20mM Trisおよび2mM EDTA、pH8を含有する溶液中に可溶化することにある。このようにして可溶化されたタンパク質は非変性条件下、4~12%ポリアクリルアミドの勾配(ゲル当たり35-50mg)からなる分取SDSゲル(厚さ5mm)上で分離する。次いでゲルの一部について、タンパク質をニトロセルロース膜上へ電気転移(セミドライ・トランスファー(semi-dry transfer), 21V, 45分, Biorad)させる。3%アルブミンを含有するPBS溶液中でこの膜の遊離部位をブロッキングした後、この膜を40 µg/mlの¹²⁵I-LDLとともに、0.8mMオレイン酸塩の存在下(図8、レーン2)または不在下(図8、レーン1)でインキュベートする。次いでこの膜を、0.5%(v/v)TritonX100を含有するPBS中で10分間、5回洗浄し、さらにPhosphor Imager screenに感光させる。注目するタンパク質は電気溶出させる(Electroeluter, Biorad)。

10

20

【0331】

前記のように、ラット肝臓原形質膜タンパク質を調製し、ポリアクリルアミド上で分離する。バンドAの正確な位置は種々のレベルで取られた分取ゲルサンプルの電気転移後に行われるリガンドブロッキングにより立証された。

【0332】

次いで、バンドAを含有するゲル断片を採取し、電気溶出し、濃縮し(speedvac)、次いで電気泳動およびニトロセルロース膜上への転移後、オレイン酸塩の存在下でLDLと結合する能力に関して試験する(図8、レーン3；80 µgタンパク質/レーン)。

【0333】

このようにして得られたタンパク質はまた、その特異性がウエスタンブロッティングにより試験されるポリクローナル抗体を産生するために使用できる(図8、レーン4)。

30

【0334】

ポリクローナル抗体の調製

抗LSR抗体の産生のための抗原として用いられるLSRタンパク質を前記のように調製した。

【0335】

従来の免疫感作法に従い、抗原調製物を、完全フロイントアジュバントの存在下でウサギに皮下注射する。ラットタンパク質に向けられた抗体の力価を正確に決定する(ドットブロット法)。後者が十分であると判定される場合、得られた抗体の特異性を、前記のように、二次抗体としてヨウ素I¹²⁵で標識した抗ウサギIgGヤギ抗体を用いる、ラット肝臓原形質膜タンパク質を可溶化した調製液についてのウエスタンブロッティングにより試験する。

40

【0336】

非還元条件下における電気泳動後のウエスタンブロット結果は、バンドAのタンパク質から産生した抗体は、オレイン酸塩の存在下で¹²⁵I-LDLと結合する3つの主要なタンパク質バンド(240kDa、115kDaおよび90kDa)と結合することを示している(図8、レーン4)。これらのタンパク質複合体とLSR活性の関連を証明するために、LSR活性に対するこれらのポリクローナル抗体の効果について試験した。

【0337】

50

用いた方法は以下に詳細に記載されている(Mann et al., 1995; Troussard et al., 1995)。LSR活性はリポタンパク質の原形質膜への結合の測定、およびラット肝細胞初代培養におけるリポタンパク質の結合、取り込みおよび分解の測定により評価される。

【0338】

原形質膜におけるリポタンパク質の結合の測定

LSR活性はラット肝臓原形質膜の調製に対して測定される(Bartles and Hubbard, 1990)。これらの膜は5-ヌクレオチダーゼ(原形質膜に特異的なマーカー)の10~15倍の強さを示す。100 μ gのタンパク質アリコートに100mM PBS、2mM EDTA、350mM NaCl、pH8を補給した最終容量250 μ lにて(緩衝液A)、0.8mMオレイン酸塩の存在下または不在下で、37℃にて30分間インキュベートする。オレイン酸塩を5~10 μ l容量のイソプロパノールに添加する。次いで、過剰な結合していないオレイン酸塩を6回の洗浄によって除去する。このペレットを250 μ lのインキュベーション緩衝液中に再懸濁し、有効サイクルにおいて電力1.90%で5秒間超音波処理をし、次いで18,000rpmで15分間遠心分離する。活性化した膜は、4℃にて1時間、種々の濃度の抗体とともに、次いで5 μ lの 125 I-LDLとともに(4℃にて1時間)インキュベートする。25 μ lの2%BSAをインキュベーション混合液に添加する。膜に結合した 125 I-LDLの量は、200 μ lのインキュベーション混合液を緩衝液A中5%(w/v)のBSA層に置いた後、遠心分離により膜を沈降させることにより測定する。この上清を吸引によって除去し、試験管の底部を切り離し、それらの放射能を γ カウンターで測定する。

【0339】

LSR活性に対する抗LSR抗体の阻害効果は、ウサギ免疫グロブリン調製物のいずれもの効果と比較して、図9に示されている。LSR活性の抗LSR抗体による阻害は、前記の多量体複合体が受容体の活性にあずかり、それを同定するために用いられるリガンドブロッティング法を有効にすることを立証するものである。さらに、抗バンドA抗体の効果は、受容体活性の他の段階について試験された：すなわち、初代培養の肝細胞表面で発現するLSRによるリポタンパク質の取り込みおよび分解の段階である。

【0340】

肝細胞によるリポタンパク質の結合、取り込みおよび分解の測定

ラット肝細胞の初代培養におけるLSR活性は、Bihain and Yen, 1992およびMann et al., 1995に記載されたように、 125 I-LDLおよび 125 I-VLDL(LDL：低密度リポタンパク質；VLDL：超低密度リポタンパク質)の結合、取り込みおよび分解により測定される。

【0341】

LDLの結合、取り込みおよび分解における抗LSR抗体の効果をLSRによって測定するために、ラット肝細胞の初代培養(平板培養後48時間)を20ngのレプチン/ウェルの存在下で、37℃にて30分間インキュベートし、次いで、オレイン酸塩の存在下または不在下で抗LSR抗体を添加する。室温にて30分間インキュベートした後、 125 I-LDL(20 μ g/ml)を添加し、次いで、細胞を37℃にて4時間インキュベートする。 125 I-LDLの結合、取り込みおよび分解をBihain and Yen, 1992およびMann et al., 1995に記載されたように測定する。

【0342】

図9Bのデータは、抗バンドA抗体が肝細胞のレベルで存在するLSRに対するLDLの結合活性の大部分を阻害するというを示す。この阻害はリポタンパク質の取り込みおよびタンパク質分解性の分解におけるのと同じ割合での減少を引き起こす。

【0343】

かくして、抗バンドA抗体は抗LSRとして同定される。それらの関連する特異性は選択的免疫沈降法によって決定した。以下に記載されるプロトコールに従い、初代培養の肝細胞抽出物を前記の抗LSR抗体によって免疫沈降させる。

【0344】

特異的抗体の存在下での肝細胞抽出物の免疫沈降

ラット肝細胞の初代培養(Oukka et al., 1997)を、 35 S-メチオニンおよび 35 S-システイン(Promix, Amersham)の混合液の存在下で、60分~2時間インキュベートする。その後、この培地を除去し、細胞を洗浄し、次いで1%のTritonX100を含有するPBS中でインキュベ

ートする。次いで細胞溶解物を非特異的抗体の、次いでタンパク質Aの存在下でインキュベートする。その後、40 μ g当量の特異的抗LSR抗体を添加し、LSR抗体複合体をタンパク質Aの二次調製物を用いて沈降させる。洗浄後、複合体を5% β -メルカプトエタノールを補給するか、またはしない1%SDSの存在下で解離させ、100°Cにて5~10分間インキュベートし、次いで10%アクリルアミドゲル上で分離する。このゲルを乾燥し、Phosphor Imager screenに感光させる。レーンの各々は165cm²のフラスコと等価量、つまり22 $\times$ 10⁶細胞を含有する。

【0345】

免疫沈降の解析結果は、非還元条件下（図10、レーン2-100°Cにおけるインキュベーションなしおよび3-100°Cにおけるインキュベーション有り）で、抗体が3つの主要なタンパク質バンド：見かけの分子量240kDaおよび180kDaの2つ、見かけの分子量68kDaの1つを示している。分子量115kDaおよび90kDaに相当するより弱い強度の2つのバンドの存在もまた注目される。それゆえに、この実験アプローチは本質的には、リガンドブロッキング法により同定されたものと同じタンパク質構成要素を同定する。さらに、還元条件下（図10、レーン1および4）で高分子量構成要素が各々68kDa、56kDaおよび35kDaの見かけの分子量の3要素へと解離することが観察できる。

【0346】

68kDaおよび56kDaバンドの相対強度は等価であるが、35kDaバンドの相対強度は他の2つの相対強度の約1/4である。

【0347】

実施例2： α -および β -LSRをコードするcDNAのクローニング

前記の抗LSR抗体による発現ライブラリーのスクリーニングは、以下に示されるように行った。

【0348】

発現ライブラリーのスクリーニング

ラット肝臓cDNA (Clontech Laboratories Inc.から購入)(5'Strech PluscDNA Library)を含有する λ GT11バクテリオファージによる細菌の感染後、細胞をLB MgSO₄培地上で平板培養する。42°Cにて4時間の培養後、予め10mM IPTG溶液でインキュベートしたニトロセルロース膜をペトリ皿に置く。4時間後、第1の膜を取り出し、第2の膜をペトリ皿に施す。

【0349】

1時間攪拌を続けたブロッキング緩衝液を含むペトリ皿に各膜を浸漬する。次に、抗体をブロッキング緩衝液の最終濃度10 μ g/mlまで添加する(Huynh et al., 1984;Young and Davis, 1983a and 1983b)。次いでこの膜をTNT(10mM Tris,150mM NaCl,0.05% Tween20)で10分間3回洗浄する。

【0350】

この膜を二次抗体（アルカリ性ホスファターゼ結合affinipureF(ab')₂断片ヤギ抗ウサギIgG; Immunotech）の存在下で、最終濃度0.08 μ g/mlのブロッキング緩衝液（TNT+5%脱脂粉乳、Paturage trademark）にてインキュベートする。

【0351】

TNT中で膜を洗浄した後、BCIP（5-ブromo-4-クロロ-3-インドリルリン酸塩）およびNBT（ニトロブルーテトラゾリウム）の存在下で、呈色するまでインキュベートする。

【0352】

次いで陽性クローンをディッシュに回収し、滴定し、次いで同免疫スクリーニング法にかけ、それらが真に陽性であることを確認する（二次スクリーニング）。所望により三次スクリーニングを行ってもよい。クローンを選択し、溶菌液(Clontech protocol)から単離し、次いで制限酵素EcoR1で消化したファージDNAをプラスミドpBluescriptSK+のEcoR1部位に挿入する。

【0353】

このようにして、1.8kbの挿入を含有する2クローンが得られ、同一の配列であることが

証明される。この挿入断片のBgIII-XbaI断片に相当するプローブを用いた、ラット肝細胞 mRNA (2 µg のポリA+mRNA) のハイブリダイゼーションによって、各々1.9kDaおよび2.1kDaのサイズのバンドが明らかになった (図11A)。この挿入断片のXbaI-XbaI断片に相当するプローブを用いた、対応するメッセンジャーの組織分布についてのノーザンブロット解析では、優先的にそれらが肝臓において発現することを示す (図11B)。ノーザンブロット解析は以下のプロトコールに従って行われた。

【0354】

ノーザンブロット解析

種々のラット組織のmRNAを含有する膜(Clontech)を、5xSSPE、0.5% SDSを含有する10xデンハート緩衝液、100 µg/mlのサケ精子DNA、50%脱イオン化ホルムアミド中で、LSR遺伝子に対するcDNAおよび [³²P] dCTPで標識されたヒトβ-アクチン(Clontech)に対するcDNA断片と42°Cにて16時間ハイブリダイズさせた。次いで、この膜を室温にて2xSSC、0.5% SDS中で、さらに65°Cにて1xSSC、0.1% SDS中で洗浄し、その後Phosphor Image screen(Molecular Dynamics)に曝した。

【0355】

1.9kbバンドに相当するcDNAを、5'RACE PCRによって1.8kb断片から再構築し、配列決定した。

【0356】

ノーザンブロット解析における多重バンドの存在を解明するために、ラットのDNA配列断片を定義している数対のプライマーを合成し、PCR増幅用プライマーとして用いた (図11C)。用いたオリゴヌクレオチド配列を以下に挙げる：

a : 5' -GTTACAGAATTCGCCGCGATGGCGCCGCG-3' (配列番号20)

b : 5' -GCCAGGACAGTGTACGCACT-3' (配列番号21)

c : 5' -ACCTCAGGTGTCCCGAGCAT-3' (配列番号22)

d : 5' -GAAGATGACTGGCGATCGAG-3' (配列番号23)

e : 5' -ACCTCTATGACCCGGACGAT-3' (配列番号24)

b' : 5' -CACCACCCTGACAGTCCGTA-3' (配列番号25)

c' : 5' -CTGGGGGCATAGATGCTCGG-3' (配列番号26)

d' : 5' -GCCCTGGAAGGCCTCGATCG-3' (配列番号27)

e' : 5' -CAAGTCCCTAGGATCGTCCG-3' (配列番号28)

【0357】

各プライマー対は単一断片を示すのに対して、bc'対は異なるサイズの3断片を増幅することが可能である。これらの断片の配列解析によって、各々2097bp (配列番号1)、2040bp (配列番号3) および1893bp (配列番号5) のサイズを有し、かつ、3つ総てが選択的スプライシングによって同一の前駆メッセンジャーに対応するラットLSRに対する3つの完全DNAの配列を再構築することを可能にする。

【0358】

これらの3つのDNAはコザック共通配列(Kozak, 1987 and 1990)に囲まれた219位においてAUGコドンで開始するオープンリーディングフレームを含んでいる。これらの3つのcDNAによってコードされるタンパク質の推定分子量は各々66kDa、64kDaおよび58kDaである。

【0359】

次いで、最長および最短形態のラットLSRを各々コードする2つのcDNAを以下に示したようにin vitroで翻訳した。

【0360】

in vitro翻訳

cDNAはプラスミドpcDNA中へサブクローニングする；in vitro転写および翻訳はPromega TNTキットを用いて行う。³⁵S-メチオニンおよび³⁵S-システインで標識した翻訳生成物は、ポリアクリルアミド勾配ゲル(10%)上での電気泳動後、視覚化し、Phosphor Imagerに感光させる。

【0361】

得られた生成物の分子量、すなわち68kDaおよび56kDa(図12)は、LSRのαおよびβサブユニットの分子量に丁度一致している。

【0362】

これらmRNAの生成物がLSR活性に関与するかどうかを決定するために、3つの異なる実験アプローチを用いた。

【0363】

第一に、サイズ2097bpのmRNAから生成したLSRの169~186残基(SAQDL DGNNEAYAE L I V L G R : 配列番号29)、および556~570残基(EEGQYPPAPPYSET : 配列番号30)に相当する2つのペプチドを合成した。これらのペプチドの配列は前記にて同定された3つのタンパク質に共通である。これらの合成ペプチドに向けられる抗体は、前記にて示されたプロトコールに従って得た。図13Cおよび14Cは、これらの抗LSRペプチド抗体がLDLの、ラット原形質膜に存在するLSRとの結合に対して阻害効果を有することを示し、それは実施例1に記載されたプロトコールに従って測定された。

【0364】

第二に、αおよびβサブユニットの部分精製物は、サルコシルを用いる選択的可溶化により得られた；ウエスタンおよびリガンドブロッキングを用いる研究は、αおよびβ構成要素が抗LSRポリクローナル抗体(図13B、レーン1)、抗LSRペプチド抗体(図13B、レーン2および図14B、レーン21)、およびオレイン酸塩とともにインキュベートした後のLDLと結合することを示している。リガンドブロッキングは、実施例1に記載のプロトコールに従って行った；ウエスタンブロッキングは以下に示すように行った。

【0365】

ウエスタンブロッキング

ラット肝細胞の初代培養は実験方法で示したように調製した。培養48時間後、採取した細胞を洗浄し、1% Triton X100を含有するPBSに溶解する。この細胞溶解物を還元条件下(2%SDS、5%β-メルカプトエタノールおよび20mMDTT、56℃にて1時間)で10%SDS-PAGEゲル上に置く。ニトロセルロース膜上に転移させた後、LSR受容体に向けられたIgG抗体でウエスタンブロッキングを行う。

【0366】

第三に、cDNA LSR-Rn-2097およびLSR-Rn-1893からのin vitro翻訳により得られた標識タンパク質LSR66および58を用いて、以下に詳述されるプロトコールに従ってLDLの結合におけるオレイン酸塩の効果を評価する。

【0367】

in vitroにて発現したLSRタンパク質に対するLDLの結合(浮上)

³⁵S-システインおよび³⁵S-メチオニンで標識したin vitro翻訳生成物(17μl)を緩衝液A中100μg/mlのLDL、1mMオレイン酸塩の存在下、最終容量400μlで37℃にて1時間インキュベートする。同量の8%(w/v)BSAを添加する。その密度を臭化ナトリウムによって1.21g/ml(初密度1.025g/mlと仮定)に調節する。その後、サンプルを1.063g/mlにて臭化ナトリウム溶液に入れ、次いで4℃にて20時間遠心分離する(Beckman SW41 rotor)。その表面の1ml容量を採取し、電気泳動溶出緩衝液に対して透析し、さらに放射能を測定する(Beckman βカウンター)。

10

20

30

40

50

【0368】

オレイン酸塩は2つの因子（または5つ）によってLDLのLSR56（またはLSR68）との結合を増強する。従って、それは好ましくはcDNA LSR-Rn-2097およびcDNA LSR-Rn-1893（LSR56およびLSR68）によって各々コードされるラットLSRの α および β サブユニットがオレイン酸塩とともにインキュベートした後、LDLと結合するというを示し得る。

【0369】

これらの結果は総て、cDNA LSR-Rn-2097およびcDNA LSR-Rn-2040が電気泳動によって識別されず、かつ、見かけの分子量が68kDaである2つのタンパク質をコードすることを示す；これらのタンパク質は還元条件下での免疫沈降後に同定されるLSRの α および α' サブユニットを含んでなるバンドに相当する。LSRの β サブユニットはおそらく、cDNA LSR-Rn-1893の翻訳生成物であろう。免疫沈降後の化学量論の解析では、見かけの分子量240kDaの多量体複合体は結果として3つの β サブユニットを有する α サブユニットの集合体を生じる。 α -および β -LSRに相当するタンパク質の種々のドメインの解析は、リポタンパク質受容体の機能と矛盾しない。

