

(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2009-131261

(P2009-131261A)

(43) 公開日 平成21年6月18日(2009.6.18)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B 0 2 4
C 1 2 N 9/12 (2006.01)	C 1 2 N 9/12	4 B 0 5 0
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 B 0 6 3
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 B 0 6 5
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	4 C 0 8 4

審査請求 有 請求項の数 24 O L (全 49 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2008-309904 (P2008-309904)
 (22) 出願日 平成20年12月4日 (2008.12.4)
 (62) 分割の表示 特願2000-502066 (P2000-502066) の分割
 原出願日 平成10年7月7日 (1998.7.7)
 (31) 優先権主張番号 08/888,429
 (32) 優先日 平成9年7月7日 (1997.7.7)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 399093869
 ユニバーシティー オブ マサチューセツ
 ツ
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 O
 2 1 1 0 ポストン フランクリン スト
 リート 2 2 5 トゥエルフス フロアー
 (74) 代理人 100102978
 弁理士 清水 初志
 (72) 発明者 デイビス ロジャー ジェイ.
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 プ
 リンストン ヒコリー ドライブ 5 3
 (72) 発明者 ウィトマーシュ アラン
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 シ
 ユリュースバリー シュリュースバリー
 グリーン 5 0 アpartment ケイ
 最終頁に続く

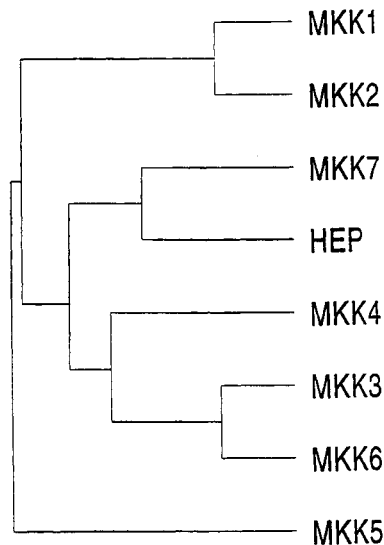
(54) 【発明の名称】 サイトカイン、ストレス、およびオンコプロテインに活性化されるヒト蛋白質キナーゼキナーゼ

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 ヒトマイトジェン活性化プロテイン(MAP)キナーゼキナーゼアイソフォーム(MKK)、およびその利用方法を提供する。

【解決手段】 活性化転写因子2(ATF2)およびc-Junを含む他の因子の活性化を誘導する、ヒトMAPキナーゼp38およびJNKを活性化する独特のシグナル伝達経路を仲介するM K K。および、MKK機能または活性を調節する試薬の同定方法、ならびにMKKを介する疾病の治療におけるそのような試薬の利用法。

【選択図】 図 2 B



【特許請求の範囲】

【請求項1】

セリン、スレオニン、およびチロシンキナーゼ活性を有し、マイトジェン活性化プロテイン (MAP)キナーゼJNKをリン酸化するがp38はリン酸化しない、実質的に純粋な哺乳類マイトジェン活性化プロテインキナーゼキナーゼ (MKK7) ポリペプチド。

【請求項2】

配列番号：18、配列番号：20、配列番号：26、配列番号：28、配列番号：30、または配列番号：32のアミノ酸配列を含む、請求項1記載のポリペプチド。

【請求項3】

請求項1記載のポリペプチドをコードする単離ポリヌクレオチド配列。

10

【請求項4】

配列番号：17、配列番号：19、配列番号：25、配列番号：27、配列番号：29、もしくは配列番号：31、もしくはその縮重変異体、または配列番号：17、配列番号：19、配列番号：25、配列番号：27、配列番号：29、もしくは配列番号：31の配列に完全に相補的なポリヌクレオチド配列、もしくはその縮重変異体の配列を含む、請求項3記載の単離ポリヌクレオチド配列。

【請求項5】

配列番号：17、配列番号：19、配列番号：25、配列番号：27、配列番号：29、配列番号：31の配列またはその相補配列に、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド配列を含む、請求項3記載の単離ポリヌクレオチド配列。

20

【請求項6】

請求項3記載のポリヌクレオチド配列を含む組換え発現ベクター。

【請求項7】

請求項3記載のポリヌクレオチド配列を含む組換え宿主細胞。

【請求項8】

請求項1記載のポリペプチドに特異的に結合する精製抗体。

【請求項9】

請求項2記載のポリペプチドに特異的に結合する精製抗体。

【請求項10】

下記の段階を含む、生体試験試料中のマイトジェン活性化プロテインキナーゼキナーゼ (MKK7) の活性を測定する方法：

30

a) 試験試料を、請求項1記載のMKKポリペプチドのMKK基質および標識されたリン酸塩と共に、該基質がリン酸化されるのに十分な条件下でインキュベートする段階；および

b) 該基質への標識リン酸塩の取り込みの割合を決定する段階であって、該取り込みの割合がMKK活性の指標である段階。

【請求項11】

MKK基質が、JNK MAPキナーゼ、活性化転写因子-2 (ATF-2)、ATFa、cAMP応答配列結合蛋白質 (CRE-BPa)、およびc-Junからなる群より選択される、請求項10記載の方法。

【請求項12】

生体試験試料が哺乳類から得られた体液、細胞、または組織である、請求項10記載の方法。

40

【請求項13】

下記の段階を含む、生体試験試料におけるMKK7の合成を測定する方法：

a) 生体試料を得る段階；

b) 請求項1記載のMKK7ポリペプチドに特異的に結合する抗体と、該生体試料とを接触させる段階；および

c) MKK7ポリペプチドに結合した該抗体を検出する段階であって、MKK7合成のレベルが、結合した抗体の量によって決定される段階。

【請求項14】

50

下記の段階を含む、試験試料におけるMKK7の発現レベルを測定する方法：

- a) 試験試料から総RNAまたはポリアデニル化RNAを単離する段階；
- b) 請求項3記載のMKK7ポリヌクレオチドに特異的なポリヌクレオチドプローブと共にRNAをインキュベートする段階；
- c) RNAにハイブリダイズした該プローブの量を決定する段階であって、MKK7の発現レベルが、RNAにハイブリダイズしたMKK7プローブの量に直接に関連している段階。

【請求項15】

下記の段階を含む、MKK7活性を調節する試薬を同定する方法：

- a) MKK7を含む試験試料を得る段階；
- b) 試薬が存在しない場合に基質がリン酸化されるのに十分な条件下で、請求項1記載のMKK7ポリペプチドのMKK7基質、一連の濃度の試薬、および標識リン酸塩と共に、該試験試料をインキュベートする段階；
- c) 該基質のリン酸化を検出する段階；および
- d) 対照と該試薬のMKK7活性に対する効果を比較する段階であって、対照と比較した何らかの変化により、試薬がMKK7基質のリン酸化を調節できることが示される段階。

【請求項16】

MKK7基質がJNK、ATF2、ATFa、CRE-BPa、およびc-Junのうちの1つまたは複数である、請求項15記載の方法。

【請求項17】

調節がMKK7活性の阻害である、請求項15記載の方法。

【請求項18】

下記の段階を含む、MKK7合成を調節する試薬を同定する方法：

- a) MKK7合成能力のある試料を提供する段階；
- b) 試薬が存在しない場合にMKK7が合成される条件下で、一連の濃度の試薬と共に該試料をインキュベーションする段階；
- c) 請求項1記載のMKK7ポリペプチドを検出する段階；および
- d) 対照と該試薬のMKK7合成に対する効果を比較する段階であって、対照と比較した何らかの変化により、試薬がMKK7を調節できることが示される段階。

【請求項19】

調節がMKK7合成の阻害である、請求項18記載の方法。

【請求項20】

下記の段階を含む、MKK7発現を調節する試薬を同定する方法：

- a) MKK7発現能力のある試料を提供する段階；
- b) 試薬の非存在下でMKK7が発現される条件下で、一連の濃度の試薬と共に該試料をインキュベーションする段階；
- c) 試料から総RNAまたはポリアデニル化RNAを単離する段階；
- d) 請求項3記載のMKK7核酸に特異的なポリヌクレオチドプローブと共にRNAをインキュベートする段階；および
- e) 対照と該試薬のMKK7 RNA合成に対する効果を比較する段階であって、対照と比較した何らかの変化により、試薬がMKK7発現を調節できることが示される段階。

【請求項21】

治療的に有効な量のMKK7活性を調節する試薬を患者に投与する段階を含む、患者におけるMKK7を介する疾患の治療方法。

【請求項22】

MKK7を介する疾患が、虚血性心疾患、腎不全、酸化性肝障害、呼吸障害症候群、熱および放射線による熱傷、敗血症性ショック、慢性関節リウマチ、自己免疫疾患、および炎症性疾患からなる群より選択される、請求項21記載の方法。

【請求項23】

治療的に有効な量のMKK7ポリペプチドを患者に投与する段階を含む、患者におけるMKK7関連疾患の治療方法。

10

20

30

40

50

【請求項24】

MKK7関連疾患が、虚血性心疾患、腎不全、酸化性肝障害、呼吸障害症候群、熱および放射線による熱傷、敗血症性ショック、慢性関節リウマチ、自己免疫疾患、または炎症性疾患である、請求項23記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は蛋白質キナーゼに関する。

【背景技術】

【0002】

マイトジェン活性化プロテイン(MAP)キナーゼは、細胞表面から核へのシグナル伝達の重要な仲介因子となっている。酵母では、SMK1、HOG1、MPK1、FUS3、およびKSS1を含む多数のMAPキナーゼが記述されている。哺乳類で同定されたMAPキナーゼは、細胞外シグナル制御MAPキナーゼ(ERK)、c-Junアミノ末端キナーゼ(JNK)、およびp38キナーゼ(Davis (1994) Trends Biochem. Sci. 19:470(非特許文献1))である。これらのMAPキナーゼアイソフォームは、スレオニンとチロシンの二重のリン酸化によって、活性化される。

【0003】

活性化転写因子2(ATF2)、ATFa、およびcAMP応答配列結合蛋白質(CRE-BPa)は、多くの遺伝子のプロモーターにある類似配列に結合する関連した転写因子である(Ziff (1990) Trends in Genet. 6:69(非特許文献2))。これらの転写因子が結合すると、転写活性が上昇する。ATF2はオンコプロテインEla(LiuおよびGreen (1994) Nature 368:520(非特許文献3))、B型肝炎ウイルスX蛋白質(Maguireら(1991) Science 252:842(非特許文献4))、およびヒトT細胞白血病ウイルス1 tax蛋白質(WagnerおよびGreen (1993) Science 262:395(非特許文献5))を含むいくつかのウイルス蛋白質に結合する。またATF2は、癌抑制遺伝子産物Rb(Kimら(1992) Nature 358:331(非特許文献6))、高移動度群蛋白質HMG(1)Y(Duら(1993) Cell 74:887(非特許文献7))、ならびに転写因子である核NF- κ B(Duら(1993) Cell 74:887(非特許文献7))およびc-Jun(BenbrookおよびJones (1990) Oncogene 5:295(非特許文献8))とも、相互作用する。

【非特許文献1】Davis (1994) Trends Biochem. Sci. 19:470

【非特許文献2】Ziff (1990) Trends in Genet. 6:69

【非特許文献3】LiuおよびGreen (1994) Nature 368:520

【非特許文献4】Maguireら(1991) Science 252:842

【非特許文献5】WagnerおよびGreen (1993) Science 262:395

【非特許文献6】Kimら(1992) Nature 358:331

【非特許文献7】Duら(1993) Cell 74:887

【非特許文献8】BenbrookおよびJones (1990) Oncogene 5:295

【発明の開示】

【0004】

本発明は、新しいグループのヒトマイトジェン活性化プロテインキナーゼキナーゼ(MKK)の同定と単離に基づく。本明細書に記述されるMKKアイソフォームMKK3、MKK6、MKK4(MKK4⁻、⁻、および⁻を含む)、MKK7(マウスMKK7、ヒトMKK7、MKK7b、MKK7c、MKK7d、およびMKK7eを含む)は、セリン、スレオニン、およびチロシンキナーゼ活性を持つ。MKK3、MKK4、およびMKK6は、ヒトMAPキナーゼp38のThr¹⁸⁰およびTyr¹⁸²を特異的にリン酸化する。MKK4アイソフォームは、ヒトMAPキナーゼJNK(JNK1、JNK2、およびJNK5を含む)のThr¹⁸³およびTyr¹⁸⁵もリン酸化する。MKK7アイソフォームは、JNKのThr¹⁸³およびTyr¹⁸⁵をリン酸化する。

【0005】

したがって、本発明はヒトp38MAPキナーゼを特異的にリン酸化するセリン、スレオニン、およびチロシンキナーゼ活性を持つ実質的に純粋なヒトMKKポリペプチドを特徴とする。MKK3は、配列番号：2のアミノ酸配列を持つ。さらに本発明は、配列番号：4のアミノ酸

10

20

30

40

50

配列を持ち、ヒトp38 MAPキナーゼを特異的にリン酸化するセリン、スレオニン、およびチロシンキナーゼ活性を持つMKK6も含む。

【0006】

さらに本発明は、ヒトp38 MAPキナーゼおよびJNKを特異的にリン酸化するセリン、スレオニン、およびチロシンキナーゼ活性を持つ実質的に純粋なヒトMKKポリペプチドを特徴とする。MKK4アイソフォームのMKK4- は、配列番号：6のアミノ酸配列を持つ。MKK4アイソフォームのMKK4- は、配列番号：8のアミノ酸配列を持つ。MKK4アイソフォームのMKK4- は、配列番号：10のアミノ酸配列を持つ。

【0007】

また、本発明はマイトジェン活性化プロテインキナーゼJNKを特異的にリン酸化するセリン、スレオニン、およびチロシンキナーゼ活性を持つ実質的に純粋なMKKポリペプチド(MKK7)をも特徴とする。MKKアイソフォームMKK7(マウス)およびMKK7(ヒト)は、それぞれ、配列番号：18および26のアミノ酸配列を持つ。MKK7アイソフォームのMKK7b、MKK7c、MKK7d、およびMKK7eは、それぞれ、配列番号：20、配列番号：28、配列番号：30および配列番号：32のアミノ酸配列を持つ。

10

【0008】

本明細書で使用される「マイトジェン活性化プロテインキナーゼキナーゼ」または「MKK」という用語は、ヒトマイトジェン活性化プロテインキナーゼのリン酸化および活性化という、特徴的な活性を持つ蛋白質キナーゼを意味する。MKKの例には、p38 MAPキナーゼのThr¹⁸⁰およびTyr¹⁸²を特異的にリン酸化し活性化するMKK3およびMKK6、p38 MAPキナーゼのThr¹⁸⁰およびTyr¹⁸²ならびにJNKのThr¹⁸³およびTyr¹⁸⁵を特異的にリン酸化し活性化するMKK4アイソフォーム、JNKのThr¹⁸³およびTyr¹⁸⁵を特異的にリン酸化するMKK7アイソフォームが含まれる。

20

【0009】

「MKK7」は、セリン、スレオニン、およびチロシンキナーゼ活性を持ち、マイトジェン活性化プロテイン(MAP)キナーゼJNKをリン酸化するがp38をリン酸化しない、マイトジェン活性化プロテインキナーゼキナーゼ(MKK)ポリペプチドの哺乳類アイソフォームである。

【0010】

本発明は、開示される特定のp38およびJNK MKK、ならびに本発明のMKKのポリヌクレオチドおよびアミノ酸配列から調製されるプローブまたは抗体を使用して同定および単離される近縁のMKKも含む。これは、例えば、ゲノム、cDNA、またはコンビナトリアルケミストリーのライブラリーを、開示されるMKKの核酸配列の全体または一部を持つプローブによってスクリーニングするなどの、標準的な技術を用いて実行できる。さらに本発明は、本明細書に記述されるMKKのアミノ酸配列の全体または一部を持つ合成ポリヌクレオチドも含む。

30

【0011】

「ポリペプチド」という用語は、長さまたは翻訳後修飾(例、グリコシル化またはリン酸化)に関わらず、任意のアミノ酸鎖を意味し、天然蛋白質ならびに合成または組換えのポリペプチドおよびペプチドを含む。

40

【0012】

ポリペプチドに関して用いる場合の「実質的に純粋」という用語は、天然に会合している蛋白質や天然に存在する有機分子を含まない、重量で少なくとも60%のポリペプチドを意味する。実質的に純粋なMKKポリペプチド(例、ヒト)は、重量で少なくとも75%、より好ましくは少なくとも90%、および最も好ましくは少なくとも99%、MKKポリペプチドである。実質的に純粋なMKKは、例えば、天然源からの抽出、MKKポリペプチドをコードする組換え核酸の発現、または蛋白質の化学合成によって得られる。純度は、例えば、カラムクロマトグラフィー、ポリアクリルアミドゲル電気泳動、またはHPLC分析のような、任意の適切な方法で測定できる。

【0013】

50

1つの局面において、本発明は、本発明のMKKをコードする単離ポリヌクレオチドを特徴とする。1つの態様では、ポリヌクレオチドは配列番号：1のヌクレオチド配列である。別の態様では、ポリヌクレオチドは、それぞれ配列番号：3、配列番号：5、配列番号：7、配列番号：9、配列番号：17、配列番号：19、配列番号：25、配列番号：27、配列番号：29、または配列番号：31のヌクレオチド配列である。

【0014】

本明細書で使用される「ポリヌクレオチド」とは、分離した断片、または、より大きな構築物の成分の形の、デオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチドの核酸配列を指す。本発明のポリペプチドの一部または全体をコードするDNAは、組換え転写ユニット中で発現できる合成遺伝子を提供するcDNA断片またはオリゴヌクレオチドから、組み立てることができる。本発明のポリヌクレオチド配列には、DNA、RNA、およびcDNA配列が含まれ、天然由来または当技術分野で公知の方法によって合成された合成配列であり得る。

10

【0015】

「単離された」ポリヌクレオチドとは、生物体の天然に存在するゲノムにおける配列から、何らかのやり方で分離された核酸分子である。したがって、「単離ポリヌクレオチド」という用語には、天然に存在しない任意の核酸分子が含まれる。したがって、この用語には、例えば、ベクター、自律的に複製するプラスミドもしくはウイルス、もしくは原核生物もしくは真核生物のゲノムDNAに組み込まれた組換えポリヌクレオチド、または他の配列とは独立した別個の分子として存在する組換えポリヌクレオチドが含まれる。また、別のポリペプチド配列をコードするハイブリッド遺伝子の一部である組換えDNAも含まれる。

20

【0016】

本発明の単離ポリヌクレオチド配列には、本明細書で説明するポリヌクレオチド配列に、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド配列も含まれる。「ストリンジェントな条件」という用語は、本明細書に記述するような、ハイブリダイズするポリヌクレオチド配列間の特異性を保証するようなハイブリダイゼーション条件または、それよりも厳密な条件を意味する。当業者は、非特異的なハイブリダイゼーションの数を低下させ、相補性の高い配列のみが同定されるような、温度や塩濃度を含めたハイブリダイゼーション後の洗浄条件を選択することができる（Sambrookら(1989)「分子クローニング (Molecular Cloning)」第2版；Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY）。

30

【0017】

本発明の単離ポリヌクレオチド配列には、MKKをコードするポリヌクレオチドに相補的な配列（アンチセンス配列）も含まれる。アンチセンス核酸は、特定のmRNA分子の少なくとも一部に相補的なDNAまたはRNA分子である（Weintraub (1990) Scientific American 262:40）。本発明には、MKKポリペプチドの生産を阻害するすべてのアンチセンスポリヌクレオチドが含まれる。細胞中では、アンチセンス核酸は、対応するmRNAにハイブリダイズし、二重鎖分子を形成する。約15ヌクレオチドのアンチセンスオリゴマーは、簡単に合成され、標的MKK産生細胞に導入できるので、好ましい。アンチセンス法を用いて遺伝子の翻訳を阻害する方法は、当技術分野で公知であり、例えばMarcus-Sakura Anal. Biochem., 172:289 (1988)に記述されている。

40

【0018】

また、MKKのリボザイムヌクレオチド配列も、本発明に含まれる。リボザイムは、DNA制限エンドヌクレアーゼと同様な方法で、他の一本鎖RNAを特異的に切断する能力を持つRNA分子である。これらのRNAをコードするヌクレオチド配列を修飾することによって、RNA分子中の特異的なヌクレオチド配列を認識し、切断するように分子を操作できる（Cech (1988) J. Amer. Med. Assn. 260:3030）。この方法の大きな利点は、配列特異的であるため、特定の配列のmRNAのみが不活化されるということである。

【0019】

リボザイムには、テトラヒメナ型（Hasselhoff (1988) Nature 334:585）および「ハン

50

マーヘッド」型の、2つの基本的なタイプがある。テトラヒメナ型リボザイムは、長さが4塩基の配列を認識するが、「ハンマーヘッド」型リボザイムは、長さが11~18塩基の塩基配列を認識する。配列が長ければ長いほど、その配列が標的mRNA種のみに見られる可能性が高くなる。したがって、特定のmRNA種を不活化するためには、テトラヒメナ型リボザイムよりもハンマーヘッド型リボザイムの方が好ましく、短い認識配列よりも、18塩基の認識配列のほうが好ましい。

【0020】

MKKポリペプチドは、MKKポリペプチドのエピトープと免疫反応するか、結合する抗体を生産するためにも、使用できる。したがって、本発明の1つの局面は、本発明のMKKポリペプチドに対する抗体を特徴とする。本発明の抗体には、異なるエピトープ特異性を持つモノクローナル抗体のプールを含むポリクローナル抗体、および別個のモノクローナル抗体調製物が含まれる。モノクローナル抗体は、当技術分野で公知の方法によって、MKKポリペプチドの抗原含有断片から生産される（例えば、Kohlerら(1975) Nature 256:495参照）。

10

【0021】

本明細書で使用される「抗体」という用語は、エピトープ決定基に結合する能力のある、完全な分子、ならびにFa、F(ab')₂、およびFvなどの、その断片を含む。MKKポリペプチドに特異的に結合する抗体は、完全なポリペプチドまたは目的の小さなペプチドを含む断片を、免疫抗原として使用して調製できる。動物の免疫に使用するポリペプチドまたはペプチドは、翻訳されたcDNA由来でも化学合成されたものでもよく、必要に応じてキャリア蛋白質に結合できる。ペプチドに化学的に結合されて一般的に使用されるキャリアには、ウシ血清アルブミンおよびチログロブリンが含まれる。その後、結合されたペプチドを用いて動物（例、マウス、ラットまたはウサギ）を免疫する。

20

【0022】

「特異的に結合する」分子（例、抗体）とは、例えばMKK7を含む生体試料などの試料中で、例えばMKK7のような特定のポリペプチドに結合するが、他の分子は実質的に認識しないか、または結合しない分子である。検出可能マーカーを含む化合物に結合した抗体（またはその断片）から成る構築物という表現には、化学的方法および組換え技術を含む、任意の技術により作製された構築物が含まれる。

30

【0023】

本発明は、MKKシグナル伝達経路の活性化を測定することによって、MKKを介する疾病のリスクを持つ患者を同定する方法も特徴とする。MKKシグナル伝達経路の活性化は、MKK合成；MKKアイソフォームの活性化；MKK基質p38またはJNKのアイソフォームの活性化；またはATF2、ATFa、CRE-BPaおよびc-Junのようなp38およびJNKの基質の活性化を、測定することにより決定できる。「JNK」または「JNKアイソフォーム」という用語には、JNK1、JNK2、およびJNK3が含まれる。本明細書で使用される「MKK基質」という用語には、MKKの基質およびMKKの基質の基質、例、p38、JNK、ATF2、およびc-Junも含まれる。

【0024】

1つの態様において、MKKシグナル伝達経路の活性化は、適当なMKKシグナル伝達経路基質（例、p38、JNKアイソフォーム、ATF2、ATFa、CRE-BPa、またはc-Junから選択される）の活性化を測定することによって決定される。MKK活性は、標識されたリン（例えば³²Pまたは³³P）の取り込みの割合を定量することによって決定される基質のリン酸化の割合によって測定される。これは、抗体のような、リン酸化に特異的な試薬を用いても測定できる。MKKの基質リン酸化の特異性は、p38の活性化、JNKの活性化、もしくはその両方を測定することによって、またはMKKリン酸化部位を持たない変異p38もしくはJNK分子を利用して調べられる。対照値と比較して基質のリン酸化が変化していることは、MKKシグナル伝達経路が変化したことを示し、患者のMKKを介する疾病のリスクが高まっていることを示す。MKKによるp38およびJNKの活性化は、MKKシグナル伝達の基質ATF2、またはATFaやCRE-BPaのような関連化合物と組み合わせたアッセイ法で検出できる。基質c-Junを用いても、活性化は検出できる。ATF2を解析に使用する際には、これは完全な蛋白質または完

40

50

全な蛋白質の断片、例えば活性化ドメイン（残基1～109、またはその一部）として存在する。ATF2は、MKK活性を測定する試験試料および[^{-32}P]ATPと共に、ATF2がリン酸化されるのに十分な条件下でインキュベーションする。その後、ATF2を単離して、リン酸化の量を定量する。1つの特定の態様において、ATF2は免疫沈降によって単離され、SDS-PAGEによって解析され、オートラジオグラフィによって検出される。

【0025】

別の態様において、MKKシグナル伝達経路の活性化は、試験試料中のMKK発現のレベルを測定することにより決定される。1つの特定の態様では、MKK発現のレベルは、ウエスタンブロット分析で測定される。試料中に存在する蛋白質は、ゲル電気泳動によって分別し、メンブレンに移し、MKKに対する標識抗体でプローブする。別の特定の態様では、MKK発現のレベルは、ノーザンブロット分析で測定する。細胞の総mRNAまたはリン酸化[ポリ(A)+] mRNAを試験試料から単離する。RNAは電気泳動によって分別し、メンブレンに移す。メンブレンは標識MKK cDNAでプローブする。別の態様において、MKK発現は、発現したmRNAに対する定量的PCRによって測定される。

10

【0026】

本発明のMKKは、MKK活性を調節する試薬のスクリーニングに役立つ。MKKはリン酸化によって活性化される。したがって、1つの局面において、本発明は、試験試薬とMKKをインキュベートして、MKKの合成、リン酸化、機能、または活性に対する試験試薬の効果を測定することによって、MKK活性を調節する試薬を同定する方法を特徴とする。1つの態様において、試験試薬はMKKおよび[^{32}P]P-ATPと共にインキュベートされ、上述のようにMKKリン酸化の速度が決定される。別の態様では、MKKポリヌクレオチド発現ベクターによりトランスフェクトされた細胞と共に試験試薬をインキュベートし、上述のように、ノーザンブロット分析によってMKK転写に対する試験試薬の効果を測定する。別の態様では、MKK合成に対する試験試薬の効果は、MKKに対する抗体を用いてウエスタンブロット分析によって測定される。さらに別の態様では、MKK活性に対する試薬の効果は、試験試薬、[^{32}P]P-ATP、ならびにp38、JNK、およびATF2のうちの1つまたは複数を含むMKKシグナル伝達経路の基質と共に、MKKをインキュベートすることにより測定される。基質のリン酸化の割合は、上述のように決定される。

20

【0027】

「MKK活性の調節」という用語には、阻害または刺激効果が含まれる。

30

【0028】

本発明は、MKK活性を阻害する試薬のスクリーニングに特に有用である。そのような試薬は、例えば、炎症および酸化による損傷のような、MKKを介する疾病の治療または予防に役立つ。

【0029】

本発明はさらに、MKK活性を阻害する治療試薬の有効量を、必要としている患者に投与することにより、MKKを介する疾病を治療する方法を特徴とする。

【0030】

「MKKを介する疾病」とは、少なくとも一部は、MKKシグナル伝達経路の過剰な活性化の結果として起こる病的状態である。MKKシグナル伝達経路は、炎症およびストレスを含む、いくつかの要因により活性化される。MKKを介する疾病には、例えば、虚血性心疾患、熱または放射線（UV、X-線、等）による熱傷、腎不全、酸化ストレスまたはアルコールによる肝臓障害、呼吸障害症候群、敗血症性ショック、慢性関節リウマチ、自己免疫疾患、およびその他の種類の炎症性疾患が含まれる。

40

【0031】

「治療試薬」とは、必要とする患者に投与された場合に、MKKを介する疾病に望ましい効果を与える任意の化合物または分子である。

【0032】

MKKを介する疾病には、増殖性疾患、特にストレスに関連した疾患がさらに含まれる。ストレスに関連したMKKを介する増殖性疾患の例には、乾癬、後天性免疫不全症候群、皮

50

膚、骨髄、肺、肝臓、乳房、胃腸系、および尿生殖路の悪性腫瘍を含む、体の種々の組織の悪性腫瘍がある。好ましくは、治療試薬はMKKの活性または発現を阻害して、細胞の増殖を阻害するかアポトーシスを誘導する。

【0033】

「MKK活性を阻害する」治療試薬は、MKKを介するシグナル伝達経路に干渉する。例えば、治療試薬はMKKのプロテインキナーゼ活性を変化させたり、例えばMKK mRNAに結合できるアンチセンスポリヌクレオチドのように、MKKの転写または翻訳レベルを低下させたり、またはp38、JNK、もしくはATF2のMKKによるリン酸化を抑制することができ、その結果MKKを介するシグナル伝達経路を混乱させる。そのような試薬の例には、MKKポリペプチドに特異的に結合する抗体、およびMKKポリペプチド活性を競合阻害するMKKポリペプチド断片が含まれる。

10

【0034】

「MKK活性を増大させる」治療試薬は、MKKを介するシグナル伝達経路を補う。そのような試薬の例には、MKKポリペプチド自身が含まれ、これはMKKポリペプチドの発現不足、または変異MKKポリペプチドの発現に起因するMKKを介する疾病の場合に投与できる。さらに、MKKポリペプチドをコードするDNAの一部を、MKKポリペプチドの発現が不足している細胞に導入することもできる。

【0035】

「治療的有効量」とは、MKKを介する疾病に伴う症状を低下または予防するために十分な試薬の量である。

20

【0036】

本発明の方法によって同定されるMKKを介する疾病の治療のための治療試薬は、注射、注入、徐放性の注射または移植による非経口的方法を含む、当技術分野で公知のいくつかの方法で、患者の静脈内、腹腔内、筋肉内、皮下、または経皮的に投与される。表皮の疾患および上皮組織の疾患は、試薬の局所適用により治療される。試薬は、安定性と送達の効率を改善するために他の化合物と混合される（例、リボソーム、保存剤、またはジメチルスルホキシド(DMSO)）。アンチセンス配列を含むポリヌクレオチド配列を、当技術分野で公知の技術を用いて治療用に投与し、MKKを介する疾病を患う患者の細胞中に導入することができる。これらの方法には、ウイルスベクター（例、レトロウイルス、アデノウイルス、ワクシニアウイルス、またはヘルペスウイルス）、コロイド分散、およびリボソームの使用が含まれる。

30

【0037】

本発明の材料は、MKKのレベルまたは活性の検出のためのキットの調製に、理想的に適している。したがって、本発明は、MKKに結合する抗体またはMKKポリヌクレオチドにハイブリダイズする核酸プローブ、および適当な緩衝液を含むキットを特徴とする。プローブまたはモノクローナル抗体は、MKKポリヌクレオチドまたは蛋白質への結合を検出するために標識することができる。1つの好ましい態様において、キットはMKKに対する標識抗体を特徴とする。

【0038】

特に定義しないかぎり、本明細書で使用される全ての技術および科学的用語は、本発明が属する技術分野の当業者が一般に理解するものと同一の意味を持つ。本発明の実施または試験には、本明細書に説明する方法および材料と類似または同等なものを使用することもできるが、適当な方法および材料を以下に記述する。本明細書に記載される出版物、特許出願、特許、および他の参考文献は全て、その全体が参照として組み入れられる。さらに、材料、方法、および実施例は説明のみのためであり、制限する意図はない。

40

【0039】

本発明の他の特徴および利点は、以下の詳細な説明および請求の範囲から明らかになると思われる。

【0040】

ヒトマイトジェン活性化プロテインキナーゼキナーゼ

50

本明細書に記述されるヒトMAPキナーゼキナーゼMKK3およびMKK4 (MKK3/4)、およびMKK7は、細胞表面から核までの特定の経路に沿った特異的なシグナルの伝達を仲介する。これらのシグナル伝達経路は、サイトカイン、UV照射、浸透圧ショック、および酸化ストレスのような要素によって開始する。MKK3/4、MKK6、およびMKK7が活性化されると、MAPキナーゼの活性化が起きる。p38はMKK3およびMKK4により活性化される。JNKはMKK4およびMKK7により活性化される。次に、p38およびJNKは、ATF2、ATFa、およびCRE-BPaのような関連する転写因子のグループを活性化する。次にこれらの転写因子は、特定の遺伝子の発現を活性化する。例えば、ATF2はヒトT細胞白血病ウイルス1 (WagnerおよびGreen (1993) *Science* 262:395)、トランスフォーミング増殖因子b2 (Kimら(1992)前記)、インターフェロン (Duら(1993) *Cell* 74:887)、およびE-セレクトリン (DeLucaら(1994) *J. Biol. Chem.* 269:19193)の発現を活性化することが知られている。また、ATF2は、T細胞特異的エンハンサーの機能にも関係する (Georgopoulosら(1992) *Mol. Cell. Biol.* 12:747)。

10

【0041】

MAPキナーゼのJNKグループは、細胞が環境ストレスにさらされたり、炎症促進型サイトカインで細胞を処理すると活性化される (Guptaら(1994) *EMBO J.* 15:2760-2770; Derijardら(1991) *Cell* 76:1025-1037; Kyriakisら(1994) *Nature* 369:156-160; Slussら(1994) *Mol. Cell. Biol.* 14:8376-8384; Kallunkiら(1994) *Genes & Dev.* 8:2996-3007)。JNKシグナル伝達経路の標的には、転写因子ATF2およびc-jun (Whitmarsh & Davis (1996) *J. Mol. Med.* 74:589-607)が含まれる。これらの転写因子は、多くの遺伝子のプロモーター中のAP-1およびAP-1様部位に、ホモまたはヘテロダイマー複合体として結合するbZIPグループのメンバーである (Curran & Franza (1988) *Cell* 55:395-397)。JNKはATF2およびc-JunのNH₂末端領域に結合し、各々の転写因子の活性化ドメイン内の2つの部位をリン酸化する (Derijardら(1994) *Cell* 76:1025-1037; van Damら(1995) *EMBO J.* 14:1798-1811; Livingstoneら(1995) *EMBO J.* 14:1785-1797)。このリン酸化によって、転写活性が上昇する (Whitmarsh、前記)。これらの生化学研究を合わせると、JNKシグナル伝達経路が、サイトカインおよび環境ストレスに応答したAP-1転写活性の調節に寄与していることが示される (Whitmarsh、前記)。JNKシグナル伝達経路がAP1転写活性の正常な調節に必要であることを示す遺伝的証拠が、この仮説を強く支持している (Yangら(1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94:3004-3009)。

20

【0042】

JNKは、Thr-183およびTyr-185の二重のリン酸化によって活性化される (Derijard、前記)。MKK4 (SEK1としても知られる)は、JNKシグナル伝達経路の成分として同定された最初のMAPキナーゼキナーゼであった (Derijardら(1995) *Science* 267:682-685; Linら(1995) *Science* 268:286-290; Sanchezら(1994) *Nature* 372:794-798)。MKK4がJNKをリン酸化し活性化することが生化学研究によって示されている (Derijardら(1995) *Science* 267:682-685; Linら(1995) *Science* 268:286-290; Sanchezら(1994) *Nature* 372:794-798)。しかし、MKK4はp38 MAPキナーゼもリン酸化し活性化するので、MKK4の機能は、JNKシグナル伝達経路に限定されていない可能性がある (Derijardら(1995) *Science* 267:682-685; Linら(1995) *Science* 268:286-290)。MKK4がJNKおよびp38 MAPキナーゼの両方を活性化するというこの特異性により、サイトカインや環境ストレスによって処理された細胞における、これらのMAPキナーゼの同格の活性化を担うと考えられる機構が提供される (Davis (1994) *Trends Biochem. Sci.* 19:470-473)。しかし、この同格の活性化は、常に観察されるとは限らない。例えば、肝臓におけるJNKの活性化は、p38 MAPキナーゼ活性の低下と相関している (Mendelsonら(1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:12908-12913)。これらのデータは、MKK4の性質は、インピボにおけるJNKの調節を説明するには不十分であることを示唆している。

30

40

【0043】

ヒトMKKの単離は、実施例1、実施例22、Derijardら ((1995) *Science* 267:682-685、参照として本明細書に組み入れられる)、およびRaingaudら ((1995) *Mol. Cell. Biol.* 16:1247-1255)に記述されている。酵母PBS2配列の特徴的な領域を用いて、ポリメラーゼ

50

連鎖反応 (PCR) プライマーがデザインされた。これらのプライマーを用いてヒト脳mRNAを増幅すると、特異的な産物が形成されたので、これらをプラスミドベクターにクローニングし、配列の決定を行った。ヒトプロテインキナーゼをコードする2つの異なる相補的DNA (cDNA) が同定された：1つは36 kD蛋白質 (MKK3) をコードし、1つは44 kD蛋白質 (MKK4) をコードしていた。MKK4には、
、
、および
と同定された、NH₂末端が僅かに異なる3つのアイソフォームが含まれている。MKK3 (配列番号：2)、MKK4- (配列番号：6)、MKK4- (配列番号：8)、およびMKK4- (配列番号：10) のアミノ酸配列は、図1に示されている。MKK3 (図4)、MKK6 (図5)、MKK4- (図6)、MKK4- (図7)、およびMKK4- (図8) の核酸およびアミノ酸配列も示されている。MKK6は、MKK3とのクロスハイブリダイゼーションによって、ヒトの骨格筋ライブラリーから単離された。N末端の違いを除いて、MKK6はMKK3と相同性が高い。存在するヒトMKK3およびMKK4の他のアイソフォームは、実施例1に説明する方法によって同定できる。

10

【0044】

これらのヒトMKKアイソフォームの発現を、8人の成人組織から単離されたmRNAのノーザン (RNA) プロット分析によって調べた (実施例2)。両方のプロテインキナーゼとも、ヒトの組織で広範囲に発現されており、骨格筋組織で最も発現が多いことが分かった。

【0045】

MKK3の基質特異性は、エピトグタグを付けた組換えMAPキナーゼ (JNK1、p38およびERK2) を基質として用いたインビトロのリン酸化解析で調べた (実施例3)。MKK3はp38をリン酸化した。JNK1またはERK2はリン酸化しなかった。p38のリン酸化アミノ酸分析によって、ホスホスレオニンおよびホスホチロシンの存在が示された。p38の変異分析によって、Thr¹⁸⁰およびTyr¹⁸²のリン酸化部位を、それぞれAlaおよびPheによって置換すると、p38のリン酸化が阻止されることが示された。これらの結果は、MKK3がインビトロでp38 MAPキナーゼキナーゼとして働くことを立証するものである。

20

【0046】

MKK4の基質特異性のインビトロ実験は、実施例4に記載されている。[⁻³²P]ATP、およびJNK1、p38、またはERK2と共にインキュベーションされたMKK4は、p38およびJNK1の両方をリン酸化することが分かった。MKK4によるJNKおよびp38の活性化もまた、MKK4を野生型または変異型JNK1またはp38とインキュベーションすることにより調べられた。p38の基質ATF2は、各解析に含まれていた。MKK4は、MKK3よりも自己リン酸化が少ないことが分かった。MKK4は、活性化されたMAPキナーゼの基質でもあることが分かった。MKK3とは異なり、MKK4はJNK1も活性化することが分かった。野生型JNK1とインキュベートされたMKK4は、ATF2のリン酸化を上昇させたが、変異型JNK1とインキュベーションした場合には上昇させなかった。これらの結果は、MKK4が、MAPキナーゼのJNKサブグループもリン酸化するp38 MAPキナーゼキナーゼであることを立証する。

30

【0047】

UV刺激を受けたMKK3によるインビボのp38の活性化は、実施例5に記載されている。MKK3を発現する細胞を、UV照射の存在下または非存在下で露出した。免疫沈降によってMKK3を単離し、基質のp38またはJNKを用いてプロテインキナーゼアッセイ法を行なった。一部のアッセイ法では、p38およびJNKの基質として、ATF2が含まれていた。非活性化培養COS細胞由来のMKK3は、MKK3の基礎活性による、p38 MAPキナーゼのリン酸化を低レベルで誘導した。UV照射した細胞のMKK3は、p38 MAPキナーゼのリン酸化を増加させたがJNK1のリン酸化は増加させなかった。p38活性の上昇は、基質としてATF2を含めたアッセイ法でも検出された。これらの結果は、MKK3がUV照射によって活性化されることを立証する。

40

【0048】

MKK3およびMKK4の発現のp38活性に対する効果は、COS-1細胞で調べられた (実施例6)。p38およびMEK1、MKK3、またはMKK4をコードするベクターで細胞をトランスフェクトした。細胞の一部は、EGFまたはUV照射の処理をした。免疫沈降によってp38を単離し、[⁻³²P]ATPおよびATF2によって活性を解析した。ERK活性化因子MEK1の発現は、p38によるATF2のリン酸化を変化させなかった。これとは対照的に、MKK3またはMKK4の発現は、p38 MAP

50

キナーゼの活性を上昇させた。MKK3およびMKK4によるp38の活性化は、UV照射細胞で観察されたものと類似しており、EGF処理細胞で検出されるものよりもはるかに強かった。このようなインビボの結果は、MKK3とMKK4がインビボでp38を活性化させるという証拠となる。

【0049】

JNK1によるATF2の調節の可能性を調べるために、一連の実験が行なわれた。これらの実験は、参照として本明細書に組み入れられるGuptaら(1995) Science 267:389-393に記述されている。ATF2のリン酸化に対するUV照射の効果が、エピトープタグを付けたJNK1の存在下および非存在下でトランスフェクトされたCOS-1細胞において調べられた(実施例7)。細胞にUV照射をし、JNK1およびJNK2は、基質ATF2を用いたゲル内プロテインキナーゼアッセイ法によって可視化した。JNK1およびJNK2は、UV照射をしたトランスフェクト細胞および非トランスフェクト細胞で検出された；しかし、JNK1レベルは、トランスフェクト細胞で高かった。これらの結果は、ATF2がJNK1およびJNK2プロテインキナーゼの基質であり、これらのプロテインキナーゼはUV線に露出された細胞で活性化されることを示す。

10

【0050】

JNK1によるATF2のリン酸化部位は、欠失分析によって調べられた(実施例8)。連続的なNH₂末端ドメイン欠失GST-ATF2融合蛋白質を作製し、UV照射細胞から単離されたJNK1によるリン酸化を調べた。その結果、ATF2のNH₂末端ドメインのリン酸化には、JNK1はATF2の残基1~60の存在を必要とすることが示された。

20

【0051】

JNK1の結合に必要なATF2の残基も同様に調べた。JNK1を、固定化したATF2と共にインキュベートし、結合しなかったJNK1を念入りに洗浄して除去し、結合したJNK1を[⁻³²P]ATPとのインキュベーションによって検出した。結果は、JNK1による結合とリン酸化のためには、ATF2の残基20~60が必要なことを示している。ATF2と55 kD JNK2プロテインキナーゼとの間の同様な結合相互作用も観察された。

【0052】

JNK1によるリン酸化は、ATF2の電気泳動の移動度を低下させることが示された(実施例9)。全長ATF2分子(残基1~505)のリン酸化アミノ酸分析によって、JNKはThrおよびSer残基の両方をリン酸化することが示された。ThrおよびSerリン酸化の主要な部位は、それぞれNH₂およびCOOH末端ドメインに存在していた。NH₂末端のリン酸化部位は、リン酸化ペプチドマッピングと変異解析によって、Thr⁶⁹およびThr⁷¹と同定された。これらのThrリン酸化部位は、ATF2内でJNK結合に必要なサブドメイン(残基20~60)とは別の領域に存在している。

30

【0053】

ATF2のリン酸化で見られる電気泳動の移動度の低下を、さらに詳しく調べられた(実施例10)。JNK1を発現するCHO細胞に、UV照射、炎症促進型サイトカインであるインターロイキン-1(IL-1)処理、または血清処理をして、JNK1を活性化した。JNK1に活性化されたATF2の電気泳動の移動度の低下は、UV照射とIL-1処理をした細胞で観察された。血清で細胞を処理すると、これよりも小さな効果が見られた。これらの結果は、ATF2がJNK1のインビボでの基質であることを示す。

40

【0054】

野生型(Thr⁶⁹、⁷¹)ATF2およびリン酸化欠損(Ala⁶⁹、⁷¹)ATF2分子の性質に対する、UV照射の効果を調べた(実施例11)。UVに露出すると、内因性および過剰発現した野生型のATF2の両方の電気泳動の移動度が低下した。電気泳動の移動度のこの変化は、ATF2のリン酸化の増加を伴っていた。電気泳動の移動度のシフトおよびリン酸化の増加のいずれも、ATF2内でThr⁶⁹およびThr⁷¹をAlaで置換すると阻止された。この変異により、インビボにおけるATF2のThr残基のリン酸化も阻止された。

【0055】

GAL4 DNA結合ドメイン、および野生型または変異型ATF2からなる融合蛋白質の転写活性を調べた(実施例12)。ATF2のThr⁶⁹および/またはThr⁷¹における点変異は、野生型分子

50

と比較してATF2の転写活性を有意に低下させ、これらの部位におけるリン酸化が、活性に生理的に関連していることを示した。

【0056】

JNK1がATF2のNH₂末端活性化ドメインに結合することから（実施例8に記述）、触媒作用の不活性化JNK1分子が、野生型JNK1分子のドミナントな阻害剤として機能することが示唆された。この仮説は、触媒作用の不活性化JNK1分子のATF2機能に対する効果を調べて、検証された（実施例13）。触媒作用の不活性化JNK1変異体は、Thr¹⁸³およびTyr¹⁸⁵活性化リン酸化部位を、それぞれAlaおよびPheで置換して作製された（Ala¹⁸³、Phe¹⁸⁵、「ドミナントネガティブ」と呼ばれる）。野生型JNK1の発現は、血清刺激されたATF2の転写活性を僅かに上昇させた。これとは対照的に、ドミナントネガティブJNK1は、対照および血清刺激されたATF2活性の両方を阻害した。この阻害効果は、JNK1変異体がATF2活性化ドメインに非生産的に結合し、ATF2のリン酸化を効果的に阻害することによる。

10

【0057】

癌抑制遺伝子産物Rbは、ATF2に結合し、ATF2に刺激される遺伝子発現を上昇させる（Kimら(1992) Nature 358:331）。同様に、アデノウイルスのオンコプロテインE1AはATF2のDNA結合ドメインと会合し、ATF2のNH₂末端活性化ドメインが必要な機構によって、ATF2に刺激される遺伝子発現を上昇させる（LiuおよびGreen (1994) Nature 368:520）。ATF2の転写活性は、ルシフェラーゼレポーター遺伝子システムを用いて、野生型または変異型ATF2分子を発現する、対照、Rb処理、およびE1A処理細胞において調べられた（実施例14）。RbとE1Aは、野生型および変異型ATF2の両方の、ATF2に刺激される遺伝子発現を上昇させることが分かった。しかし、変異型ATF2では、野生型ATF2よりも、レポーター遺伝子発現のレベルは低かった。これらの結果を合わせると、最大の転写活性を得るためには、ATF2リン酸化（Thr⁶⁹およびThr⁷¹での）に加えて、RbまたはE1Aのいずれかが必要であることが示される。したがって、RbおよびE1AはATF2のリン酸化と協調して働き、転写活性を制御している。

20

【0058】

p38活性化の作用を調べ、p38 MAPキナーゼ経路とERKおよびJNKシグナル伝達経路との関係を確立するために、一連の実験が行われた（Raugeaudら(1995) J. Biol. Chem. 270:7420、参照として本明細書に組み入れられる）。まず、ERKおよび/またはJNKグループのMAPキナーゼの基質であることが示されている蛋白質と共にp38をインキュベートすることにより、p38の基質特異性を調べた（実施例15）。本発明者らは、MBP（Ericksonら(1990) J. Biol. Chem. 265:19728）、EGF-R（Northwoodら(1991) J. Biol. Chem. 266:15266）、細胞質ホスホリパーゼA₂（cPLA₂）（Linら(1993) Cell 72:269）、c-Myc（Alvarezら(1991) J. Biol. Chem. 266:15277）、I_B、c-Jun、および野生型（Thr⁶⁹、⁷¹）または変異（Ala⁶⁹、⁷¹）ATF2のリン酸化を調べた。p38はMBPおよびEGF-Rをリン酸化し、それよりも低いレベルでI_Bをリン酸化したが、他のERK基質はリン酸化せず、このことからp38の基質特異性が、ERKおよびJNKグループのMAPキナーゼとは異なることが示される。野生型ATF2はp38の優れた基質であるが、変異型ATF2（Ala⁶⁹、⁷¹）はそうでないことが判明した。

30

【0059】

p38によるATF2のリン酸化は、ポリアクリルアミドゲル電気泳動において、ATF2の電気泳動の移動度のシフトを伴った。本発明者らは、p38によるATF2のリン酸化部位は、JNK1と同じであるという仮説を、Thr⁶⁹およびThr⁷¹をAla（Ala⁶⁹、⁷¹）で置換することにより、検証した。p38は変異ATF2をリン酸化しないことが分かったが、これはp38がATF2のNH₂末端活性化ドメイン内のThr⁶⁹およびThr⁷¹をリン酸化することを示す。

40

【0060】

JNK1またはp38を発現する細胞の抽出物を、エピトープのみ(GST)またはGST-ATF2（活性化ドメインを含む残基1~109）とインキュベートして、ATF2に対するJNKとp38の結合の比較を行なった（実施例16）。結合したプロテインキナーゼは、ウエスタンブロット分析によって検出した。結果は、p38とJNKの両方がATF2の活性化ドメインに結合することを示す。

50

【 0 0 6 1 】

EGFおよびホルボールエステルは、ERKシグナル伝達経路の強力な活性化因子であり (EganおよびWeinberg (1993) Nature 365:781)、MAPキナーゼのERKサブグループを最大限に活性化する。しかし、これらの処理は、JNKプロテインキナーゼの活性を僅かに上昇させるのみである (Derijardら (1994) 上記; Hibiら (1993) 上記)。EGFまたはホルボールエステル、およびUV照射、浸透圧ショック、インターロイキン-1、腫瘍壊死因子、およびLPSのp38活性に対する効果を全て試験した (実施例17)。重要なことに、EGFおよびホルボールエステルは、p38のプロテインキナーゼ活性を中程度にしか上昇させなかったが、環境ストレス (UV照射および浸透圧ショック) は、p38とJNKの両方の活性を著しく上昇させた。p38とJNKのいずれも、炎症促進型サイトカイン (TNFおよびIL-1) または内毒素LPSで処理された細胞において活性化された。これらの結果を合わせると、p38は、JNKと同様に、ストレスに誘導されるシグナル伝達経路によって活性化されることが示される。

10

【 0 0 6 2 】

ERKおよびJNKは、それぞれ、モチーフThr-Glu-TyrおよびThr-Pro-Tyr内の2重のリン酸化によって活性化される。これとは対照的に、p38は関連配列Thr-Glu-Tyrを持っている。このモチーフがp38の活性化に関連しているかどうかを調べるために、Thr-Gly-TyrをAla-Gly-Pheで置換した効果を調べた (実施例18)。野生型 (Thr¹⁸⁰、Tyr¹⁸²) または変異型p38 (Ala¹⁸⁰、Phe¹⁸²) を発現する細胞に対するUV照射の効果を調べた。抗ホスホチロシン抗体を用いたウエスタンブロット分析では、UV照射を行なうとp38のTyrリン酸化が上昇することが示された。Tyrリン酸化の上昇は、[⁻³²P]リン酸塩標識細胞から単離されたp38のホスホ化アミノ酸分析によって、確認された。この分析では、UV照射がp38のThrリン酸化を上昇させることも示された。重要なことに、Thr¹⁸⁰およびTyr¹⁸²のリン酸化の上昇は、Ala¹⁸⁰/Phe¹⁸²変異によって、阻止された。この結果は、UV照射が二重のリン酸化によるp38の活性化を増加させることを示す。

20

【 0 0 6 3 】

最近、マイトジェンに誘導される二重特異性を持つフォスファターゼMKP1およびPAC1によって、ERK活性が調節されていることが示された (Wardら (1994) Nature 367:651)。二重リン酸化によりp38が活性化される (実施例18) ため、p38も二重特異性フォスファターゼによって調節されているという可能性が生じる。本発明者らは、p38 MAPキナーゼ活性に対するMKP1およびPAC1の効果を調べた (実施例19)。ヒトMKP1およびPAC1を発現する細胞を、UV照射処理をしたものとしなないもので、p38活性を測定した。PAC1またはMKP1の発現は、p38活性を阻害することが分かった。MKP1の阻害効果は、PAC1よりも大きかった。これとは対照に、触媒作用の不活性な変異フォスファターゼ (変異PAC1 Cys²⁵⁷/Ser) でトランスフェクトされた細胞は、p38 MAPキナーゼを阻害しなかった。これらの結果は、p38が二重特異性フォスファターゼPAC1およびMKP1によって調節されることを示す。

30

【 0 0 6 4 】

p38 MAPキナーゼの細胞内分布は、間接免疫蛍光顕微鏡法によって調べた (実施例20)。エピトープタグを付けたp38 MAPキナーゼは、M2モノクローナル抗体を用いて検出した。エピトープタグを付けたp38 MAPキナーゼでトランスフェクトされた細胞の特異的な染色は、細胞表面、細胞質、および核で観察された。UV照射後には、細胞表面および核のp38 MAPキナーゼには著しい変化は観察されなかったが、細胞質p38 MAPキナーゼの核周囲領域への局在の増加が検出された。

40

【 0 0 6 5 】

高浸透圧培地によるJNKの活性化を研究するために、一連の実験を行った (実施例21)。これらの実験は、参照として本明細書に組み入れられるGalcheva-Gargovaら (1994) Science 265:806に報告された。エピトープタグを付けたJNK1を発現するCHO細胞は、0~1000 mMソルビトールとインキュベートされ、基質c-Junを用いて免疫複合体キナーゼ解析によって、JNK1活性が測定された。100 mMソルビトールで1時間インキュベートされた細胞で、JNK1活性の上昇が観察された。300 mMソルビトールへの露出では、5分以内にJNK1活性の上昇が観察された。最大の活性は、浸透圧ショックの15~30分後に観察され、この後は

50

、JNK1活性が徐々に低下した。浸透圧ショックによるJNKの活性化は、野生型 (Thr¹⁸³、Tyr¹⁸⁵) または変異 (Ala¹⁸³、Phe¹⁸⁵) JNK1を発現する細胞で調べた。JNK1活性は、300 mMソルビトールの存在下または非存在下での15分のインキュベーション後に測定された。野生型JNK1を発現する細胞では、JNK1活性の上昇が見られたが、変異JNK1を発現する細胞では見られなかった。これらの結果は、高浸透圧培地に露出された哺乳類培養細胞において、JNKシグナル伝達経路が活性化されることを示す。

【0066】

上述の実験の結果は、図3に示されており、これはERK、p38、およびJNK MAPキナーゼシグナル伝達経路を模式的に表わしている。細胞をEGFまたはホルボールエステルで処理すると、ERKが強力に活性化される。これとは対照的に、p38はこのような条件では僅かに活性化されるのみである (実施例15)。しかし、UV照射、浸透圧ショック、および炎症性サイトカインは、p38活性を著しく上昇させる。ERKとp38の活性化パターンのこのような違いは、これらのMAPキナーゼが異なるシグナル伝達経路によって調節されていることを示唆する。これらのシグナル伝達経路が別のものであることの分子的基础は、ERKを活性化するMAPキナーゼキナーゼ (MEK1およびMEK2) とp38 (MKK3、MKK4、およびMKK6) が異なるという証明によって立証される。