【0370】

実施例3：トランスフェクトされた細胞における組換えLSR受容体の活性の解析、およびそのサブユニット

発明者らはまた、以下のプロトコールに従い、CHO細胞における組換えLSR受容体を発現させた。

【0371】

LSR受容体をコードするcDNA配列でのトランスフェクション

再構築した受容体の活性と同様に、LSRの組換えサブユニットの各々の活性を研究するために、発明者らは発現プラスミドpcDNA3(No et al., 1996)を使用し、動物細胞においてラットLSRの α サブユニットをコードするcDNA (α プラスミド)、または β サブユニットをコードするcDNA (β プラスミド)のいずれかの発現を研究した。LSRcDNAをEcoRIおよび／またはNotI制限部位を用いて、プラスミドpcDNA3(Invitrogen)中にサブクローニングした。一度得れば、これらの構築体を用いて、CHO（チャイニーズハムスター卵巣）動物細胞をトランスフェクトする。

【0372】

培養48時間後、CHO（チャイニーズハムスター卵巣）細胞(CHO-K1、CCL-61、ATCC、Rockville)を6-ウェルプレート(Falcon)に $2.5 \sim 2.75 \times 10^5$ 細胞／ウェルに分注する。10%(v/v) FBS、2mMグルタミンおよび100ユニット／mlのペニシリンおよびストレプトマイシンを含有するHam F-12培地での培養24時間後、最大 $2 \mu\text{g}$ のプラスミド／ウェルを、供給者の指示に従ってSuperfect(Qiagen)を用いて、トランスフェクトした（ $10 \mu\text{l}$ Superfect／ウェル、血清を含まないHam F-12培地で 37°C にて2時間）。次いで、このプレートをPBS中で洗浄してトランスフェクション試薬を除去し、次いで細胞を血清を含有するHam F-12培地で培養した。実施例1に記載されたプロトコールに従い、トランスフェクション48時間後、LSR活性を測定した。

【0373】

発明者らは、以下に詳細に記載されるプロトコールに従い、LSR受容体活性の3種の段階において、 α プラスミド単独、または β プラスミド単独でのトランスフェクションの効果と比較し、 α および β プラスミドでの同時トランスフェクションの効果を試験した。図15および16は、 α サブユニット単独、または2つの α および β サブユニットを発現する組換え細胞において得られたLSR活性間の比較を示す；同様の結果が、 β 対 $\alpha + \beta$ の比較により得られ、それは各々のサブユニット（それらは各々、リポタンパク質リガンドおよびオレイン酸塩のような脂肪酸に対する可能性ある結合部位もまた有する）の一次配列の比較解析と矛盾はない。

【0374】

LDLの結合、取り込みおよび分解における、LSR(α)プラスミド単独でのトランスフェクション、またはLSR(α)およびLSR(β)プラスミドでの同時トランスフェクションの効果

CHO-K1細胞を漸増濃度の α プラスミドで一時的にトランスフェクトし、また $0.4\mu\text{g}$ の α プラスミドおよび漸増濃度の β プラスミドで同時トランスフェクトした。培養48時間後、細胞をPBS中で一度洗浄し、次いで、 0.2% BSA、 5mM Hepes、および 2mM CaCl_2 、 $\text{pH}7.5$ を含むDMEM中、 1mM オレイン酸塩の存在下または不在下で、 $20\mu\text{g/ml}^{125}\text{I}$ -LDLとともに、 37°C にて3時間インキュベートした。次ぎに、この細胞を前記のように洗浄し、PBS中 10mM スラミンとともに 4°C にて1時間インキュベートした。

【0375】

LDLの結合を測定するために（図15）、培地を回収し、 γ カウンターを通過させて結合した ^{125}I -LDLの量を評価した。結果は2回の測定の平均値である。LDLの取り込みおよび分解の測定（図16）については、実施例1に詳細に記載されたプロトコールに従い、取り込まれ、次いで分解された ^{125}I -LDLの量を測定した。 10

【0376】

α および β プラスミドでの同時トランスフェクションは、LSR活性の3段階の確立を可能とする（図15および16）。

【0377】

発明者らはまた、 α プラスミド単独でのトランスフェクションと比較して、 α および β プラスミドでの同時トランスフェクションによってLSR活性が増強されることも観察した。 β および α サブユニット濃度の $([\beta]/[\alpha])$ 比率が増強を表したとき、より有効なLSR活性を示すという結果は、LSR受容体が α （または α' ）サブユニット、およびいくつかの、好ましくは3つの β サブユニットの集合体からなる可能性があるという所見と適合する。 20

【0378】

結果は、それがタンパク質の完全なタンパク質分解を可能にするという意味で、 β および α サブユニットでの同時トランスフェクションのみが完全に機能的なLSR受容体の過剰発現を可能にするということを示す。

【0379】

LSR cDNAでトランスフェクトされた細胞における前記で得られたリポタンパク質分解活性を確認するために、発明者らは最後に、前記で測定したようにLDLの結合を阻害する抗LSR抗体の能力を、それらの基質特異性ととともに試験した。

【0380】

組換えLSR受容体を発現するトランスフェクト細胞において得られるリポタンパク質分解活性の同定 30

CHO細胞は1:3の濃度比で α および β プラスミドでトランスフェクトした。

【0381】

図17Aは、トランスフェクトされた細胞において得られたLDL結合活性（非トランスフェクト対照細胞で認められる同活性と比較して表現）が、抗LSR抗体によって特異的に阻害されることを示す。

【0382】

図17Bは、競合リガンドとして作用する種々の非標識リポタンパク質の存在下でトランスフェクトされた細胞において得られたLDL結合活性を示す。結果は、リガンド特異性がラットの内生LSR活性に認められるものと同様であることを示す(Mann et al., 1995): ラットカイロミクロンはラット組換えLSRに好ましい基質であり: 特に、VLDL、次いでLDLが特異性のオーダーを低下させることになる。 40

【0383】

実施例4: サイトカイン類のクリアランスにおけるLSRの関与

LSRの α サブユニットの配列解析により、腫瘍壊死因子型サイトカイン受容体サインに相当するシステイン豊富領域が明らかになる。しかしながら、LSRは受容体/リガンド複合体の急速なエンドサイトーシスを可能にするシグナルの存在によって、サイトカイン受容体と識別できる（クラスリンモチーフ）。

【0384】

発明者らはこの受容体がサイトカイン類、特にレプチンの除去に働き得るという仮説を 50

立て；この仮説を検証するために、以下のプロトコールに従って初代培養の肝細胞により、組換えレプチンの分解を解析した。

【0385】

初代培養における肝細胞によるレプチンの分解

ラット肝細胞の初代細胞を、0.5mMオレイン酸塩、75 μ g/mlのRAP、200 μ g/mlの非特異的抗体または抗LSR特異的抗体、または50 μ Mクロロキニンの不在下または存在下で、20ng/mlの 125 I-レプチンとともに、37℃にて4時間インキュベートする。次いで培地を回収し、分解された 125 I-レプチンの量を測定する。

【0386】

図18に示されたように、初代培養における肝細胞によるレプチンの分解は：

10

a) LSRに対して向けられたポリクローナル抗体。これらの抗体はまた、同一の割合でLSR活性も阻害する。

【0387】

b) 39kD受容体結合タンパク質(RAP)；このタンパク質はin vitroにてLSR活性をブロックし、in vivoにてカイロミクロンのクリアランスを遅延する(Troussard et al., 1995; Willow et al., 1994)。

【0388】

c) クロロキン；この細胞毒はエンドサイトーシス小胞の酸性化を妨げ、リソソームプロテアーゼの活性を阻害する。

【0389】

20

d) オレイン酸塩；この遊離脂肪酸はリポタンパク質結合部位をマスキングしないLSRのコンフォメーション変異を誘導する。

【0390】

により阻害される。

【0391】

このことは、LSRのFAF（脂肪酸遊離）コンフォメーションが、おそらくレプチンの結合、それに次ぐ分解という役割と適合する唯一のものであることを示す。非特異的免疫グロブリンにはレプチンの分解に対する効果はない（図18）。

【0392】

LSRへのレプチンの結合を証明するため、以下に詳細に記載されるプロトコールに従い、ラット肝臓原形質膜タンパク質を、組換えレプチンを含有するアフィニティークロマトグラフィーカラムに装填した。

30

【0393】

レプチンアフィニティークロマトグラフィーカラム

Hi-trapカラム(Pharmacia)を用いる：製造者により推奨された方法に従い、5mgのレプチンを1mlのカラムに結合させる。原形質膜タンパク質を前記にて示したように(Mann et al., 1995)ラットの肝臓から可溶化させ、次いでPBS pH7.4、0.1%Tween20に対して一晚透析する。このカラムを同緩衝液で洗浄し、次いでタンパク質抽出液を0.2ml／分の速度で装填する。カラムを6mlの同緩衝液で洗浄する。次いで、100mMグリシンpH3を補給した同緩衝液で溶出し；次いで、500 μ lの20画分を5 μ lのPBS、0.1%Tween20、pH8で中和する。各画分50 μ lを抗LSR抗体によるドットブロット解析用のニトロセルロース膜上に載せる。陽性画分（1,3,4,7および8）を24mM重炭酸アンモニウム、0.01% Tween20に対して透析し、プールしてSpeedvacにより最終容量300 μ lまで濃縮する。40 μ lの最終生成物を抗LSR抗体によるウェスタンブロットティングによって解析する。

40

【0394】

図19は、抗LSR抗体が、レプチンへの結合後にグリシン緩衝液により放出された α サブユニットを特異的に認識することを示す。

【0395】

α サブユニットの安定したトランスフェクション実験により、この新規な受容体に対するレプチンの親和性の測定が可能となるであろう。

50

【0396】

これらの結果は総て、LSRがレプチンの分解および排出の経路の一つを表していることを示唆している。放射性標識された組換えレプチンのin vivo注射は、肥満マウスおよび対照マウスの双方において、肝臓および腎臓によるレプチンの迅速なクリアランス、および優先的な取り込みを示した：10分後に注射用量の50%がこれらの2器官で確認される。レプチンの選択的な取り込みのメカニズムを解析するために、発明者らは、同トレーサー用量のこれら2種の放射性標識タンパク質注射後5分の、正常マウスおよび2種の肥満マウスラインの腎臓および肝臓に存在するレプチンと β 2-ミクログロブリン（対照として選択されたレプチンに類似した分子量を有している可溶性タンパク質）の量を比較した。

【0397】

10

マウスにおけるレプチンクリアランスの測定

空腹状態のメス対照、ob/ob、またはdb/dbマウス（6-8週）に麻酔をかけ、値で伏在静脈を通して80ngのネズミ組換え 125 I-レプチンまたは 125 I- β 2-ミクログロブリン（Sigma、レプチン同様ヨードビーズ法により標識）の注入を施す。5分後、この動物を生理的食塩水（15ml、4℃）を注入する。組織を採取し、それらの放射能を測定する（ γ カウンター）。ある場合には、 125 I-レプチンの注入後30分、抗LSR抗体または対照タンパク質を注入する。 125 Iでのレプチンによる標識はその生物学的活性に影響を与えないということに注目することが重要である。

【0398】

図20に示された結果は、肝臓により選択的に取り込まれたレプチンの量が、対照マウスに比べて、肥満マウスでは減少しており；さらに腎臓のレプチンの取り込みに関しては、種々のライン間では差が認められないことを示す。

【0399】

次いで発明者らは、以下のプロトコールに従い、対照、ob/obおよびdb/dbマウスにおけるLSR受容体の数を測定した。

【0400】

原形質膜におけるLSR受容体の見かけの数の測定

原形質膜におけるLSR受容体の見かけの数は、前記にて記載された(Mann et al., 1995)ように、原形質膜調製物と結合したLDLの量を評価することにより測定する。原形質膜(100 μ g)を1mMオレイン酸塩とともにインキュベートする；すなわち、次いで、それらを前記で示したように3回洗浄し、37℃にて1時間、40 μ g/mlの 125 I-LDLとともにインキュベートする。その後、原形質膜に結合した 125 I-LDLの量を計数することにより決定する。各々の群においての3個体の異なる動物に対して、1動物につき3回の測定について、その平均をとる。

【0401】

図21は、レプチン欠損(ob/ob)、またはob受容体の欠損(db/db)のいずれかを示す肥満動物におけるLSR受容体の数が有意に減少することを示している。肥満マウスにおける選択的な肝臓のレプチンの取り込みにおける減少は、これらの動物におけるLSR受容体の見かけの数の減少と一致する。

【0402】

40

発明者らは最後に、前記に示したプロトコールに従い、トレーサー用量の注射後5分、肝臓と腎臓の間のレプチンの分布における抗LSR抗体の効果を試験した。

【0403】

抗LSR抗体の存在下における肝臓と腎臓の間のレプチン分布の測定

対照マウスに麻酔をかけ、次いで1mgの非特異的IgG抗体または抗LSR IgG抗体を静脈内に注入する。30分後、80ngの 125 I-レプチンを注入し、5分後4℃にて生理的食塩水を注入する。直ちに組織を摘出し、放射能を測定する。結果は各々の群について3個体の動物に対して得られた平均と標準偏差を表す。

【0404】

図22に示されたように、抗LSR抗体により、対照免疫グロブリンに比較して、肝臓での

50

レプチンの取り込みは低下し、腎臓でのレプチンの取り込みは増加する。

【0405】

従ってこれらの結果は、LSRが肝臓でのレプチンの選択的な取り込みを招き、受容体の数の減少が肥満動物で認められることを示す。かかる減少によって、レプチン抵抗性症候群およびほとんどの肥満ヒト患者に認められるレプチンの血漿濃度における増加の説明がつくであろう。

【0406】

LSR受容体が他のサイトカイン類の、特に脂肪組織により生成されたものの分解経路として働くという可能性もある。腫瘍壊死因子 α および神経成長因子の重要性が特に注目されるであろう。これら2種のサイトカインは、ヒト患者に注射すると有意な痩身効果を発揮する (Cytokines and their receptor, 1996)。

【0407】

実施例5：サイトカイン類によるLSR活性の制御

LSR受容体の α サブユニットはレプチンと結合し、かつ、可能性あるリン酸化部位を有する。これにより、エンドサイトーシスを仲介するだけでなく、細胞のシグナリングにおいても作用できる受容体とすることができる。

【0408】

従って発明者らは、以下に記載するように、レプチンがLSRの活性を調整するという仮説を試験した。

【0409】

レプチンの存在下におけるリポタンパク質の結合、インターナリゼーションおよび分解についてのLSR活性の測定

初代培養のラット肝細胞を漸増濃度レプチンとともに37℃にて30分間インキュベートし、次いで500 μ Mのオレイン酸塩の不在下または存在下で、50 μ g/mlの 125 I-LDL（比活性：209cpm/ng）、または50 μ g/mlの 125 I-VLDL（比活性：157cpm/ng）のいずれかとともに37℃にて4時間インキュベートする。次いで細胞を洗浄し、結合した、取り込まれた、さらには分解された 125 I-リポタンパク質の量を前記の実施例1において記載したように測定する (Bihain and Yen, 1992)。図23に示された結果は、オレイン酸塩とともに、または無しでインキュベートした細胞間で得られた差を表す。各点は3回の測定の平均を表す。各点に関する標準偏差は記号に含まれている。

【0410】

漸増濃度のレプチンを培地の肝細胞に添加することにより、VLDLおよびLDLの結合、取り込みおよび分解が増加する（図23）。

【0411】

レプチンによるLSR活性を誘導する能力の解析

レプチンの存在下における、初代培養ラット肝細胞の表面で発現したLSR受容体の見かけの数の測定

ラット肝細胞の初代培養を、20ng/mlのレプチンの存在下または不在下で、37℃にて30分間、0.8mMオレイン酸塩の存在下で、37℃にて10分間インキュベートする。この細胞を4℃に予め冷却したPBS緩衝液で洗浄し、次いで漸増濃度の 125 I-LDLの存在下で、4℃にて2時間インキュベートする。その後、細胞を洗浄し、溶解して結合した 125 I-LDLの量を測定する。

【0412】

シクロヘキシミド、コルヒチンおよびサイトカラシンBの存在下におけるレプチンの効果の比較

初条件は前記にて記載されたものと同一である；レプチンとともにインキュベートした後、細胞を37℃30分間、5 μ Mシクロヘキシミド、5 μ Mコルヒチンまたは2.5 μ MサイトカラシンBとともにインキュベートする。次いでこの細胞を0.8mMオレイン酸塩の存在下で、37℃にて10分間インキュベートする。その後、細胞を4℃に予め冷却したPBS緩衝液で洗浄し、次いで50 μ g/mlの 125 I-LDLの存在下で、4℃にて2時間インキュベートする。2回測定を

10

20

30

40

50

行い、その平均結果を表す。

【0413】

このように、レプチンによるLSR活性における増強は肝細胞の表面で発現したLSR受容体の見かけの数における増加を通して得られることが示される(図24A)。この増加は、一方では、タンパク質の合成(それは、タンパク質合成の阻害剤であるシクロヘキシミドにより部分的に阻害される)における増加から生じる。他方で、それは微小管系(それは実際に、微小管輸送をブロックするサイトカラシンBにより阻害される)によるエンドサイトーシス小胞の移動に関与している(図24B)。

【0414】

LSR活性に対するレプチンのin vivo効果を確認するため、発明者らは、以下のプロトコールに従い、試験食餌を強制に取らせた後、対照、ob/obおよびdb/dbマウスの食後トリグリセリド血応答を確認した。 10

【0415】

マウスにおける食後脂肪血応答の測定

当日まで飢えさせた対照ob/obおよびdb/dbマウスに、熱量56kcal/動物体重kgを供給する極めて高脂肪の餌[60%脂肪(37%が飽和、27%が一不飽和、および36%がポリ不飽和脂肪酸)、20%タンパク質および20%炭水化物]を強制的に取らせた。食餌後直ちに(時間=0時間)、そのマウスに200 μ lの生理食塩水を静脈注射する。種々の時間で、20 μ lの血液を尾の静脈から、90 μ lのニナトリウムEDTAを含有する試験管に採取し、遠心分離により血漿を分離した後、酵素アッセイキットを用いて血漿のトリグリセリド血濃度を求める。示した曲線の各点は、動物につき3回の測定および3個体の異なる動物に関して得られた標準偏差を伴う平均値に相当する。 20

【0416】

マウスにおける食後脂肪血応答に対するレプチンの効果の測定

手順は、食餌後直ちに(時間=0時間)マウスに200 μ lの生理食塩水か、または50 μ gのネズミ組換えレプチンを含有する200 μ lの同溶液かのいずれかを静脈注射する以外、前記と同様である。