10

【0067】

マウスおよびヒトMKK7の単離は、実施例22に記述されている。ショウジョウバエMAPキナーゼキナーゼhep配列の特徴的な領域を用いて、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) のプライマーがデザインされた。これらのプライマーを用いてマウス精巣mRNAを増幅すると、特異的な産物が形成され、これはプラスミドベクターにクローニングされ、配列決定が行なわれた。hepに関連する1つの配列が同定され、マウス精巣ライブラリーのスクリーニングに使用された。プロテインキナーゼをコードする5つのDNA (cDNA) が同定された：1つはMAPプロテインキナーゼキナーゼ (MKK7) をコードしていた。他は種々のスプライシング変異体をコードしていた：MKK7b (部分配列が図11に記載されている)、MKK7c (図13)、MKK7d (図14)、MKK7e (図15)。MKK7 (配列番号：18) およびhep (配列番号：21) の推定アミノ酸配列は図9に示されており、MAPキナーゼキナーゼMEK1 (配列番号：11)、MEK2 (配列番号：12)、MKK3 (配列番号：2)、MKK4 (配列番号：10)、MKK5 (配列番号：22)、およびMKK6 (配列番号：4) と比較されている。ヒトMKK7は、全長 (マウス) MKK7 cDNAプロンプを用いてヒトcDNAライブラリーをスクリーニングして、同定された。同定された部分配列 (3'末端を欠く) は、マウスMKK7cと相同である。

20

30

【0068】

MKK7およびMKK4アイソフォームの発現は、8つのマウス組織から単離されたポリA+ mRNAのノーザン (RNA) プロット分析によって調べた (実施例23)。両方のプロテインキナーゼが、広範囲で発現されていることが判明した。

【0069】

MKK7の基質特異性は、エピトープタグを付けた組換えMAPキナーゼ (JNK1、p38、およびERK2) を基質としたインビトロリン酸化アッセイ法で調べた (実施例24)。MKK7はJNKをリン酸化したが、p38もERK2もリン酸化しなかった。MKK7は、p38およびJNK1によってリン酸化された。

40

【0070】

MKK7は、インビボでJNKプロテインキナーゼを特異的に活性化することが分かった (実施例25)。CHO細胞に、エピトープタグを付けたMAPキナーゼ (JNK1、p38、またはERK2) と、空の発現ベクターまたはMKK1、MKK4、MKK6、もしくはMKK7をコードする発現ベクターとを、コトランスフェクションし、リン酸化反応の産物を分析した。MKK7はJNK1しか活性化しなかったが、その程度はMKK4よりも高かった。

【0071】

MKK7がAP-1転写活性を上昇させるかどうかを検証するために、コトランスフェクション解析を実施した (実施例26)。MKK7とJNKとを共に発現させると、AP-1レポーター遺伝子発現が上昇し、それはMKK4およびJNKで見られる上昇よりも大きかった。レポーター遺伝

50

子にATF2を使った場合も、同様な結果が観察された。また、MKK7単独で、ATF2の発現を増加させることができた(図16)。

【0072】

MKKアイソフォームは、MKK活性を調節する試薬のスクリーニングに有用である。実施例の後の用途の項には、MKK活性を阻害または活性化する能力のある試薬の同定方法が記述されている。

【0073】

ヒトMKKアイソフォームおよびMKKが仲介するシグナル伝達経路を見出すことは、MKKを介する疾患の治療にとって、臨床的意義がある。MKKアイソフォームの1つの用途は、MKK-MAPキナーゼ-ATF2経路の活性化を阻害または予防できる試薬をスクリーニングするための方法における使用である。

10

【0074】

実施例

以下の実施例は、本発明を例証するためのもので、制限するものではない。

【0075】

実施例1. MKKプロテインキナーゼ

MKK3およびMKK4の一次配列は、ヒト胎児脳ライブラリーから単離されたcDNAクローンの配列から、推定された。

【0076】

PBS2 (Brewsterら(1993) Science 259:1760; Maedaら(1994) Nature 369:242) の配列に基づいて、プライマーTTYTAYGGNGCNTTYTTYATHGA (配列番号: 14) およびATBCTYTCNGGNGCCATKTA (配列番号: 15) がデザインされた。プライマーは、ヒト脳mRNAを鋳型としたPCR反応で使用された。PBS2関連プロテインキナーゼの断片をコードする2つの配列が同定された。全長ヒトcDNAクローンは、ヒト胎児脳ライブラリーのスクリーニングで単離された (Derijardら(1995) Science 267:682-685)。cDNAクローンは、アプライド バイオシステムズ (Applied Biosystems) モデル373Aを用いて配列を決定した。MKK3 (2030塩基対(bp)) およびMKK4 (3576 bp) について得られた最長のクローンは、これらのプロテインキナーゼのコード領域全体を含んでいた。

20

【0077】

MKK3 (配列番号: 2) およびMKK4 (配列番号: 6) の一次構造は、図1に示されている。インフレームの停止コドンがMKK3 cDNAの5'非翻訳領域に存在するが、MKK4 cDNAの5'領域にはない。表示されたMKK4蛋白質配列は、2番目のインフレーム開始コドンから開始する。

30

【0078】

これらの配列を、ヒトMAPキナーゼMEK1 (配列番号: 11) およびMEK2 (配列番号: 12) (ZhengおよびGuan (1993) J. Biol. Chem. 268:11435) ならびに酵母MAPキナーゼキナーゼPBS2 (配列番号: 13) (BoguslawskiおよびPolazzi (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:5848) と比較した(図1)。キナーゼとヒトMKK3 (サブドメインIとXIの間) の同一性および類似性は、BESTFITプログラム (バージョン7.2、Wisconsin genetics Computer Group) によって計算した (同一性の割合/類似性の割合): MEK1, 41%/63%, MEK2, 41%/62%; MKK4, 52%/73%; およびPBS2, 40%/59%。キナーゼとヒトMKK4 の同一性および類似性は以下のとおりであると計算された (同一性の割合/類似性の割合): MEK1, 44%/63%, MEK2, 45%/61%; MKK3, 52%/73%; およびPBS2, 44%/58%。

40

【0079】

MKK3およびMKK4 のcDNA配列は、それぞれ寄託番号L36719およびL36870でジーンバンク (GenBank) に寄託された。MKK4 cDNA配列には、異なるスプライシング部位からインピボで生成するMKK4 およびMKK4 のcDNA配列が含まれている。当業者は、寄託されたcDNA配列から、MKK3およびMKK4アイソフォームのアミノ酸配列を簡単に決定できる。

【0080】

実施例2. 成人組織におけるMKK3およびMKK4 mRNAの発現

50

ヒトの心臓、脳、胎盤、肺、肝臓、筋肉、腎臓、および膵臓組織から単離されたポリアデニル化 [ポリ(A)⁺] mRNA (2 μg) を用いて、ノーザンブロット分析が行われた。変性アガロースゲル電気泳動によってmRNAは分別され、ナイロンメンブレンに移された。ブロットは、[⁻³²P]ATP (デオキシアデノシン3リン酸) (Amersham International PLC) を用いたランダムプライミングによって標識されたMKK3およびMKK4 cDNAでプローブした。MKK3およびMKK4は、調べたすべての組織で発現されていた；MKK3およびMKK4の発現が最高だったのは、骨格筋組織だった。

【 0 0 8 1 】

ヒトと酵母のMAPキナーゼキナーゼグループのメンバー間の関係は、樹状図で示されている (図2)。MKK3/4は、ヒトMAPキナーゼキナーゼの独特なサブグループを形成する。

10

【 0 0 8 2 】

実施例3. MKK3によるp38 MAPキナーゼのインビトロリン酸化

GST-JNK1およびGST-ERK2は記述されている (Derijardら (1994) 上記 ; Guptaら (1995) Science 267: 389; WartmannおよびDavis (1994) J. Biol. Chem. 269:6695、各々は参照として本明細書に組み入れられる)。GST-p38 MAPキナーゼは、発現ベクターpGSTag (Dressierら (1992) Biotechniques 13:866) およびp38 MAPキナーゼcDNAのコード領域を含むPCR断片から、調製された。GST-MKK3およびMKK4は、pGEX3X (Pharmacia-LKB Biotechnology) およびMKK3およびMKK4 cDNAのコード領域を含むPCR断片から、調製された。GST融合蛋白質は、GSHアガロース (SmithおよびJohnson (1988) Gene 67:31) を用いたアフィニティークロマトグラフィーによって、精製された。発現ベクターpCMV-Flag-JNK1およびpCMV-MEK1は、記述されている (Derijardら (1994) 上記 ; WartmannおよびDavis (1994) 上記)。プラスミドpCMV-Flag-p38 MAPキナーゼは、発現ベクターpCMV5 (Anderssonら (1989) J. Biol. Chem. 264:8222) およびp38 MAPキナーゼcDNAから調製された。MKK3およびMKK4の発現ベクターは、cDNAをpCDNA3 (Invitrogen) のポリリンカーにサブクローニングして、調製された。Flagエピトープ (Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys (配列番号: 16) ; Immunex、ワシントン州シアトル) は、挿入重複PCR (Hoら (1989) Gene 77:51) によって、キナーゼのコドン1と2の間に挿入された。

20

【 0 0 8 3 】

プロテインキナーゼアッセイ法は、キナーゼ緩衝液 (25 mM 4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニエタンスルホン酸、pH 7.4、25 mM -グリセロリン酸塩、25 mM MgCl₂、2 mMジチオスレイトール、および0.1 mM オルトバナジン酸塩) 中で実行された。組換えGST-MKK3は、[⁻³²P]ATPおよび緩衝液、GST-JNK1、GST-p38 MAPキナーゼ、またはGST-ERK2とインキュベートされた。アッセイ法は、最終容量25 μlの中に、1 μgの基質蛋白質および50 μM [⁻³²P]ATP (10 Ci/mmol) を添加して開始された。25 で30分後に、レムリ (Lemmli) サンプル緩衝液を添加して反応を終了させた。SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) 後に、オートラジオグラフィーによって基質蛋白質のリン酸化を調べた。部分酸加水分解および薄層クロマトグラフィーによって、ホスホアミノ酸分析を行った (Derijardら (1994) 上記 ; Alvarezら (1991) J. Biol. Chem. 266:15277)。すべてのグループでMKK3の自己リン酸化が観察された。MKK3は、p38 MAPキナーゼをリン酸化したが、JNK1またはERK2はしなかった。

30

40

【 0 0 8 4 】

同様な挿入重複PCR手法を用いて、p38のThr¹⁸⁰およびTyr¹⁸²を、それぞれAlaおよびPheで置換した。すべてのプラスミドの配列は、アプライド バイオシステムズ (Applied Biosystems) モデル373Aを用いた自動シーケンシングによって、確認された。GST-MKK3は[⁻³²P]ATPおよび緩衝液、野生型GST-p38 MAPキナーゼ (TGY) または変異GST-p38 MAPキナーゼ (AGF) とインキュベートされた。リン酸化された蛋白質は、SDS-PAGEで解析され、オートラジオグラフィーで検出された。野生型p38のリン酸化のみが観察された。

【 0 0 8 5 】

実施例4. MKK4によるJNKおよびp38 MAPキナーゼのインビトロでのリン酸化および活性化

プロテインキナーゼアッセイ法は、実施例3のように行なわれた。組換えGST-MKK4は、[

50

-³²P]ATPおよび緩衝液、GST-JNK1、GST-p38 MAPキナーゼ、またはGST-ERK2とインキュベートされた。JNK1およびp38は、リン酸化され、またJNK1およびp38と共にインキュベートされたMKK4もリン酸化された。

【0086】

GST-MKK4は[-³²P]ATPおよび緩衝液、野生型JNK1 (Thr¹⁸³、Tyr¹⁸⁵)、または変異GST-JNK1 (Ala¹⁸³、Phe¹⁸⁵)とインキュベートした。各インキュベーションには、JNK1の基質ATF2 (Guptaら(1995)上記)も含まれていた。ATF2はMKK4および野生型JNK1の存在下で、リン酸化された。これらの結果は、MKK4がp38とJNK1の両方をリン酸化し、活性化することを立証する。

【0087】

実施例5. UV刺激を受けたMKK3によるp38 MAPキナーゼのリン酸化および活性化

エピトープタグを付けたMKK3を、ウシ胎仔血清(5%)(Gibco-BRL)を添加したダルベッコ変法イーグル培地中で維持したCOS-1細胞で発現させた。細胞は、製造元(Gibco-BRL)の推奨する方法にしたがって、リポフェクタミン試薬を用いてトランスフェクトし、記述されたようにUV照射またはEGFで処理した(Derijardら(1994)上記)。

【0088】

細胞は、UV-Cの存在下または非存在下に露出した(40 J/m²)。細胞は溶解緩衝液(20 mM Tris, pH 7.4, 1% 登録商標TRITON X-100, 10%グリセロール、137 mM NaCl, 2 mM EDTA, 25 mM β-グリセロリン酸塩、1 mM オルトバナジン酸ナトリウム、1 mMフェニルメチルスルホニルフルオリド、およびロイペプチン(10 μg/ml))で溶解し、4 °Cで100,000 x gで15分間遠心した。MKK3は免疫沈降によって単離された。エピトープタグを付けたプロテインキナーゼは、プロテインGセファロース(Pharmacia-LKB Biotechnology)に結合したFlagエピトープ(1BI-Kodak)に対するM2抗体と、4 °Cで1時間インキュベートした。免疫沈降物は、溶解緩衝液で2回、キナーゼ緩衝液で2回洗った。

【0089】

プロテインキナーゼアッセイ法は、基質GST-p38 MAPキナーゼまたはJNK1を用いて行なった。一部のアッセイ法にはATF2が含まれていた。MKK3による基礎レベルのp38 MAPキナーゼリン酸化が観察された。UV照射を行なうと、p38 MAPキナーゼのリン酸化が増加したが、JNK1は増加しなかった。p38 MAPキナーゼ活性が増加すると、ATF2のリン酸化が増加した。

【0090】

実施例6. MKK3またはMKK4を発現する細胞におけるp38 MAPキナーゼの活性化

COS-1細胞はエピトープタグを付けたp38 MAPキナーゼと、空の発現ベクターまたはMEK1、MKK3、またはMKK4 をコードする発現ベクターでトランスフェクトした。培養物の一部は、UV照射(40 J/m²)または10 nM EGFで処理した。p38 MAPキナーゼは、モノクローナル抗体M2による免疫沈降で単離し、プロテインキナーゼ活性は、[-³²P]ATPおよびATF2を基質として用いて、免疫複合体で測定された。リン酸化反応の産物は、SDS-PAGE後にオートラジオグラフィによって可視化した。対照のMEK1またはEGF処理群ではATF2はリン酸化されなかったが、MKK3、MKK4、およびUV照射群ではリン酸化された。ATF2のMKK3およびMKK4によるリン酸化は、UV照射細胞から単離されたp38 MAPキナーゼで見られるものと類似していた。

【0091】

実施例7. JNK1およびJNK2によるATF2のリン酸化

COS-1細胞は、ウシ血清アルブミン(5%)(Gibco-BRL)を添加したダルベッコ変法イーグル培地中で維持された。[³²]Pによる代謝標識は、[³²]オルトリン酸塩(2 mCi/ml)(Dupont-NEN)を添加したリン酸塩フリーのダルベッコ変法イーグル培地(Flow Laboratories Inc.)中で、3時間細胞をインキュベートして行なった。COS-1細胞は、エピトープタグを付けたJNK1の存在下(JNK1)または非存在下(モック)でトランスフェクトした。JNK1 cDNAをコードするプラスミド発現ベクターは、以前に記述されている(Derijardら(1994) Cell 76:1025、参照として本明細書に組み入れられる)。プラスミドDNAは、リポフェクタミン

10

20

30

40

50

法 (Gibco-BRL) によって、COS-1細胞にトランスフェクトした。48時間インキュベーションした後、培養物の一部に40 J/m²のUV照射を行ない、37℃で1時間インキュベートした。

【0092】

細胞は、20 mM Tris, pH 7.5, 25 mM β-グリセロリン酸塩、10%グリセロール、1% 登録商標Triton X-100, 0.5% (w/v) デオキシコール酸塩、0.1% (w/v) SDS, 0.137 M NaCl, 2 mM ピロリン酸塩、1 mMオルトパナジン酸塩、2 mM EDTA, 10 μg/mlロイペプチンおよび1 mM PMSF中で溶解された。可溶性抽出物は、4℃で20分間微量遠心して調製された。組換えJNK1を抗原として調製されたウサギ抗血清を用いた反応によって、JNK1免疫沈降物も調製された。

【0093】

ゲル内プロテインキナーゼアッセイ法は、細胞溶解物とJNK1免疫沈降物を用いて、SDS-PAGE後に、プロテインキナーゼを再生、ゲル中での基質 (GST-ATF2、残基1~505) の重合、および[³²P]ATPとのインキュベーションによって実行した (Derijardら (1994) 上記)。 [³²P]リン酸塩の取り込みは、オートラジオグラフィによって可視化し、ホスホールイメージャー (Phosphorimager) およびイメージクアント (ImageQuant) ソフトウェア (Molecular Dynamics Inc., カリフォルニア州サニーベール) によって定量した。細胞溶解物には、UV照射細胞から調製された抽出物中でATF2をリン酸化する46 kDおよび55 kDのプロテインキナーゼが存在することが示された。46 kDおよび55 kDプロテインキナーゼは、それぞれJNK1およびJNK2であると同定された。

【0094】

実施例8. JNK1のATF2への結合およびNH₂末端活性化ドメインのリン酸化

ATF2のJNK1によるリン酸化部位は、ATF2の連続的なNH₂末端ドメイン欠失を作製して調べた。ATF2をコードするプラスミド発現ベクター (pECE-ATF2) (LiuおよびGreen (1994)

および(1990)) は、記述されている。GST-ATF2融合蛋白質の細菌の発現ベクターは、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によるATF2 cDNA断片をpGEX-3X (Pharmacia-LKB Biotechnology Inc.)へサブクローニングして、作製された。作製されたすべてのプラスミドの配列は、アプライドバイオシステムズ (Applied Biosystems) モデル373Aを用いた自動シーケンシングによって確認された。GST-ATF2蛋白質は、記述されたようにして精製され (SmithおよびJohnson (1988) Gene 67:31)、SDS-PAGEで解析され、クーマシーブルーで染色された。GST-ATF2融合蛋白質には、残基1~505、1~349、350~505、1~109、20~109、40~109、および60~109が含まれていた。

【0095】

UV照射細胞から単離されたJNK1によるGST-ATF2融合蛋白質のリン酸化は、免疫複合体キナーゼアッセイ法によって、調べられた。免疫複合体キナーゼアッセイ法は、Flagエピトプタグを付けたJNK1およびモノクローナル抗体M2 (IBI-Kodak)を用いて、Derijardら (1994) 上記、に記述されたようにして行なわれた。免疫複合体蛋白質キナーゼアッセイ法は、組換えJNK1を抗原として調製されたウサギ抗血清を用いても、行なわれた。細胞は、20 mM Tris, pH 7.5, 10%グリセロール、1% 登録商標Triton X-100, 0.137 M NaCl, 25 mM β-グリセロリン酸塩、2 mM EDTA, 1 mMオルトパナジン酸塩、2 mM ピロリン酸塩、10 μg/mlロイペプチン、および1 mM PMSF中で溶解された。JNK1は、JNKに対するウサギモノクローナル抗体、またはFlagエピトプに対するM2モノクローナル抗体に結合した、プロテインG-セファロースを用いて免疫沈降させた。ビーズは溶解緩衝液で3回、キナーゼ緩衝液 (20 mM HEPES, pH 7.6, 20 mM MgCl₂, 25 mM β-グリセロリン酸塩、100 μMオルトパナジン酸ナトリウム、2 mMジチオスレイトール) で1回洗った。キナーゼアッセイ法は、30 μlのキナーゼ緩衝液中で1 μgの基質、20 μMアデノシン3リン酸、および10 μCiの[³²P]ATPを用いて、25℃で10分間行なった。反応は、レムリ (Laemmli) サンプル緩衝液を添加して停止し、産物はSDS-PAGE (10%ゲル) で解析した。JNK1は、残基1~505、1~349、1~109、20~109、および40~109を持つGST-ATF2融合蛋白質をリン酸化するが、60~109はしなかった。これらの結果は、JNKによるリン酸化には、ATF2の残基1~60が必要であることを示す。

10

20

30

40

50

【0096】

固定したGST-ATF2融合蛋白質の結合は、Hibiら(1993) Genes Dev. 7:2135、参照として本明細書に組み入れられる)に記述されるようにして、固相キナーゼアッセイ法によって調べられた。UV照射細胞のJNK1は、GSH-アガロースに結合したGST-ATF2融合蛋白質とインキュベートした。アガロースビーズは、未結合のJNK1を取り除くために、念入りに洗った。結合したJNK1プロテインキナーゼによるGST-ATF2融合蛋白質のリン酸化は、[^{-32}P] ATPを添加して調べた。JNK1は、残基1~505、1~349、1~109、20~109、および40~109を持つGST-ATF2融合蛋白質に結合し、JNK1のATF2への結合には残基20~60が必要であることが示された。

【0097】

実施例9. JNK1によるATF2のNH₂末端活性化ドメインのThr⁶⁹およびThr⁷¹のリン酸化

野生型(Thr⁶⁹、⁷¹)およびリン酸化欠損(Ala⁶⁹、⁷¹)ATF2分子の性質に対するUV照射の影響が調べられた。モックトランスフェクトおよびJNK1でトランスフェクトしたCOS細胞を、40 J/m² UV照射の有無の処理をした。エピトープタグを付けたJNK1は、モノクローナル抗体M2による免疫沈降で単離された。GST-ATF2(残基1~109)は、上述のように免疫複合体キナーゼアッセイ法で調べた。GST-ATF2は、SDS-PAGEによって他の蛋白質から分離し、クーマシーブルー染色した。GST-ATF2のリン酸化は、オートラジオグラフィーで検出した。JNK1トランスフェクト細胞は、ATF2をリン酸化したが、モックトランスフェクト細胞はしなかった。JNK1によるATF2のリン酸化は、UV照射をした細胞の方が多かった。JNK1によるATF2のリン酸化は、電気泳動の移動度の低下を伴っていた。

【0098】

別の実験では、全長ATF2(残基1~505)、NH₂末端断片(残基1~109)、およびCOOH末端断片(残基95~505)を含むGST融合蛋白質が、JNK1によってリン酸化され、ホスホアミノ酸分析によって、リン酸化部位が分析された。ホスホペプチドマッピングおよびホスホアミノ酸分析に使用した方法は、記述されている(Alvarezら(1991) J. Biol. Chem. 266:15277)。ペプチドマップの水平方向は電気泳動で、垂直方向はクロマトグラフィーである。ホスホペプチドマッピングおよび変異分析によって、リン酸化のNH₂末端部位は、Thr⁶⁹およびThr⁷¹であると同定された。上述のように、位置指定突然変異導入法を実行してThr⁶⁹およびThr⁷¹をAlaに置換した。変異ATF2のリン酸化は観察されなかった。

【0099】

実施例10. JNK活性化ATF2の電気泳動移動度の低下

CHO細胞は、5%ウシ血清アルブミン(Gibco-BRL)を添加したハム(Ham)のF12培地で維持された。上述のようにして、細胞を標識し、JNK1によってトランスフェクトした。CHO細胞はUV-C(40 J/m²)、IL-1(10 ng/ml)(Genzyme)、またはウシ胎仔血清(20%)(Gibco-BRL)で処理した。細胞を回収する前に、37°Cで30分インキュベートした。ATF2の電気泳動の移動度は、SDS-PAGE後に蛋白質免疫プロット分析によって調べた。UV、IL-1、および血清で処理された細胞で、ATF2の電気泳動の移動度の変化が観察された。これらの結果は、JNK1による活性化は、ATF2の電気泳動の移動度の変化を伴うことを示し、さらに、ATF2がJNK1のインビボの基質であることを示唆する。

【0100】

実施例11. JNKの活性化後のATF2リン酸化の増加

COS-1細胞は、上述のようにATF2発現ベクターの存在下(ATF2)または非存在下(対照)で、トランスフェクトされた(Haiら(1989)上記)。細胞を40 J/m² UV-Cに露出した効果を調べた。照射後、細胞を37°Cで0または30分(対照)および0、15、30、45分(ATF2)インキュベートし、回収した。SDS-PAGEでのATF2の電気泳動の移動度は、上述のように蛋白質免疫プロット分析によって調べた。ATF2トランスフェクト細胞では、ATF2は2つの電気泳動移動度を示したが、対照細胞ではそうではなかった。

【0101】

40 J/m² UV-Cの処理または非処理後、37°Cで30分インキュベートした[^{32}P]P標識細胞において、野生型(Thr⁶⁹、⁷¹)ATF2および変異型(Ala⁶⁹、⁷¹)ATF2のリン酸化状態を調べ

10

20

30

40

50

た (Haiら (1989) 上記)。ATF2蛋白質は免疫沈降で単離され、SDS-PAGEおよびオートラジオグラフィで分析した。リン酸化ATF2蛋白質は、上述のようにホスホアミノ酸分析によって調べた。両方の型のATF2がホスホセリンを含んでいたが、野生型ATF2のみがホスホスレオニンを含んでいた。

【0102】

トリプシンホスホペプチドマッピングを用いて、インビトロでJNK1によってリン酸化されたATF2と、COS-1細胞中でリン酸化されたATF2とを比較した。インビボとインビトロでリン酸化されたATF2を等量含む試料(ミックス)でも、マップを作製した。ATF2のThr⁶⁹およびThr⁷¹に変異が導入されると、UV照射細胞から単離されたATF2のマップで、2つのリン酸化トリプシンペプチドが失われる。これらのホスホペプチドは、Thr⁶⁹およびThr⁷¹を含むモノリン酸化およびビスリン酸化ペプチドに対応する。このホスホペプチドのいずれも、インビトロでJNK1によってリン酸化されたATF2のマップで観察された。

10

【0103】

実施例12. リン酸化部位Thr⁶⁹およびThr⁷¹の変異による、ATF2刺激遺伝子発現の阻害

上述のように、ATF2およびGAL4 DNA結合ドメインを含む融合蛋白質を、CHO細胞で発現させた。GAL4-ATF2融合蛋白質の活性は、レポータープラスミドpG5E1bLuc (Sethら (1992) J. Biol. Chem. 267:24796、参照として本明細書に組み入れられる) とのコトランスフェクション解析で測定した。このレポータープラスミドには、最小プロモーター要素およびホタルルシフェラーゼ遺伝子の5'上流に5つのGAL4部位がクローニングされている。トランスフェクションの効率は、ガラクトシダーゼを発現する対照プラスミドでモニターした (pCH110; Pharmacia-LKB Biotechnology)。細胞抽出物中で検出されるルシフェラーゼおよびガラクトシダーゼの活性は、3回の実験の平均の活性比として測定された (Guptaら (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:3216、参照として本明細書に組み入れられる)。表1に示す結果は、転写活性にはThr⁶⁹およびThr⁷¹のリン酸化が重要であることを示す。

20

【0104】

【表1】

リン酸化部位 Thr^{69, 71} の変異による、ATF2 刺激遺伝子発現の阻害

30

蛋白質	ルシフェラーゼ活性 (光単位/OD)
GAL4	45
GAL4- ATF2 (野生型)	320,000
GAL4- ATF2 (Ala ⁶⁹)	24,000
GAL4- ATF2 (Ala ⁷¹)	22,000
GAL4- ATF2 (Ala ^{69, 71})	29,000
GAL4- ATF2 (Glu ⁶⁹)	27,000

40

【0105】

実施例13. ATF2機能に対するドミナントネガティブJNK1変異体の影響

野生型 (Thr¹⁸³、Tyr¹⁸⁵) または変異 (Ala¹⁸³、Phe¹⁸⁵) JNK1でトランスフェクトされた血清処理CHO細胞中の、ATF2リン酸化部位Thr⁶⁹およびThr⁷²における点変異の影響を、ルシフェラーゼレポータープラスミド系を用いて決定した。対照実験は、モックトランスフェクト細胞を用いて行なった。CHO細胞は、18時間血清除去した後、血清の存在下または非存在下で4時間インキュベートした。野生型ATF2が発現されると、血清に刺激されるATF2転写活性がわずかに上昇した。反対に、変異JNK1は対照および血清刺激ATF2活性の両方を阻害した。

【0106】

実施例14. ATF2に刺激される遺伝子発現に対する、癌抑制遺伝子産物Rbおよびアデノウイ

50

ルスオンコプロテインE1aの影響

癌抑制遺伝子産物RbおよびアデノウイルスオンコプロテインE1Aの発現のATF2転写活性に対する影響は、上述のように、ルシフェラーゼレポータープラスミドおよびGAL4- ATF2 (残基1~505)を用いて調べた。細胞は、野生型 (Thr⁶⁹、⁷¹) または変異 (Ala⁶⁹、⁷¹) A TF2でトランスフェクトされた。GAL4- ATF2の非存在下では、ルシフェラーゼ活性に対するRbまたはE1Aの効果は、検出されなかった。野生型および変異ATF2のいずれでも、RbおよびE1AはATF2に刺激される遺伝子発現を増加させることが分かった。しかし、変異ATF2によるレポーター遺伝子発現のレベルは、野生型ATF2よりも低かった。これらの結果は、最大の転写活性を得るためには、ATF2のリン酸化 (Thr⁶⁹およびThr⁷¹) に加え、RbまたはE1Aが必要なことを示す。

【0107】

実施例15. p38 MAPキナーゼの基質特異性

p38 MAPキナーゼの基質リン酸化は、細菌で発現されたp38 MAPキナーゼを、I B、cMyc、EGF-R、細胞質ホスホリパーゼA₂ (cPLA₂)、c-Jun、および変異ATF2 (Thr⁶⁹、⁷¹) ならびにATP [⁻³²P] (Raigneaudら(1995) J. Biol. Chem 270:7420、参照として本明細書に組み入れられる) とインキュベーションして調べた。GST-I Bは、バルチモア (D. Baltimore) 博士 (マサチューセッツ工科大学) から提供された。GST-cMyc (Alvarezら(1991) J. Biol. Chem. 266:15277)、GST-EGF-R (残基647~688) (Kolandら(1990) Biochem. Biophys. Res. Commun. 166:90)、およびGST-c-Jun (Derijardら(1994)上記)は、記述されている。リン酸化反応は、30分後にLaemmliサンプル緩衝液を添加して、停止した。リン酸化蛋白質は、SDS-PAGEで分離し、オートラジオグラフィーで検出した。基質蛋白質のリン酸化率は、ホスホールイメジャー (PhosphorImager) (Molecular Dynamics Inc.) 分析によって定量した。ATF2、MBP、EGF-R、およびI Bの相対的リン酸化は、それぞれ、1.0、0.23、0.04、および0.001だった。

【0108】

実施例16. ATF2に対するp38 MAPキナーゼの結合

エピトープタグを付けたJNK1およびp38 MAPキナーゼを発現する細胞抽出物を、GSHアガロースに固定した、ATF2の活性化ドメイン (残基1~109) を含むGST融合蛋白質とインキュベートした。上清を取り除き、アガロースを念入りに洗った。上清およびアガロース結合画分のウエスタンブロット分析は、以下のように行なった。蛋白質はSDS-PAGEによって分画し、電気泳動によってイモビロン (Immobilon) -Pメンブレンに移し、ホスホチロシン (PY20) およびフラッグエピトープ (M2) に対するモノクローナル抗体で、プローブした。免疫複合体は増幅化学ルミネセンス (Amersham International PLC) を用いて検出した。対照実験は、固定したGSTを用いて行なった。

【0109】

実施例17. 炎症促進型サイトカインおよび環境ストレスによるp38 MAPキナーゼおよびJNK1の活性化

ホルボールエステル、EGF、UV照射、浸透圧ストレス、IL-1、腫瘍壊死因子 (TNF)、およびLPSの、p38 MAPキナーゼおよびJNK1の活性に対する影響は、ATP [⁻³²P] およびATF2を基質として用いた免疫複合体タンパク質キナーゼアッセイ法によって、測定した。TBF およびIL-1 は、ゲンザイム社 (Genzyme Corp.) のものである。リポ多糖 (LPS) は、記述されたようにして (Mathisonら(1988) J. Clin. Invest. 81:1925)、凍結乾燥した細菌サルモネラ ミネソタ (Salmonella minnesota) Re595から単離された。ホルボールミリステートアセテートは、シグマ (Sigma) のものだった。EGFはマウスの唾液腺から精製された (Davis (1988) J. Biol. Chem. 263:9462)。キナーゼアッセイ法は、p38およびJNKの免疫沈降物を用いて行なった。免疫複合体は、キナーゼ緩衝液 (上述) で2回洗い、アッセイ法は、最終容量25 μl中で、1 μgのATF2および50 μMの [⁻³²P]ATP (10 Ci/mmol) を添加して開始した。反応は、30、30分後に、レムリ (Laemmli) サンプル緩衝液を添加して停止した。ATF2のリン酸化は、SDS-PAGE後にオートラジオグラフィーによって調べ、ATF2のリン酸化率は、ホスホールイメジャー (PhosphorImager) 分析によって定量した

10

20

30

40

50

。

【0110】

結果は表2に示されている。HeLa細胞を10 nMのホルボールミリステートアセテートに露出すると、p38とJNK1が非常に弱く活性化された。同様に、10 nMのEGFで処理しても、p38とJNK1を非常に弱く活性化したのみだった。これとは対照的に、40 J/m² UV-C、300 mMソルビトール、10 ng/mlインターロイキン-1、および10 ng/ml TNF で処理すると、p38とJNK1活性が強く活性化された。p38の活性に対するLPSの効果は、ヒトCD14を発現するCHO細胞を用いて調べた。CHO細胞を10 ng/ml LPSに露出しても、p38とJNK1活性は僅かに活性化されただけだった。

【0111】

10

【表2】

炎症促進型サイトカインおよび環境ストレスによる p38 および JNK1 の活性化

	相対的プロテインキナーゼ活性	
	JNK	p38
対照	1.0	1.0
上皮成長因子(10 nM)	1.9	2.1
ホルボールエステル(10 nM)	2.3	2.9
リポ多糖(10 ng/ml)	3.6	3.7
浸透圧ショック(300 mM ソルビトール)	18.1	4.2
腫瘍壊死因子(10 ng/ml)	19.3	10.3
インターロイキン-1(10 ng/ml)	8.9	6.2
UV(40 J/m ²)	7.4	17.1

20

【0112】

実施例18. TyrおよびThrの二重リン酸化によるp38 MAPキナーゼの活性化

野生型 (Thr¹⁸⁰、Tyr¹⁸²) または変異 (Ala¹⁸⁰、Phe¹⁸²) p38 MAPキナーゼを発現するCOS-1細胞を、UV-C (40 J/m²) の照射の有無で処理した。細胞はUV照射の有無で処理後、30分で回収した。対照実験は、モックトランスフェクト細胞を用いて行なった。エピトープタグをつけたp38 MAPキナーゼの発現レベルおよび、p38 MAPキナーゼのTyrリン酸化状態は、モノクローナル抗体M2およびホスホチロシンモノクローナル抗体PY20を用いたウエスタンブロット分析によって調べた。免疫複合体は、増幅化学ルミネセンスによって検出した。

30

【0113】

野生型および変異p38は、同様なレベルで発現されていた。ウエスタンブロット分析では、UV照射によってp38のTyrリン酸化が増加したことが示された。Tyrリン酸化の増加は、[³²P]リン酸塩標識細胞から単離されたp38のホスホアミノ酸分析でも確認された。この結果では、UV照射がp38のThrリン酸化を増加させたことも示された。TyrおよびThrのリン酸化の増加は、変異p38によって阻害された。野生型および変異型のp38は、免疫沈降によってCOS-1細胞から単離された。プロテインキナーゼ活性は、[³²P]ATPおよびGST-ATF2を基質として使用して、免疫複合体中で測定された。リン酸化GST-ATF2は、SDS-PAGE後にオートラジオグラフィーによって検出された。UV照射によって、野生型p38の活性が著しく上昇したが、変異p38は触媒作用が不活性であることが分かった。これらの結果は、p38がThr-Gly-Tyrモチーフ内の二重のリン酸化によって活性化されることを示す。

40

【0114】

実施例19. MAPキナーゼホスファターゼはp38 MAPキナーゼ活性化を阻害する

細胞を40 J/m²のUV-Cの照射の有無で処理した。対照実験は、モックトランスフェクト

50

した細胞（対照）、および触媒作用が不活性の変異ホスファターゼmPAC1 (Cys²⁵⁷/Ser)およびヒトMKP1でトランスフェクトした細胞を用いて行なった。p38 MAPキナーゼの活性は、[⁻³²P]ATPおよびGST-ATF2を基質として用いた免疫複合体プロテインキナーゼアクセス法で測定した。PAC1またはMKP1の発現は、p38によるリン酸化を阻害することが分かったが、これはp38が両特異性を持つホスファターゼPAC1およびMKP1によって調節され得ることを示す。

【0115】

実施例20. p38 MAPキナーゼの細胞内分布

エピトプタグを付けたp38 MAPキナーゼは、COS細胞で発現された。細胞は、40 J/m²のUV照射の有無で処理した後、37℃で60分間インキュベートした。p38 MAPキナーゼは、モノクローナル抗体M2を用いた間接免疫蛍光によって検出した。デジタルイメージング顕微鏡法によって像を得て、画像復元処理を行った。

【0116】

免疫組織化学

カバースリップ（22 mm x 22 mm No.1; ゴールドシールカバーガラス; Becton-Dickinson）は、0.1 N HCl中で10分間煮沸による前処理をして、蒸留水ですすぎ、オートクレーブして、0.01% ポリ-L-リジン（Sigma; ミズーリ州セントルイス）でコートした。カバースリップは、35 mmマルチウェル組織培養プレート（Becton Dickinson、英国）の底に置いた。トランスフェクトされたCOS-1細胞をカバースリップ上に直接播き、5%ウシ胎仔血清（Gibco-BRL）を添加したダルベッコ変法イーグル培地中で一晩接着させた。トランスフェクションの24時間後に、細胞を一度洗い、25 mM HEPES, pH 7.4、137 mM NaCl、6 mM KCl、1 mM MgCl₂、1 mM CaCl₂、10 mMグルコース中で37℃で30分間インキュベートした。リン酸緩衝生理食塩水で細胞を一度洗い、組織培養ウェルからカバースリップを取り出した。新しく調製したリン酸緩衝生理食塩水中の4%パラホルムアルデヒドで、22℃で15分間細胞を固定した。リン酸緩衝生理食塩水中の0.25% 登録商標Triton X-100で5分間処理して細胞を透過性にして、DWB溶液（150 mM NaCl、15 mMクエン酸ナトリウム、pH 7.0、2%ウマ血清、1% (w/v)ウシ血清アルブミン、0.05% 登録商標Triton X-100）で3回洗った。一次抗体（抗フラッグモノクローナル抗体M2、Eastman-Kodak Co., コネチカット州ニューヘブーン）は、DWBで250倍に希釈し、加湿環境下で22℃で1時間細胞に適用した。再び細胞を上述のように3回洗い、2次抗体であるフルオレセインイソチオシアネート結合ヤギ抗マウスIg（Kirkegaard & Perry Laboratories Inc., メリーランド州ゲーサーズバーグ）は、250倍希釈して、加湿環境下で22℃で1時間適用した。その後、DWBで細胞を3回洗い、その後、免疫蛍光分析用に、ゲル-マウント（Gel-Mount）（Biomed Corp., カリフォルニア州フォスターシティ）によってスライド上にマウントした。対照実験は、観察された免疫蛍光の特異性を評価するために実行した。トランスフェクトされた細胞が、一次モノクローナル抗体M2の非存在下で染色されたトランスフェクト細胞や、モックトランスフェクトされた細胞では、蛍光は検出されなかった。

【0117】

デジタルイメージング顕微鏡法および画像復元

個々の細胞中の蛍光分布のデジタル画像は、既述のように、エピ蛍光用のゼイズ（Zeiss）IM-35顕微鏡上でニコン60x プラナポ（Planapo）対物レンズ（開口数=1.4）を用いて得た（Carringtonら（1990）細胞生物学の非侵襲性技術（Non-invasive Techniques in Cell Biology）、Fosbett & Grinstein編、Wiley-Liss, NY; pp 53-72; Fayら（1989）J. Microsci. 153:133-149）。種々の焦平面の画像は、コンピュータ制御焦点機構および熱電流冷却電荷結合素子カメラ（モデル220; Photometrics Ltd., アリゾナ州ツーソン）を用いて得た。試料の励起源への露出は、コンピュータ制御シャッターおよび波長選択システム（MVI、マサチューセッツ州エイボン）により決定した。電荷結合素子カメラおよび顕微鏡の機能は、マイクロコンピュータで制御され、カメラから得たデータはシリコングラフィクス（Silicon Graphics）モデル4D/GTXワークステーション（カリフォルニア州マウンテンビュー）へ転送して画像処理をした。画像は、感度の不均一性および電荷結合素子

10

20

30

40

50

検知器の暗電流のための補正をした。顕微鏡のぼやけの較正は、この装置の点広がり関数を、直径0.3 μmの蛍光標識ラテックスビーズ (Molecular Probes Inc.) の0.125 μm間隔の光学切片のシリーズとして測定することにより、決定した。画像復元アルゴリズムは、誤った問題の理論に基づいたもので、未処理画像よりも実質的に正確な細胞内の定量的色素密度値を得るものである (Carringtonら (1990) 上記; Fayら (1989) 上記)。画像処理後に、シリコン グラフィクス (Silicon Graphics) ワークステーション上のコンピュータグラフィックスソフトウェアを用いて、細胞の個々の光学切片を分析した。p38 MAPキナーゼは、細胞表面、細胞質、および核に観察された。照射後、細胞質p38の核周囲領域への局在が増加した。

【0118】

実施例21. 浸透圧ショックによるMKKシグナル伝達経路の活性化

CHO細胞を、プラスミドpCMV-Flag-Jnk1およびpRSV-Neoでコトランスフェクションした (Derijardら (1994) 上記)。ジェネティシン (Gibco-BRL) を用いた選択によって、エピトプタグを付けたJnk1 (Flag; Immunex Corp.) を発現する安定した細胞株を単離した。細胞を、0、100、150、300、600、または1000 mMソルビトールと37 °Cで1時間インキュベートした。細胞は溶解緩衝液 (20 mM Tris, pH 7.4, 1% 登録商標TRITON X-100, 2 mM EDTA, 137 mM NaCl, 25 mM β-グリセロリン酸塩、1 mM オルトパナジン酸塩、2 mMピロリン酸塩、10%グリセロール、1 mMフェニルメチルスルホニルフルオリド、および10 μg/mlロイペプチン) 中で回収し、4 °Cで100,000 × gで30分間遠心して可溶性抽出物を得た。エピトプタグを付けたJNK1は、モノクローナル抗体M2 (Immunex Corp) を用いた免疫沈降によって単離した。免疫沈降物は、溶解緩衝液で念入りに洗った。免疫複合体キナーゼアッセイ法は、25 μlの25 mM Hepes, pH 7.4, 25 mM MgCl₂, 25 mM β-グリセロリン酸塩、2 mMジチオスレイトール、100 μM オルトパナジン酸塩、および50 μM ATP [γ-³²P] (10 μCi/mmol) 中で、細菌で発現されたグルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST) 融合c-Jun (残基1~79) 2.5 μgを基質として使用して、行なった。c-Junのリン酸化はSDS-PAGE後に、オートラジオグラフィーおよびホスホールイメージャー (PhosphorImager) (Molecular Dynamics Inc.) 分析によって調べた。すべての濃度のソルビトール処理で、JNK1の活性化が観察された。

【0119】

JNK1プロテインキナーゼ活性化の時間変化は、上述のように300 mMソルビトールを添加した培地中でインキュベートした細胞中で、測定された。ソルビトールへの露出後、5分以内にJNK1の活性の上昇が観察され、最大活性は15~30分後に見られた。

【0120】

JNK1のリン酸化部位Thr¹⁸³およびTyr¹⁸⁵に変異を導入すると、浸透圧ショックによるJNK1プロテインキナーゼ活性の活性化が阻止された。CHO細胞をベクター、野生型JNK1 (Thr¹⁸³, Tyr¹⁸⁵)、および変異JNK1 (Ala¹⁸³, Phe¹⁸⁵) でトランスフェクトした。300 mMソルビトールの添加のある培地とない培地で15分間インキュベートしてから、上述のようにJNK1プロテインキナーゼ活性を測定した。JNK1の活性化は、野生型JNK1では見られたが、変異JNK1では見られなかった。

【0121】

実施例22. MKK7の分子クローニング

RT-PCRを用いて新規の哺乳類MAPキナーゼキナーゼの断片を同定した。このプロトコール用にデザインしたプライマーATNGCNGTNAARCARATG (配列番号: 23) およびATNCKYTCNGGNGCCATRTA (配列番号: 24) は、ショウジョウバエMAPキナーゼキナーゼhep (Gliseら (1995) Cell 83:451-461) の配列に基づいている。マウスの精巣mRNAは鋳型として使用された。マウス精巣mRNAのRT-PCR増幅後に、単一の生成物(461 bp)が検出された。配列分析により、このPCR産物が新規の哺乳類MAPキナーゼキナーゼの断片であることが同定された。全長マウスcDNAクローンは、マウス精巣ライブラリー (Stratagene Inc.) をスクリーニングして、単離された。このcDNAクローンの配列は、アプライドシステムズ (Applied Biosystems) モデル373Aを用いて決定した。配列分析により、7つのクローン群が、プロテ

10

20

30

40

50

ンキナーゼと推定されるものをコードする単一の長いオープンリーディングフレームを含むと同定された(図9および図10; 配列番号: 17および配列番号: 18)。インフレームの停止コドンがこれらのクローンの5'および3'領域に検出された。この配列は、プロテインキナーゼサブドメインI~XIを含んでおり、MAPキナーゼキナーゼグループに関連している。この新規のプロテインキナーゼは、MKK7と命名された。MAPキナーゼキナーゼのサブドメインVIIIに存在するリン酸化を活性化する部位は、MKK7に保存されている。MKK7を他の哺乳類MAPキナーゼキナーゼグループメンバーと比較すると、MKK7がJNK活性化因子MKK4と近縁であることが示された。ファージライブラリーから単離された別の1つのcDNAクローンは、他の7つのクローンとは異なっていた。このクローンは、3'非翻訳領域およびMKK7のコード領域を含んでいたが、インフレームの停止コドンを欠く、異なる5'領域を持っていた。このクローンは、MKK7の異なるスプライシングを表わす(MKK7b; 図11; 配列番号: 19)。MKK7b cDNAクローンは、その5'領域中に開始コドンを持たない; したがって、このcDNAは、単離された他のクローンと同じMKK7プロテインキナーゼをコードしている。しかし、MKK7b cDNAクローンが全長クローンでなければ、追加の5'配列がインフレームの開始コドンを含む可能性もある。もしそうならば、MKK7bはM-[?]-SPAPAPSQRAALQLPLA NDGGSRSPPSESSPQHPTPPTRPRH- (配列番号: 33) という配列をMKK7の開始メチオニン(図9)に融合させると予測される。ショウジョウバエのMAPキナーゼキナーゼhepはMKK7と実質的な配列類似性を持っているが、MKK7bのNH₂末端部分は、hepプロテインキナーゼでは保存されていない。3つの別のクローンが、5'および3'領域が異なるMKK7のスプライシング変異体をコードしていた。これらのクローン(MKK7c(図13)、MKK7d(図14)、およびMKK7e(図15))は、5'および3'領域にインフレームの停止コドンが存在するため、全長である。

10

20

【0122】

全長のマウスMKK7 cDNAプローブで、ヒトcDNAライブラリーをスクリーニングした。単一のクローンが同定され、配列決定された。3'末端を持たない部分的MKK7配列が同定された(図12; 配列番号: 25、および配列番号: 26)。配列は、マウスMKK7cと最も相同性が高かった。

【0123】

MKK7、MKK7b、hep、およびヒトMKK7のcDNAの配列は、それぞれ寄託番号U93030、U93031、U93032、AF00319としてジーンバンク(Genbank)に寄託された。

30

【0124】

実施例23. MKK7の発現

MKK7の発現は、異なる組織から単離されたmRNAのノーザンプロット分析によって調べられた。分析は、異なる組織から単離され、変性アガロースゲル電気泳動により分画し、ナイロンメンブレン(Clontech)に移されたポリA+ mRNA(2μg)を用いて行なった。プロットは、[⁻³²P]dATP(Amersham International PLC)を用いたランダムプライマーで標識したMKK4およびMKK7 cDNAでプローブした。

【0125】

MKK7はマウス組織で広範囲に発現されていることが分かった。精巣で2つのMKK7トランスクリプト(4.0 kbおよび1.6 kb)が検出されたのを除き、調べたすべての組織で、単一のMKK7トランスクリプト(約4.0 kb)が検出された。MKK7発現のレベルが最高だったのは、精巣だった。かなりのMKK7発現が、心臓、脳、肺、肝臓、および腎臓で観察された。これは、脳、肝臓、筋肉、心臓、および腎臓でかなりの量の発現が観察されるが、脳でレベルが最高であるMKK4の発現とは対照的だった。MKK4およびMKK7は、共に発現されるが、調べた組織によって、各MAPキナーゼキナーゼの相対的な量は、異なっていた。

40

【0126】

実施例24. インビトロにおける、MKK7によるJNKの特異的活性化

MKK7の特異性を調べるために、インビトロプロテインキナーゼアッセイ法を行なった。MKK7 cDNA(Eco RIおよびPvu II断片)をpGEX-5XL(Pharmacia-LKB)のEco RIおよびSma I部位にサブクローニングして、細菌のMKK7発現ベクターを調製した。アフィニティーク

50

ロマトグラフィーによって、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) 融合蛋白質を精製した (SmithおよびJohnson (1988) Gene 67:31-40)。組換え蛋白質GST-ATF2 (Guptaら (1995) Science 267:389-393)、GST-cJun (Derijard (1994) 上記)、GST-cMyc (Alvarezら (1991) J. Biol. Chem. 266:15277-15285)、GST-ERK2 (Sethら (1992) J. Biol. Chem. 267:24796-24804)、GST-p38 (Raigneaudら (1995) J. Biol. Chem. 270:7420-7426)、および GST-JNK1 (Derijard (1994) 上記) は記述されている。

【0127】

プロテインキナーゼアッセイ法は、キナーゼ緩衝液 (25 mM 4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニエタンスルホン酸塩 (pH 7.4)、25 mM γ -グリセロリン酸塩、25 mM MgCl₂、2 mM ジチオスレイトール、0.1 mM オルトバナジン酸塩) 中で実行された。アッセイ法は、最終容量25 μ lの中に、1 μ gの基質蛋白質および50 μ M [γ -³²P]ATP (10 Ci/mmol) を添加して開始された。25 $^{\circ}$ Cで30分後に、レムリ (Laemmli) サンプル緩衝液を添加して反応は終了した。SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) 後に、オートラジオグラフィーによって基質蛋白質のリン酸化を調べた。

【0128】

組換えMAPキナーゼは、基質ATP [γ -³²P] を用いて、GST (対照) またはGST-MKK7とインキュベートされた。細菌から精製された組換えMKK7の自己リン酸化は観察されなかった。組換えMKK7をMAPキナーゼとインキュベートすると、MKK7はJNK1をリン酸化するが、p38とERK2はリン酸化しないことが示された。MKK7はp38とJNK1によってリン酸化された。MAPキナーゼによるMAPキナーゼキナーゼの逆方向のリン酸化の意義は不明であるが、同様な逆方向リン酸化はMKK4 (Derijard (1995) 上記) およびショウジョウバエJNK活性化因子hep (Sluss (1996) 上記) を用いたキナーゼアッセイ法でも、検出されている。

【0129】

MKK7によるJNK1のリン酸化がプロテインキナーゼ活性を上昇させたかどうかを調べるために、JNK基質としてATF2を使った実験を行った。GST-MKK7は、プロテインキナーゼアッセイ法で組換えJNK1とインキュベートされた。JNK活性は、各アッセイ法にJNKの基質ATF2を含めて、測定された。ATF2はMKK7によってリン酸化されないが、JNK1によって弱くリン酸化される。JNK1とMKK7をインキュベートすると、JNK1がリン酸化され、ATF2のリン酸化が大きく上昇した。このデータは、MKK7がJNK1をリン酸化し、活性化することを示す。この結論を確認するために、JNKの二重のリン酸化のモチーフThr-Pro-TyrをAla-Pro-Pheで置換した効果を調べた。MKK7は変異JNK1 (APF) 蛋白質をリン酸化しなかった。さらに、MKK7は、変異JNK1プロテインキナーゼによるATF2リン酸化を上昇させなかった。したがって、MKK7はインビトロにおけるJNKの活性化因子である。

【0130】

実施例25. インビボにおけるMKK7によるJNKの特異的活性化

インビボにおけるMKK7の特異性を調べるために、コトランスフェクション解析を行なった。CHO細胞は、ウシ胎仔血清 (5% ; Gibco-BRL) を添加したダルベッコ変法イーグル培地で維持された。細胞は、製造元 (Gibco-BRL) の推奨する方法にしたがって、リポフェクタミン試薬を用いてトランスフェクトした (Derijardら (1994) 上記)。細胞に、エピトープタグを付けたJNK1と、空の発現ベクター (対照) またはMKK4もしくはMKK7をコードする発現ベクターをコトランスフェクトした。エピトープタグは、インフルエンザウイルスのヘマグルチニン蛋白質 (HA) に由来する。JNK1は細胞溶解物の免疫沈降によって単離された。細胞は溶解緩衝液 (20 mM Tris (pH 7.4), 1% 登録商標TRITON X-100, 10%グリセロール、137 mM NaCl, 2 mM EDTA, 25 mM γ -グリセロリン酸塩、1 mM オルトバナジン酸ナトリウム、2 mMピロリン酸塩、1 mM PMSF、および10 μ g/mlロイペプチン) で溶解し、4 $^{\circ}$ Cで100,000 x gで15分間遠心した。エピトープタグを付けたプロテインキナーゼは、プロテインGセファロス (Pharmacia-LKB Biotechnology Inc.) に結合した抗HAモノクローナル抗体を用いて、4 $^{\circ}$ Cで3時間インキュベーションし、免疫沈降させた。免疫沈降物は、溶解緩衝液で3回洗った (Guptaら (1995) Science 267:389-393)。基質として[γ -³²P]ATP およびc-Junを用いて、免疫複合体でプロテインキナーゼ活性を測定した。リン酸化反応

の産物は、SDS-PAGE後にオートラジオグラフィーによって可視化した。ERK2およびp38 MAPキナーゼは、共に発現されたMKK7によって活性化されなかった。対照実験では、ERK2とp38 MAPキナーゼが、それぞれの近縁MAPキナーゼキナーゼMKK1およびMKK6で活性化されることが示された。これとは対照に、MKK7はJNK1を活性化した。興味深いことに、同時に発現されたMKK7によるJNK1の活性化は、以前に記述されたJNK活性化因子MKK4によるものよりも、高レベルだった。これらのデータを合わせると、MKK7が培養細胞においてJNKの特異的な活性化因子として機能することが立証される。

【0131】

実施例26. MKK7によるJNKシグナル伝達経路の活性化

JNKシグナル伝達経路は、AP-1転写活性を調節することが知られている。(Whitmarsh (1996) 上記)。MKK7の発現がAP-1の転写活性を上昇させるという仮説を検証するために、最小プロモーター要素の上流に3つのAP-1部位がクローニングされたルシフェラーゼレポーター遺伝子を用いたコトランスフェクション解析を行なった(RinconおよびFlavell (1994) EMBO J. 13:4370-4381)。ルシフェラーゼレポーター遺伝子発現は、レポータープラスミドpTRE-ルシフェラーゼ(Rincon (1994) 上記) 0.5 μgと、ガラクトシダーゼ発現ベクターpCH110 (Pharmacia-LKB) 0.25 μgとを用いたコトランスフェクション解析で測定された。GAL4融合蛋白質を用いた実験は、0.25 μgのpGAL4-ATF2(残基1~109)、0.5 μgのレポータープラスミドpG5E1bLuc、および0.25 μgのpCH110を用いて行なった(Guptaら(1995) 上記)。プロテインキナーゼの効果は、0.3 μgの空の発現ベクターまたはプロテインキナーゼ発現ベクターとのコトランスフェクションによって調べた。ERK2、p38、JNK1、MKK1、MKK3、MKK4、およびMKK6発現ベクターは、記述されている。細胞はトランスフェクション後36時間で回収した。細胞溶解物中のガラクトシダーゼおよびルシフェラーゼの活性は、記述されたようにして測定した(Gupta (1995) 上記)。MKK4、MKK7、またはJNK1が発現されても、AP-1レポーター遺伝子の発現に著しい変化は見られなかった(図16A)。これとは対照に、MKK7とJNK1が同時に発現すると、AP-1に依存するレポーター遺伝子の発現が上昇した。MKK4はMKK7よりも弱くJNKを活性化させるという観察と一致して、MKK4とJNKとが同時に発現すると、AP-1レポーター遺伝子の発現が、MKK7の場合よりも少なく、上昇した(図16A)。これらのデータを合わせると、MKK7がJNKシグナル伝達経路の活性化因子として機能することを示す。