【0417】

ラクトフェリンおよび／またはレプチンの存在下におけるマウスの食後脂肪血応答の測定 30

当日まで飢えさせたob/obマウスに前記と同じ食餌を強制的に取らせる。食餌後直ちに(時間=0時間)マウスに、添加物なし、または0.5 μ gのレプチン、または2.5 μ gのラクトフェリン、またはそうでなければ0.5 μ gのレプチンと2.5 μ gのラクトフェリンの混合物のいずれかを含有する200 μ lの生理食塩水を静脈注射する。食餌後2~3時間の間に血液を採取し、血漿のトリグリセリド(TG)濃度を測定する。得られた値は、動物につき4回の測定および2個体の異なる動物に関して得られた標準偏差[p<0.02(ob/ob+レプチンと比較したob/ob)、p<0.01(ob/ob+ラクトフェリンと比較したob/ob)、NS(ob/ob+レプチン+ラクトフェリンと比較したob/ob+ラクトフェリン)]を伴う平均値を表す。

【0418】

処置されていない肥満マウスでは、肥満マウスに見られるLSR受容体数の減少に一致して、食後脂肪血応答の増幅も存在する。試験食餌と同時に静脈経路によりレプチンを投与することにより、2種の肥満マウス系統および対照マウスにおいて食後脂肪血応答を低下させることが可能となる(図25)。 40

【0419】

レプチンにより誘導される脂肪血応答の低下は、LSRの活性を阻害するラクトフェリンの投与により抑制される(図26)(Yen et al., 1994; Marm et al., 1995)。このことは、脂肪血応答の低下がLSR活性の増強により説明されることを強く示唆するものである。

【0420】

最後に、in vivoでも、レプチンの投与は肝細胞の表面レベルで発現したLSR受容体の見かけの数の増加をもたらす。この増加はob/obマウスおよびdb/dbマウスの双方で顕著であ 50

る(図27)。

【0421】

従って、レプチンおよびおそらく他のサイトカイン類は、LSR活性のレギュレーターである。レプチンまたは他のサイトカイン類に抵抗性を持つ症候群は、恒常的かまたは食後状態に限定される高トリグリセリド血症をもたらす。

【0422】

実施例6：LSRの発現におけるレプチンの効果；治療上の効果

レプチン投与、食後脂肪血応答の低下、およびLSR受容体の発現または活性の促進の間の相関を補強するため、またレプチンによるリポタンパク質の脂肪の肝臓クリアランス活性の誘導の可能性ある治療上の関わりをさらによく評価するため、発明者らは、レプチン
10
その他で処置した対照マウスまたは肥満マウスにおいて、体重変化、LSR活性およびLSR
mRNAの発現をモニターすることを前記分析に付け加えた。

【0423】

対照および肥満マウスにおける食後脂肪血応答およびLSR活性

対照雄マウス(C57BL6)(n=8)および肥満雄マウス(ob/ob、n=8、レプチン遺伝子欠損動物、およびdb/db、n=8、レプチン受容体遺伝子欠損動物)(17週齢)を、ライン間の重量における差異を定量的に立証するために秤量した(図28A)。各ラインの動物の食後脂肪血
20
応答を、前記のように、レプチン処置せずに測定した。前記のように、肝細胞表面で発現したLSR受容体の見かけの数を、各ライン4個体の動物について測定し、5'-ヌクレオチダーゼ(原形質膜のレベルで選択的に測定される酵素；Sigmaキット)活性と比較して表した。最後に、前記のプロトコールに従い、ノーザンブロッティングによって、各ライン3
個体の動物におけるLSR受容体の発現レベルを評価することが可能であった。

【0424】

肥満動物において食後脂肪血応答がより高いことは(図28B)、同動物における肝臓LSR受容体の見かけの数がより少ないことに一致している(図28C)。さらに、ノーザンブロッティングの結果(図28D)は、この肥満動物におけるLSR受容体のみかけの数の減少が、同動物
30
における受容体の発現レベルの低下を伴うものであることを示している。発明者らは、実際に、肥満マウスob/obおよびdb/dbにおいてLSR受容体をコードするmRNAの数の減少が見られることを示した。

【0425】

発明者らはまた、ob/obマウスに対するレプチン処置の長期処置の効果も研究した(図29)。

【0426】

ob/obマウスに対するレプチン長期処置の効果

ob/obマウスに30日間毎日、レプチンかまたは同容量の滅菌PBSかいずれかを注射した。注射用量は0~4日までは50 μ g/動物、5~17日までは100 μ g/動物、および18~30日までは150 μ g/動物である。以下に示したいくつかのパラメーターを測定する：

体重(図29A)：体重変化は処置期間にわたり、6個体の動物について測定する。

【0427】

食後脂肪血応答(図29B)：実施例5に詳細に記載したプロトコールに従い、29日目に各群
40
3個体の動物について測定する。

【0428】

LSR受容体の見かけの数(図29C)：実施例4に詳細に記載したプロトコールに従い、30日目に各群3個体の動物について測定する。

【0429】

LSR mRNAの定量(図23D)：実施例2のプロトコールで示したように、ノーザンブロッティングにより評価する。

【0430】

かくして発明者らは、30日間にわたりレプチンで処置したob/ob肥満マウスにおいて、極めて顕著な体重減少を観察した。さらに、レプチンでの処置は食後脂肪血応答に明確な
50

低下をもたらす。この食後脂肪血応答の低下は、細胞表面におけるLSR受容体の見かけの数の増加、およびLSR受容体のサブユニットをコードするmRNAの量の増加と相関している。

【0431】

これらの結果は、LSRが食餌脂質の排出の律速段階であることを、in vivoにおいて立証するものである。さらに、この体重減少をもたらす肥満の治療は、食餌脂質の肝臓での分解活性を増強し、次いで、食後脂肪血応答を低下させる。

【0432】

実施例7：ヒトLSR受容体の同定

ノーザンブロット解析

ラットLSRの核プローブを用い、ヒト心臓、脳、胎盤、肺、肝臓、骨格筋、腎臓および脾臓ポリARNAを含んでなる膜(Human Multiple Tissue Northern Blot, Clontech #7760-1)でノーザンブロット解析を行った。肝臓および腎臓では、約2kbpのバンドhが検出されている。ハイブリダイゼーションのおよその定量の結果、LSRは肝臓では腎臓の少なくとも5倍発現することを示している。

【0433】

cDNAのクローニング；スプライシングゾーンの研究

mRNAに対する逆転写PCR実験は、5'側におけるエキソン1のサイズ、およびエキソン1と2の間のスプライシング部位をより厳密に決定することを可能にした。しかしながら、この終結部位がこのエキソンの開始部位をなすことは明らかではない。さらに、エキソン1には第2の開始部位が存在し、これは第1の開始部位よりも下流にあり、かつ、おそらくは後者よりも大きい。エキソン1と2の間のスプライシングは、ヒトRNAとラットRNAの間では異なる。

【0434】

増幅はいくつかのプライマーを用いて行った：

a : 5' -ATGCAACAGGACGGACTTGG-3'	エキソン1	(配列番号31)
b : 5' -TCAGACGACTAACTTTCCCGACTCAGG-3'	エキソン10	(配列番号32)
c : 5' -CTACAACCCCTACGTTGAGT-3'	エキソン2	(配列番号33)
d : 5' -TCGTGACCTGACCTTTGACCAGAC-3'	エキソン3	(配列番号34)
e : 5' -CCTGAGCTACTCCTGTCAACGTCT-3'	エキソン6	(配列番号35)
f : 5' -AGGCCGAGATCGCCAGTCGT-3'	エキソン9	(配列番号36)

【0435】

ab対のプライマーを用いて行った増幅から、電気泳動ゲル上での分離後、サイズ1.8kbおよび2kbの2つの生成物が得られた。これら2つの生成物のサイズはラットにおける記載同様、選択的スプライシングにより説明可能であることが示され、他の増幅プライマーが得られた。これらのプライマーにより、RNAの選択的スプライシングから生じる3つの形態のcDNAを同定することが可能となった。

【0436】

第1のcDNAは、10個のエキソンを総て含み、LSR-Hs-2062と呼ばれ、配列番号7に相当する。これはラットcDNA LSR-Rn-2097に当たる。第2のcDNAは、エキソン1、2、3、5、6、7、8、9および10を含み、LSR-Hs-2005と呼ばれている。それは配列番号9に相当する。このcDNAはラットcDNA LSR-Rn-2040に当たる。最後に、1、2、3、6、7、8、9および10を含むcDNAはLSR-Hs-1858と呼ばれ、その配列は配列番号11に挙げられ

10

20

30

40

50

ている。それはラット c D N A LSR-Rn-1893に当たる。

【0437】

エキソン8の境界でのスプライシング部位のずれが証明されたことに注目すべきである。配列番号19の19953～19955位にあるトリプレットTAGの、配列番号19の19956～19958位にある隣接するトリプレットAAGへのこのずれの結果、配列番号8の c D N A の386位のGlu残基を欠損させることになる。

【0438】

c D N A LSR-Hs-2062、LSR-Hs-2005およびLSR-Hs-1858によりコードされるタンパク質配列は、それぞれ配列番号8、10および12に相当する。この生物学的タンパク質配列リーディングフレーム内で見られる第1のATGコドンで開始する（タンパク質配列の35位）。しかしながら、転写の開始のために好ましいコドンは、このタンパク質配列のより下流の83位にある。さらに、この開始コドンは、まだ決定されていないエキソン1の5'領域内の、あるいは前に示した可能性あるエキソン内のより上流にある可能性が高い。

【0439】

最後に、図3は、ヒトにおいて同定された種々のタンパク質の略図を表し、保存的モチーフが示されている。

【0440】

この解析により、ラットにおけるLSR66、LSR64およびLSR58型に等しいLSRの α 、 α' および β サブユニットの3つがヒトに存在すると結論づけることが可能になる。

【0441】

ヒトLSRのゲノム配列の同定および単離

本発明者らにより単離されたマウスLisch7配列（受託番号：U49507）およびラットLSR_2097配列の双方を用いた、核酸配列の公的データバンク (Genbank, Version: 101) のスクリーニングにより、2つのヒトゲノム D N A 配列を単離することが可能となった。それらは、各々サイズが45,328bpおよび41,936bpで、受託番号AC002128およびAD000684のコスミドである。これら2つのコスミドは部分的に重複する。コスミドAC002128の3'末端は、コスミドAD000684の5'末端と12838bpにわたって重複する。12,838bpの共通部分においては、コスミドAD000684の822および3170位における2つの欠失を別にすれば、配列は100%一致する。ヒトLSR遺伝子はこの2つのコスミドにわたって分配されている。この領域についての研究を助けるため、完全ゲノム配列を再構築した：コスミドAC002128の45,328bpを、12,839塩基～41,936塩基の間でコスミドAD000684配列に付加した。この組み合わせは74,426bpの配列をなす。LSR遺伝子にわたるゲノム配列を抽出した（配列番号19）。

【0442】

LSR遺伝子の推定エキソンは、マウスLisch7およびラットLSRの R N A の配列を用いての前記配列の整列後に決定した。スプライシング部位の確実性は、推定エキソンのいずれの側かで異なる。

【0443】

さらに、BACからなるヒトゲノムライブラリーを、Chumakov et al., 1995に記載の方法によりスクリーニングした：LSRをコードするヒトゲノム配列（配列番号41）を得るために、このようにして単離したクローンを接ぎ、サブクローニングし、次いで、配列決定した。

【0444】

このようにして得られた2つの配列（配列番号19および41）は微細な差異を有しており、それらは添付のリストに記載されている。

【0445】

実施例8：ヒトにおけるLSR活性

LDL受容体遺伝子のプロモーターおよび第1のエキソンに影響を及ぼす欠失を有する患者から単離したヒト繊維芽細胞の初代培養物を得た。

【0446】

オレイン酸塩の存在下および不在下でのこれらの細胞のインキュベーションは、後者が

10

20

30

40

50

、浸潤速度論(Bihain and Yan, 1992)に従うLDL結合、インターナリゼーションおよび分解活性を誘導することを示している。オレイン酸塩により誘導されたこの受容体の親和性は、高トリグリセリド粒子(VLDLおよびカイロミクロン)に関して、ならびに組換えアポタンパク質Eを補足したトリオレインおよびホスファチジルコリンに関して最大となる。受容体に対するLDLの親和性は、VLDLおよびカイロミクロンのそれより低い、しかしながらApoEを含まないトリオレインおよびホスファチジルコリン粒子のそれ、または第3種高脂血症およびApoE_{2/2}表現型を有する患者から単離されたVLDLのそれよりも高い(Yen et al., 1994)。

【0447】

以下のプロトコールに従い、正常ヒト験体(図30)の繊維芽細胞におけるLSR活性を測定することもできた。

【0448】

繊維芽細胞によるLDLの結合、取り込みおよび分解の測定

繊維芽細胞は、培地が20%ウシ胎児血清を含んだ以外は前記と同様に、予め1週間培養する(Goldstein et al., 1983)。次ぎに、それらを1mMオレイン酸塩の存在下または不在下で、斬増濃度の¹²⁵I-LDLとともにインキュベートする。次いで、細胞を洗浄、溶解し、その放射活性を測定する。

【0449】

実施例9：ヒトにおけるLSR活性に対するレプチンの効果

ヒト繊維芽細胞HF(家族性高コレステロール血症)のLSR活性もまた、レプチンとのインキュベーション後に増加し(図31)、このことはラットにおける場合と同様、ヒトにおいてもLSRがサイトカイン類のクリアランスにあずかり、その活性が後者により調整されることを示唆している。対応する測定法は以下に示したように行った。

【0450】

ヒト繊維芽細胞におけるLSR活性に対するレプチンの効果

繊維芽細胞HFを斬増濃度のレプチンとともに37℃にて30分間、次いで、500μMのオレイン酸塩の存在下で、50μg/mlの¹²⁵I-LDLとともに37℃にて2時間インキュベートする。LDLの結合、取り込みおよび分解は、実施例1に示したように測定する。

【0451】

実施例10：マウスLSRのcDNAのクローニング；選択的スプライシングの生成物の解析

マウス肝臓mRNAを用いてマウスLSRのcDNAのクローニングを行った。使用したクローニング方法は、ヒトLSRのcDNAに関するものと同様である。mRNAを精製し、特異的DNAプライマーを用いて逆転写PCR増幅を行った。この増幅断片をTAクローニングベクター(Introgene)へクローン化した。

【0452】

エキソン2およびエキソン9中に位置するプライマーを用いる選択的スプライシング生成物の研究もまた、ヒトLSRに関して行ったものと同様にして行った。

【0453】

3つの選択的スプライシング生成物が認められた：LSR-Mm-1886、LSR-Mm-1829およびLSR-Mm-1682。LSR-Mm-1886はエキソン1~10の総てを含む。LSR-Mm-1829およびLSR-Mm-1682はそれぞれ、エキソン4、およびエキソン4と5を欠く。これら3つのcDNAの生物学的形態は、実際には、ヒトおよびラットで見られるものに相当する。cDNA LSR-Mm-1886、LSR-Mm-1829およびLSR-Mm-1682の核酸配列はそれぞれ配列番号13、14および15に示されている。cDNA LSR-Mm-1886、LSR-Mm-1829およびLSR-Mm-1682によりコードされるタンパク質配列は、配列番号16、17および18に示されている。

【0454】

実施例11：LSRのγサブユニットの同定

LSRのαおよびβサブユニットは前記で示したように同定した。これら2つのサブユニットをコードするRNAの翻訳生成物の解析からは、分子量~35kDaの第3のサブユニッ

10

20

30

40

50

トの存在が説明することはできなかった。このサブユニットはLSR複合体の還元後にのみ検出された（図10、レーン4）。

【0455】

発明者らはこの γ サブユニットのNH₂末端配列を精製して得た。

【0456】

この精製は以下の手段に従い、イムノアフィニティークロマトグラフィーにより行った。

【0457】

LSRのガンマサブユニットの精製

抗LSR抗体（バンドA）を、樹脂[3.5mlのaffigel Hzイムノアフィニティークット樹脂(Biorad 153-6060)につき2.5mgのIgG]に結合させ、次いで、ラット肝臓の全膜から可溶化させたタンパク質とともにインキュベートする（20mMトリス緩衝液、2mM EDTA、0.125Mオクタグルコシド(5 X CMC)、1%阻害剤カクテル、pH=7.4：160mgの膜タンパク質から、容量17ml中に41.3mgの可溶化タンパク質(SP)が得られる）。

【0458】

インキュベーションは、回転攪拌しながら、室温にて2時間行った：17mlを20mlトリス緩衝液、2mM EDTA、pH7.4および3.5mlの樹脂で50mlにする。この樹脂を40mlの20mMトリス緩衝液、2mM EDTA、pH7.4で洗浄し、次いで、20mMトリス緩衝液、2mM EDTA、200mMグリシン、pH2.5を用いて500 μ lの30の画分へと溶出する。各画分のpHは、1Mトリス緩衝液、2mM EDTA、pH9のチューブにつき100 μ lで中和する。各画分50 μ lをドット-ブロット解析用ニトロセルロース膜に置き、抗LSR抗体とともに、次いで、アルカリ性ホスファターゼに結合させた二次抗体とともにインキュベートする。

【0459】

7～28の可能性ある画分を2つを一組としてプールし、Speedvac中で2.5倍濃縮する。このプール、濃縮および分離した画分について、10% PAGE-SDSゲル上でウエスタンブロッティングを行う。バンドは画分7～14（これら画分はプールする）で見られる。

【0460】

2つのプールを24mM重炭酸アンモニウムに対して透析し、次いで、Speedvac中で凍結乾燥する。この粉末を80 μ lの10mMトリス緩衝液、2mM EDTA、2% SDS、3%尿素、pH7.4中に取り、100℃にて30分間、5% β -メルカプトエタノールの存在下で還元する。

【0461】

泳動および30mAにて配列決定膜(PVDF)への50mMトリス、50mMホウ酸塩中のウェットトランスファーの後、この膜をアミドブラックで染色する。

【0462】

かくして、約35kDaの明確な分子量を有するバンドが同定され、Edman法に従う配列決定へとまわした。

【0463】

得られた配列は、LHTGDKAFVEFLTDEIKEEである。この配列は、Clqの球状ヘッド(gClq-R)と結合する細胞表面のタンパク質として先に同定された(Ghebrehiwet et al., 1994)分子量33kDaのタンパク質の配列と全く一致するものである。さらに最近の観察では、このClqの可能性ある受容体はまた、細胞表面下に位置する小胞内にあることが示されている(Van den Berg et al., 1997)。このタンパク質はまた、ラミン受容体と結合するp34と従前に同定されているタンパク質に相当する。この受容体は、細胞核の内側へと向かう長いNH₂末端セグメント、ならびに8つのトランスメンブランドメインを有する。この受容体はリン酸化の程度に依存してラミンに結合する。最後に、gClq-Rは「スプライシング因子2」と結合する(Honore et al., 1993)。このラミン受容体および「スプライシング因子2」は、一般に、ラミン受容体の場合はNH₂末端セグメントレベルに、またSF2の場合はカルボキシ末端セグメントのレベルに位置するセリンおよびアルギニンの反復配列(RSRS)を含有するという特性を有する。