【0132】

転写活性に対するMKK7の効果をさらに調べるために、転写因子ATF2に対するMKK7の影響を探った。以前の研究で、ATF2がJNKシグナル伝達経路の標的であることが示されている(van Damら(1995) 上記; Guptaら(1995) 上記; Livingstoneら(1995) 上記)。JNKはATF2のNH₂末端活性化ドメイン中の2つの部位(Thr-69およびThr-71)をリン酸化し、転写活性を上昇させる。ATF2の活性化ドメインの転写活性をモニターするために、GAL4融合蛋白質戦略を採用した(Gupta (1995) 上記)。レポーター遺伝子の発現を測定すると、MKK4とJNK1が同時に発現すると、転写活性が上昇することが示された(図16B)。MKK7が発現してもレポーター遺伝子発現は同様なレベルで観察されたが、MKK7がJNK1と同時に発現すると、さらに大きな上昇が検出された。転写活性に対して、MKK4と比較してMKK7の方が強い効果を示すということは、JNK活性化に対するMKK7とMKK4の相対的な効果と一致している。レポーター遺伝子発現の上昇がATF2のリン酸化によって仲介されることを確認するために、ATF2リン酸化部位(Thr-69およびThr-71)をAlaに置換した効果を調べた。変異ATF2蛋白質は、MKK4、MKK7、またはJNK1によって調節されない(図16B)。これらのデータを合わせると、MKK7がJNKシグナル伝達経路の生理的な標的を調節し得ることを示す。

【0133】

用途

本発明のMKKポリペプチドおよびポリヌクレオチドは、MKKシグナル伝達経路を調節する試薬の同定に有用である。MKKシグナル伝達経路を調節する試薬は、MKK合成、MKKリン酸化またはMKK活性に対するその影響によって、同定できる。例えば、MKK活性に対する試薬の影響は、上述のインビトロキナーゼアッセイ法によって、測定できる。MKKは成分の反

応を許すような条件下で、試験試薬の存在下および非存在下（対照）でインキュベートし、その後、試験試薬のキナーゼ活性に対する効果を測定する。MKKシグナル伝達経路を阻害する試薬は、MKKを介する疾病の治療に利用できる。MKKシグナル伝達経路を刺激する試薬は、組織におけるプログラムされた細胞死（アポトーシス）の誘導を含め、いくつかの方法に、使用できる。例えば、UVで損傷を受けた細胞の除去は、癌の予防に使用できる。

【0134】

一般に、MKKシグナル伝達経路を阻害する試薬の同定には、キナーゼアッセイ法（例えば、実施例3参照）が使用される。MKK基質および $[\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ のような放射性標識を含む試験システムに、種々の濃度の試薬（例、1.0 nM~100 mM）を添加する。適当な基質分子には、p38、JNK1、JNK2、またはATF2が含まれる。標識リン（例、 $[\text{}^{32}\text{P}]$ または $[\text{}^{33}\text{P}]$ の基質への取り込みを決定し、試験試薬で得られた結果を対照の値と比較する。特に興味深いのは、 $[\text{}^{32}\text{P}]$ の取り込みを約80%またはそれ以上阻害する試薬である。リン酸化は、リン酸化に依存する試薬、例えば、抗体を用いて調べられることもできる。リン酸化依存性抗体は、活性化部位、Ser¹⁹⁸およびThr²⁰²がリン酸化されたMKK7を用いて作製できる。これは、リン酸化されたSer¹⁹⁸およびThr²⁰²を持つMKK7配列に対応する合成ペプチド（例えば、長さ約15アミノ酸）で動物を免疫して実施できる。そのような抗体の生産方法は、当技術分野で周知である。そのような抗体は、組織および細胞抽出物において活性化MKK7の検出（例、ウエスタンブロット）に役立ち、キットとして使用できる可能性がある。

10

【0135】

MKK合成に対する試薬の効果を検定するアッセイ法も、MKKシグナル伝達経路を阻害する化合物の同定に利用できる。MKK発現に対する試験試薬の影響は、例えば、MKKに特異的な抗体を用いたウエスタンブロット分析で測定される。抗体の結合は、オートラジオグラフィまたは化学ルミネセンスによって可視化し、定量する。MKK mRNA発現に対する試験試薬の効果は、例えば、ポリヌクレオチドプローブを用いたノーザンブロット分析、またはポリメラーゼ連鎖反応によって、調べることができる。

20

【0136】

MKKシグナル伝達経路を阻害することが分かった試薬は、MKKを介する疾病の治療に使用できる。そのような試薬は、MKKシグナル伝達経路を阻害するために必要な分子の特異的な特徴を解明するための薬剤デザインにも、有用である。

【0137】

さらに、本発明はMKKを介するストレス関連および炎症性疾患の治療方法も提供する。この方法には、MKK機能を阻害する治療試薬の有効量の投与が含まれる。適当な試薬は、MKK活性または発現のいずれかを阻害する。投与する試薬の濃度は、適当な用量、投与経路、および治療する特定の症状を含め、いくつかの要素によって、決定される。適当な試薬用量は、通常の実験から個々の患者および治療する特定のMKKを介する疾患に必要な最適用量までを含め、当業者に周知の方法によって、決定される。投与に適当で治療に有効な特定の量は、当業者によって簡単に決定される（例、レミントンの薬学(Remington's Pharmaceutical Sciences) 第18版、Gennaro編、Mack Publishing Company、ペンシルベニア州イーストン、1990参照）。用量は約0.1~10 mg/キロ/日の範囲に渡る可能性がある。

30

【0138】

本発明は、ストレス関連および炎症性疾患の急性治療および予防の方法を提供する。例えば、虚血性心疾患は、再灌流後の酸化ストレスおよび虚血の発現時に、治療されると想像される。さらに、虚血のリスクを持つ患者は、虚血症状の発現前に、治療できる。

40

【0139】

別の例では、MKK機能または活性を阻害する治療薬を投与して、TNFおよびIL-1を含む炎症促進型サイトカインの分泌を阻害することにより、炎症反応をコントロールする。

【0140】

ストレスに関連する増殖性疾患も、MKK機能または活性を阻害する治療試薬を投与することによって、本発明の方法により治療できる。そのような治療試薬は、単独または、例えば悪性腫瘍の治療における化学療法剤などの他の治療試薬と組合わせて、使用できる。

50

実際に、本発明によって提供される治療試薬によるストレス活性化MKKのコントロールは、ストレスを誘導する他の治療戦略によって引き起こされる症状を調節できる。

【0141】

採用される治療試薬は、ポリヌクレオチド、ポリペプチド、およびアンチセンスオリゴヌクレオチドおよびリボザイムのような他の分子を含む、MKK機能または活性を阻害する化合物であり、本発明および当技術分野で周知の技術にしたがって製造できるものである。MKKのエピトープに結合するポリクローナルまたはモノクローナル抗体（その断片または誘導体を含む）も、治療試薬として採用できる。基質の結合および/またはリン酸化に関して、効率的にMKKを排除するまたはMKKと競合するMKKのドミナントネガティブ型は、10
プロテインキナーゼ活性を低下させるために使用できる。ドミナントネガティブ型は、当技術分野で周知の方法を用いて、上述（実施例13）のように、プロテインキナーゼの触媒ドメイン内に変異を導入することによって、作製できる。触媒性の残基は、すべてのMKKアイソフォームで保存されている。例えば、Lys⁷⁶の変異は、MKK7の活性を阻害する。同様に、活性化リン酸化の保存された部位（Ser¹⁹⁸、Thr²⁰²）の変異は、MKK7活性を阻害する。これらのMKK7のキナーゼ不活性型は、ドミナントネガティブ阻害剤として作用する。

【0142】

場合によっては、例えばアポトーシスの誘導のように、MKK活性の増加が望ましいことがある。本発明の方法を用いて、MKK機能または活性を増加させる能力のある試薬を同定できる。または、MKKを過剰発現して活性の増加が実現できる。MKKを介する疾病が、MKK発現の不足、または変異MKKポリペプチドの発現を伴う場合には、センスポリヌクレオチド配列（DNAコード鎖）またはMKKポリペプチドを細胞に導入して、正常なMKK活性を増大させることができる。必要ならば、これらの治療法は、投与様式（例、細胞の種類に特異的なウイルスベクターの使用）、または当技術分野で周知の方法により細胞の種類に特異的もしくは誘導可能なプロモーターを持つ組換え構築物にMKK7核酸を入れることによって、特定の細胞が標的となるようにする。例えば、MKK7核酸を含むベクターは、当技術分野で標準的な組換えDNA技術によって、作製できる。ベクターは、哺乳類細胞での複製および発現に使用される、プラスミド、ウイルス、または当技術分野で周知の他のベクターであり得る。MKK7核酸をコードする配列の発現は、哺乳類細胞、好ましくはヒト細胞において当技術分野で周知の任意のプロモーターでよい。そのようなプロモーターは、誘導性または構成性であり得る。そのようなプロモーターには、SV40初期プロモーター領域（Bern10
oistら、Nature 290:304, 1981）；ラウス肉腫ウイルスの3'長い末端反復配列に含まれるプロモーター（Yamamotoら、Cell 22:787-797, 1988）；ヘルペスチミジンキナーゼプロモーター（Wagnerら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:1441, 1981）；またはメタロチオネイン遺伝子の調節配列（Brinsterら、Nature 296:39, 1988）が含まれるが、これらに限定されるわけではない。

【0143】

本発明の抗体は、注射または時間をかけた徐々の注入により、非経口的に投与できる。本発明のモノクローナル抗体は、静脈内、腹腔内、筋肉内、皮下、腔内、または経皮的に投与できる。

【0144】

本発明のポリペプチドまたは抗体の非経口投与用調製物には、無菌の水性または非水性溶液、懸濁液、および乳濁液が含まれる。非水性溶媒の例は、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブ油のような植物油、およびオレイン酸エチルのような注射可能な有機エステルである。水性キャリアには、生理食塩水および緩衝媒体を含む、水、アルコール性/水性溶液、乳濁液、または懸濁液が含まれる。非経口賦形剤には、塩化ナトリウム溶液、リンゲルのブドウ糖、ブドウ糖および塩化ナトリウム、乳酸リンゲル液、または固定油が含まれる。静脈内賦形剤には、液体および栄養補充液、電解質補充液（リンゲルのブドウ糖に基づくものなど）、および同様なものが含まれる。例えば、抗菌剤、抗酸化剤、キレート剤、および不活性ガス、および同様なものなどの、保存剤および他の添加物も、存在する可能性がある。

10

20

30

40

50

【0145】

アンチセンス配列を含むポリヌクレオチド配列は、当技術分野で周知の様々な技術によって、治療用に投与できる。そのような治療法は、MKKポリヌクレオチドをMKKを介する疾病を持つ哺乳類の細胞中に導入することによって、その治療効果を発揮する。MKKポリヌクレオチドの送達は、遊離ポリヌクレオチド、またはキメラウイルスのような組換え発現ベクター、またはコロイド分散系を利用して実施できる。ヌクレオチド配列の治療用送達に特に好ましいのは、標的を定めたりリボソームを利用することである。

【0146】

治療用試薬を、特定の組織にターゲティングすることは、送達効率を上昇させるために望ましい。ターゲティングは、投与経路を通じた受動的な機構によって、実現できる。特定の組織に対して積極的にターゲティングすることもできる。リボソーム、コロイド懸濁液、およびウイルスベクターを利用すると、例えば、標的組織の成分の受容体として働く分子を入れるなど、治療用試薬を含む製剤の組成を変化させることによって、ターゲティングが可能になる。例には、糖、糖脂質、ポリヌクレオチド、または蛋白質が含まれる。これらの分子は、治療用試薬に含まれることができる。または、例えば、この分子をコードするポリヌクレオチドを入れる、またはターゲティング分子を提供するパッケージング系を利用することによって、間接的な方法によって、これらの分子を入れることもできる。本明細書に提供される教示を利用すれば、特定の組織に治療試薬を送達するために、どの分子や手順が有用であるか、当業者は理解するまたは確認するだろう。

【0147】

トランスジェニック動物

MKKポリペプチドは、トランスジェニック動物で発現することができる。これらの動物は、MKKの過剰発現または発現不足によって誘導または増悪される疾患の研究、およびMKKの発現または活性を調節する治療薬の開発のための、モデルシステムとなる。例えば、マウス中でドミナントネガティブで構成的に活性化された対立遺伝子を発現して、生理的機能を立証できる。

【0148】

トランスジェニック動物は、家畜（ブタ、ヤギ、ヒツジ、ウシ、ウマ、ウサギ、および同様なもの）、齧歯類（ラット、モルモット、およびマウスなど）、非ヒト霊長類（例えば、ヒヒ、サル、およびチンパンジー）、およびペット（例、イヌおよびネコ）であり得る。トランスジェニックマウスは、特に好ましい。

【0149】

トランスジェニック動物のファウンダーシステムを作製するために、当技術分野で周知の任意の技術を用いて、MKKトランスジーンを動物に導入することができる。そのような技術には、前核マイクロインジェクション（米国特許第4,873,191号）；レトロウイルスを介した生殖系統への遺伝子移入（Van der Puttenら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:6148, 1985）；胚性肝細胞への遺伝子ターゲティング（Thompsonら、Cell 56:313, 1989）；および胚のエレクトロポレーション（Lo, Mol. Cell. Biol. 3:1803, 1983）が含まれるが、これらに限定されるわけではない。特に有用なのは、Yangら（Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:3004-3009, 1997）に記述される方法である。

【0150】

本発明は、すべての細胞にMKKトランスジーンを持つトランスジェニック動物、および一部の細胞にのみトランスジーンを持つ動物を提供する。すなわち、本発明は、モザイク動物を提供する。トランスジーンは、単一のトランスジーン、または例えば、逆方向もしくは同方向に縦につながったコンカテマーとして組み込まれ得る。トランスジーンは、特定のタイプの細胞に選択的に導入および活性化できる（Laskoら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:6232, 1992）。そのような細胞のタイプに特異的な活性化に必要な調節配列は、興味のある特定の細胞のタイプに依存し、当業者には明らかだろう。

【0151】

MKKトランスジーンが内因性MKK遺伝子の染色体部位に組み込まれることが望ましい場合

10

20

30

40

50

には、遺伝子ターゲティングが好ましい。簡単に述べると、そのような技術を使用する場合には、染色体配列との相同組換えによって内因性遺伝子に組み込まれ、その機能を破壊するために、内因性MKK遺伝子と相同なヌクレオチド配列を含むベクターがデザインされる。トランスジーンも、特定のタイプの細胞に選択的に導入され、そのタイプの細胞でのみ内因性MKK遺伝子を不活化することができる (Guら、Science 265:103, 1984)。そのような細胞のタイプに特異的な不活化に必要な調節配列は、興味のある特定の細胞のタイプに依存し、当業者には明らかだろう。これらの技術は、機能的なMKK遺伝子を持たない「ノックアウト」の調製に有用である。

【0152】

トランスジェニック動物が作製されたら、標準的な方法で、組換えMKK遺伝子の発現を解析できる。最初のスクリーニングは、サザンブロット分析またはPCR技術による、トランスジーンを組み込みが起きたかどうかの決定である可能性がある。トランスジェニック動物の組織中でのトランスジーン mRNA 発現のレベルは、動物から得た組織試料のノーザンブロット分析、インサイチュハイブリダイゼーション分析、およびRT-PCRを含むが、これらに限定されることのない技術を用いても、評価できる。MKK遺伝子発現組織の試料は、MKKトランスジーン産物に特異的な抗体を用いて免疫組織化学的にも、評価できる。

【0153】

トランスジェニック動物の作製および評価に使用できる技術の総説には、当業者はGordon (Intl. Rev. Cytol. 115:171-229, 1989)を参照し、例えば、Hoganら、(マウス胚の操作(Manipulating the Mouse Embryo), Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, 1986)、Krimpenfortら (Bio/Technology 9:86, 1991)、Palmiterら (Cell 41:343, 1985)、Kraemerら (初期哺乳類胚の遺伝子操作(Genetic Manipulation of the Early Mammalian Embryo), Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, 1985)、Hammerら (Nature 315:680, 1985)、Purcellら (Science, 224:1281, 1986)、Wagnerら (米国特許第5,175,385号)、およびKrimpenfortら (米国特許第5,175,384号)から、さらに手引きを得ることができる可能性がある (最後の2つは、参照として本明細書に組み入れられる)。

【0154】

他の態様

本発明はその詳細な説明と関連して説明されてきたが、上述の説明は、添付の請求の範囲によって定義される本発明の範囲を明らかにするためのもので、それを制限する意図はないことを理解する必要がある。他の局面、利点、および修正は、請求の範囲内である。

【図面の簡単な説明】

【0155】

【図1】図1はMKK3 (配列番号:2)、MKK4- (配列番号:6)、ヒトMAPキナーゼキナーゼMEK1 (配列番号:11) およびMEK2 (配列番号:12)、ならびに酵母HOG1 MAPキナーゼキナーゼPBS2 (配列番号:13) のアミノ酸配列を比較したものである。配列は、PILE-UPプログラム (バージョン7.2; Wisconsin Genetics Computer Group) を用いて比較した。蛋白質配列は、1文字コード (A, Ala; C, Cys; D, Asp; E, Glu; F, Phe; G, Gly; H, His; I, Ile; K, Lys; L, Leu; M, Met; N, Asn; P, Pro; Q, Gln; R, Arg; S, Ser; T, Thr; V, Val; W, Trp および Y, Tyr) で示されている。PBS2配列は、NH₂-(<) および COOH-(>) 末端の両方で切断されている。整合を最適化するために配列に導入されたギャップは、ハイフンで示されている。同一の残基は、ピリオドで示されている。MEK中の活性化リン酸化の部位は、アスタリスクで示されている。

【図2A】図2Aは、ヒトおよび酵母のMAPキナーゼキナーゼのメンバーの間の関係を示す樹状図である。樹状図は、算術平均を用いて、無加重のペアグループ法によって、作製された (PILE-UPプログラム)。ヒト (hu) MAPキナーゼキナーゼMEK1、MEK2、MEK3、およびMEK4; *Sccharomyces cerevisiae* (サッカロミセス・セレビジエ) (sc) MAPキナーゼキナーゼPBS2、MKK1、およびSTE7; および *Sccharomyces pombe* (サッカロミセス・ポンベ) (sp) MAPキナーゼキナーゼWIS1 およびBYR1が示されている。

10

20

30

40

50

【図 2 B】図2Bは、MKKの間の関係を示す樹状図である。樹状図は、図2Aのようにして作製された。

【図 3】図3は、ERK、p38、およびJNKシグナル伝達経路を模式図で表わしたものである。MEK1およびMEK2は、MAPキナーゼのERKサブグループの活性化因子である。MKK3およびMKK4は、p38 MAPキナーゼの活性化因子である。MKK4は、MAPキナーゼのp38およびJNKサブグループの両方の活性化因子であると同定されている。

【図 4 A】図4A～4Dは、MKK3の核酸配列（配列番号：1）およびアミノ酸配列（配列番号：2）を表わしたものである。

【図 4 B】図4Aの続きを示す図である。

【図 4 C】図4Bの続きを示す図である。

【図 4 D】図4Cの続きを示す図である。

【図 5 A】図5A～5Cは、MKK6の核酸配列（配列番号：3）およびアミノ酸配列（配列番号：4）を表わしたものである。

【図 5 B】図5Aの続きを示す図である。

【図 5 C】図5Bの続きを示す図である。

【図 6 A】図6A～6Fは、MKK4 の核酸配列（配列番号：5）およびアミノ酸配列（配列番号：6）を表わしたものである。

【図 6 B】図6Aの続きを示す図である。

【図 6 C】図6Bの続きを示す図である。

【図 6 D】図6Cの続きを示す図である。

【図 6 E】図6Dの続きを示す図である。

【図 6 F】図6Eの続きを示す図である。

【図 7 A】図7A～7Fは、MKK4 の核酸配列（配列番号：7）およびアミノ酸配列（配列番号：8）を表わしたものである。

【図 7 B】図7Aの続きを示す図である。

【図 7 C】図7Bの続きを示す図である。

【図 7 D】図7Cの続きを示す図である。

【図 7 E】図7Dの続きを示す図である。

【図 7 F】図7Eの続きを示す図である。

【図 8 A】図8A～8Fは、MKK4 の核酸配列（配列番号：9）およびアミノ酸配列（配列番号：10）を表わしたものである。

【図 8 B】図8Aの続きを示す図である。

【図 8 C】図8Bの続きを示す図である。

【図 8 D】図8Cの続きを示す図である。

【図 8 E】図8Dの続きを示す図である。

【図 8 F】図8Eの続きを示す図である。

【図 9 A】図9は、PILE-UPプログラム（バージョン7.2；Wisconsin Genetics Computer Group）を用いて、MKK7（配列番号：18）の推定される一次構造を、hep（配列番号：21）、MAPキナーゼキナーゼMEK1（MKK1；配列番号：11）、MEK2（MKK2；配列番号：12）、MKK3（配列番号：2）、MKK4（配列番号：10）、MKK5（配列番号：22）、およびMKK6（配列番号：4）と比較したものである。整合を最適化するために配列に導入されたギャップは、ハイフン(-)で示されている。同一の残基は、ピリオド(.)で示されている。MAPキナーゼキナーゼ（2、27、37、および38）中の活性化リン酸化の部位は、アスタリスク(*)で示されている。

【図 9 B】図9Aの続きを示す図である。

【図 10 A】図10A～10Dは、MKK7の核酸配列（配列番号：17）およびアミノ酸配列（配列番号：18）を表わしたものである。

【図 10 B】図10Aの続きを示す図である。

【図 10 C】図10Bの続きを示す図である。

【図 10 D】図10Cの続きを示す図である。

10

20

30

40

50

【図 1 1 A】図11A～11Dは、MKK7bの核酸配列（配列番号：19）およびアミノ酸配列（配列番号：20）を表わしたものである。

【図 1 1 B】図11Aの続きを示す図である。

【図 1 1 C】図11Bの続きを示す図である。

【図 1 1 D】図11Cの続きを示す図である。

【図 1 2 A】図12A～12Bは、ヒトMKK7の核酸配列（配列番号：25）およびアミノ酸配列（配列番号：26）を表わしたものである。

【図 1 2 B】図12Aの続きを示す図である。

【図 1 3 A】図13A～13Dは、マウスMKK7cの核酸配列（配列番号：27）およびアミノ酸配列（配列番号：28）を表わしたものである。

10

【図 1 3 B】図13Aの続きを示す図である。

【図 1 3 C】図13Bの続きを示す図である。

【図 1 3 D】図13Cの続きを示す図である。

【図 1 4 A】図14A～14Dは、マウスMKK7dの核酸配列（配列番号：29）およびアミノ酸配列（配列番号：30）を表わしたものである。

【図 1 4 B】図14Aの続きを示す図である。

【図 1 4 C】図14Bの続きを示す図である。

【図 1 4 D】図14Cの続きを示す図である。

【図 1 5 A】図15A～15Dは、マウスMKK7eの核酸配列（配列番号：31）およびアミノ酸配列（配列番号：32）を表わしたものである。

20

【図 1 5 B】図15Aの続きを示す図である。

【図 1 5 C】図15Bの続きを示す図である。

【図 1 5 D】図15Cの続きを示す図である。

【図 1 6】図16Aは、細胞にAP-1レポータープラスミドpTRE-ルシフェラーゼと、MKK4、MKK7、JNK1、JNK1 (APF) の発現ベクターまたは対照ベクターとを、コトランスフェクトしたトランスフェクション解析のデータのグラフである。図16Bは、細胞にGAL4-ATF2融合ベクターと、MKK4、MKK7、JNK1、JNK1 (APF) の発現ベクターまたは対照ベクターとを、コトランスフェクトしたトランスフェクション解析のグラフである。

【 4 B 】

600 605 610 615 620 625 630 635 640
 GGC AGC GTC GAC TGT TTC TAC ACT GTC ACC TTC TAC GGG GCA GTA TTC
 GCG TGC CAG CTC ACA AAG ATG TGA CAG TGG AAG ATG CCC GGT GAT AAG
 Arg Thr Val Asp Cys Phe Tyr Thr Val Thr Phe Tyr Gly Ala Leu Phe>
 645 650 655 660 665 670 675 680 685 690
 AGA GAG GGA GAC GTG TGG ATC TGC ATG GAG CTC GAC ACA TCC TGG
 TCT CTC CTT CTG CAC ACC TAG ACC TAC CTC GAG TAC CTG TGT AAG AAC
 Arg Glu Gly Asp Val Trp Ile Cys Met Glu Leu Met Asp Thr Ser Leu>
 695 700 705 710 715 720 725 730 735
 GAC AAG TTC TAC CCG AAG GTG CTG GAT AAA AAC ATG ACA ATT TCA GAG
 CTG TTC AAG ATG GCG TTC CAC GAC CTA TTT TGG TAC TGT TAA GGT CTC
 Asp Lys Phe Tyr Arg Lys Val Leu Asp Lys Asn Met Thr Ile Pro Glu>
 740 745 750 755 760 765 770 775 780 785
 GAC ATC CTT GGG GAG ATT GGT GTG TCT ATC GTG CCG GCG CTG GAC CAT
 CTG TAG GAA CCC CTC TAA CGA CAC AGA TAG CAC GCG CCG GAC CTC GTA
 Asp Ile Leu Gly Glu Ile Ala Val Ser Ile Val Arg Ala Leu Glu His>
 790 795 900 905 910 915 920 925 930 935
 CTG CAC AGC AAG CTG TCG GTG ATC CAC AGA GAT GTG AAG CCC TCC AAT
 GAC GTG TCG TTC GAC AGC CAC TAG GTG TCT CTA CAC TTC GGG AGG TTA
 Leu His Ser Lys Leu Ser Val Ile His Arg Asp Val Lys Pro Ser Asn>
 840 845 850 855 860 865 870 875 880
 GTC CTT ATC AAC AAG GAG GGC CAT GTG AAG ATG TGT GAT TTT GGC ATC
 CAG GAA TAG TTT TTC CTC CCG GTA CAC TTC TAC ACA CTG AAA CCG TGG
 Val Leu Ile Asn Lys Glu Gly His Val Lys Val Lys Met Cys Asp Phe Ile>
 885 890 895 900 905 910 915 920 925 930
 AGT GGC TAC TTT GTG GAC TCT GTG CCG AAG ACC ATG GAT GCG GCG TGC
 TCA CCG ATG AAC CAC CTG AGA CAC CCG TTC TGC TAC CTA CCG CCG ACG
 Ser Gly Tyr Leu Val Asp Ser Val Ala Lys Thr Met Asp Ala Gly Cys>
 935 940 945 950 955 960 965 970 975
 AAG CCC TAC ATG GGC CTT GAG ACG ATC AAC CCA GAG CTC AAC CAG AAG
 TTC CCG ATG TAC CCG GCA CTG TCC TAG TTT GGT CTC GAC TTG GTG CTC
 Lys Pro Tyr Met Ala Pro Glu Arg Ile Asn Pro Glu Leu Asn Glu Lys>
 980 985 990 995 1000 1005 1010 1015 1020 1025
 GGC TAC AAT GTC AAG TGC GAC GTC TGG ACC CTG GGC ATC ACC ATG ATT
 CCG ATG TTA CAG TTC AAG CTG CAG ACC TCG GAC CCG TAG TGG TAC TAA
 Gly Tyr Asn Val Lys Ser Asp Val Ile Thr Met Ile>
 1030 1035 1040 1045 1050 1055 1060 1065 1070 1075
 GAC ATG GGC ATC CTG CCG TTC CCT TAC GAC TCC TGG GGG ACC CCG TTC
 CTG TAC CCG TAG GAC GGC AAG GGA ATG CTC AGG ACC CCC TGG GGC AAG
 Glu Met Ala Ile Leu Arg Phe Pro Tyr Glu Ser Trp Gly Thr Pro Phe>
 1080 1085 1090 1095 1100 1105 1110 1115 1120

【 4 C 】

CAG CAG CTG AAG CAG GTG CTG GAG GAG GCG TCC CCC CAG CTC CCA GCG
 GTC CTC GAC TTC CTC GAG CAC CTC CTC GCG AGG GGG CTC GAG GGT CCG
 Glu Glu Leu Lys Glu Val Val Glu Glu Pro Ser Pro Glu Leu Pro>
 1125 1130 1135 1140 1145 1150 1155 1160 1165 1170
 GAC CCG TTC TCC CCG GAG TTT GTG GAC TTC ACT GCT GAG TCC CTG AGG
 CTG GCA AAG AGG GGG CTC AAA CAC CTG AAG TGA CGA GTC ACC GAC TCC
 Asp Arg Phe Ser Pro Glu Phe Val Asp Phe Thr Ala Glu Cys Leu Arg>
 1175 1180 1185 1190 1195 1200 1205 1210 1215
 AAG AAC CCC GCA GAG CCG ATG ACC TAC CTC GAG CTG ATG GAG CAC CTC
 TTC TTG GGG CTT CTC GCA TAC TCG ATG GAC CTG GAC TAC CTC CTG GGG
 Lys Asn Pro Ala Glu Arg Met Ser Tyr Leu Glu Leu Met Glu His Pro>
 1220 1225 1230 1235 1240 1245 1250 1255 1260 1265
 TTC TTC ACC TTC CAC AAA ACC AAG AAC AGC GAC ATT GCT GCG TTC CTG
 AAG AAG TGG AIC GTG TTT TGG TTC TTC TCC CTG TAA GCA CCG AAG GAC
 Phe Phe Thr Leu His Lys Thr Lys Lys Thr Asp Ile Ala Ala Phe Val>
 1270 1275 1280 1285 1290 1295 1300 1305 1310 1315 1320
 AAG AAG TAC TTT TGG TGA TGA TGA TGA TGA TGA TGA TGA TGA TGA TGA TGA
 TTC TTC TAG GAC CCG CTT CTT GGT ATCCCCGAC CCGAGCCCTG GGGTGAAGCC
 Lys Lys Ile Leu Gly Glu Asp Ser> (SEQ ID NO:2)
 1325 1330 1335 1340 1345 1350 1355 1360 1365 1370 1375 1380
 CCGTCCAGAG CCGTCCAGCC CCGTCCAGCC CCGTCCAGCC CCGTCCAGCC CCGTCCAGCC
 GGGAGGCTTC GGGAGGCTTC GGGAGGCTTC GGGAGGCTTC GGGAGGCTTC GGGAGGCTTC
 1385 1390 1395 1400 1405 1410 1415 1420 1425 1430 1435 1440
 CCGTCCAGCC CCGTCCAGCC CCGTCCAGCC CCGTCCAGCC CCGTCCAGCC CCGTCCAGCC
 CCGTCCAGCC CCGTCCAGCC CCGTCCAGCC CCGTCCAGCC CCGTCCAGCC CCGTCCAGCC
 1445 1450 1455 1460 1465 1470 1475 1480 1485 1490 1495 1500
 CCGTCCAGCC CCGTCCAGCC CCGTCCAGCC CCGTCCAGCC CCGTCCAGCC CCGTCCAGCC
 CCGTCCAGCC CCGTCCAGCC CCGTCCAGCC CCGTCCAGCC CCGTCCAGCC CCGTCCAGCC
 1505 1510 1515 1520 1525 1530 1535 1540 1545 1550 1555 1560
 CCGTCCAGCC CCGTCCAGCC CCGTCCAGCC CCGTCCAGCC CCGTCCAGCC CCGTCCAGCC
 CCGTCCAGCC CCGTCCAGCC CCGTCCAGCC CCGTCCAGCC CCGTCCAGCC CCGTCCAGCC
 1565 1570 1575 1580 1585 1590 1595 1600 1605 1610 1615 1620
 CCGTCCAGCC CCGTCCAGCC CCGTCCAGCC CCGTCCAGCC CCGTCCAGCC CCGTCCAGCC
 CCGTCCAGCC CCGTCCAGCC CCGTCCAGCC CCGTCCAGCC CCGTCCAGCC CCGTCCAGCC
 1625 1630 1635 1640 1645 1650 1655 1660 1665 1670 1675 1680
 CCGTCCAGCC CCGTCCAGCC CCGTCCAGCC CCGTCCAGCC CCGTCCAGCC CCGTCCAGCC
 CCGTCCAGCC CCGTCCAGCC CCGTCCAGCC CCGTCCAGCC CCGTCCAGCC CCGTCCAGCC
 1685 1690 1695 1700 1705 1710 1715 1720 1725 1730 1735 1740
 CCGTCCAGCC CCGTCCAGCC CCGTCCAGCC CCGTCCAGCC CCGTCCAGCC CCGTCCAGCC
 CCGTCCAGCC CCGTCCAGCC CCGTCCAGCC CCGTCCAGCC CCGTCCAGCC CCGTCCAGCC

【 4 D 】

AAAAAATTAG AGAGCTGACT TACCTGAAAC GTGTGAAACC GGGTCCACAC GGTGTGAGAA
 1745 1750 1755 1760 1765 1770 1775 1780 1785 1790 1795 1800
 ATCCCCGCTT TGGTCCGCGG TACACAAAGG GGGATGATTT GTGTGAAATC CCGAAGACTG
 TGGGGCGAAA ACCAGCGCCC ATGTGTTTTC CCGTACTGTA CAGACTTATG GGGTGTGAGG
 1805 1810 1815 1820 1825 1830 1835 1840 1845 1850 1855 1860
 CCGTCCAGCC GATCCCATGA CCGCGCCGAG GCGTCCGCTT GCGACTGCGA AACAGGCGCT
 GGTACTCCCT CCGAGCTACT CCGCGCCGCT CCGAAGGCGA CCGTCCAGCC TTTTCCCGAA
 1865 1870 1875 1880 1885 1890 1895 1900 1905 1910 1915 1920
 CCGCGGACCA CACTCCGCTA CCGAGCTGCG CCGCGCCGCG TTTTCCGCTT CAGTCCAGCT
 GAGCGCTCTT CCGAGCTACT CCGTCCAGCC AACAGGCGA AACAGGCGA GTTAACTGGA
 1925 1930 1935 1940 1945 1950 1955 1960 1965 1970 1975 1980
 TCGTCCGCTT TTTAAATTAT CCGTCCGCTA TTTTCCGCTT TCGTCCAGCT CAGTCCAGCT
 AAGCAAAAAA AAATTAAGTA GAGAGCAACT AAAAAGAAAA AGAATAATCC CAAACCGAAC
 1985 1990 1995 2000 2005 2010 2015 2020 2025 2030
 TTTTCCGCTT ATGGTTGGA CCGTCCGCTT TTTTCCGCTT CCGTCCAGCT CCGTCCAGCT
 AAAAAGAAC TACAAACT CAGTCCAGCT AAGAGGCGG GGGGATCCC (例)番号:1)

【 5 A 】

5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60
 TAGCTCCAGC ACAGCTCTTC CTAAGCTTTC AACTGGGGGA AAATTCAGTT TCGAGCTTCT
 ATCCAGCTGC TGTCCGAGGG GATTCGAGGG TTAGCCGCTT TTTTGGGAAA AGCTTAGACA
 65 70 75 80 85 90 95 100 105 110 115 120
 TTTCCAGCTT GTCCATTTTC ATCTTGATTC CCGTAAAGTC CAGTCTCTGC ATCGCTGATC
 AAAGCTTCTA CAGTAAAGG TGAAGCTTAG GAGCTTTTAC GTTAGAGGAG CTTAGCCAGC
 125 130 135 140 145 150 155 160 165 170 175 180
 AGAACTCCCA CTTCCATGAA GATTCGAGCC GTCCAGCTTC CAGTCTTCTT GCAAACTGAT
 TCTTTGAGGT GAGGCTACTT CTAAGCTTTC GAGCTGAGC GTTAGAACAAG CCGTTTCCCG
 185 190 195 200 205 210 215 220 225 230 235 240
 CTACAGAAAG GAAGCAAGCC AAAGTCTTTT GTCTCTCCCT CCGCCATCAA AGAAGAGGGG
 GAGTCTTCTT CTTGTTTCCG TTTGCAAAA CAGAGGGGGA GGGGGTATTT TCGTTTCCCG
 245 250 255 260 265 270 275 280 285
 AAA ATG TCT CAG TCG AAA GGC AAG AAG CGA AAC CCG GCG CTT AAA ATT
 TTT TAC AGA GTC ACC TTT CCG TTC TTA GCT GCT TTG GGA CCG GAA TTT TAA
 Met Ser Glu Ser Lys Gly Lys Lys Arg Asn Pro Gly Leu Lys Ile>
 290 295 300 305 310 315 320 325 330 335
 CCA AAA GAA GCA TTT GAA CAA CCG CAG ACC AGT TTC ACA CCA CCA CCA
 GGT TTT CTT CTT AAA CTT GTT GGA GTC TCG TCA AGG TGT GGT GAA TTT
 Pro Lys Glu Ala Phe Glu Glu Pro Glu Thr Ser Ser Thr Pro Pro Arg>
 340 345 350 355 360 365 370 375 380
 GAT TTA GAC TCC AAG GGT TGC ATT TCT ATT GGA AAT CAG AAC TTT GAG
 CTA AAT CTG AGG TTC GCA AGG TAA AGA TAA CCT TTA CTC TTG AAA CTC
 Asp Leu Asp Ser Lys Ala Cys Ile Ser Ile Gly Asn Glu Asn Phe Glu>
 385 390 395 400 405 410 415 420 425 430
 GTG AAG GCA GAT GAC CTG GAG CCG ATA ATG GAA CTG GGA GCA GGT GCG
 CAC TTC CCG CTA CTG GAC CTC GAA TAT TAC CTT GAC CCG GCT CCA CCG
 Val Lys Ala Asp Asp Leu Glu Pro Ile Met Glu Leu Gly Arg Gly Ala>
 435 440 445 450 455 460 465 470 475 480
 TAC GGG GTG GTG GAG AAG ATG CCG CAC GTG CCC AGC GGG CAG ATC ATG
 TAC CCG CAC GAC CTC TTC TAC GCG CTG CAC GCG TCG CCG GTG TAG TAC
 Tyr Gly Val Val Glu Lys Met Arg His Val Pro Ser Gly Glu Ile Met>
 485 490 495 500 505 510 515 520 525
 GCA GTG AAG GCG ATT CGA GCG ACA GTA AAT ACC CAG GAA CAG AAA CCG
 CCG CAC TTC GCG TAG CCG GGT TGT GAT TTA TCG GTC CTT GCT TTT GCG
 Ala Val Lys Arg Ile Arg Ala Thr Val Asn Ser Glu Glu Lys Arg>
 530 535 540 545 550 555 560 565 570 575
 CTA CTG ATG GAT TTG GAT ATT TCC ATG ACG ACG GTG GAC TGT CCA TTC
 GAT GAC TAC CTA AAC CTA TAA AGG TAC TCC TCC CAC CTG ACA GGT AAG

【 5 B 】

Leu Leu Met Asp Leu Asp Ile Ser Met Arg Thr Val Asp Cys Pro Phe>
 580 585 590 595 600 605 610 615 620
 ACT GTC ACC TTT TAT GGC CGA CTG TTT GGG GAG GGT GAT GTC TGG ATC
 TGA CAG TGG AAA ATA CCG CCG GAC AAA GCG CCG CCA CTA CAC ACC TAG
 Thr Val Thr Phe Tyr Gly Ala Leu Phe Arg Glu Gly Asp Val Trp Ile>
 625 630 635 640 645 650 655 660 665 670
 TGC ATG GAG CTC ATG GAT NCA CTA CTA GAT AAA TTC TAC AAA CAA GTT
 ACC TAC CCG TAC TCC TGT AGT GAT CTA TTT AAG ATG TTT CCG CAA
 Cys Met Glu Leu Met Asp Thr Ser Leu Asp Lys Phe Tyr Lys Glu Val>
 675 680 685 690 695 700 705 710 715 720
 ATT GAT AAA GGC GAG ACA ATT CCA GAG GAG ATC TTA GGG AAA ATA GCA
 TAA CTA TTT CCG GTC CCG TAA GGT CCG CTG TAG AAT CCG TTT TAT CCG
 Ile Asp Lys Gly Glu Thr Ile Pro Glu Asp Ile Leu Gly Lys Ile Ala>
 725 730 735 740 745 750 755 760 765
 GTT TTT ATT GTA AAA GCA TCA GAA CAT TTA CAT AGT AAG CTG TCT GTC
 CAA AGA TAA CAT TTT CCG AAT CCG GAT AAT GTA TCA TCA TGC AGA CAG
 Val Ser Ile Val Lys Ala Leu Glu His Leu His Ser Lys Leu Ser Val>
 770 775 780 785 790 795 800 805 810 815
 ATT CAC AGA GAC CTC AAG CCG TCT AAT GTA CTC ATC AAT CCG CTC GGT
 TAA GTG TGT CTG CAG TTC CGA AGA TTA CAT GAG TAG TTA CGA GAG CCA
 Ile His Arg Asp Val Lys Pro Ser Asn Val Leu Ile Asn Ala Leu Gly>
 820 825 830 835 840 845 850 855 860
 CAA GTC AAG ATG TGC GAT TTT GGA ATC AGT GGC TAC TTG GTG GAC TCT
 GTT CAC TTC TAC ACC GTA AAA CCT TAG TCA CCG ATG AAC CAC CTG AGA
 Glu Val Lys Met Cys Asp Phe Gly Ile Ser Gly Tyr Leu Val Asp Ser>
 865 870 875 880 885 890 895 900 905 910
 GTT GCT AAA ACA ATT GAT GCA GGT TGC AAA CCA TAC ATC GGC CCG GAA
 GAA GCA TTT TGT TAA CTA CTA CCG TTA GCG AGC TTT ATG TAC CGG GCA CTT
 Val Ala Lys Thr Ile Asp Ala Gly Cys Lys Pro Tyr Met Ala Pro Glu>
 915 920 925 930 935 940 945 950 955 960
 AGA ATA AAC CCA CAG CTC AAC CAG AAG GAC TAC AGT CTC AAG TCT GAC
 TCT TAT TTG GGT CTC GAG TTG GTC TCT CCG ATG TCA CAC TTC AGA CTG
 Arg Ile Asn Pro Glu Leu Asn Glu Lys Gly Tyr Ser Val Lys Ser Asp>
 965 970 975 980 985 990 995 1000 1005
 ATT TGG AGT CTC GGC ATC ACC ATG ATT GAG TTG GGC ATC CTT GAA TTT
 TAA ACC TCA GAC CCG TAG TCC TAC TAA CTC AAC CCG TAG GAA GCT AAA
 Ile Trp Ser Leu Gly Ile Thr Met Ile Glu Leu Ala Ile Leu Arg Phe>
 1010 1015 1020 1025 1030 1035 1040 1045 1050 1055
 CCC TAT GAT TCA TGG GGA ACT CCA TTT CAG CAG CTC AAA GAG GTG GTA
 GGG ATA CTA AGT ACC CCG TTA GGT AAA GTC CTC GAG TTT CTC CAC GAT
 Pro Tyr Asp Ser Trp Gly Thr Pro Phe Glu Glu Leu Lys Glu Val Val>

【 5 C 】

1060 1065 1070 1075 1080 1085 1090 1095 1100
 GAG GAG CCA TCG CCA CAA CTC CCA GCA GAC AAG TTC TCT GCA GAG TTT
 CTC CTC GGT AGC GAT GGT GAG GGT GGT GGT CTC TTC AAG AGA CGT CTC AAA
 Glu Glu Pro Ser Pro Glu Leu Pro Ala Asp Lys Phe Ser Ala Glu Phe>
 1105 1110 1115 1120 1125 1130 1135 1140 1145 1150
 GTT GAC TTT ACC TCA CAG TCC CTA AAG AAG AAT TCC AAA GAA CCG CCG
 CAA CTG AAA TGG AGT GTC ACG AAT TTC TTC TTA AGG TTT CTT GCG GGA
 Val Asp Phe Thr Ser Glu Leu Met Glu His Pro Phe Thr Leu His Glu Ser>
 1155 1160 1165 1170 1175 1180 1185 1190 1195 1200
 ACA TAC CCA GAG CTA ATG CAA CAT CCA TTT TTC ACC CTA CAT GAA TCC
 TGT ATG GGT CTC GAT TAC GGT GTA GGT AAA AAG TGG GAT GTA CTT AGG
 Thr Tyr Pro Glu Leu Met Glu His Pro Phe Thr Leu His Glu Ser>
 1205 1210 1215 1220 1225 1230 1235 1240 1245 1250
 AAA GGA ACA GAT GTG GCA TCT TTT GTA AAA CTG ATT CTT GGA GAC TAAA
 TTT CCG TGT CTA CAC CGT AGA AAA CAT TTT GAC TAA GAA CCG CCG ATTTT
 Lys Gly Thr Asp Val Ala Ser Phe Val Lys Leu Ile Leu Gly Asp>
 1255 1260 1265 1270 1275 1280 1285 1290 1295 1300 1305 1310
 AGCAGTGGAC TTAATCGGTT GACCTACTG TGGATTGGTG GGTTCGGGG TGAGCAAGT
 TCGTCACTG AATTAAGCAA CTGGGATGAC ACCTAAAGCC ACAAAGCCCG ACTTCGTCA
 1315 1320 1325 1330 1335 1340 1345 1350 1355 1360 1365 1370
 TCCTACAGC ATCAATAGAA AGTCATCTTT GAGATAATTT AACCTCGCT CTGAGAGGT
 AGTATGTCG TAGTATCTT TCAGTAGAAA CTTATATRAA TTGGAGCGA GAGTCTCCCA
 1375 1380 1385 1390 1395 1400 1405 1410 1415 1420 1425 1430
 TTTCTCTCCG AATTTCTCTT TTAATCTCCG TCTTAAGGGG GCTTTGGAGT CTAATGATTA
 AAAGAGAGGG TTAAGAGAAA AATGAGGGGG AGAATTCGCC CGAAGCTTA GATATGATAT
 1435 1440 1445 1450 1455 1460 1465 1470 1475 1480 1485 1490
 GATGAACTG TCTAGATGA TGAATTATGA TAAAGCGCTA GGACTCTAAA AGCTGATTA
 CTAATCTGAC AGATCTACCT ACTTAATGCT ATTTCCGAA CCGTAGGTT TCGATATAT
 1495 1500 1505 1510 1515 1520 1525 1530 1535 1540 1545 1550
 ATATTTAATG ATGTGTCATA TGAGTCTTCA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA
 TTTAATATCA TACAGATAT ACTGAGGAGT TTTTCTTTCT TTTTCTTTCT TTTTCTTTCT
 1555 1560 1565 1570 1575 1580 1585 1590 1595 1600
 AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AA (配列番号:3)
 TTTTCTTTCT TTTTCTTTCT TTTTCTTTCT TTTTCTTTCT TTTTCTTTCT CT

【 6 A 】

5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55
 CTAAGGTCCT CCGCCCGCAG CCACCGCGCC CTACAGCAGC ATG CAG GGT AAA CCG AAA
 GATCCACAGG CCGCCCGCCT GGTGGCCCGC CAGTCGTCT TAC GTC CCA TTT CCG TTT
 Met Glu Gly Lys Arg Lys>
 60 65 70 75 80 85 90 95 100 105
 GCA CTG AAG TTT AAT TTT GCA AAT CCA CCG TTC AAA TCT ACA GCA AGG
 CCG GAC TTC TAC TTA AAA CCG TTA GCG GGT GGA AAG TTT AGA TGT CTT TCC
 Ala Leu Lys Leu Asn Phe Ala Asn Pro Phe Lys Ser Thr Ala Asp>
 110 115 120 125 130 135 140 145 150
 TTT ACT CTG AAT CCG AAT CCG ACA GGA GTT CAA AAC CCA CAC ATA GAG
 AAA TGA GAC TTA GGG TTA GGA TGT CCA GGT GGA AAG TTT AGA TGT CTT TCC
 Phe Thr Leu Asn Pro Asn Pro Thr Gly Val Glu Asn Pro His Ile Glu>
 155 160 165 170 175 180 185 190 195 200
 AGA CTG AGA ACA CAC AGC ATT GAT TCA TCA GGA AAA CTG AAG ATC TCC
 TCT GAC TCT TGT GTG TCG TAA CTC AGT AGT CCG TTT GAC TTC TAG AGG
 Arg Leu Arg Thr His Ser Ile Glu Ser Ser Gly Lys Leu Lys Ile Ser>
 205 210 215 220 225 230 235 240 245
 CCG GAA CAA CAC TGG GAT TTT ACT GCA GAG GAC TTG AAA GAC CCG GGA
 GGA CTT GTC GTG ACC CTA AAG TAC CCG CTC CTG AAC TTT CCG GAA CCG
 Pro Glu Glu His Trp Asp Phe Thr Ala Glu Asp Leu Lys Asp Leu Gly>
 250 255 260 265 270 275 280 285 290 295
 GAA ATT GCA GCA GCA GCT TAT CCG TTT GTC AAC AAA ATG CTC CAC AAA
 CTT TAA CCG CCG CCG TTA GGA TGT CCA GGT GGA AAG TTT TAC CAG GTG TTT
 Glu Ile Gly Arg Gly Ala Tyr Gly Ser Val Asn Lys Met Val His Lys>
 300 305 310 315 320 325 330 335 340 345
 CCA ACT GGG CAA ATA ATG GCA GTT AAA AGA ATT CCG TCA ACA GTG GAT
 GGT TCA CCG GTT TAT TAC CCG CAA TTT TCT TAA GCG AGT TGT CAC CTA
 Pro Ser Gly Glu Ile Met Ala Val Lys Arg Ile Arg Ser Thr Val Asp>
 350 355 360 365 370 375 380 385 390
 GAA AAA GAA CAA AAA CAA CTT CTT ATG GAT TTG GAT GTA GTA ATC CCG
 CTT TTT CTT GTT TTT GTT GAA TAC TCA AAG CTA CAC GAT CAT TAC CCG
 Glu Lys Glu Glu Lys Glu Leu Leu Met Asp Leu Asp Val Val Met Asp>
 395 400 405 410 415 420 425 430 435 440
 AGT AGT GAT TGC CCA TAC ATT GAT CAG TTT TAT GCG GCA CTC TTC AGA
 TCA TCA CTA ACC GGT ATG TAA CAA CCG TTT TAA CCA CCG GAG AAG TCT
 Ser Ser Asp Cys Pro Tyr Ile Val Glu Phe Tyr Gly Ala Leu Phe Arg>
 445 450 455 460 465 470 475 480 485
 GAG GGT GAC TGT TGG ATC TGT ATG GAA CTC ATG TCT ACC TCG TTT GAT
 CTC CCA CTG ACA ACC TAG ACA TAC CTT GAG TAC AGA TGG AGC AAA CTA
 Glu Gly Asp Cys Trp Ile Cys Met Glu Leu Met Ser Thr Ser Phe Asp>

【 6 B 】

490 495 500 505 510 515 520 525 530 535
 AAG TTT TAC AAA TAT GTA TAT AGT GTA TTA GAT GAT GAT ATT CCA GAA
 TTC AAA ATG TTT ATA CAT ATA TCA CAT AAT CTA CTA GAA TAA GGT CTT
 Lys Phe Tyr Lys Tyr Val Tyr Ser Val Leu Asp Asp Val Ile Pro Glu>
 540 545 550 555 560 565 570 575 580 585
 GAA ATT TTA GGC AAA ATC ACT TTA GCA ACT GTC AAA GCA CTA AAC CAC
 CTT GAA AAT CCG TTT CAG TGA AAT CCG TGA CAC TTT CCG GAT TTC GTC
 Glu Ile Leu Gly Lys Ile Thr Leu Ala Thr Val Lys Ala Leu Asp His>
 590 595 600 605 610 615 620 625 630
 TTA AAA GAA AAC TTG AAA ATT ATT CCG AGA GAT ATC AAA CCG TCC AAT
 AAT TTT CTT TTG AAC TTT TAA TAA GTG TCT CTA TAG TTT GGA AGG TTA
 Leu Lys Glu Asn Leu Lys Ile Ile His Arg Asp File Jwy Pro Phe Asn>
 635 640 645 650 655 660 665 670 675 680
 ATT CTT CTG GAC AGA AGT GGA AAT ATT AAG CTC TGT GAC TTT GGC ATC
 TAA GAA GAC CTG TCT TCA CCG TTA TAA TTC GAG ACA CCG AAG CCG TAG
 Ile Leu Leu Asp Arg Ser Gly Asn Ile Lys Leu Cys Asp Phe Gly Ile>
 685 690 695 700 705 710 715 720 725
 AGT GCA CAG CTT GTG GAC TCT ATT CCG AAG ACA AGA GAT CCG GGC TGT
 TCA CCG GTC GAA CAC CTG AGA TAA CCG TTC TGT TCT CTA CCA GAG ACA
 Ser Gly Glu Leu Val Asp Ser Ile Ala Lys Thr Arg Asp Ala Gly Cys>
 730 735 740 745 750 755 760 765 770 775
 AGG CCA TAC ATG GCA CCG GAA AGA ATA GAC CCA AGC GCA TCA CGA GAA
 TCC GGT ATG TAC CCG GGA CTT TGT TAT CTG GGT TCG GGT AGT CCG CTT
 Arg Pro Tyr Met Ala Pro Glu Arg Ile Asp Pro Ser Ala Ser Arg Glu>
 780 785 790 795 800 805 810 815 820 825
 GGA TAT GAT GTC CCG TCT GAT GTC TGG AGT TTG GGG ATC ACA TTC TAT
 CCG ATA CTA CAG CCG AGA CTA CAG ACC TCA AAC CCG TAG TGT AAG ATA
 Gly Tyr Asp Val Arg Ser Asp Val Trp Ser Leu Gly Ile Thr Leu Tyr>
 830 835 840 845 850 855 860 865 870
 GAG TTG GGC ACA GGC CGA TTT CTT TAT CCA AAG TCG AAT AGT GTA TTT
 CTC AAC CCG TTT CCG GCT AAA GCA ATA GGT TTC ACC TTA TCA GAT AAA
 Glu Leu Ala Thr Gly Arg Phe Pro Tyr Pro Lys Trp Asn Ser Val Phe>
 875 880 885 890 895 900 905 910 915 920
 GAT CAA CTA ACA CAA GTC GTG AAA GAA GAT CCG CCG CAG CTG AGT AAT
 CTA GTT GAT TGT GGT CAG CAC TTT CTT CTA GGA GCG GTC GCA TTA
 Asp Glu Leu Thr Glu Val Val Lys Gly Asp Pro Pro Glu Leu Ser Asn>
 925 930 935 940 945 950 955 960 965
 TCT GAG GAA AGG GAA TTC TCC CCG AGT TTC ATC AAC TTT GTC AAC TTG
 ACA CTC CTT TCC CTT AAG AGG GCG TCA AAG TAG TTG AAA CAG TTG AAC
 Ser Glu Glu Arg Glu Phe Ser Pro Ser Phe Ile Asn Phe Val Asn Leu>
 970 975 980 985 990 995 1000 1005 1010 1015

【 6 C 】

TGC CTT AGG AAG GAT GAA TCC AAA AGC CCA AAG TAT AAA GAG CTT CTG
 ACG GAA TCC TTC CTA CTT AGG TTT TCC GGT TTC ATA TTT CTC GAA GAC
 Cys Leu Thr Lys Asp Glu Ser Lys Tyr Lys Glu Leu Leu>