【0464】

α -LSRおよび β -LSRの双方がセリンおよびアルギニン含量の高い反復配列を示すことが明白に観察される(図1)。発明者らの仮説は、 γ -LSRタンパク質がそれらのRSRSドメインを介してLSRの α および β サブユニットと結合する分子シャペロンであることである。

【0465】

この仮説を検証するために、発明者らは、その配列がgC1q-Rタンパク質のカルボキシまたはNH₂末端に位置する2つの合成ペプチドに向けられたポリクローナル抗体を得た：

gC1q-RのNH₂末端ペプチド：LRCVPRVLGSSVAGY* (gC1q-Rのアミノ酸5~19) (配列番号39)

gC1q-RのCOOH末端ペプチド：C*YITFLEDLKSFKVSQ (gC1q-Rのアミノ酸268~282) (配列番号40)

*：ペプチドの抗原性を最適化するための、タンパク質配列とは異なるアミノ酸。

【0466】

図32は、これらの抗体がLSRの活性を特異的に阻害することを示している。COOH末端に向けられた抗体が最も効果的であると考えられる。これらの結果は、gC1q-Rまたはその構造的に同じである相同体の1つがLSR多量体複合体と非共有結合的に結合した分子シャペロンであることを示している。

【0467】

実施例12：C1qおよびその相同体によるLSR活性の調節

gC1q-Rは補因子1の球状ヘッドに結合できることが示されている。発明者らは、LSRと結合したgC1q-Rを解離させるC1qのこの特性を用いることを考え、初代培養の肝細胞によるLDLの結合、インターナリゼーションおよび分解に対する斬増用量のC1qの効果を測定した。図33は、オレイン酸塩の不在下でさえ、ヒトC1qにより誘導されたLDLの取り込みおよび分解における増加を示す。

【0468】

オレイン酸塩の存在下では、本質的ではないが、やはり顕著な増加も認められる。しかしながら、これらの条件下では、最大効果は低濃度のC1qについて得らる。

【0469】

従って、gC1q-RはLSRに対して阻害効果を示すことが明らかであり、この阻害効果はLRP、LDL受容体およびLSRの34kD RAPにより誘導されるものに匹敵するものである(Troussard et al., 1995)。その補体C1qと結合する能力を用いるシャペロンgC1q-Rの解離により、阻害効果を引き上げるが可能となる。gC1q-R配列の解析では、それが典型的な膜受容体であると考えられることが示されている。実際に、このタンパク質は、リン脂質二重膜を通過できる疎水性配列を持たない。

【0470】

LSRの活性における補体C1qの効果は、肥満の遺伝学に主要な展望を開く。実際に、C1qの遺伝子、gC1q-Rの遺伝子、またはそうでなければ、例えば、AdipoQ、セレベリン、コラーゲン α 1-10、SPAおよびSPD(肺表面活性タンパク質)、マンナン結合タンパク質およびスカベンジャー受容体またはその相同LRP(Hu et al., 1996; Drickamer et al., 1986; Krieger and Herz, 1994; Elomaa et al., 1995)などそれらの類似体の遺伝子にいずれかに影響を及ぼす突然変異は、リポタンパク質およびレプチン双方のクリアランスについてのLSRの活性を調整することができる。

【0471】

いくつかのタンパク質は補体C1qとの相同性を示すので、gC1q-Rと相互作用可能である。特に、マウスにおいて単離された2つのタンパク質AdipoQ(Hu et al., 1996)およびacrp30(Scherer et al., 1995)ならびにヒトタンパク質APMI(Maeda et al., 1996)は顕著な相同性を示す。これら3つのタンパク質は、補体C1qの構成要素(C1qA、B、C)同様、タンパク質を分泌し；それらはコラーゲンに類似したNH₂末端(Gly-X-Yモチーフの反復)および補体C1qの球状ドメインに相当するCOOH末端を有する。これら3つのタンパク質は脂肪組織で発現することが好ましい。AdipoQとacrp30との間で異なるアミノ酸は3つだけである。そのメッセンジャーが脂肪細胞で高度に発現することを特徴とするタンパク質、APM1

10

20

30

40

50

は、AdipoQと79.9%の核酸一致、80.6%のアミノ酸一致を示す。従って、APM1はAdipoQのヒト相同体であることが確実である。

【0472】

実施例13：LSR受容体活性を修飾する化合物のスクリーニング

前記のように、本発明者らは、gC1Rと高い相同性を持つタンパク質であるLSR「ガンマバンド」が分子シャペロンと同様、LSR受容体と相互作用し、従って、LSR受容体の α または α' および β サブユニットとgC1R型分子を含んでなる「LSR複合体」を形成するであろうとの仮説を立てた。gC1Rはこれまでに、補因子C1qの球状ヘッドと結合する細胞表面タンパク質として同定されている。C1qの他、C1q、特にマウスにおけるAdipoQおよびacrp30、ならびにヒトにおけるAPM1と相同性を示すいくつかのタンパク質が、LSR複合体のgC1Rと相同なタンパク質と相互作用して、LSR活性を修飾することができる。

10

【0473】

スクリーニングパラメーター

C1qまたはAdipoQなどの化合物のスクリーニングは、種々のパラメーターの測定を通じて行われ、このうち、LSR受容体の活性に対する化合物の効果測定が最も重要である。種々のパラメーターは以下の通り：

体重変化

食物摂取

食後の脂肪血応答

LDLなどのリポタンパク質の結合、取り込みおよび／または分解。

20

【0474】

体重変化

浸透性ポンプを、400-450gの12個体のSprague-Drawley雄ラットの腹腔内に外科的に挿入した。この浸透性ポンプには、2mlのPBS（リン酸塩緩衝生理食塩水）、pH7.4（対照はラット6個体）かまたは、2mlの組換えAdipoQタンパク質（5ml PBS、ラット6個体）のいずれかを含まれていた。これらのポンプは $10\mu\text{l/h}$ ($50\mu\text{g AdipoQ/h}$)を送り出すよう設計されていた。動物を秤量し、各々代謝ケージで飼った。各群3個体の動物に通常食か脂肪食のいずれかを無制限に取らせる（第0日）。脂肪食は、2%(w/w)のコレステロール、ベジタリン形態での飽和脂肪酸10%、(w/w)、%(w/w)のヒマワリ油および15%のスクロースを添加した通常食からなる。3日目に動物を秤量し、尾の静脈から血液サンプルを採取する。血漿トリグリセリド量は、酵素キットを用いて測定する。

30

【0475】

食物摂取

組換えAdipoQタンパク質 ($100\mu\text{g}$) またはPBS単独を、代謝ケージで維持したob/obまたはdb/dbマウスの尾の静脈を通じて、5日間毎日注射した。このマウスを毎日秤量し、接種食物量を測定した。結果は、各群4個体のマウスについての平均食物摂取と標準偏差を示す。

【0476】

食後の脂肪血応答

6日前から空腹にさせた雄Sprague-Drawleyラット (400-450g) に、脂肪が極めて高い食餌 ($t=0$) (60%脂肪酸（うち37%が飽和、27%が一不飽和、および36%がポリ不飽和）、20%タンパク質、および20%炭水化物、全56kcal/体重kgを供給) を強制的に取らせ、その後直ちに $300\mu\text{l}$ のPBS単独、または1mgのマウス組換えAdipoQタンパク質を含有する同容量のいずれかの静脈注射（大腿部）を受けさせた。種々の時間（0、2、4および6時間）で血液サンプルを採取した。血漿トリグリセリド量は酵素キットを用いて測定した。結果は、3個体の動物についての平均値と標準偏差で表されている。

40

【0477】

LSR活性またはリポタンパク質の結合、取り込みおよび分解

初代培養のラット肝細胞を準備し、6ウェルプレートに分注した（9000,000細胞／ウェル）。48時間後、細胞をPBS (2ml/ウェル) で一度洗浄し、次いで、20ng/mlの組換えネズミ

50

レプチンとともに37℃にて30分インキュベートした。次いで、この細胞を、0.5mMオレイン酸塩の存在下または不在下で、斬増濃度の組換えネズミAdipoQタンパク質および20 μg/mlの¹²⁵I-LDLとともに、37℃にて4時間インキュベートした。リポタンパク質の結合、取り込みおよび分解は実施例1で示したように測定した。

【0478】

C1q

化合物C1qをLSR受容体の活性（リポタンパク質の結合、取り込みおよび分解）を調整する能力に関して試験した。図33は、化合物C1qがオレイン酸塩の存在下および不在下において、好ましい活性の増強を示すことを示している。このように、この化合物C1qは、前記の活性試験によりLSR活性のモジュレーターとして選択することが可能であった。

10

【0479】

AdipoQ

前記で示した4つのパラメーターに従い、化合物AdipoQを試験した。

【0480】

図34は、化合物AdipoQがオレイン酸塩の存在下でLSR活性を調整することを示している。実際には、それは25ng/mlの濃度でLSR活性を増強する。

【0481】

図35は、AdipoQの投与が食後の脂肪血応答を大幅に低下させることを可能にすることを示している。

【0482】

20

図36は、AdipoQでの3日の腹膜内注射処理が、ラットが脂肪臓を受けた場合により重くなる体重に減少をもたらすことを示している。さらに、本発明者らは、AdipoQで処置した動物において、血漿トリグリセリドのレベルが低下することを観察した。

【0483】

図37は、肥満動物において、Adipoの注射が食物摂取を減少させることを示している。

【0484】

25ng/mlのAdipoQにより誘導されるLSR活性の増強で、食後の脂肪血応答の低下および体重減少を説明することができる。

【0485】

このように、AdipoQタンパク質は、特に肥満の治療に使用できる、非常に価値ある化合物である。肥満治療における候補分子としてのこのタンパク質の選択は、LSR活性を調整する注目の化合物をスクリーニングするためのパラメーターを有効にし、その最も重要なパラメーターはLSR活性を測定することにある。

30

【0486】

参 考 文 献

- Aalto-Setälä, K., Fisher, E.A., Chen, X., Chajek-shaul, T., Hayek, T., Zechner, R., Walsh, A., Ramakrishnan, R., Ginsberg, H.N., and Breslow, J.L.. *J.Clin.Invest.* 90 : 1889-1900, 1992.
- Banner, D.W., D'Arcy, A., Janes, W., Gentz, R., Schoenfeld, H.-J., Broger, C., Loetscher, H., and Lesslauer, W.. *Cell* 73: 431-445, 1993. 10
- Bartles, J.R., and Hubbard, A.L. *Methods Enzymol.* 191 : 825-841, 1990.
- Belcher, J.D., Hamilton, R.L., Brady, S.E., Hornick, C.A., Jaeckle, S., Schneider, W.J., and
- Havel, R.J.. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84 : 6785-6789, 1987.
- Bihain, B.E., and Yen, F.T. *Biochemisiry* 31 :4628-4636, 1992.
- Bilheimer, D.W., Eisenberg, S., and Levy, R.I. *Biochim. Biophys. Acta* 260 : 212-221, 1972. 20
- Bodansky M., Principles of peptide synthesis, (1984).
- Brendel, V., Bucher, P., Nourbakhsh, I., Blaisdell, B.E., and Karlin, S. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 2002-2006, 1992.
- Buckholz, R.G.. *Curr. Op. Biotechnology* 4 : 538-542, 1993.
- Busch et al. *J. Chromatogr.* 777 311-328 (1997)
- Carter, B.J. *Curr. Op. Biotechnology* 3 : 533-539, 1993.
- Chen, W.-J., Goldstein, J.-L., and Brown, M.S. *J. Biol. Chem.* 263: 3116-3123, 1990.
- Chen, H., Charlat, O., Targlia, L.A., et al. *Cell* 84 : 491-495, 1996. 30
- Cherif D., Julier, C., Delattre, O., Derré, J., Lathrop, G.M., and Berger, R. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87 : 6639-6643, 1990.
- Chumakov, I., Rigault, P., Guillou, S., Ougen, P., Billault, A., Guasconi, G., Gervy, P., Le Gall, I., Soularue, P., Grinas, P., et al. *Nature* 359 : 380-386, 1992.
- Chumakov, I.M., Rigault, P., Le Gall, I., et al. *Nature* 377 : 175-183, 1995.
- Compton, J. *Nature* 350: 91-92, 1991.
- Cytokines and Their Receptors (Nicola, N.A., ed.). Oxford University Press, Oxford. 1996. 40

- Davis, C.G., Lehrman, M.A., Russell, D.W., Anderson, R.G.W., Brown, M.S., and Goldstein, J.L. *Cell* 45 : 15-24, 1986.
- Edwards, C.P., and Aruffo, A. *Curr. Op. Biotechnology* 4 : 558-563, 1993.
- Elomaa, O., Kangas, M., Sahlberg, C., Tuukkanen, J., Sormunen, R., Liakka, A., Thesleff, I., Kraal, G., and Tryggvason, K. *Cell* 80 (4) : 603-609, 1995.
- Epstein, A. *Médecine/Sciences* 8 : 902-911, 1992.
- Fan, J.L., McCormick, S.P.A., Krauss, R.M., Taylor, S., Quan, R., Taylor, J.M., and Young, S.G. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol* 15 : 1889-1899, 1995. 10
- Goldstein, J.L., Basu, S.K., and Brown, M.S. *Methods Enzymol.* 98 : 241-260, 1983.
- Goldstein, J.L., Hobbs, H.H., Brown, M.S. Familial Hypercholesterolemia In The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease, Volume II, 7th Edition (Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S., Valle, D., ed). Mc Graw-Hill, New-York. pp.1981-2030, 1995.
- Guatelli J.C. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 1874-1878, 1990.
- Gura T. *Science* 275 : 751-753, 1997.
- Heldin, C.H. *Cell* 80 : 213-223, 1995. 20
- Herz, J., Hamann, U., Rogne, S., Myklebost, O., Gausepohl, H., and Stanley, K.K. *EMBO J.* 7 : 4119-4127, 1988.
- Herz, J., Qiu, S.-Q., Oesterle, A., DeSilva, H.V., Shafi, S., and Havel, R.J. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 92 : 4611-4615, 1995.
- Homanics, G.E., de Silva, H.V., Osada, J., Zhang, S.H., Wong, H., Borensztajn, J., and Maeda, N. *J.Biol.Chem.* 270 : 2974-2980, 1995.
- Honoré, B., Madsen, P., Rasmussen, H.H., Vandekerckhove, J., Celis, J.E., and Leffers, H. *Gene* 134 : 283-287, 1993. 30
- Huang, Y.D., Schwendner, S.W., Rall, S.C., and Mahley, R.W. *J.Biol Chem.* 271 : 29146-29151, 1996.
- Huynh, T.U., Young R.A. and Davis R.W. DNA cloning techniques: A practical approach, ed Glover D. (IRL Press, Oxford), 1984.
- Iida, M., Murakami, T., Ishida, K., Mizuno, A., Kuwajima, M., and Shima, K. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 224 : 597-604, 1996.
- Ishibashi, S., Brown, M.S., Goldstein, J.L., Gerard, R.D., Hammer, R.E., and Herz, J. *J. Clin. Invest.* 92 : 883-893, 1993. 40
- Ito, Y., Azrolan, N., O'Connell, A., Walsh, A., and Breslow, J.L. *Science* 249: 790-793, 1990.
- Kleyn, P.W., Fan, W., Kovats, S.G., et al. *Cell* 85 : 281-290, 1996.
- Kobayashi, J., Applebaum-Bowden, D., Dugi, K.A., Brown, D.R., Kashyap, V.S., Parrott,

- C., Duarte, C., Maeda, N., and Santamarina-Fojo, S. *J.Biol.Chem.* 271 : 26296-26301, 1996.
- Köhler et Milstein. *Nature* 256, 495-497, 1975.
- Kosak M. *Nucleic Acids Res.* 15: 8125-8148, 1987.
- Kosak M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 8301-8305, 1990.
- Krainer, A.R., Mayeda, A., Kozak, D., and Binns, G. *Cell* 66 : 383-394, 1991.
- Krieger, M., and Herz, J. *Ann. Rev. Biochem.* 63: 601-637, 1994. 10
- Landegren U., Kaiser R., Sanders J. & Hood L. *Science* 241: 1077-1080, 1988.
- Lee, M.G-S., Bihain, B.E., Russell, D.G., Deckelbaum, R.J., and Van Der Ploeg, L.H.T. *Molec. Cell. Biol.* 10 : 4506-4517, 1990.
- Letourneur, F., and Klausner, R.D. *Cell* 69 : 1143-1157, 1992.
- Lockhart et al. *Nature Biotechnology* 14: 1675-1680, 1996
- Lu, D., Willard, D., Patel, I.R., et al. *Nature* 371 : 799-802, 1994.
- Luckow, V.A. *Curr. Op. Biotechnology* 4 : 564-572, 1993.
- Maeda, N., Li, H., Lee, D., Oliver, P., Quarfordt, S.H., and Osada, J. *J.Biol.Chem.* 269 : 23610-23616, 1994. 20
- Mann, C.J., Khallou, J., Chevreuil, O., Troussard, A.A., Guermani, L.M., Launay, K., Delplanque, B., Yen, F.T., and Bihain, B.E. *Biochemistry* 34 : 10421-10431, 1995.
- Manne, J., Argeson, A.C., Siracusa, L.D. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92 : 4721-4724, 1995.
- Montague, C.T., Farooqi, I.S., Whitehead, J.P., Soos, M.A., Rau, H., Wareham, N.J., Sewter, C.P., Digby, J.E., Mohammed, S.N., Hurst, J.A., Cheetham, C.H., Earley, A.R., Barnett, A.H., Prins, J.B., and O'Rahilly, S.O. *Nature* 387 :903-908, 1997. 30
- No D., Yao T.P. and Evans R.M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93: 3346-3351, 1996.
- Nobben-Trauth, K., Naggert, J.K., North, M.A., and Nishina, P.M. *Nature* 380 : 534-538, 1996.
- Olins, P.O., and Lee, S.C. *Curr. Op. Biotechnology* 4 : 520-525, 1993.
- Oukka, M., André, P., Turmel, P., Besnard, N., Angevin, V., Karlsson, L., Trans, PL., Charron, D., Bihain, B., Kosmatopoulos, K., Lotteau, V. *Eur. J. Immunol.* 27 : 855-859, 1997.
- Parra-Lopez, C.A., Lindner, R., Vidavsky, I., Gross, M., and Unanue, E.R. *J. Immunol.* 158: 2670-2679, 1997. 40
- Perricaudet, M., Stratford-Perricaudet, L. and Briand, P. *La Recherche* 23 : 471-473, 1992.
- Pietu et al. *Genome Research* 6:492-503, 1996