1020 1025 1030 1035 1040 1045 1050 1055 1060 1065

AAA CAT CCC TTT ATT TCG ATG TAT GAA GAA CGT GCC GTT GAG CTC GCA
 TTT GTA GGG AAA TGA AAC TAC ATA CTT CTT GCA CGG CAA CTC CAG COT
 Lys His Pro Phe Ile Leu Met Tyr Glu Glu Arg Ala Val Glu Val Ala>

1070 1075 1080 1085 1090 1095 1100 1105 1110

TGC TAT GTT CTT AAA ATC CTG GAT CAA ATG CCA GCT ACT CCC ACC CTT
 ACG ATA GAA AGA TTT TAG GAC CTA GTT TTC GGT CCA TGA GGG TCG ABA
 Cys Tyr Val Cys Lys Ile Leu Asp Glu Met Pro Ala Thr Pro Ser Ser>

1115 1120 1125 1130 1135 1140 1145 1150 1155 1160 1165 1170

CCC ATG CAT GTC GAT TG ATATGCTTC TACATCAGAC TGTAGAAAA AGGCTCAGA
 GGG TAC ATA CAG CTA AG TATAGCAGC ATGTAGCTCG AGATCTCTTT TCCGACTCT
 Pro Met Tyr Val Asp (配列番号5)

1175 1180 1185 1190 1195 1200 1205 1210 1215 1220 1225 1230

GGAGCAAGA CTTAAAGAT TTTCACTCC TATCACTGTC TTTTATTTC TCCCCAGAC
 CTTTCCTCT GCATTCTTA AAGTAGGGC ATAGTGTCC AAAAAAAG AGCGGCTGT

1235 1240 1245 1250 1255 1260 1265 1270 1275 1280 1285 1290

ACCATGTCA ATAAAGATT TGTTCCTTC CATCATCTCT GTATACCTCT CTCACCTAGA
 TGTACACTT TATTCTAAC ACAAGCAAG GTATGACAGA CATATGAGGA CAGTGGATCT

1295 1300 1305 1310 1315 1320 1325 1330 1335 1340 1345 1350

ACCTGCATCC TTTTAATCC TGAATATCA CAGCATGTTA GTCTGTCTA GAGAGACCTG
 TGCATCTAG AACATTATG ACTAATCTG GTTCTCATAT CACGCGCTT CTCTCTGGG

1355 1360 1365 1370 1375 1380 1385 1390 1395 1400 1405 1410

ATCTCTCTT TTTTGTGTA ACATATTCAT GAATGTGGA ACCTGATCC ATCAAGTCTT
 TAGGAGGGA AAACACTCT TTTATAGTA CTTTACACT TCGCTCATCC TACTTCAAGA

1415 1420 1425 1430 1435 1440 1445 1450 1455 1460 1465 1470

TGACTGTGAT TAGATCAGT CTTTAATCA TTTTGTGAT ACCTGATCC ATCAAGTCTT
 ACTGACTA ATCTAGTGA GAATTATAG TAAATCTGA GTTTTGACC TTTAGTGTGA

1475 1480 1485 1490 1495 1500 1505 1510 1515 1520 1525 1530

ACTGGAAAG TTTTGTGTA GACTTCAAA TCCGTGAAG ACACAGTAT GATATGACTA
 TGACCTTACC ACAAAACAG CTGAAGTCT AGGACTCTCC TTTGTGACTA CTTGATGAT

1535 1540 1545 1550 1555 1560 1565 1570 1575 1580 1585 1590

TATCTGAACA TAGAACTCG GGTCTGATG AGAAGACTT GCACGCCAA CGAGACACT
 ATAGACTTCT ATCTTTGAGC CCGAATCTAC TTTCTGAAA CCGTCTGGT CTTCTGTGTA

1595 1600 1605 1610 1615 1620 1625 1630 1635 1640 1645 1650

TCCCTCTCG AGCTGGAGA CAAGAGAGA ATTACTCTT TCCACAGT CCAATGATT
 ACGAAGACC TCGACCTCT GTTCTCTCT TAAATGAAG AAGTGTCCA CTTATCTAA

【 6 D 】

1655 1660 1665 1670 1675 1680 1685 1690 1695 1700 1705 1710

ACTGATGTGA TATCTCTTTC CTTTACAGTT ACAGTTGATG TTTGGGATC GAGTCTCTA
 TGACTACTCT ATAGAGCAAC GAAATGTCAA TGTCAACTAC AAACCTGAG CTCAAGGAT

1715 1720 1725 1730 1735 1740 1745 1750 1755 1760 1765 1770

GGCAATTTTC CTTTGTGAAA TATCACTGTA AATTGAAATG AATTATCTT TAGCAAAAAC
 CCGTTTAAAG GACAACCTTC ATAGTACAA TTAATCTTAC TTAATAGAA ATGTTTCTG

1775 1780 1785 1790 1795 1800 1805 1810 1815 1820 1825 1830

CATGTTCGGT TCAAAAGAGT GAACATTAAA ATATAGAGAC AGGACAGAA GTTCTCTTT
 GTACAAGCCA AGTTTCTCCA CTTGTAAATT TATATCTCTG TCTCTCTTTA CACAAGAAA

1835 1840 1845 1850 1855 1860 1865 1870 1875 1880 1885 1890

CTCTCTTACC AGTCCATTT TCAATGGGA AGACTCAGGA GTCTGCCACT TTTCAAGAA
 GAGGAGATG TCAAGATAAA AAGTTACCTT TGTGATCTT CAGAGCGTGA ACATTTCTT

1895 1900 1905 1910 1915 1920 1925 1930 1935 1940 1945 1950

GGTCTGTAT CTAAGATTT TCAATCTCA GAATTCGGTG TCTGCCAAC TGTGATGTC
 CCGCACTAG GATTTCTAAA AAGTAAGAT CTTAAGCCAC ACGAAGGTTG AACTAGNAG

1955 1960 1965 1970 1975 1980 1985 1990 1995 2000 2005 2010

ACTTCCACA AACCAACAG ACTGAAAGAA GAAACAGTA CAGAGGCCA AGTTTCTGA
 TCGAGGTTT TGTGTGTCC TCACTTTCTT CTTTGTCTAT GTTCTCTCTT TCAAAATGCT

2015 2020 2025 2030 2035 2040 2045 2050 2055 2060 2065 2070

TGTTTTTAT TCTAGTATT TATCTGAAAC AACCTGTAG ACCTATATAT TTTCTCTTG
 ACAAAAATA AGATCTAAA ATAGACTCT TTAACATCT TCGACATATA AAGGGAACC

2075 2080 2085 2090 2095 2100 2105 2110 2115 2120 2125 2130

TCCCAAGCTT CATACTTTG CCACTATAAC TCACTAAGC GGAGAGATG CTTGTGCAA
 AGGTTTGGGA CTATGAATC GGTAGTATTG AGTATGTC CTTCTCTCAG CATCACTTT

2135 2140 2145 2150 2155 2160 2165 2170 2175 2180 2185 2190

TGTCTCTTGA TTGATTAGT AAGATTCTT AGTAGCAGC AAAAGACAA ATCTCAGTG
 ACAGGAACT AACTATCTA TTTCTAAGA TCACTCTCT TTTCTCTCT TAGACTCAC

2195 2200 2205 2210 2215 2220 2225 2230 2235 2240 2245 2250

TTACTCTTTC GGCATCCTC GTCCAGGTT TCAATTTCC AATCTCTTT CTTCTCTCT
 AAACGAGAA CCGTAGTAC CAGTCTCAG ATCAAGGC TTAGAGAAAG GAGAGGGAC

2255 2260 2265 2270 2275 2280 2285 2290 2295 2300 2305 2310

TGTTCTATG TCGTATGTC ACTTGGGCT AATCAATAT TTTGCTTTT TTTTATATCA
 ACCAGTAAAC AGGCATAC TCAAGCGAA TTAGGTTATA AAACGGAAA AAGATATAGT

2315 2320 2325 2330 2335 2340 2345 2350 2355 2360 2365 2370

AAAACTTT ACAGTAGCA GGAATGTTCC TTAACGAGA TTTTAAACC CCAATCTCT
 TTTTGGAAA TGTCAATGT CCGTCAAGG AATGGCTCT AAAAAATGG GGTTAGAGG

2375 2380 2385 2390 2395 2400 2405 2410 2415 2420 2425 2430

【 6 E 】

ATATCTGCTA GTTCTTAAA GCCTAAGAT AGTGGGCC AACCGATGT GTAGGTGATA
 TATTAGGAT CACAATTTT CCGATCTTA TCGACCGGG TTGGCTACAC CATCAGTAT

2435 2440 2445 2450 2455 2460 2465 2470 2475 2480 2485 2490

AAGAGGATC TTTCTTAGAG ACACATTCAG ATCCGAAAG CCGAGCCTTA
 TTTCTCGAT AAAAAGATCT TGTATACCT GTCTCTCTC TAGCTTTCC CTTCCGAAAT

2495 2500 2505 2510 2515 2520 2525 2530 2535 2540 2545 2550

CCTTCATAC CTCTCTAGAC CCTCTCTAGT CCAATCAGAT TTTCTTGCAT TCGAATCTA
 CGAATAGTG GAGGATCTTT GAGAGATCA GTTATGGTA AAGAACCCTA ACCTTAAAT

2555 2560 2565 2570 2575 2580 2585 2590 2595 2600 2605 2610

CTGAAAAA ATACAAAAG CAACAAAAG CCTCAGCAC TTTTACAAGA GGCATTTAA
 GACTTTTTT TATGTTTTT GTTTTTTTTT GGGATGCTG ACAATGTTCT CCGTAAAT

2615 2620 2625 2630 2635 2640 2645 2650 2655 2660 2665 2670

GTATCTTGT CTCTCTCACT TACCCATAG CCGAGTCTC ATTAGTTTTT CTTGGGCTT
 CATAGAAC GAGAAAGTCA ATGGTATAT GTTCANAG TATTCCHAAA CCAACCGGA

2675 2680 2685 2690 2695 2700 2705 2710 2715 2720 2725 2730

CCCTGGACT GAACCTTAGG CTTTGTATCA CATGAAGCA CCACTGTGAG TCGTTACAG
 GGAACCTGA CTTGCAATC GAACACTCT CTAATCTCT CTTGACACTC ACCAATCTG

2735 2740 2745 2750 2755 2760 2765 2770 2775 2780 2785 2790

ACACTGAAAT ATAAACAGT CATCTGCTCA GATCGAGGT ATCCGATTC AGAACCAAT
 TGTACCTTA TATTGTCTA GTACCCGACT CTAAGTCCAC TACCGTAAAG TTTTGTGTTA

2795 2800 2805 2810 2815 2820 2825 2830 2835 2840 2845 2850

CGTGGCACT ATTCTCTGT CTCTCTCTAG AGTACAGTC ATAAATACT TCAACAATA
 CGACCGTCA TACGACACA GAGGAGATC TCACTGTAG TATTATGAC AATTGTAT

2855 2860 2865 2870 2875 2880 2885 2890 2895 2900 2905 2910

AAGGAGAAAT GTTCTTTTT AAGTCCACT CCGTAAAT TCGAAGATC AAAAGTAT
 TTTCTCTTA CACGACAAA TTTCAATTA GGCATTTTA ACCTCTTAA TTTTCACTAA

2915 2920 2925 2930 2935 2940 2945 2950 2955 2960 2965 2970

ATCTCTTGA TCTACTGCC TCATTTCTCT ATCTCTCTCC CCAAGGATC CTAACCTTA
 TAGAAAAT AGATGAACG AGTAAAGGA TAGAAGAGG GTTCCATAG CATTGAAAT

2975 2980 2985 2990 2995 3000 3005 3010 3015 3020 3025 3030

GACTTCCAC TGTCTGAAA GGAGACATG CTTATGCTC GCCTTGGAC ACAGCAAGC
 CTAAGGCTG ACAGACTTT CCTCTTAA CAGATACAGA CCGAAGCTG TGTGTCTCG

3035 3040 3045 3050 3055 3060 3065 3070 3075 3080 3085 3090

ATCATCTCC ATTGCTCCG GGAATCAAG AGAATCTCT TCTCTCTCT TCAACTTCC
 TAGTAGAGG TAAAGAGGC CCTCTGATC TCTTAGACA AAGAGACGAC AGTTGAAGG

3095 3100 3105 3110 3115 3120 3125 3130 3135 3140 3145 3150

ATCTGCTCA CCAATAGGTC ACTTTGCCAT TATCGAATG GAGATAAAG CAAITTTCC
 TAGACCAAT CATTATCCAC TGAAGGGTA ATAGCTTAC CATTATTTT GTTAGAGCC

【 6 F 】

3155 3160 3165 3170 3175 3180 3185 3190 3195 3200 3205 3210

TCTCCAGAG CTAATCTCAC CTTTCTATT TTTGGATGC CACAATGAA GCAATTTTA
 ACAGGCTCT GATTAGACTG CCAAGATAAC ACAGCTACT GTATATCTT CCGTAAAAAT

3215 3220 3225 3230 3235 3240 3245 3250 3255 3260 3265 3270

GTATATTAT CATAGATTAT TATAAATAT AAACCTAAG CCAAGAGTT TATTACAAT
 CAGTAATTA GTATCTATA ATATTTGATA TTTGAAITCC GCTTCTCAA ATATGTTAC

3275 3280 3285 3290 3295 3300 3305 3310 3315 3320 3325 3330

TATCTTTAT AAACAAGAG CTTTATAGT GTTCAACAA CTTCAAAATA GTTTAGAAC
 ATAGAAATA TTTTCTTTC CCAACATCA GAGTGTGTC ACATCTTAA CACTTCTTG

3335 3340 3345 3350 3355 3360 3365 3370 3375 3380 3385 3390

TCTACTTAT GAGCTTCTT TATTTCTCT CTTTACATA GAAAATTA TAAAAATAT
 ACATGTACA CTTGAGACA ATAAAAAGAG AAGATGATAT CTTTTCAGC ATTTTAAATA

3395 3400 3405 3410 3415 3420 3425 3430 3435 3440 3445 3450

CAAAAGCTA ATCTGAGG ATATTGCTT ATTTCTCTT AAAAAATGA GCTCAGTAC
 GTTTTCTAT TACAGTCC TATAAGGAA TAAACAGACA TTTTTCACC TTTTCACTG

3455 3460 3465 3470 3475 3480 3485 3490 3495

ATACTGCTT CTTGAGGCT TGGATATTT TATCCGATAT TCTGTCT (配列番号5)
 TATTAGCAA GACCTCGAA ACCTTATAA ATAGGACATA AGAGAAA

【 7 A 】

5 10 15 20 25 30 35 40 45 50
 CAAAC ATG GCG GCT CGC AGC CCG AGC GGT GGC GGC GGC AGC GGC AGC GGC
 GTTCT TAC CCA GCG GCG GCG GCG CCA CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG
 Met Ala Ala Pro Ser Pro Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Thr Pro
 55 60 65 70 75 80 85 90 95
 GGC CCG GTA GGG TCC CCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG
 CCG GGG CAT CCG AGG GCG CCG GGT GCG GTG GCG GCG CAG TCG TCG TAC
 Gly Pro Val Gly Ser Pro Ala Pro Ala Pro Ala Val Ser Ser Met
 100 105 110 115 120 125 130 135 140 145
 CAG GGT AAA CCG AAA CCA CTG AAG TCG AAT TTT GCA AAT CCA CCG TTT
 GTC CCA TTT ACC TTT COT GAC TCC AAC TTA AAA CCG CTT TTA GGT GGA
 Gln Gly Lys Arg Lys Ala Leu Lys Leu Asn Phe Ala Val Ser Pro Phe
 150 155 160 165 170 175 180 185 190
 AAA TCT ACA GCA AGG TTT ACT CTT AAT CCG AAT CCG ACA GGA CTT CAA
 TTT AGA TGT CTT TCC AAA TGA GAC TTA GGG TTA GCA TGT CTT CAA GTT
 Lys Ser Thr Ala Arg Phe Thr Leu Asn Pro Asn Pro Thr Gly Val Gln
 195 200 205 210 215 220 225 230 235 240
 AAC CCA CAC ATA GAG AGA GCA ACA GAC AGC ATT GAG TCA TCA GGA
 TTG GGT GTG TAT CTC TCT GAC TCT TTT GTG TCG TAA CTC AGT AGT CCG
 Asn Pro His Ile Glu Arg Leu Arg Thr His Ser Ile Glu Ser Ser Gly
 245 250 255 260 265 270 275 280 285 290
 AAA CTG AAG ATC TCC CCG GAA CAA CAC TGG GAT TTC ACT CCA GAG GAC
 TTT GAC TTC TGG AGG GGA CTT GTT ACC CTA AAG TGA CCG CTT CTC CTG
 Lys Leu Lys Ile Ser Glu Gln His Thr Asp Phe Thr Ala Glu Asp
 295 300 305 310 315 320 325 330 335
 TTG AAA CAC CTT GGA GAA ATT GGA GGA GCA GCT TAT GGT TTT GTC AAC
 AAC TTT CTA GAA CCG CTT TAA CCG CTT CCG GCA TCA CCA AGA CAG TTG
 Leu Lys Asp Leu Gly Glu Ile Gly Arg Gly Ala Tyr Gly Ser Val Asn
 340 345 350 355 360 365 370 375 380 385
 AAA ATG GTC CAC AAA CCA AGT GGG CAA ATA ATG GCA GTT AAA AGA ATT
 TTT TAC CAG GTG TTT GGT TCA CCG CTT TAT TAC CCG CTT CAA TTT TTT TAA
 Lys Met Val His Lys Pro Ser Gly Gln Ile Met Ala Val Lys Arg Ile
 390 395 400 405 410 415 420 425 430
 CCG TCA ACA GTG GAT GAA AAA GAA GAA AAA CAA CAA CTT CTT ATG GAT TTG
 GGC AGT TGT CAC CTA CTT TTT CTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT
 Arg Ser Thr Val Asp Glu Lys Glu Gln Lys Leu Leu Leu Met Tyr Tyr Tyr Tyr
 435 440 445 450 455 460 465 470 475 480
 GAT GTA GTA ATG CCG AGT AGT GAT TCC CCA TAC ATT GTT CAG TTT TAT
 CTA CAT CAT TAC CCG TCA TCA CTA CCG GTT ATG TTA CAA GTC AAA ATA
 Asp Val Val Met Arg Ser Ser Asp Cys Pro Tyr Ile Val Gln Phe Tyr

【 7 B 】

485 490 495 500 505 510 515 520 525 530
 GGT GCA CTC TTC AGA GAG GGT GAC TTT TGG ATC TGT TGT GAA CTC ATG
 CCA CTT GAG AAG TGT CTC CCA GTG ACA ACC TAG TCA TAC CTT GAG TAC
 Gly Ala Leu Phe Arg Glu Gly Asp Cys Trp Ile Cys Met Gln Leu Met
 535 540 545 550 555 560 565 570 575
 TCT ACC TCG TTT GAT AAG TTT TAC AAA TAT GTA TAT AGT GTA TTA AAT
 AGA TGG AGC AAA CTA TTC AAA ATG TTT ATA CAC ATA TCA CAT AAT CTA
 Ser Thr Ser Phe Asp Lys Phe Tyr Lys Tyr Val Tyr Ser Val Leu Asp
 580 585 590 595 600 605 610 615 620 625
 GAT GTT ATT CCA GAA GAA ATT TTA GGC AAA ACT ACT TTA GCA ACT GTG
 CTA CAA TAA GGT CTT CTT TAA AAT CCG TTT TAG TCA AAT CCG TCA CAC
 Asp Val Ile Pro Glu Glu Ile Leu Gly Lys Ile Thr Leu Ala Thr Val
 630 635 640 645 650 655 660 665 670
 AAA GCA CTA AAC CAC TTA AAA GAA AAC TTT AAA ATT ATT CAC AGA GAT
 TTT CCG GAT TTG GTG AAT TTT CTT TTG AAC TTT TAA TAA GTG TCT CTA
 Lys Ala Leu Asn His Leu Lys Glu Asn Leu Lys Ile Ile His Arg Asp
 675 680 685 690 695 700 705 710 715 720
 ATC AAA CTT TCC AAT ATT CTT CTG GAC AGA AGT GGA AAT ATT GAG CTC
 TAG TTT GGA AGG TTA TAA GAA GAC CTG TCT TCA CCG TTA TAA TTC GAG
 Ile Lys Pro Ser Asn Ile Leu Leu Asp Arg Ser Gly Asn Ile Lys Leu
 725 730 735 740 745 750 755 760 765 770
 TGT GAC TTC GGC ATC AGT GGA CAG CTT GTC CCG TCT ATT GGC AAG ACA
 ACA CTG AAG CCG TAG TCA CCG GTC GAA CAG CCG AGA TAA GAG TTC TGT
 Cys Asp Phe Gly Ile Ser Gly Gln Leu Val Asp Ser Ile Ala Lys Thr
 775 780 785 790 795 800 805 810 815
 AGA GAT GCT GCG TGT AAG CCA TAC ATG CCA CTT GAA AGA ATA GAC CCA
 TCT CTA CCA CCG ACA TCC GGT ATG TAG CCG GCA CTT TCT TAT CCG GGT
 Arg Asp Ala Gly Cys Arg Pro Tyr Met Ala Pro Glu Arg Ile Asp Pro
 820 825 830 835 840 845 850 855 860 865
 AGC GCA TCA CGA CAA GGA TAT GAT GTC CCG TCT GAT GTC TGG AGT TTT
 TCG CCG AGT GCT GTT CCG ATA CTA CAG GCG AGA CTA CAG ACC TCA AAC
 Ser Ala Ser Arg Gln Gly Tyr Asp Val Arg Ser Asp Val Trp Ser
 870 875 880 885 890 895 900 905 910
 GGG ATC ACA TTG TAT GAG TTG GCG ACA GGC CCA TTT CCG TAT CCA AAG
 CCG TAG TGT AAC ATA CTC AAC CCG TTT CCG GCT AAA GGA ATA GGT TTC
 Gly Ile Thr Leu Tyr Glu Leu Ala Thr Gly Arg Phe Pro Tyr Pro Lys
 915 920 925 930 935 940 945 950 955 960
 TGG AAT AGT GTA TTT GAT CAA CTA ACA CAA GTC CTT AAA GCA GAT CCG
 ACC TTA TCA CAT AAA CTA GGT GAT TTT GTT CAG CAG TTT CTT CTA GCA
 Trp Asn Ser Val Phe Asp Gln Leu Thr Gln Val Val Lys Gly Asp Pro
 965 970 975 980 985 990 995 1000 1005 1010

【 7 C 】

CGG CAG CTG AGT AAT TCT GAG GAA AGG GAA TTC CCG AGT TTC ATC
 GGC GTC GAC TCA TTA AGA CTC CTT TCC CTT AGG AGG GGC TCA AAG TAG
 Pro Glu Leu Ser Asn Ser Glu Glu Arg Glu Phe Ser Pro Ser Phe Ile
 1015 1020 1025 1030 1035 1040 1045 1050 1055
 AAC TTT GTC AAC TTT TCC CTT AGG GAG GAT GAA TCC AAA AGG CCA AAG
 TTT AAA CAG TTT AAC AGG GAA TCC TCC CTA CTT AGG TTT TCC GGT TTC
 Asn Phe Val Asn Leu Cys Leu Thr Lys Asp Glu Ser Lys Arg Pro Lys
 1060 1065 1070 1075 1080 1085 1090 1095 1100 1105
 TAT AAA GAC CTT CTG AAA CAT CCG TTT ATT TTT ATG TAT GAA GAA CCG
 ATA TTT CTC GAA GAC TTT GTA GCG AAT TAA AAC TAG ATA CTT CTT CCA
 Tyr Lys Glu Leu Leu Lys His Pro Phe Ile Leu Met Tyr Glu Glu Arg
 1110 1115 1120 1125 1130 1135 1140 1145 1150
 GCG GTT GAG GTC GCA TGC TAT GTT TTT AAA ATC CTS GAT CAA ATG CCA
 CCG CAA CTC CAG CCG ACC ATA CAA ACT TTT TAG GAG CTA GTT TAG GGT
 Ala Val Glu Val Ala Cys Tyr Val Cys Lys Ile Leu Asp Gln Met Pro
 1155 1160 1165 1170 1175 1180 1185 1190 1195 1200
 GCT ACT CCG AGC TCT CCG ATG TAT GTC GAT TGATAT CGTTCGACA
 CGA TGA GGG TCG AGA GGG TAC ATA CAG CTA ACTATA CGRACGATG
 Ala Thr Pro Ser Ser Pro Met Tyr Val Asp (配列番号38)
 1205 1210 1215 1220 1225 1230 1235 1240 1245 1250 1255 1260
 TCAGACTCTA GAAAAAGGG CTGAGAGGGA GCAAGACGTA AAGAATTTTC ATCCCGTATC
 AGTCTGAGAT CTTTTTCCC GACTCTCTCT CTTCTCGCAT TTTTAAAGG TAGGGCATAG
 1265 1270 1275 1280 1285 1290 1295 1300 1305 1310 1315 1320
 ACAGTGTGTT TATTCCTCCG CGAGACACCA TTGCGAATA GATTGGTGT CTTTCCATC
 TCTCAAAA ATAGGGGCG GCTCTGCGT ACGCTTATY CTACACAAA GAAAGGTAG
 1325 1330 1335 1340 1345 1350 1355 1360 1365 1370 1375 1380
 ATGCTCTAT ACTCTCTCA CCGAAGAGT GCGACTTGT ATACCTTAT TGATCAGCA
 TACAGACATA TGAGGACAT GATTTTCCA CTGAGAGACA TTTAGACTA ACTAGTGTGT
 1385 1390 1395 1400 1405 1410 1415 1420 1425 1430 1435 1440
 GVTATGTC TGCTCAGAGA GACCTCATCC TCGCTTTTTC TGATGAGCAT ATTCATGAAA
 CCAATCTACG ACCAGTCTCT CTGAGTAGG ACAGAAAAC ACTACTTOTA TAAGTACTTT
 1445 1450 1455 1460 1465 1470 1475 1480 1485 1490 1495 1500
 TGTGGAAGTC AGTAGACATA AGTFTTTGAC TTGATTTAGA TCACATCTTA AATTCATTT
 ACACCTTCAG TCACTGATG TCAACACACTG ACACATATCT AGTGTAGAAT TTAAGTAAAG
 1505 1510 1515 1520 1525 1530 1535 1540 1545 1550 1555 1560
 TAGACTCAA ACCCTGAGAT CGAGCTACTG GAATGCTGTT TTCTCAGACT TCCAAATCCT
 ATCTGATTT TCGACTCTTA CTTCCATGAC CTTACACAAA AACAGTCTGA AGTFTTAGAA
 1565 1570 1575 1580 1585 1590 1595 1600 1605 1610 1615 1620
 GGAAGGACAC AGTATGATAT GTACTATATC TGACATAGA AACTGCGGCT TGAGTGAAGA
 CTTTCTGTG TCACACTTA CATGATATG ACTGTATCT TTGAGCCGGA ACTCACTTT