- Plump, A.S., Smith, J.D., Hayek, T., Aalto-Setälä, K., Walsh, A., Verstuyft, J.G., Rubin, E.M., and Breslow, J.L. *Cell* 71 : 343-353, 1992.
- Purcellhuynh, D.A., Farese, R.V., Johnson, D.F., Flynn, L.M., Pierotti, V., Newland, D.L., Linton, M.F., Sanan, D.A., and Young, S.G. *J.Clin.Invest.* 95 : 2246-2257, 1995.
- Rohlmann, A., Gotthardt, M., Willnow, T.E., Hammer, R.E., and Herz, J. *Nature Biotech.* 14 : 1562-1565, 1996.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. *Molecular cloning : a laboratory manual.* Sec. Ed. Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, New York.
- Schena et al. *Science* 270:467-470, 1995
- Simos, G., Georgatos, S.D. *FEBS Letters* 346 : 225-228, 1994.
- Sosnowski RG, et al., *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:1119-1123
- Stewart J.M. et Yound J.D., *solid phase peptides synthesis*, Pierce Chem. Company, Rockford, 111, 2nd edit., (1984).
- Suggs S.V., Wallace R.B., Hirose T., Kawashima E.H. and Itakura K. *PNAS* 78: 6613-6617, 1981.
- Szabo A. et al. *Curr Opin Struct Biol* 5, 699-705 (1995)
- Temin, H.M. *Retrovirus vectors for gene transfer.* In Kucherlapati R., ed. *Gene Transfer*, New York, Plenum Press, 149-187, 1986.
- Troussard, A.A., Khallou, J., Mann, C.J., André, P., Strickland, D.K., Bihain, B.E., and Yen, F.T. *J. Biol. Chem.* 270 : 17068-17071, 1995.
- Verhey, K.J., and Birnbaum, M.J. *J. Biol. Chem.* 269 : 2353-2356, 1994.
- Walker G.T., Fraiser M.S., Schram J.L., Little M.C., Nadeau J.G., & Malinowski D.P. *Nucleic Acids Res.* 20 : 1691-1696, 1992.
- Wang et al. *Chromatographia*, 44 205-208 (1997)
- West, D.B., Boozer, C.N., Moody, D.L., and Atkinson, R.L. *Am. J. Physiol.* 262 : R1025-R1032, 1992.
- Willow, T.E., Sheng, Z., Ishibashi, S., Herz, J. *Science*, 264 : 1471-1474, 1994.
- Woo S.L.C. *Methods Enzymol.* 68: 389, 1979.
- Yen, F.T., Mann, C.J., Guermani, L.M., Hannouche, N.F., Hubert, N., Hornick, C.A., Bordeau, V., Agnani, G., and Bihain, B.E. *Biochemistry* 33 : 1172-1180, 1994.
- Young R.A. and Davis R.W. *PNAS* 80: 1194-1198, 1983a.
- Young R.A. and Davis R.W. *Science* 222 : 778-782, 1983b.
- Zhang, S.H., Reddick, R.L., Piedrahit, J.A., and Maeda, N. *Science* 258 : 468-471, 1992.
- Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L., Friedman, J.M. *Nature*, 372 : 4425-4432, 1994.
- Zhong, G., Romagnoli, P., and Germain, R.N. *J. Exp. Med.* 185 : 429-438, 1997.

10

20

30

40

【0488】

【図1】ラットLSRタンパク質の3形態：LSR66（ α サブユニット）、LSR64（ α' サブユニット）、およびLSR58（ β サブユニット）の略図。

【図2A】ヒトLSR(LSR1.Hs)、ラットLSR(LSR1.Rn)およびマウスLSR(LSR1.Mm)の長形態タンパク質配列（ α サブユニット）の整列。整列の下にある(*)記号は保存的アミノ酸を示し、(.)記号はアミノ酸の保存的置換を示す。NH₂末端からCOOH末端までは線囲み、可能性ある脂肪酸(FAA)結合部位は線囲み、クラスリン結合部位[NPGY]、リソソームアドレッシングコンセンサス：ジローイシンLI-X10-LL、トランスメンブランTMドメインは上に線、モチーフ[RSRS]、可能性あるリポタンパク質結合部位(+--+)は線囲み。矢印付きの線が上にひかれたTNF受容体の記号；記保存的アミノ酸は記号で示す。トランスメンブラン

10

【図2B】ヒトLSR(LSR1.Hs)、ラットLSR(LSR1.Rn)およびマウスLSR(LSR1.Mm)の長形態タンパク質配列（ α サブユニット）の整列。整列の下にある(*)記号は保存的アミノ酸を示し、(.)記号はアミノ酸の保存的置換を示す。NH₂末端からCOOH末端までは線囲み、可能性ある脂肪酸(FAA)結合部位は線囲み、クラスリン結合部位[NPGY]、リソソームアドレッシングコンセンサス：ジローイシンLI-X10-LL、トランスメンブランTMドメインは上に線、モチーフ[RSRS]、可能性あるリポタンパク質結合部位(+--+)は線囲み。矢印付きの線が上にひかれたTNF受容体の記号；記保存的アミノ酸は記号で示す。トランスメンブラン

【図3A】ヒトLSR(α :LSR1.Hs, α' :LSR2.Hs, β :LSR3.Hs)の3タイプのサブユニットのタンパク質配列の整列。記号、線囲み、および上のラインの意味は図2に同じ。

20

【図3B】ヒトLSR(α :LSR1.Hs, α' :LSR2.Hs, β :LSR3.Hs)の3タイプのサブユニットのタンパク質配列の整列。記号、線囲み、および上のラインの意味は図2に同じ。

【図4A】ラットLSRの3タイプのサブユニットのタンパク質配列の整列。記号、線囲み、および上のラインの意味は図2に同じ。

【図4B】ラットLSRの3タイプのサブユニットのタンパク質配列の整列。記号、線囲み、および上のラインの意味は図2に同じ。

【図5A】マウスLSRの3タイプのサブユニットのタンパク質配列の整列。記号、線囲み、および上のラインの意味は図2に同じ。

【図5B】マウスLSRの3タイプのサブユニットのタンパク質配列の整列。記号、線囲み、および上のラインの意味は図2に同じ。

30

【図6】ヒトにおいて同定された3種のLSR形態の略図であり、それら各々の保存的モチーフを示す。A：第1のコーディングエキソンから開始するヒトLSRのゲノム構造の略図。エキソンは線囲みによって、イントロンは斜線によって示されている。ヌクレオチドにおけるエキソンおよびイントロンの大きさはそれらの上に示されている。メッセージャーおよびコードされるタンパク質を特徴付けるエレメントはこの図に示される。右の線囲みは使用した記号の意味を示す。B：ヒトLSRのLSR-Hs-2062型の構造。この形態は649のアミノ酸のタンパク質をコードする。C：ヒトLSRのLSR-Hs-2005型の構造。この形態は630のアミノ酸のタンパク質をコードする。D：ヒトLSRのLSR-Hs-1858型の構造。この形態は581のアミノ酸のタンパク質をコードする。

40

【図7A】ヒトLSR(lsr1.Hs)、ラットLSR(lsr1.rRn)およびマウスLSR(lsr1.Mm)のcDNA（ α サブユニットをコードする）の長形態ヌクレオチド配列の整列。3つの配列において保存されたヌクレオチドは配列の下にある*記号により確認される。配列の最適な整列が、微細な欠失を生じることなく達成できない場合、配列の中にダッシュを付けた。

【図7B】ヒトLSR(lsr1.Hs)、ラットLSR(lsr1.rRn)およびマウスLSR(lsr1.Mm)のcDNA（ α サブユニットをコードする）の長形態ヌクレオチド配列の整列。3つの配列において保存されたヌクレオチドは配列の下にある*記号により確認される。配列の最適な整列が、微細な欠失を生じることなく達成できない場合、配列の中にダッシュを付けた。

【図7C】ヒトLSR(lsr1.Hs)、ラットLSR(lsr1.rRn)およびマウスLSR(lsr1.Mm)のcDNA（ α サブユニットをコードする）の長形態ヌクレオチド配列の整列。3つの配列におい

50

て保存されたヌクレオチドは配列の下にある*記号により確認される。配列の最適な整列が、微細な欠失を生じることなく達成できない場合、配列の中にダッシュを付けた。

【図7D】ヒトLSR(lsr1.Hs)、ラットLSR(lsr1.rRn)およびマウスLSR(lsr1.Mm)のcDNA(αサブユニットをコードする)の長形態ヌクレオチド配列の整列。3つの配列において保存されたヌクレオチドは配列の下にある*記号により確認される。配列の最適な整列が、微細な欠失を生じることなく達成できない場合、配列の中にダッシュを付けた。

【図7E】ヒトLSR(lsr1.Hs)、ラットLSR(lsr1.rRn)およびマウスLSR(lsr1.Mm)のcDNA(αサブユニットをコードする)の長形態ヌクレオチド配列の整列。3つの配列において保存されたヌクレオチドは配列の下にある*記号により確認される。配列の最適な整列が、微細な欠失を生じることなく達成できない場合、配列の中にダッシュを付けた。

【図8】ラット肝臓膜(レーン1,2および4)の可溶化タンパク質、または240kDの部分精製タンパク質(レーン3)におけるリガンドブロッキングおよびウエスタンブロッティングによるLSR受容体の同定。レーン1,2および3:リガンドブロッキング。レーン1:オレイン酸塩および¹²⁵I-LDLの不在下;レーン2:オレイン酸塩および¹²⁵I-LDLの存在下;レーン3:オレイン酸塩および¹²⁵I-LDLの存在下。レーン4:抗LSR抗体群を用いたウエスタンブロッティング。

【図9】LSR活性に対する抗LSR抗体の効果。A:オレイン酸塩および漸増濃度の抗LSR抗体(■)、または対照抗体(□)の存在下でのラット肝細胞の原形質膜に対する¹²⁵I-LDLの結合は、抗体の不在下で結合した¹²⁵I-LDLの総量に対する%として示した。B:オレイン酸塩および抗LSR抗体(■)、または対照抗体(□)の存在下で、初代培養におけるラット肝細胞の¹²⁵I-LDLの結合、取り込み、分解は、それぞれ非特異的抗体の存在下での¹²⁵I-LDLの結合、取り込み、全分解に対する%として示した。

【図10】対照抗体(レーン1)、または抗LSR抗体(レーン2~4)の存在下で、非還元(レーン2および3)または還元(レーン1および3)条件下の電気泳動による分離後の、³⁵S-メチオニンおよび³⁵S-システイン標識肝細胞溶解液の免疫沈降によるLSR受容体の同定。

【図11】αおよびβ-LSRをコードするcDNAのクローニング。A:数種のサイズのLSRメッセンジャーRNAを示すノーザンブロット解析。B:LSRに特異的なプローブおよびβ-アクチンに特異的な対照プローブを用いるLSRmRNAのマルチティッシュノーザンブロット解析。C:全配列にわたる5対のプライマーを用いたLSRmRNA PT-PCR解析およびbc'プライマーによって得られた増幅断片における選択的スプライシングから誘導された3形態の同定。図は、LSRcDNAの3つの対応する形態の配列解析の結果を表す:四角の領域は2つの短い形態を欠き、陰付きの領域は最も短い形態のみを欠いている。

【図12】ラットLSR、および対照cDNAの最も長い形態(66kDa、レーン2)および最も短い形態(58kDa、レーン3)をコードする2つの全cDNA、LSRの最も長い形態(レーン1)をコードするcDNAのアンチセンスのin vitroでの翻訳。in vitroでの翻訳生成物は³⁵S-メチオニンで標識されており、非還元条件下での電気泳動後に解析される。

【図13】LSR活性に関与するα-およびβ-LSRサブユニットの同定。A:抗LSRペプチド抗体を生成するために用いられるLSRN-末端ペプチドの位置および配列を示す図。B:LSRのα-およびβ-LSRサブユニットのウエスタンブロッティングおよびリガンドブロッキング。ウエスタンブロッティングは抗LSR(レーン1)または抗LSRペプチド(レーン2)抗体を用いて行われる。リガンドブロッキングは¹²⁵I-LDLの存在下で、オレイン酸塩を含み(レーン4)、または含まず(レーン3)に行われる。C:ラット肝臓原形質膜のLSR活性に対する、合成LSRペプチドに向けられた抗体の効果。LSR活性は対照抗体(□)または抗LSRペプチド抗体(■)の存在下で測定される。

【図14】LSR受容体のサブユニットの同定およびLSRから誘導されたC-末端合成ペプチドに向けられた抗体の阻害効果。A:合成ペプチド170の位置および配列を示す図。B:合成ペプチド170(レーン2)、または対照抗体(レーン1)に向けられた抗体を用いるラット肝細胞溶解液のウエスタンブロッティング;レーン3:分子量マーカー。C:オレイン酸塩および対照抗体またはLSR170ペプチドに向けられた抗体の存在下における、LSR受容体による¹²⁵I-LDLの結合。

10

20

30

40

50

【図 1 5】オレイン酸塩の存在下または不在下での LDL の結合における LSR 受容体の α および β サブユニットを発現するプラスミドを有する CHO-K1 細胞の一時的トランスフェクション効果。斬増濃度の α プラスミド単独 (○□) ; 固定濃度の α プラスミドおよび斬増濃度の β プラスミド (●■)。

【図 1 6】LDL の取り込みおよび分解における LSR 受容体の α および β サブユニットを発現するプラスミドを有する CHO-K1 細胞の一時的トランスフェクション効果。斬増濃度の α プラスミド単独 (■) ; 固定濃度の α プラスミドおよび斬増濃度の β プラスミド (●)。その結果はオレイン酸塩の存在下での測定値と不在下での測定値の差で示す。

【図 1 7】トランスフェクトされていない同一細胞 (対照) において得られる LSR 活性と比較した、LSR 受容体の α および β サブユニットをコードする核配列で一時的にトランスフェクトされた CHO-K1 細胞において得られる LSR 活性の同定。A : 対照抗体または抗 LSR 抗体の存在下における ^{125}I -LDL の結合。B : 斬増濃度の標識リポタンパク質の存在下における ^{125}I -LDL の結合 ; ラットカイロミクロン (◆)、ヒト VLDL (■)、LDL (□)、HDL (●)、プロナーゼで処理した LDL (○)、またはシクロヘキサジオンで修飾した LDL (LDL-chd、●)。

【図 1 8】ラット肝細胞の初代培養でのレプチンの特異的分解におけるオレイン酸塩、RA P-39、抗 LSR 抗体およびクロロキノンの効果。

【図 1 9】レプチンを含むアフィニティークロマトグラフィーカラム上に保持されたラット肝臓原形質膜タンパク質画分の、抗 LSR 抗体を用いたウエスタンブロット解析。

【図 2 0】肝臓および腎臓における対照 (□)、ob/ob (■) および db/db (ハッチングの四角) マウスの ^{125}I -レプチンクリアランス。結果は肝臓および腎臓において見られる ^{125}I -レプチンと ^{125}I - β 2-ミクログロブリンの量の差で示されている。

【図 2 1】対照、ob/ob および db/db マウスの肝臓で発現した LSR 受容体の見かけの数。

【図 2 2】肝臓および腎臓に分布した ^{125}I -レプチン量の比率における抗 LSR 抗体の効果。

【図 2 3】初代培養でのラット肝細胞の LSR 活性に対するレプチン濃度増強の効果。結果は ^{125}I -LDL、または ^{125}I -VLDL のいずれかの存在下で、オレイン酸塩を含んで培養した細胞と、含まずに培養した細胞で得られる活性の差を表す。

【図 2 4】レプチンによる、初代培養におけるラット肝細胞の LSR 活性誘導能力。A : オレイン酸塩の存在下で結合した ^{125}I -LDL の量の測定により評価された、レプチンの存在下または不在下において肝細胞の表面で発現した受容体の見かけの数。B : レプチンによる LSR 活性の誘導におけるシクロヘキシミド、コルヒチンおよびサイトカラシン B の効果。

【図 2 5】マウス組換えレプチンの注入有り (B) および注入なし (A) を用いた、高脂肪食餌摂取後のトリグリセリド (TG) の血漿濃度における変化により影響を受ける、対照 (○)、ob/ob マウス (■) および db/db マウス (□) の食餌後の脂肪血応答におけるレプチンの効果。

【図 2 6】高脂肪食餌の摂取後のトリグリセリド (TG) の血漿濃度の測定により示される、ラクトフェリンの存在下および不在下での、ob/ob マウスの食餌後の脂肪血応答におけるレプチンの効果。

【図 2 7】ob/ob および db/db マウスの肝臓で発現した LSR 受容体の見かけの数におけるレプチン注入の効果。

【図 2 8】対照 (C57BL6)、ob/ob および db/db マウスにおける食餌後の脂肪血応答および LSR 活性。A : 対照、ob/ob および db/db 雄マウスの体重。B : 対照、ob/ob および db/db マウスにおける食餌後の脂肪血応答。C : LDL 結合の測定により評価し、各原形質膜調製物における 5'ヌクレオチダーゼ活性との比較により任意の単位で表した LSR 受容体の見かけの数。D : 肝臓総 RNA の抽出物におけるノーザンブロット。GAPDH が対照として用いられる。

【図 2 9】ob/ob マウスにおけるレプチンによる長時間処理の効果。A : 30 日にわたる体重変化。B : 処理 29 日目の食餌後の脂肪血応答。C : LDL 結合の測定により評価し、各原形質膜調製物における 5'ヌクレオチダーゼ活性との比較により任意の単位で表した、30 日における LSR 受容体の見かけの数。D : 肝臓 RNA の総抽出物において確立された LSR の発現のノーザンブロット解析。GAPDH およびアクチンが対照として用いられる。

10

20

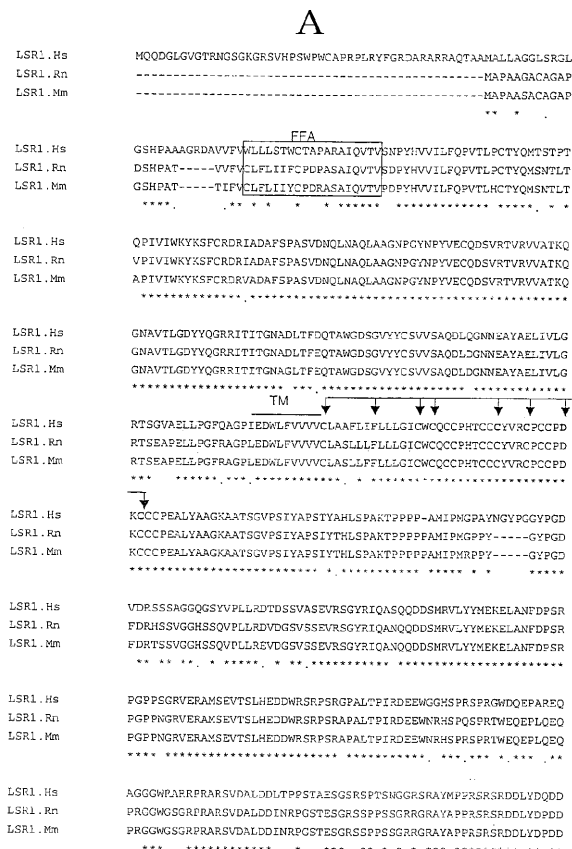
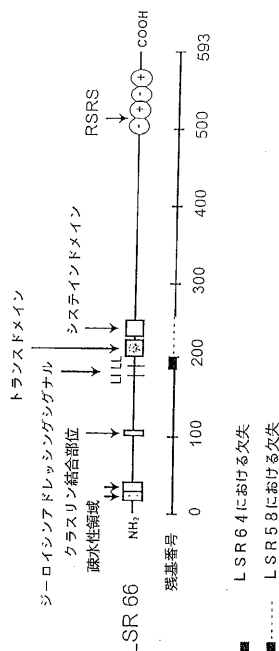
30

40

50

【図 37】 ob/ob および db/db 肥満マウスの食物摂取における 100 μ g の AdipoQ の 5 日間にあたる毎日の注入の効果。

【图 2 A】



【図 2 B】

B

```

LSR1 .Hs  SRDFPSRDPHY-DQFSRERPPADPRSHHHRTDRPDNGSRSGDLPYDGRLLLEAVRKX
LSR1 .Rn  PRDLPHSRDPHYDDIRSRD-PRADPR-SRQSRSDPRDAGFRSDQYDGRLLLEALKKK
LSR1 .Mn  PRDLPHSRDPHYDDIRSRD-PRADPR-SRQSRSDPRDAGFRSDQYDGRLLLEALKKK
** ..... **
LSR1 .Hs  GSEERRRPHKEEEE--AYYPPAPPYSETDSQASRERRLKKMLALSRESLVV
LSR1 .Rn  GSGERARVYREEEEE--GQYPPAPPYSETDSQASRERRLKKMLALSRESLVV
LSR1 .Mn  GAGERRRVYREEEEE--EEGHYPPAPPYSETDSQASRERRLKKMLALSRESLVV
* ..... *

```

【図 3 A】

A

```

LSR1 .Hs  MQQDGLGVGTNRGSGKRSVHPSWPCAPRPLRYFGDRARARRAQTAAMALLAGGLSRGL
LSR2 .Hs  MQQDGLGVGTNRGSGKRSVHPSWPCAPRPLRYFGDRARARRAQTAAMALLAGGLSRGL
LSR3 .Hs  MQQDGLGVGTNRGSGKRSVHPSWPCAPRPLRYFGDRARARRAQTAAMALLAGGLSRGL
*****
LSR1 .Hs  GSHPAAGRDADVVFVLLSTWCTAPARAIOQTVVSNPYHVVLFPQVTLCTYQMTSTPT
LSR2 .Hs  GSHPAAGRDADVVFVLLSTWCTAPARAIOQTVVSNPYHVVLFPQVTLCTYQMTSTPT
LSR3 .Hs  GSHPAAGRDADVVFVLLSTWCTAPARAIOQTVVSNPYHVVLFPQVTLCTYQMTSTPT
*****
LSR1 .Hs  QPIVINKYSFCRDRIADAFSPASVDNQLNAQLAAGNPGYNPYVECDQSVRTVRVWATKQ
LSR2 .Hs  QPIVINKYSFCRDRIADAFSPASVDNQLNAQLAAGNPGYNPYVECDQSVRTVRVWATKQ
LSR3 .Hs  QPIVINKYSFCRDRIADAFSPASVDNQLNAQLAAGNPGYNPYVECDQSVRTVRVWATKQ
*****
LSR1 .Hs  GNAVTLGDYYQGRITITGNADLTDFQTAWGDGSGVYCSVSAQDLQGNNEAYAEITVLG
LSR2 .Hs  GNAVTLGDYYQGRITITGNADLTDFQTAWGDGSGVYCSVSAQDLQGNNEAYAEITVLG
LSR3 .Hs  GNAVTLGDYYQGRITITGNADLTDFQTAWGDGSGVYCSVSAQDLQGNNEAYAEITVLG
*****
LSR1 .Hs  RTSGVAELLPFGFQAGPIEDWLFVVVVCLAAFLIFLLLGICWQCCPHTCCCVRCPCCPD
LSR2 .Hs  -----DWLFVVVVCLAAFLIFLLLGICWQCCPHTCCCVRCPCCPD
LSR3 .Hs  -----DWLFVVVVCLAAFLIFLLLGICWQCCPHTCCCVRCPCCPD
*****
LSR1 .Hs  KCCCPALYAAGKAATSGVPSIYAPSTYHLSPAKTPPPANIPMGPAVNGYGGVPGDV
LSR2 .Hs  KCCCPALYAAGKAATSGVPSIYAPSTYHLSPAKTPPPANIPMGPAVNGYGGVPGDV
LSR3 .Hs  -----VYAAGKAATSGVPSIYAPSTYHLSPAKTPPPANIPMGPAVNGYGGVPGDV
*****
LSR1 .Hs  DRSSSAGGQGSVPLLRDTSSVASEVRSVRIQASQODSMRVLYMEKELANFDPSP
LSR2 .Hs  DRSSSAGGQGSVPLLRDTSSVASEVRSVRIQASQODSMRVLYMEKELANFDPSP
LSR3 .Hs  DRSSSAGGQGSVPLLRDTSSVASEVRSVRIQASQODSMRVLYMEKELANFDPSP
*****
LSR1 .Hs  GPPSGRVERAMSEVTLSEDDWRSRPSRGPALTPIRDEEWGHSRSPRGWQDEPAREQA
LSR2 .Hs  GPPSGRVERAMSEVTLSEDDWRSRPSRGPALTPIRDEEWGHSRSPRGWQDEPAREQA
LSR3 .Hs  GPPSGRVERAMSEVTLSEDDWRSRPSRGPALTPIRDEEWGHSRSPRGWQDEPAREQA
*****
LSR1 .Hs  GGGWRARRPRARSVDALDOLTPPTAESGSRSPTSNGGRSHAYNPPRSRSDLDYQDQDS
LSR2 .Hs  GGGWRARRPRARSVDALDOLTPPTAESGSRSPTSNGGRSHAYNPPRSRSDLDYQDQDS
LSR3 .Hs  GGGWRARRPRARSVDALDOLTPPTAESGSRSPTSNGGRSHAYNPPRSRSDLDYQDQDS
*****

```

【図 3 B】

B

```

LSR1 .Hs  RDFFPSRDPHYDDQFSRERPPADPRSHHHRTDRPDNGSRSGDLPYDGRLLLEAVRKXGS
LSR2 .Hs  RDFFPSRDPHYDDQFSRERPPADPRSHHHRTDRPDNGSRSGDLPYDGRLLLEAVRKXGS
LSR3 .Hs  RDFFPSRDPHYDDQFSRERPPADPRSHHHRTDRPDNGSRSGDLPYDGRLLLEAVRKXGS
*****
LSR1 .Hs  HERRRPHKEEEEAYYPPAPPYSETDSQASRERRLKKMLALSRESLVV
LSR2 .Hs  HERRRPHKEEEEAYYPPAPPYSETDSQASRERRLKKMLALSRESLVV
LSR3 .Hs  HERRRPHKEEEEAYYPPAPPYSETDSQASRERRLKKMLALSRESLVV
*****

```

【図 4 A】

A

```

LSR1 .Rn  MAPAAGACAGAPDSHPATVVFVCLFLIFCDDPASAIQTVVSDPYHVVLFPQVTLCTY
LSR2 .Rn  MAPAAGACAGAPDSHPATVVFVCLFLIFCDDPASAIQTVVSDPYHVVLFPQVTLCTY
LSR3 .Rn  MAPAAGACAGAPDSHPATVVFVCLFLIFCDDPASAIQTVVSDPYHVVLFPQVTLCTY
*****
LSR1 .Rn  QMSNTLTVPIVINKYSFCRDRIADAFSPASVDNQLNAQLAAGNPGYNPYVECDQSVRTV
LSR2 .Rn  QMSNTLTVPIVINKYSFCRDRIADAFSPASVDNQLNAQLAAGNPGYNPYVECDQSVRTV
LSR3 .Rn  QMSNTLTVPIVINKYSFCRDRIADAFSPASVDNQLNAQLAAGNPGYNPYVECDQSVRTV
*****
LSR1 .Rn  RVVATKQGNNAVTLGDYYQGRITITGNADLTDFQTAWGDGSGVYCSVSAQDLQGNNEAY
LSR2 .Rn  RVVATKQGNNAVTLGDYYQGRITITGNADLTDFQTAWGDGSGVYCSVSAQDLQGNNEAY
LSR3 .Rn  RVVATKQGNNAVTLGDYYQGRITITGNADLTDFQTAWGDGSGVYCSVSAQDLQGNNEAY
*****
LSR1 .Rn  AELIVLQRTSEAPLPGFQAGPIEDWLFVVVVCLASLLFLLLLGICWQCCPHTCCCV
LSR2 .Rn  AELIVL-----DWLFVVVVCLASLLFLLLLGICWQCCPHTCCCV
LSR3 .Rn  AELIVL-----DWLFVVVVCLASLLFLLLLGICWQCCPHTCCCV
*****
LSR1 .Rn  RCPCCPDKCCCPALYAAGKAATSGVPSIYAPSTYHLSPAKTPPPANIPMGPPYGYF
LSR2 .Rn  RCPCCPDKCCCPALYAAGKAATSGVPSIYAPSTYHLSPAKTPPPANIPMGPPYGYF
LSR3 .Rn  -----VYAAGKAATSGVPSIYAPSTYHLSPAKTPPPANIPMGPPYGYF
*****
LSR1 .Rn  GDFDRHSSVGGHSSQVPLLRDVGSSVSSEVRSVRIQANQQODSMRVLYMEKELANFDP
LSR2 .Rn  GDFDRHSSVGGHSSQVPLLRDVGSSVSSEVRSVRIQANQQODSMRVLYMEKELANFDP
LSR3 .Rn  GDFDRHSSVGGHSSQVPLLRDVGSSVSSEVRSVRIQANQQODSMRVLYMEKELANFDP
*****
LSR1 .Rn  SRPGPPNGRVERAMSEVTLSEDDWRSRPSRAPALTPIRDEENRHSQSPRTWQEPILQ
LSR2 .Rn  SRPGPPNGRVERAMSEVTLSEDDWRSRPSRAPALTPIRDEENRHSQSPRTWQEPILQ
LSR3 .Rn  SRPGPPNGRVERAMSEVTLSEDDWRSRPSRAPALTPIRDEENRHSQSPRTWQEPILQ
*****
LSR1 .Rn  EQPRGGWGSGRPRARSVDALDDINRPGSTESGRSSPSSGGRGRAYAPPSSRSDLDYDP
LSR2 .Rn  EQPRGGWGSGRPRARSVDALDDINRPGSTESGRSSPSSGGRGRAYAPPSSRSDLDYDP
LSR3 .Rn  EQPRGGWGSGRPRARSVDALDDINRPGSTESGRSSPSSGGRGRAYAPPSSRSDLDYDP
*****
LSR1 .Rn  DDPRDLPHSRDPHYDDIRSRDPRADPRSRQSRSDPRDAGFRSDQYDGRLLLEALKKK
LSR2 .Rn  DDPRDLPHSRDPHYDDIRSRDPRADPRSRQSRSDPRDAGFRSDQYDGRLLLEALKKK
LSR3 .Rn  DDPRDLPHSRDPHYDDIRSRDPRADPRSRQSRSDPRDAGFRSDQYDGRLLLEALKKK
*****

```


【図 5 A】

A

FFA

LSR1.1.Mm MAA¹PAASACAGAGFSGHPATTIFV¹CLFLIIYICPD²RASAIQVTV³PD⁴PPHVHVLFPQVTLHCTY⁵

LSR2.1.Mm MAA¹PAASACAGAGFSGHPATTIFV¹CLFLIIYICPD²RASAIQVTV³PD⁴PPHVHVLFPQVTLHCTY⁵

LSR3.1.Mm MAA¹PAASACAGAGFSGHPATTIFV¹CLFLIIYICPD²RASAIQVTV³PD⁴PPHVHVLFPQVTLHCTY⁵

LSR1.1.Mm QMSNTLTARIPIVIMKYKSFCD¹RVDADFSPASVDNQLNAQLAAG²MG³SNPYV⁴ECQDSV⁵RTV

LSR2.1.Mm QMSNTLTARIPIVIMKYKSFCD¹RVDADFSPASVDNQLNAQLAAG²MG³SNPYV⁴ECQDSV⁵RTV

LSR3.1.Mm QMSNTLTARIPIVIMKYKSFCD¹RVDADFSPASVDNQLNAQLAAG²MG³SNPYV⁴ECQDSV⁵RTV

LSR1.1.Mm RVVATKQGN¹NAVLTDGY²YQGRRITITG³NAGLTFEQ⁴TAWGDSGVY⁵YCSV⁶YSAQDL⁷DGNNEAY

LSR2.1.Mm RVVATKQGN¹NAVLTDGY²YQGRRITITG³NAGLTFEQ⁴TAWGDSGVY⁵YCSV⁶YSAQDL⁷DGNNEAY

LSR3.1.Mm RVVATKQGN¹NAVLTDGY²YQGRRITITG³NAGLTFEQ⁴TAWGDSGVY⁵YCSV⁶YSAQDL⁷DGNNEAY

TM

LSR1.1.Mm AELIVL¹SRTSEAP²LPLGFRAGLP³EDLFW⁴VV⁵WCLASL⁶FL⁷LLGLGICW⁸CCPHT⁹CCCV¹⁰

LSR2.1.Mm AELIVL¹-----DMLFVVVCLASL⁶FL⁷LLGLGICW⁸CCPHT⁹CCCV¹⁰

LSR3.1.Mm AELIVL¹-----DMLFVVVCLASL⁶FL⁷LLGLGICW⁸CCPHT⁹CCCV¹⁰

LSR1.1.Mm RCPCPDPKCC¹PEALYAGK²RATSGV³PSIYAP⁴SIYTHLSPAK⁵TTPPPFAM⁶IEMRP⁷PGYGV⁸

LSR2.1.Mm RCPCPDPKCC¹PEALYAGK²RATSGV³PSIYAP⁴SIYTHLSPAK⁵TTPPPFAM⁶IEMRP⁷PGYGV⁸

LSR3.1.Mm -----VYAGK²RATSGV³PSIYAP⁴SIYTHLSPAK⁵TTPPPFAM⁶IEMRP⁷PGYGV⁸

LSR1.1.Mm GDFPRTSSVGGHSSQV¹LLREV²DGVS³SVSEVRSGY⁴RIQANQDD⁵SHNAVLYMEKELAN⁶FP

LSR2.1.Mm GDFPRTSSVGGHSSQV¹LLREV²DGVS³SVSEVRSGY⁴RIQANQDD⁵SHNAVLYMEKELAN⁶FP

LSR3.1.Mm GDFPRTSSVGGHSSQV¹LLREV²DGVS³SVSEVRSGY⁴RIQANQDD⁵SHNAVLYMEKELAN⁶FP

LSR1.1.Mm SRPGPPNGRVERAMSEV¹LSHEDD²WRSRPSRA³PALTPIRDE⁴EWNRHSPRS⁵PRTWQE⁶PLQ

LSR2.1.Mm SRPGPPNGRVERAMSEV¹LSHEDD²WRSRPSRA³PALTPIRDE⁴EWNRHSPRS⁵PRTWQE⁶PLQ

LSR3.1.Mm SRPGPPNGRVERAMSEV¹LSHEDD²WRSRPSRA³PALTPIRDE⁴EWNRHSPRS⁵PRTWQE⁶PLQ

LSR1.1.Mm EQP¹RGWGWSGRF²PARSVDAL³DDINP⁴GSTESGRSS⁵PSSGRGRG⁶RAYAP⁷PRSSRD⁸LDYDP

LSR2.1.Mm EQP¹RGWGWSGRF²PARSVDAL³DDINP⁴GSTESGRSS⁵PSSGRGRG⁶RAYAP⁷PRSSRD⁸LDYDP

LSR3.1.Mm EQP¹RGWGWSGRF²PARSVDAL³DDINP⁴GSTESGRSS⁵PSSGRGRG⁶RAYAP⁷PRSSRD⁸LDYDP

LSR1.1.Mm DDFP¹DLFHSRD²PHYVYD³LLRSRDP⁴ADP⁵RSQRSHD⁶PRDAG⁷FRSD⁸PQYD⁹GRLL¹⁰EAL¹¹KKK

LSR2.1.Mm DDFP¹DLFHSRD²PHYVYD³LLRSRDP⁴ADP⁵RSQRSHD⁶PRDAG⁷FRSD⁸PQYD⁹GRLL¹⁰EAL¹¹KKK

LSR3.1.Mm DDFP¹DLFHSRD²PHYVYD³LLRSRDP⁴ADP⁵RSQRSHD⁶PRDAG⁷FRSD⁸PQYD⁹GRLL¹⁰EAL¹¹KKK

【图 6】

Timing diagram for the LSR_Hls_2062 and LSR_Hls_2005 modules. The diagram shows signals for NGPY, ジーロイシンLI, ジーロイシンIL, TN-受容体, KRSS, ATG, and 停止. The diagram is divided into three sections: A) LSR_Hls_2062 (449 ns), B) LSR_Hls_2005 (639 ns), and C) LSR_Hls_1858 (581 ns). Each section shows a sequence of events with time markers and signal transitions.

Legend:

- △ : NGPY
- 0 : ジーロイシンLI
- o : ジーロイシンIL
- : TN-受容体
- ☆ : KRSS
- ◇ : ATG
- ⬇ : 停止

Section A) LSR_Hls_2062 (449 ns):

Timeline: 156, 1182, 342, 8283, 120, 2860, 27, 554, 147, 3666, 174, 146, 60, 97, 132, 141, 626, 99, 1441.

Section B) LSR_Hls_2005 (639 ns):

Timeline: 1, 252, 258, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10.

Section C) LSR_Hls_1858 (581 ns):

Timeline: 1, 252, 258, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10.

【図 7 B】

A

[illegible]

【図 7 C】

C

```

lsr1.1.Hs      TGCCCCCAGCACCATTATGCCAAGCTTGTCCCGCCGAAGCAGCCACC-- --CCCAACCAAGTAT
lsr1.1.Rn      TGCCCCCAGCAGCTATATACCAAGCTCTTCAAGCTGCCAAGCCCAACCACTTCGGCTGGCAT
lsr1.1.Mm      TGCCCCCAGCATCTATACCAAGCTCTCTCTCTGCCAAGACTCCGCCACCTTCGGCTGGCAT
*****
lsr1.1.Hs      GATTTCGCATGGGGCTTGCTTACAACGGGTACCTCGAGGATACCTTGAGACGTTTGACAG
lsr1.1.Rn      GATTTCGCATGGGGCTCTCCATAT-----GGGTACCTTGAGACGTTTGACAG
lsr1.1.Mm      GATTTCGCATGGCTCTCCATAT-----GGGTACCTTGAGACGTTTGACAG
*****
lsr1.1.Hs      GAGTAGCTCAGCTGGTGGCCAAAGGCTCTCATGTATACCTCTGCTGGGACACGGACGACGAG
lsr1.1.Rn      ACATAGTCTCAGTTGGTGGCCACAGCTCCCAAGTACCCTTGTCTGGTGAAGCTGGATGGAG
lsr1.1.Mm      GACCCAGCTCAGTTGGTGGCCACAGCTCCCAAGTGCCTCTGCTGGTGAAGTGGATGGAG
*****
lsr1.1.Hs      TGTGGCTCTGAAGTCCCGAGTGGCTACAGGATTCAGGCCAGCCAGCAGGACGACTCCAT
lsr1.1.Rn      TGTATCTTCAGAAAGTACGAAGTGGCTACAGGATTCAGGCCAATCAACGCAAGATGACTCCAT
lsr1.1.Mm      CTGATCTTCAGAAAGTACGAAGTGGCTACAGGATTCAGGCCAATCAACGCAAGATGACTCCAT
*****
lsr1.1.Hs      GCGGGCTCTGTACTACTAGTGGAGAAGGAGCTGGCCAACTTCGACACTTTCGACACTGGGCC
lsr1.1.Rn      GAGGTCTCTACTACTATATGGAGAAGAGCTATGCCAACTTTCGACACTTTCGACACTGGGCC
lsr1.1.Mm      GAGGGTCTCTACTACTATATGGAGAAGGAGCTTAGCCAACTTCGACTCTTTCGCGCTGGGCC
*****
lsr1.1.Hs      CCCCAGTGGCCCTGTGGAGCGGGCACTGAGTGAAGTCACTTCCTCCACGAGGACGACTG
lsr1.1.Rn      TCCCAATGGCAGCAAGTGGAAAGGGGCCATAGTGAAGTAACTCCCTCCATGAAGTGAAGT
lsr1.1.Mm      TCCCAATGGCCAGCAAGTGGAAAGGGSCATGAGTGAAGTAACTCCCTCCATGAAGTGAAGT
*****
lsr1.1.Hs      GCGATCTCGGCCTTCCCGGGGCTCTGCCCTACCCCGATCCGGGATGAGGAGTGGGATGG
lsr1.1.Rn      GCGATCGAGGCCTTCGAGGGCTCTGCCCTACCCCGATCCAGGATGAGGAGTGGGATGG
lsr1.1.Mm      GCGGATCTCGGCCTTCCAGGGCTCTTGCCCTCACACCCATCAGGGATGAGGAGTGGAAATG
*****
lsr1.1.Hs      CCACATCCCCCGAGATGCCAAGGGATGGACCACGAGACCCGCCAAGGAGCAGGACGAGGG
lsr1.1.Rn      CCACATCCCCAGAGGATGCCAAGACATGGGACAGGAGACCCCTTCAAGAACATCAAGGGG
lsr1.1.Mm      CCACATCCCTTCGGAGTCCCAAGACATGGGACAGGAGACCCCTTCAAGAACATCAAGGGG
*****
lsr1.1.Hs      GGCGTCGGCGGCAGAGCGGCCCGCCGGCCCGCTCGCTGGACGCCCTGACGACTCACCCG
lsr1.1.Rn      TGGTTGGGGGCTTGACGAGCTCTGGCCCGCTCTGTGGATGCTCTATGATGATCAACCAAGC
lsr1.1.Mm      TGGTTGGGGGCTTCGGCGGCTCTGGCGCGCTCTGTGGATGCTCTATGATGATCAACCAAGC
*****

```

B

[illegible]

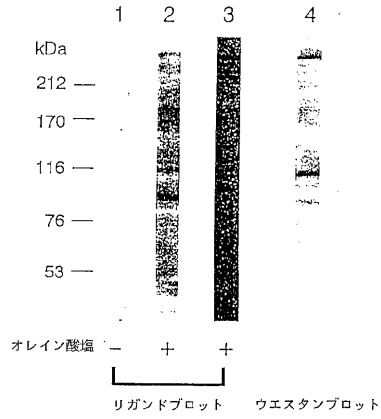
【図 7 E】

E

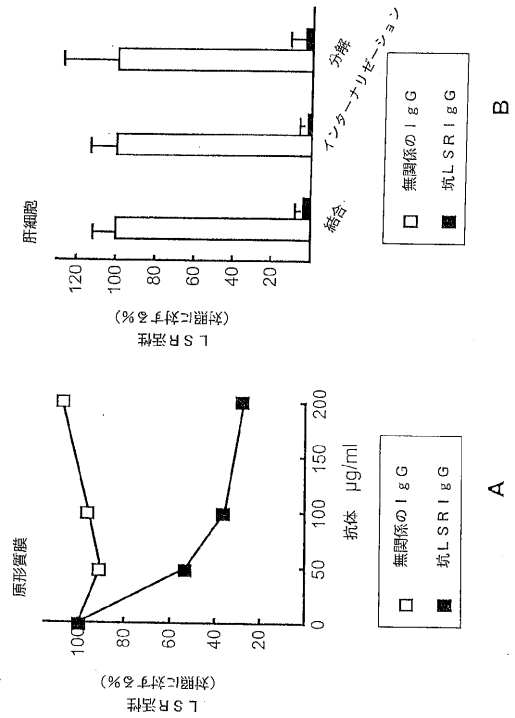
lsr1.Hs
lsr1.Rn
lsr1.Mm

AATCACAATAAATAA

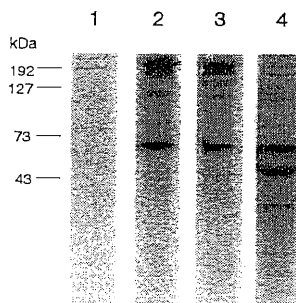
【図 8】



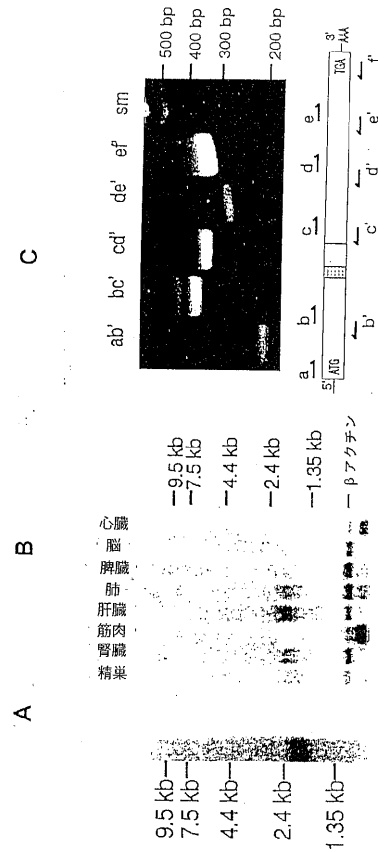
【図 9】



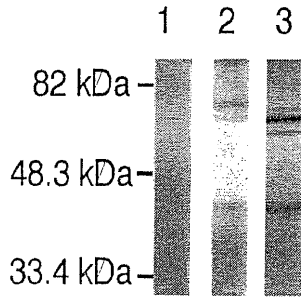
【図 10】



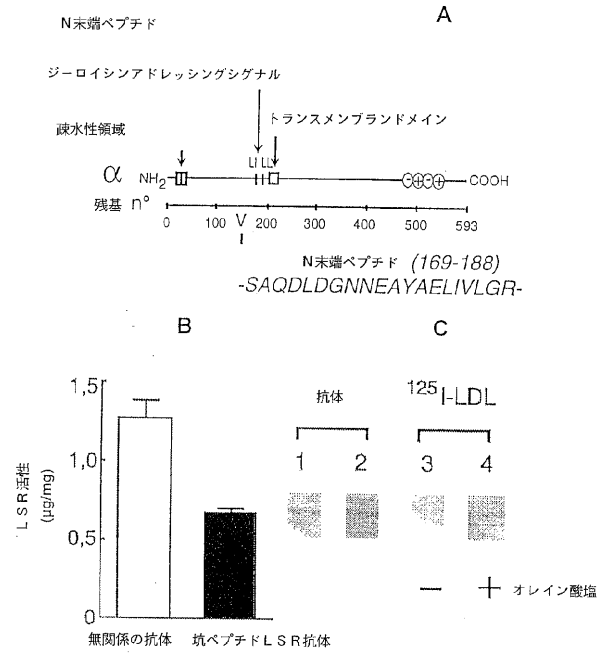
【図 11】



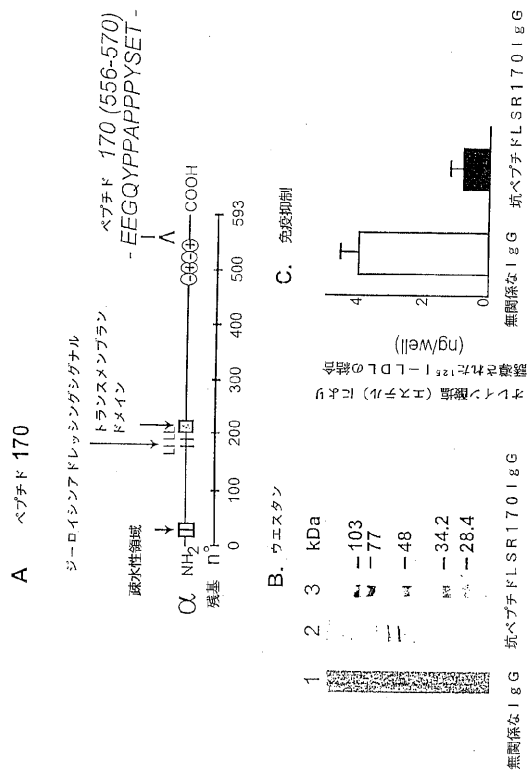
【図 1 2】



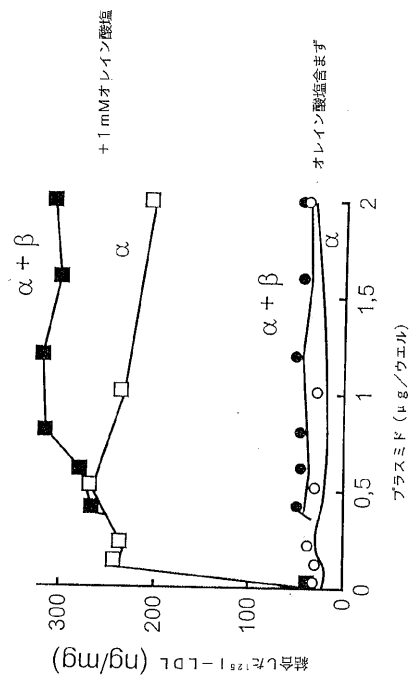
【図 1 3】



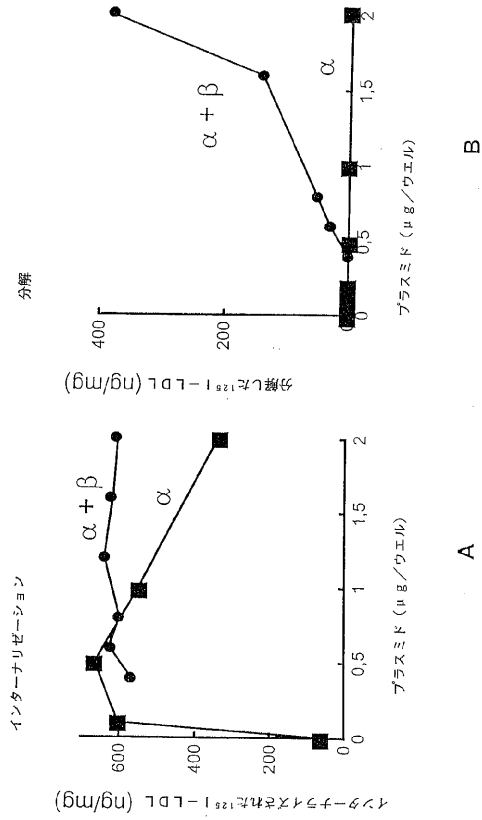
【図 1 4】



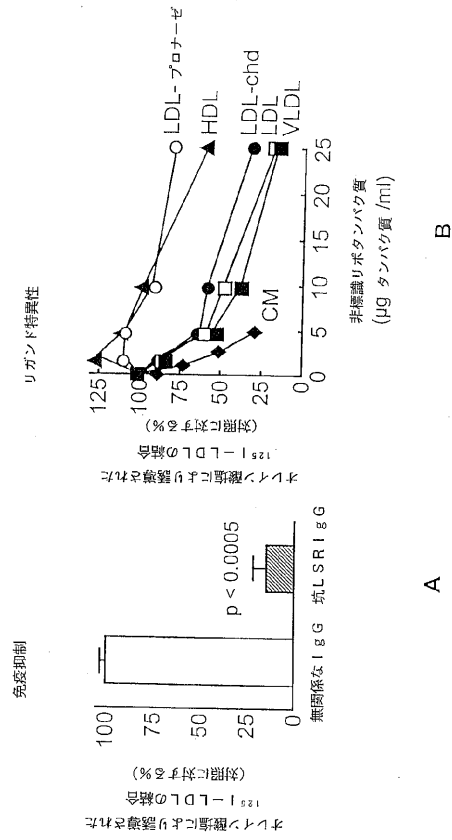
【図 1 5】



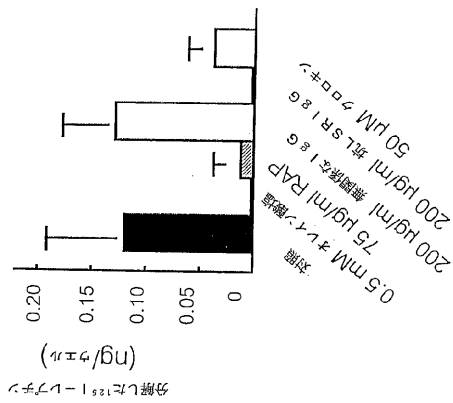
【図 16】



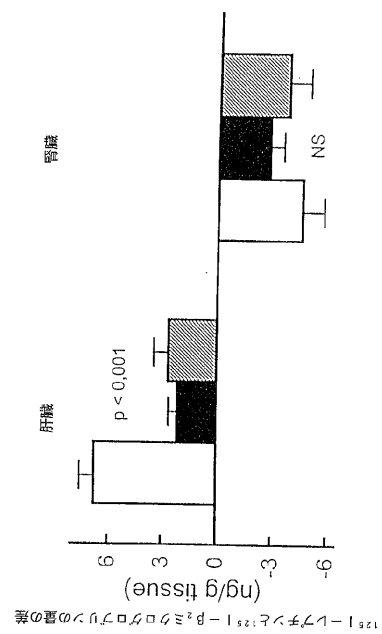
【図 17】



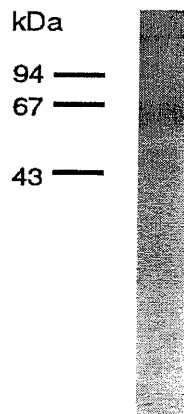
【図 18】



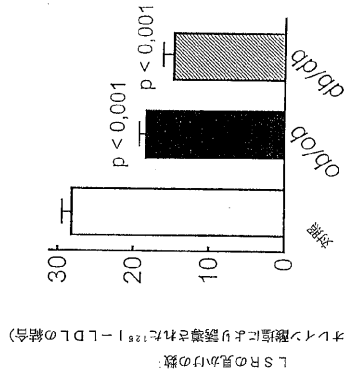
【図 20】



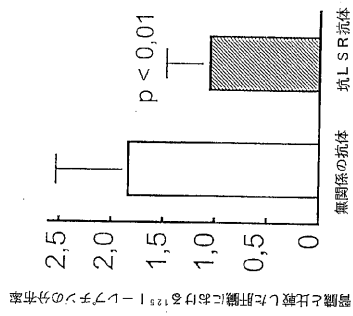
【図 19】



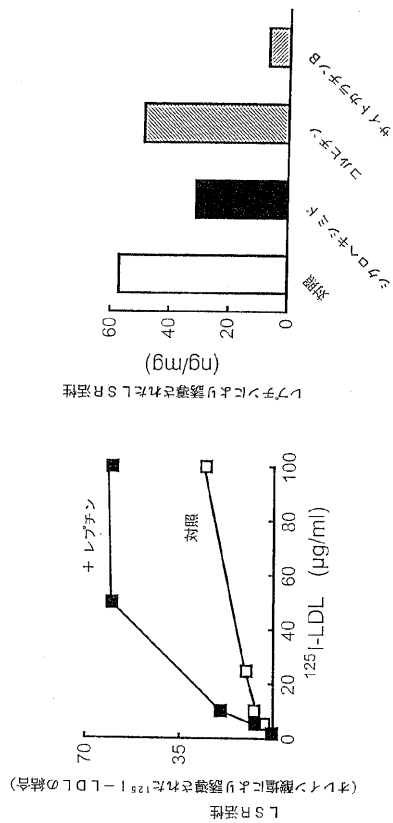
【図 2 1】



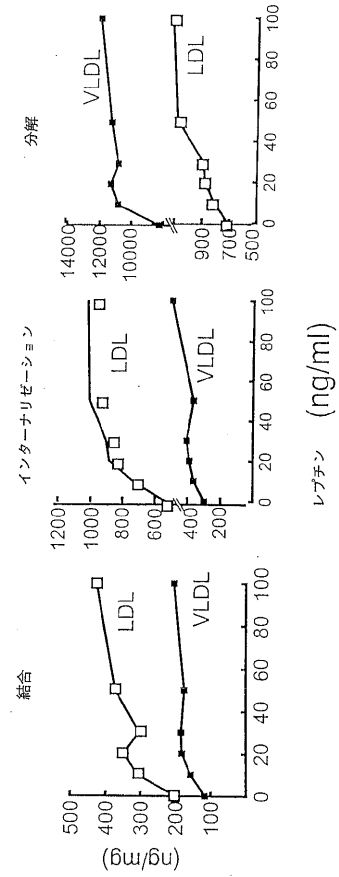
【図 2 2】



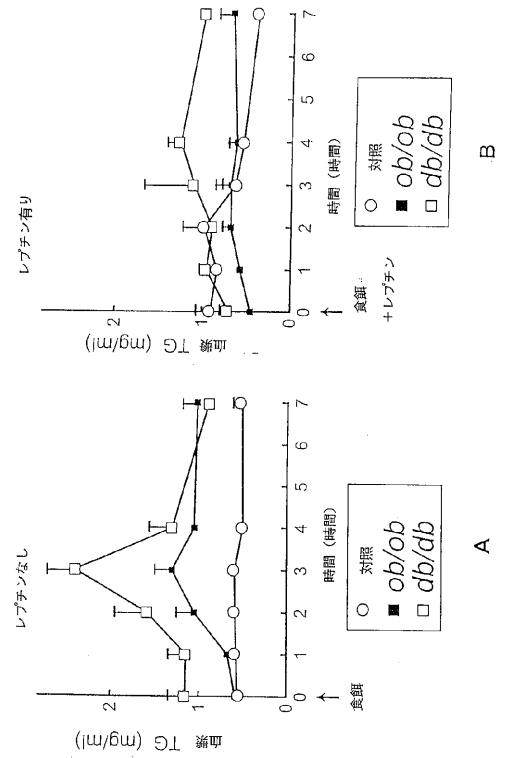
【図 2 4】



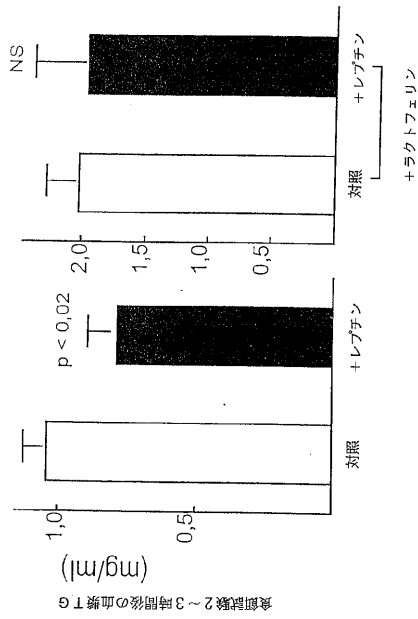
【図 2 3】



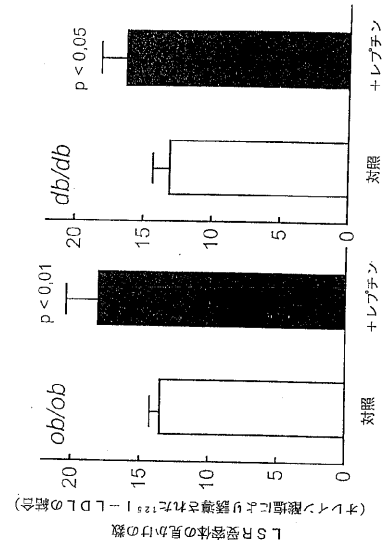
【図 2 5】



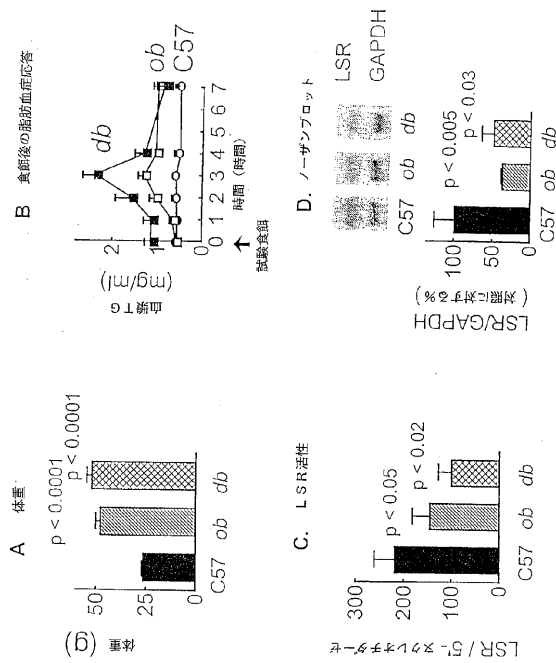
【図 26】



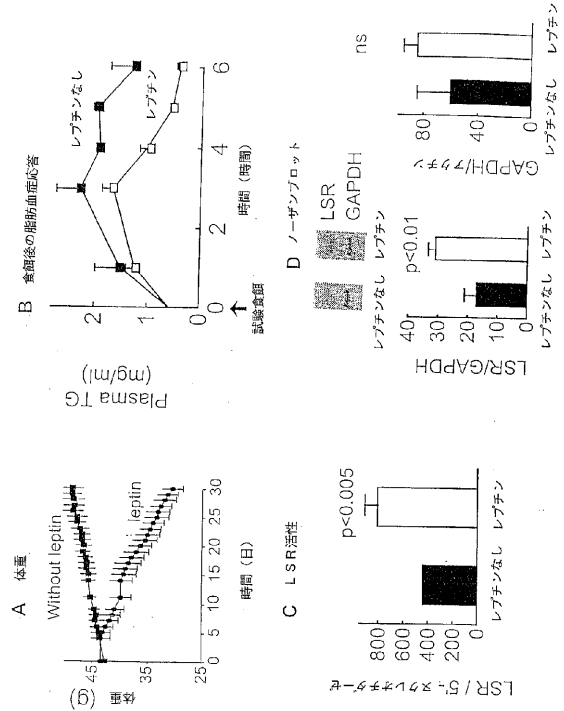
【図 27】



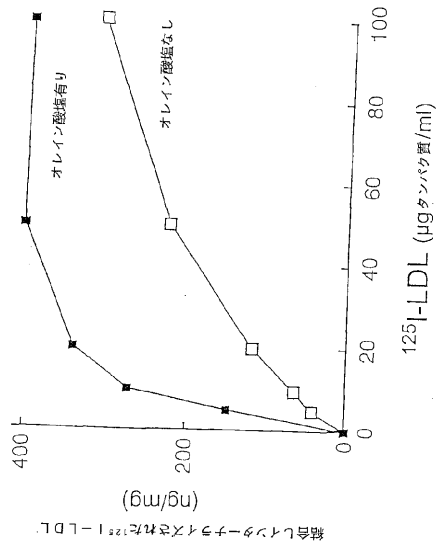
【図 28】



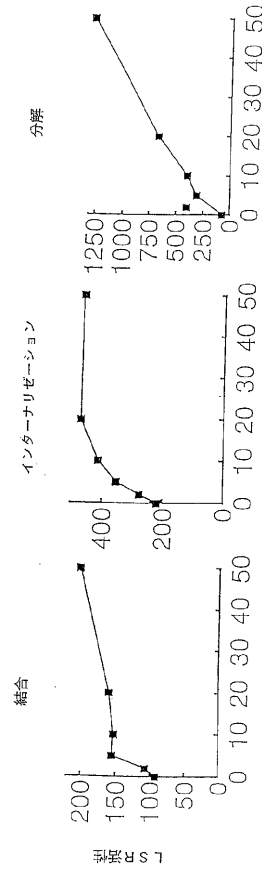
【図 29】



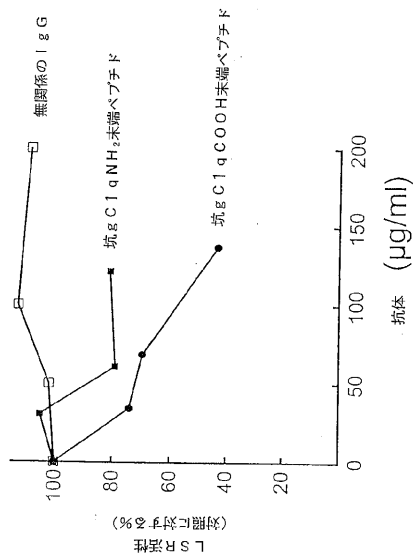
【図 30】



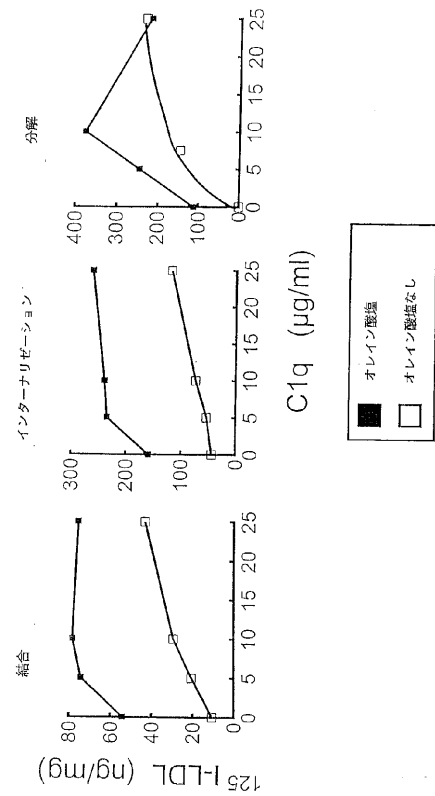
【図 31】



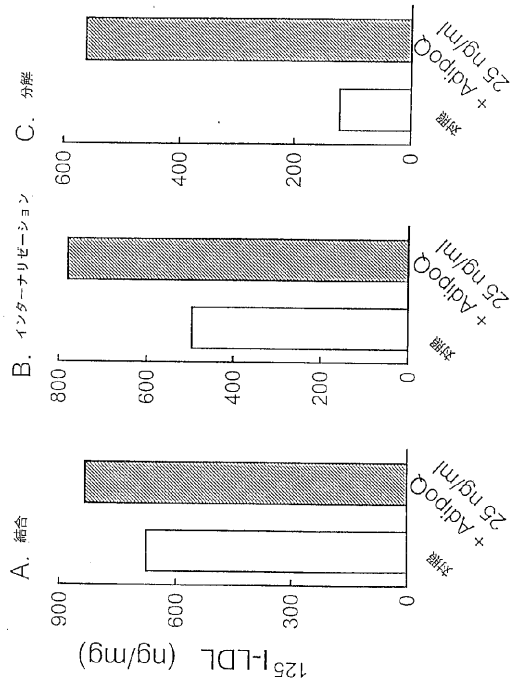
【図 32】



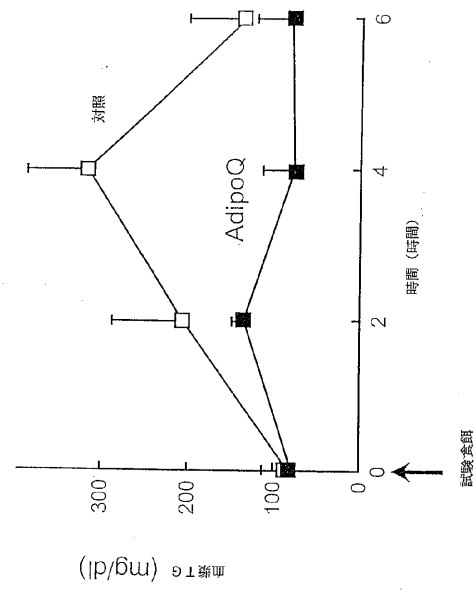
【図 33】



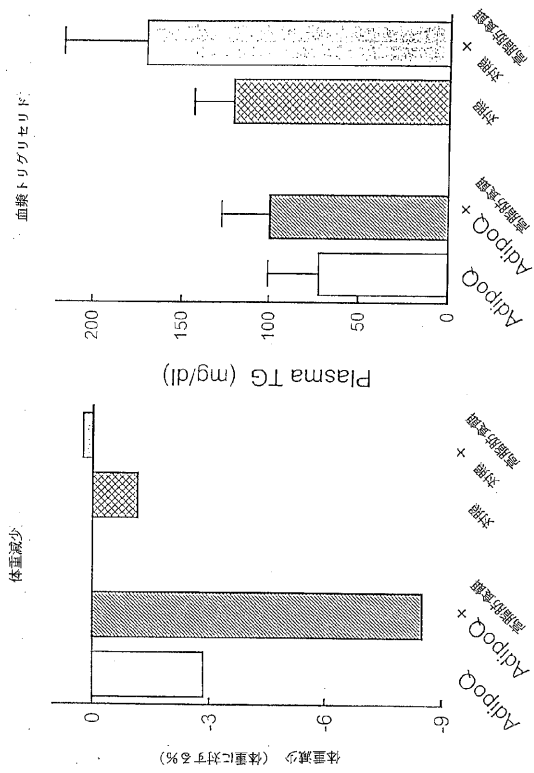
【図 3 4】



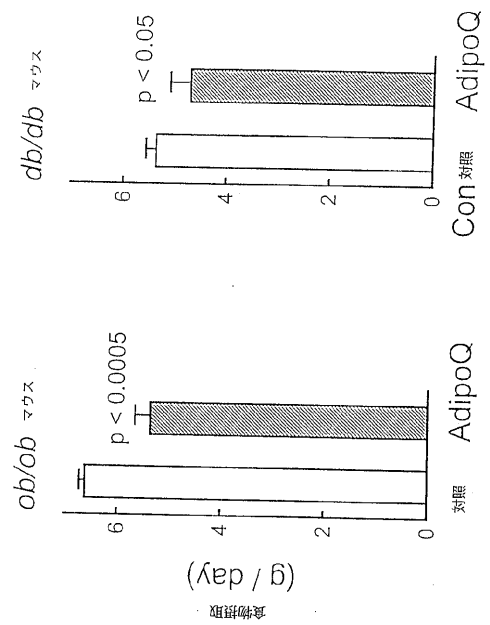
【図 3 5】



【図 3 6】



【図 3 7】



【配列表】

2005143508000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/19	4 H 0 4 5
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10	C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 Q 1/02	C 1 2 Q 1/68	A
C 1 2 Q 1/68	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/53	C 1 2 N 5/00	A
// A 6 1 K 38/00	C 1 2 N 5/00	B
A 6 1 K 45/00	A 6 1 K 37/02	
A 6 1 P 3/04	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 P 3/06	A 6 1 P 3/04	
A 6 1 P 3/10	A 6 1 P 3/06	
A 6 1 P 9/04	A 6 1 P 3/10	
A 6 1 P 9/10	A 6 1 P 9/04	
A 6 1 P 9/12	A 6 1 P 9/10	
A 6 1 P 19/06	A 6 1 P 9/12	
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 19/06	
	A 6 1 P 35/00	

(74)代理人 100091096

弁理士 平木 祐輔

(74)代理人 100096183

弁理士 石井 貞次

(72)発明者 ベルナール、ビアン

フランス国レンヌ、パルク、サン、マルタン、4

(72)発明者 リディ、ブーグルレ

フランス国バンブ、アブニュ、ビクトール、ユーゴ、108

(72)発明者 フランス、ヤンーポタン

フランス国オルジュール、ラ、ベル、エトワール

F ターム(参考) 2G045 AA25 AA40 BB03 BB20 CB01 CB17 DA36 DA77 FB03

4B024 AA01 AA11 BA63 CA04 CA09 DA02 DA06 EA04 GA03

4B063 QA18 QQ02 QQ20 QR32 QR40 QR48 QR80 QX01

4B065 AA26X AA91X AA91Y AA93Y AB01 AB04 BA02 CA24 CA25 CA44
CA464C084 AA01 AA17 NA14 ZA362 ZA422 ZA452 ZA702 ZB262 ZC312 ZC332
ZC352

4H045 AA10 AA11 AA30 BA10 CA40 DA51 DA76 EA27 EA50 FA74

专利名称(译)	lsr受体，其活性，其克隆及其在诊断，预防和/或治疗肥胖症及相关风险或并发症中的用途		
公开(公告)号	JP2005143508A	公开(公告)日	2005-06-09
申请号	JP2004355464	申请日	2004-12-08
[标]申请(专利权)人(译)	雪兰诺遗传学研究所兴业ANONYME 法国国家健康医学研究院		
申请(专利权)人(译)	雪兰诺遗传学研究所兴业ANONYME 研究所，国家，德，拉，城主，D，德，拉，RECHERCHE，医疗（安瑟伦）		
[标]发明人	ベルナルビアン リディブーグルレ フランスヤンボタン		
发明人	ベルナル、ビアン リディ、ブーグルレ フランス、ヤン-ボタン		
IPC分类号	A01K67/027 A61K31/7088 A61K38/00 A61K39/395 A61K45/00 A61K48/00 A61P1/16 A61P3/04 A61P3/06 A61P3/10 A61P9/04 A61P9/10 A61P9/12 A61P13/12 A61P19/06 A61P35/00 C07K14/47 C07K14/705 C07K14/715 C07K16/18 C07K16/28 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12N15/12 C12P21/02 C12Q1/02 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53		
CPC分类号	A01K2217/05 A61K38/00 A61P1/16 A61P3/04 A61P3/06 A61P3/10 A61P9/04 A61P9/10 A61P9/12 A61P13/12 A61P19/06 A61P35/00 C07K14/705 C07K14/715		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A01K67/027 C07K14/705 C07K16/28 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12Q1/02 C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D C12N5/00.A C12N5/00.B A61K37/02 A61K45/00 A61P3/04 A61P3/06 A61P3/10 A61P9/04 A61P9/10 A61P9/12 A61P19/06 A61P35/00 A61K38/00 C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A C12N5/00.101 C12N5/00.102 C12N5/16		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/AA40 2G045/BB03 2G045/BB20 2G045/CB01 2G045/CB17 2G045/DA36 2G045/DA77 2G045/FB03 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA63 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/DA02 4B024/DA06 4B024/EA04 4B024/GA03 4B063/QA18 4B063/QQ02 4B063/QQ20 4B063/QR32 4B063/QR40 4B063/QR48 4B063/QR80 4B063/QX01 4B065/AA26X 4B065/AA91X 4B065/AA91Y 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AB04 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA01 4C084/AA17 4C084/NA14 4C084/ZA362 4C084/ZA422 4C084/ZA452 4C084/ZA702 4C084/ZB262 4C084/ZC312 4C084/ZC332 4C084/ZC352 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA51 4H045/DA76 4H045/EA27 4H045/EA50 4H045/FA74		
优先权	1997010088 1997-08-06 FR 1998005032 1998-04-22 FR		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供具有脂蛋白清除活性的新的复合受体多肽LSR（脂解刺激受体）。解决方案：公开了纯化的或重组的LSR受体多肽，编码它的核酸，以及检测肥胖相关病症或疾病的方法，以及通过使用这些多肽或核酸选择用于治疗或预防它们的有用化合物的方法。Ž

ドメインまたはモチーフ	配列番号2の位置		存 在		
	開始	終了	α	α'	β
可能性のある脂肪酸結合部位	23	41	X	X	X
可能性のあるクラスリン結合部位	104	107	X	X	X
輸送に関するシグナル: LI LL	183	184	X	X	X
	195	196	X		
トランスメンブランドメイン	204	213	X	X	
可能性のあるサイトカイン受容体部位	214	249	X	X	
RSRSモチーフ	470	473	X	X	X
可能性のあるリポタンパク質リガンド 結合部位	544	557	X	X	X