【 7 D 】

1625 1630 1635 1640 1645 1650 1655 1660 1665 1670 1675 1680
 GAGCTTCAC AGCCACAGG ACACATTCG TCTCGAGCT GGGAGACAAA GGAGGATTT
 CTCGAACTGT TCGTCTCTCT TGTGTAAGG AAGACCTCGA CCGTCTGTTT CCGCTTAAA
 1685 1690 1695 1700 1705 1710 1715 1720 1725 1730 1735 1740
 ACTTCTTCA CCAAGTGCAA TAGATTAAGT ATGTGATATT CTTCTCTCTT ACAGTTCAG
 TGAAAAGAT GGTTCACGTT ATCTAATGAC TACACTATAA GACAACGAAA TGTCAATGTC
 1745 1750 1755 1760 1765 1770 1775 1780 1785 1790 1795 1800
 TTGATTTTG GAGATGATG TCTCAGCCCA AATTCTCTGT TTGAAATATC ATGTAATTT
 AACTACAAC CCGTAGTAC AGGATCGGTT TAAAAGGACA AACTTTATAG TACATTTTAA
 1805 1810 1815 1820 1825 1830 1835 1840 1845 1850 1855 1860
 AGAATGAATT TATCTTTTCC AAAAACCATG TCCCTCTCAA AGAGGTGAC ATTAATAAT
 TCTACTTAA ATAGAAATGG TTTTGTGATC AACGCAATTT TCTCCACTCT TAATTTATA
 1865 1870 1875 1880 1885 1890 1895 1900 1905 1910 1915 1920
 AGAGACAGGA CAGAAATGTT TCTTTTCTCC TCTACCACTC CTATTTTTCA ATGGAGAC
 TCTCTTCTCT GTCTTACGCA AGAAAAGAGG AGATGGTCAG GATAAAAGAT TACCTCTCTG
 1925 1930 1935 1940 1945 1950 1955 1960 1965 1970 1975 1980
 TCAGAGATTT GCGACTGTTC AAAGAGGATG CTGATCTTAA GAATTTTTCA TTTCCAGAT
 AGTCCGCHGA CCGTGAACAG TTTCTTCCAG CACTAGGATTT CTTAAAAGAT AAGAGTETA
 1985 1990 1995 2000 2005 2010 2015 2020 2025 2030 2035 2040
 TCGTCTTCT GCGACTTGA TTTCTTCCAG CCGCAATGCG AACGAGACTC AAGAGAAA
 AGCCACACGA CCGTGAACCT ACAAGTGGGA CCGTGTGTTG TGTCTCTGAC TGTCTCTTTT
 2045 2050 2055 2060 2065 2070 2075 2080 2085 2090 2095 2100
 ACAGTACAGA AGCCAAAGTT TACAGATTTT TTTAATCTTA GTATTTTATC TCGAACACT
 TGTATGTTCT TCGTCTTCAA ATCTCTACAA AAATTAAGAT CATAAAAGT ACCTTGTGA
 2105 2110 2115 2120 2125 2130 2135 2140 2145 2150 2155 2160
 TTTAGGACT ATATATTTCC CCGTGGTCCC AAGCCTGATA CTTTGGACAT CATAACTAC
 ACATCTCGCA TATATAAAGG GGAACACGGC TCCGACTAT GAAATCGGTA GTATGTAGTG
 2165 2170 2175 2180 2185 2190 2195 2200 2205 2210 2215 2220
 TAAAGGAGG AAGTAGTAGT TAGCAATGTC CCGTGTATTA TTAGATAAAG ATTTCTAGTA
 ATTTCTCCCT TTACTCGACT ATCTGTACAC GGAACACTAT AATCATTTTC TAAAGATCAT
 2225 2230 2235 2240 2245 2250 2255 2260 2265 2270 2275 2280
 GGCAGAAAA GACCAAACTC CAGTGTGTTG CTTCTTGCCA TCACGTGCCC AGGTCTTAC
 CCGTCTTTTT CTGTTTTAGA GTCAACAAAC GAAGAACGCT AGTAAACAGG TCCAGAACTC
 2285 2290 2295 2300 2305 2310 2315 2320 2325 2330 2335 2340
 TTTGGAATC TCTTTCCCTT CCGCTGTGCT CTATTTTGGC TATGTTGAT CCGCTTATC
 AAAGCTTAG AGAAAAGGGA GGGGACACA GATAACAGCG ATACACTGAA CCGGAATAG
 2345 2350 2355 2360 2365 2370 2375 2380 2385 2390 2395 2400

【 図 7 E 】

CAATATTTCG CCGTTTCTCT ATATCAAAA ACCCTTACAG TTACGAGGGA TTTTCCTTAC
 GTTATAAACC GGA AAAAAGA TATAGTTT TGAAATGTC AATCTGCTCT ACAAGGAATG

2405 2410 2415 2420 2425 2430 2435 2440 2445 2450 2455 2460

CGAGGATTTT TACCCCGGAA TCTCTCATTA TCCCTATGTT TTAAGAGCTT AAGAATGATG
 GCTCTAATAA ATTGGGGGTA AGAGAGATTT AGCGATACCA AATTTTCGGA TCTTTATCAC

2465 2470 2475 2480 2485 2490 2495 2500 2505 2510 2515 2520

GGGCCCAACC GATGTGGTGA GTGATAAAGA GGCATCTTTT CTAGAGACAC ATTGGACCAG
 CCGGGGTTGG CTACAGCATG GCGATATTTT CCGTAAAAA AATCTCTGTT TACCTGGTTC

2525 2530 2535 2540 2545 2550 2555 2560 2565 2570 2575 2580

ATGAGATCCC AAAAGCGGAC CCGTTAGGTT CATCACTCTC TGAACCTCTT TATAGCTCAA
 TATCTCTAGG CTTTCCCGCT GGAATATGGA GTATGTGAGG ATCTTGGAGA GATCTAGGTA

2585 2590 2595 2600 2605 2610 2615 2620 2625 2630 2635 2640

CAGCTCTCTT GCGATCTGTT TCTCTCTGTT AAAAATAATC AAAAGCAAAA ACAAACCTT
 GTGGTAAGA ACCGTACCTT TAAGATGACC CTTTCTTATG TTTTCTGTTT TGTTTGGGGA

2645 2650 2655 2660 2665 2670 2675 2680 2685 2690 2695 2700

TACGACTGTT ACAAGAGGCG APTTAAGTAT CTGTGCTCTC TTAGCTTACC GATTAGCCAG
 GTCTGACAAA TCTTCTCCGG TAATTCATTA GACACAGGAG AAGTGAATGG GTAACTGGTC

2705 2710 2715 2720 2725 2730 2735 2740 2745 2750 2755 2760

GTTCCTAATTA GGTTTTGGTT GGGCCCTCCT GGCACGTGAC CTTAGGCTTT GTATGACAGT
 CAAGAGTAAT CCAAAACGGA CCGGGAGGGA CGGTGACTGG GAATCGAAAA CATACTGTCA

2765 2770 2775 2780 2785 2790 2795 2800 2805 2810 2815 2820

GAAGCAGCAC TGTAGTGGTT TCAAGCACAC TCGAATATAA AACAGTCATG GCTGTGAGATG
 CTCTCTGGTG ACACCTCACA AGTCTGGTGG ACCTTATATT TTTCTAGTAC CGGACTGTAC

2825 2830 2835 2840 2845 2850 2855 2860 2865 2870 2875 2880

CAGTTGATGC CATTACAGAA CCAAACTGTT GCAAGTATGG CTGTGCTCC TCTCAGAGTG
 GTCCACTAAG GTAATCTGTT GGTTTAGCAC CTGTCATAAC GACACAGAGG AGAGTCTCAC

2885 2890 2895 2900 2905 2910 2915 2920 2925 2930 2935 2940

ACAGTCATAA ATACTGTCAA ACAATAAAGG GAGAATGGTG CTTTATAAG TCCATCTCCT
 TGTGATGATT TATGACAGTT TGTATTATCC CTCTTACCAC GACAATTTTC AATGTAGGGA

2945 2950 2955 2960 2965 2970 2975 2980 2985 2990 2995 3000

GTAAATTTCA GAATTCAAA GTGATTATCT CTTTGTACTA CTTCGCCATC TCCCTATCT
 CATTTAGCTT CTTAAGTTTT CACTATATGA GAACHTAGAT GACCGAGGTA AAGGGATAGA

3005 3010 3015 3020 3025 3030 3035 3040 3045 3050 3055 3060

ATGCCCCAC GGTCTCTCAA CTTTATATCT CCGATGTT TGTGAAGAGG ACATTTCTCT
 TAGGGGGGTT CCAATAGATT TGAATCTGA AGGGTACAAA GACTTTCTCT TGTAAAGAGA

3065 3070 3075 3080 3085 3090 3095 3100 3105 3110 3115 3120

*ATGCTCTCTC TCGACCACAG CAAGCCATCA TCTCTCATTT CTTCCCGGGA CTCGAAGGGA

【 図 7 F 】

TACAGACGGA ACCTGGTGTG GTTCCGATGT AGGAGGTAA C GAGGGCCCTT GAGTTCTCTT

3125 3130 3135 3140 3145 3150 3155 3160 3165 3170 3175 3180

ATCTGTTTCT CTTCTGTCAA CTCTCCATCT GCTCAGCAT AGGGTCACTT TCCCATATTG
 TACAGAAAGA GAGGAGATTT GAGGGGTAGA CCGAGTCGTA TCCCGATGAA ACGGTATATG

3185 3190 3195 3200 3205 3210 3215 3220 3225 3230 3235 3240

CAAAATGGGA TAAAGCAATC TCTGGCTGTC CAGGAGCTAA TCTGACCTTT TATTTGATGT
 GTTTACTCTT ATTTCTGTTA AGACCGACAG GTCTCTGATT GTCTCTGATT GATAACACAC

3245 3250 3255 3260 3265 3270 3275 3280 3285 3290 3295 3300

GATGACCACA TAAGAAGGCA ATTTAGTGTG ATTAATCATA GATTATTATA AACTATAAAC
 CTACTGCTGT ATCTTCCGTT TAAAATCACA TAATTAGTAT TCAATAAATAT TGTATATTGT

3305 3310 3315 3320 3325 3330 3335 3340 3345 3350 3355 3360

TTAAGGGGCA GGAGTTTATT ACAATGTATC TTTATTAAAA CAAAAGGCTC TATAGTGTTC
 AATTCCTGTT CCTCAATAAA TTTTACATAG AAATAAATTT GTTTCCGCAC ATATCACAG

3365 3370 3375 3380 3385 3390 3395 3400 3405 3410 3415 3420

ACAAACTGTG AAAATAGTGT AAGAATGTTA CATTGTGAC TCTGTGATT TTTCTCTGTT
 TGTTTGACAC TTTTATCACA TTTGTGACAT GTAAAGCTGG AGACCATATP AAAGAGAAC

3425 3430 3435 3440 3445 3450 3455 3460 3465 3470 3475 3480

ACCATAGAAA AATGTATAAA AATTATCAAA AAGCTAATGT CGAGGATAT TCCCTATTAT
 TGTATCTTTT TTACATATTT TTAATAGTTT TTAGATTACA CTTCTCTATA ACGGAATAAA

3485 3490 3495 3500 3505 3510 3515 3520 3525 3530 3535 3540

GTCTGTAAA AATGGAGCTC AGTAACATAA CTCTCTCTCT GAGCTTTGCA ATATTCTATC
 GACACATTTT TTTCTCTGAG TCAATGATTT GAGGAGAAC CTCCAAACTC TATAAATATG

3545 3550

CTGATTTCTT GTTT (在列番号付)
 GACATAGAAA CAAA

【 図 8 A 】

5 10 15 20 25 30 35 40 45 50

CTCCCAACA ATG GCG GCT CCG AGC CCG AGC GCG GCG GCG TCG GCG GCG
 GAGGGTGTG TAC CAC CCA GCG TCG GCG TCG CCG GCG CCG GCG AGG CCG CCG
 Met Ala Ala Pro Ser Pro Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly

55 60 65 70 75 80 85 90 95

GCG AGC GCG AGC GCG ACC CCG GCG CCG GTA GGG TCG CCG GCG CCA GCG
 CCG TCG CCG TCG CCG TCG GCG CCG GCG CAT CCG AGG GCG CCG GGT CCG
 Gly Ser Gly Ser Gly Pro Gly Pro Val Gly Ser Pro Ala Pro Gly

100 105 110 115 120 125 130 135 140 145

CAC CCG GCG GTC AGC AGC ATG CAG GGT AAA CCG AAA GGA CTG AAG TTG
 GTG GCG CCG CAG TCG TCG TAC GTC CCA TTT GCG TTT CCG TAC TCA AAC
 Lys Pro Ala Val Ser Ser Met Gln Gly Lys Arg Lys Ala Leu Lys Leu

150 155 160 165 170 175 180 185 190 195

AAT TTT GCA AAT CCA GGT TTT AAA TTT ACA GCA AGG TTT ACT GGT AAT
 TTA AAA CDT TTA GGT GGA AAG TTT AGA TGT CDT TCC AAA TGA SAC TTA
 Asn Phe Ala Asn Pro Pro Phe Lys Ser Thr Ala Arg Phe Thr Leu Asp

200 205 210 215 220 225 230 235 240

CCG AAT CTT ACA GCA GTT CCA AAC CCA CAC ATG GAG AGA CTG AGA ACA
 GGG TTA GGA TGT CCG CAA CCG TTT GGT GTG TAT CTC TCT GAC TTT TGT
 Pro Asn Pro Thr Gly Val Lys Asn Pro His Ile Gly Arg Leu Arg Thr

245 250 255 260 265 270 275 280 285 290

CAC AGC ATT GAG TCA TCA GGA AAA CTG AAG ATC TCC CDT GAA CAA CAC
 GTG TCG TAA CTC AGT AGT CDT TTT GAC TTT TAG AGG GGA CTT GTT GTG
 His Ser Ile Glu Ser Ser Gly Lys Lys Lys Ile Ser Pro Glu Gln His

295 300 305 310 315 320 325 330 335

TGG GAT TTC ACT GCA GAG GAC TTG AAA GAC CTT GSA GAA ATT GSA CCA
 ACC CTA AAG TGA CDT CTC CTG AGC TTT TTT CTG GAA CCG CDT TTA CDT CDT
 Trp Asp Phe Thr Ala Glu Asp Leu Lys Asp Leu Gly Gly Ile Gly Asp

340 345 350 355 360 365 370 375 380 385

GSA CDT TAT CDT CDT GTC AAC AAA ATG GTC CAC AAA CCA ACT GGG CAA
 CDT CCA ATA CCA AGA CAG TTG TTT TAC CAG GTG TTT GGT TCA CCG CTT
 Gly Ala Tyr Gly Ser Val Asn Lys Met Val His Lys Pro Ser Gly Gln

390 395 400 405 410 415 420 425 430 435

ATA ATG GCA GTT AAA AGA ATT CCG TCA ACA GTG GAT GAA AAA GAA CAA
 TAT TAC CDT CAA TTT TCT TAA GCC AGT TGT CAC CTA CTT TTT CTT GTT
 Ile Met Ala Val Lys Arg Ile Arg Ser Thr Val Asp Gly Lys Glu Gln

440 445 450 455 460 465 470 475 480

AAA CAA CTT CTT ATG GAT TTG GAT GTA GTA ATG CCG AGT AGT GAT TCC
 TTT GTT GAA GAA TAC CTA AAC CTA CAT CAT TAC GCC TCA TCA CTA AEE
 Lys Gln Leu Leu Met Asp Leu Asp Val Val Met Arg Ser Ser Asp Oys

【 図 8 B 】

485 490 495 500 505 510 515 520 525 530

CCA TAC ATT GTT CAG TTT TAT GGT GCA CTD TTC AGA GAG GGT GAC TGT
 AGT ATG TAA CAA GTC AAA ATA CCA CGT GAG AAG TCT CTC CCA CTS ACA
 Pro Tyr Ile Val Gln Phe Tyr Gly Ala Leu Phe Arg Glu Gly Asp Oys

535 540 545 550 555 560 565 570 575

TGG ATC TGT ATG GAA CTD ATG TGT ACC TCG TTT GAT AAG TTT TAC AAA
 ACC TAG ACA TAG CTT GAG TAC AGA TCG AGC AAT CTA TTE AAA ATG TTT
 Thr Ile Oys Met Glu Leu Met Ser Thr Ser Phe Asp Lys Phe Tyr Lys

580 585 590 595 600 605 610 615 620 625

TAT GTA TAT AGT GSA TTA GAT GAT GTT ATT CCA GAA GAA ATT TTA GCA
 ATA CAT ATA TCA CAT AAT CTA CTA CAA TAA GGT CTT CTT TAA AAT CCG
 Tyr Val Tyr Ser Val Leu Asp Asp Val Ile Pro Glu Glu Ile Leu Gly

630 635 640 645 650 655 660 665 670 675

AAA ATC ACT TTA GCA AGT CTT AAA GCA TTA AAC CAC TTA AAA GAA AAA
 TTT TAG TGA AAT CDT TGA CAC TTT CDT GAT TTG GTG AAT TTT CTT GTT
 Lys Ile Thr Leu Ala Thr Val Lys Ala Leu Asn His Leu Lys Glu Asp

680 685 690 695 700 705 710 715 720

TTG AAA ATT ATT CAC AGA GAT ATT AAA CTT TCC AAT ATT CTT CTG GAC
 AAC TTT TTA TTA GTG TGT CTA TAG TTT GSA AGG TTA TTA GAA GAC CTG
 Leu Lys Ile Ile His Arg Asp Ile Lys Pro Ser Asn Ile Leu Leu Asp

725 730 735 740 745 750 755 760 765 770

AGA AGT GSA AAT ATT AAG CTT TGT GAC TTT GCG ATC AGT GSA GAC CTT
 TCT TCA CDT TTA TAA TTT GAG ACA CTG AAG CCG TAG TCA CDT GTC GAA
 Arg Ser Gly Asn Ile Lys Leu Cys Asp Phe Gly Ile Ser Gly Gln Leu

775 780 785 790 795 800 805 810 815

GTG GAC CDT ATT GCG AAG ACA AGA GAT CDT GCG TGT AGG CCA TAC ATG
 CAC CTG AGA TAA CCG TTC TGT CTT CTA CCA CCG ACA TCC GGT ATG TAC
 Val Asp Ser Ile Ala Lys Thr Arg Asp Ala Gly Cys Arg Pro Tyr Met

820 825 830 835 840 845 850 855 860 865

GCA CDT GAA AGA ATA CAC CCA AGC GCA TCA CCA CAA GGA TAT GAT GTC
 CDT GCA CTT TCT TAT CTT GGT TCG CDT AGT GCT GTT CDT ATA CTA CAG
 Ala Pro Glu Arg Ile Asp Pro Ser Ala Ser Arg Gln Gly Tyr Asp Val

870 875 880 885 890 895 900 905 910 915

GCG TGT GAT GTC TCG AGT TTT GGG ATC ACA TTG TAT GAG TTG CCG ACA
 GCG AGA CTA CAG ACC TCA AAC CCG TAG TTT AAC ATA CTC AAC CCG TGT
 Arg Ser Asp Val Trp Ser Leu Gly Ile Thr Leu Tyr Glu Leu Ala Thr

920 925 930 935 940 945 950 955 960

GCG CCA TTT CDT TAT CCA AAG TGG AAT AGT GTA TTT GAT CCA CTA ACA
 CCG CDT AAA GGA ATA GGT TTC ACC TTA TCA CAT AAA CTA GAT GAT TGT
 Gly Arg Phe Pro Tyr Pro Lys Trp Asn Ser Val Phe Asp Gln Leu Thr

965 970 975 980 985 990 995 1000 1005 1010

【 8 C 】

CAA GTC CTG AAA GGA GAT CCG CCG CAG CTG AGT AAT TGT GAG GAA AGG
 GTT CAG CAC TTT COT CTA GGA GGC GTT CAC TCA TTA AGA CTC GTT TCC
 Gln Val Val Lys Gly Asp Pro Pro Gln Leu Ser Asn Ser Glu Gln Argp
 1015 1020 1025 1030 1035 1040 1045 1050 1055

GAA TTC TGC CGG AGT TTC ATC AAC TTT GTC AAC TTT TGC CTT ACC AAG
 CTT AAG AAG GGC TCA AAG TAG TCG AAA CAG TTG AAC ACC GAA TGC TTC
 Glu Phe Ser Pro Ser Phe Ile Asn Phe Val Asn Leu Cys Leu Thr Lys>
 1060 1065 1070 1075 1080 1085 1090 1095 1100 1105

GAT GAA TCC AAA AGG CCA AAG TAT AAA GAG CTT CTG AAA CAT GGC TTT
 CTA CTT AGG TTT TCC GAT TTC ATA TTT CTC GAA GAC TTT GTA GGG AAA
 Asp Glu Ser Lys Arg Pro Lys Tyr Lys Glu Leu Leu Lys His Pro Phe>
 1110 1115 1120 1125 1130 1135 1140 1145 1150 1155

ATT TTG ATG GAT GAA GAA CCG GGC GTT GAG GTC GCA TGC TAT GTT TGT
 TAA AAC TAG ATA CTT CTT GCA CGG CAA CTT CAG CTT ACC ATA CAA ACA
 Ile Leu Met Tyr Glu Glu Arg Ala Val Glu Val Ala Cys Tyr Val Cys>
 1160 1165 1170 1175 1180 1185 1190 1195 1200

AAA ATC CTG GAT CAA ATG CGA GCT ACT CCG ACC TTT CCG ATG TAT GTC
 TTT TAG GAC CTA GTT TAC GGT CGA TGA GGG TCG AGA GGG TAC ATA CAG
 Lys Ile Leu Asp Gln Met Pro Ala Thr Pro Ser Ser Ser Met Tyr Val>
 1205 1210 1215 1220 1225 1230 1235 1240 1245 1250 1255 1260

GAT TGA ATGCTGCTA CATCAGACT TAGAAAAAG CCGTAGAGG AAGCAAGAG
 CTA ACTA TAGCGAGAT GTAGTCTGAT ATCTTTCTC CGACTCTCC TCGTTCTGC
 Asp> (配列番号:10)

1265 1270 1275 1280 1285 1290 1295 1300 1305 1310 1315 1320

TAAAGAATT TCATCCGTA TCACAGTGT TTTATCTCC GCCCAGAC CATGTCCAT
 ATTCTTAAA AGTAGGCAT AGTCTCCAA AATATACGG CCGCTCTGT GTACAGCTA

1325 1330 1335 1340 1345 1350 1355 1360 1365 1370 1375 1380

AAGATTGTC TTCCTTCCA TCATCTCTGT ATACTCTGT CACTAGAA STGCATCTT
 TTCTAACGC AAGCAAGGT AATACAGCA TATGAGGACA GTGATGAT CAGTATGAA

1385 1390 1395 1400 1405 1410 1415 1420 1425 1430 1435 1440

GTAATGACT ATTATACA CAGTGTAGT CCGTGTGAA GAGACTCAT CCTGCTCTT
 CATATGGAC TACTGACT GTACAGTCA CAGCAGTCT CTCTGAGTA GAGCAGAAA

1445 1450 1455 1460 1465 1470 1475 1480 1485 1490 1495 1500

TTCCAGAAC ATATTGATA AATGTGAGG TACTGACAT CAGTGTGTC ACTGTGATTA
 ACATCTCTC TATAAGTAA GTAGCTTCT TTAGACTTCA GTTCACAC TGACACTAAT

1505 1510 1515 1520 1525 1530 1535 1540 1545 1550 1555 1560

GATCAGACT TAAATTCAT TATGATACA AAGCTCGAG ATGCAGTCA TGAATGGTG
 CTATGTAGA ATTTAAGTAA AGATCTGAT TTTGAGCTC TTTGAGTGT ACCTTACAC

1565 1570 1575 1580 1585 1590 1595 1600 1605 1610 1615 1620

TTTGTGCA GTTCAAACT CTGGAAGAC ACAGTATGA ATGTACTATA TCTGAACATA

【 8 D 】

AAAACAGTCT GAAGGTTTAG GACCTTCTGT TGTCACTACT TACATGATAT AGACTGTAT
 1625 1630 1635 1640 1645 1650 1655 1660 1665 1670 1675 1680

GAACTCTGGG CTTGAGTGG AAGAGCTTGC ACAGCCAAAG AAGACAGATT CTTCTGGAG
 CTTTGAAGCC GAATCTACT TCTCGAAGC TGTGGTTGC TCTGTGTAAG GGAAGAGCTC

1685 1690 1695 1700 1705 1710 1715 1720 1725 1730 1735 1740

CTGGAGACG AAGGAGGAA TTTACTTCTT CACCAAGTGC AATAGATTAC TGTGTGATA
 GACCTCTGT TCTCTCTTA AATGAAGAA TGTGTTCCAG TTTATCTAATG ACTAGACTAT

1745 1750 1755 1760 1765 1770 1775 1780 1785 1790 1795 1800

TCTGTGCTT TTAGCTTAC AGTTGATTT TGGGATGCA TGTGCTCAGC CAAATTTCT
 AAGACAAGCA AATGTCAATG TCAACTACAA ACCCTTAGCT ACAGAGAGTGT GTTTAAAGGA

1805 1810 1815 1820 1825 1830 1835 1840 1845 1850 1855 1860

GTTTGAAATA TCAATGAAA TTGAAATGAA TTTATCTTCA CCAAAAACCA TTTTCTCTT
 CAAACTTTAT ATGACATTT AATCTTACT AATATGAAAT GTTTTTTGT ACTAGGAGG

1865 1870 1875 1880 1885 1890 1895 1900 1905 1910 1915 1920

AAAGAGGTTA ACATTAAGAT ATAGACAGAG GACAGAATGT GTTCTTTTCT CCTCTCCAG
 TTTCTCAGT TATAATTTTA TATCTCTCTT TATCTCTTCA CAGAAAAGAA GAGATCTCTC

1925 1930 1935 1940 1945 1950 1955 1960 1965 1970 1975 1980

TCTTATTTT CAATGGGAG ACTCAGGAT CTCCACTTC TCAAGAGAG TCTGTATCT
 AGGATAAAAA GTTACCTTCT TGAATCTCTA GAGCTGAAAC AGTTCTTCTC ACGATATGGA

1985 1990 1995 2000 2005 2010 2015 2020 2025 2030 2035 2040

AAGATTTTT CATCTCCAG ATTCGGTGT CTCCCAACT GATGTTCCCA CTCCACAAA
 TTTTAAAAA GTTAGAGTCT TTAGCCACAC GAGGTTGAA CTACAGGTTG GAGCTGTTT

2045 2050 2055 2060 2065 2070 2075 2080 2085 2090 2095 2100

CCACAGAGC TGAAGAAGA AACAGTACA GAGGCCAAG TTTACAGATG TTTTAAATC
 GGTGTTCTG ACTTTCTCT TTTGTCATGT CTCTGTTTC AAATGTCTAC AAAAATTAAG

2105 2110 2115 2120 2125 2130 2135 2140 2145 2150 2155 2160

TAGTATTTA TCTGAACAA CTTGTAGCA CTATATATT CCCCCTGTC CCAAGCTCA
 ATCATAAAT AGACTTCTT GAACATCTCT GATATATAAA GGGGAACAG GGTTCGACT

2165 2170 2175 2180 2185 2190 2195 2200 2205 2210 2215 2220

TACTTTAGCC ATCATAACT ACTAACAGG AAGATAGCT AGTACAAAT CTTCTGATT
 ATGAATCCG TAGTATTGAG TGAATTTCCC TTTTATCGA TTTCTGTTAC ACGGACTAA

2225 2230 2235 2240 2245 2250 2255 2260 2265 2270 2275 2280

GATTAGATA AGATTTCTAG TAGGCACAA AAGCCAAAT CTCAGTTTGT TCTCTCTCC
 CTATCTATT TATAAGATC ATCCCTGTT TTTCTGTTA GAGTCAACAA ACGAAGAGC

2285 2290 2295 2300 2305 2310 2315 2320 2325 2330 2335 2340

CATCACTGT CCAAGTCTC AGTTTCCGAA TCTTCTTCCC TTTCCCTGTG GTTATTTCT
 GTATGACCA GTTCCAGAG TCAAAAGCTT AAGAAAAGG AAGGGAGAC CAGTATACG

【 8 E 】

3345 2350 2355 2360 2365 2370 2375 2380 2385 2390 2395 2400

CGATGTGAC TTCGCGTAA TCCATATTT TCGTTTTTT CTATATCAA AAAGCTTTAC
 CGATCAGCT AACCGCAAT AGTTATATA ACGGAAAAA GATATGATTT TTTGGAATG

2405 2410 2415 2420 2425 2430 2435 2440 2445 2450 2455 2460

AGTTAGCAG GATTTCTTT ACCGAGGAT TTTAAACCC AATCTCTCAT AATCGTATP
 TCAATCTCC CTGCAAGGA TCGCTGTTA AATTTGGGG TTTGAGGTTA TTTGAGTCA

2465 2470 2475 2480 2485 2490 2495 2500 2505 2510 2515 2520

GTTTAAAGG CTAAAGTAA TCGCGGCTA CCGTATGCT AGGTATATA GAGCCTCTT
 CAAATTTCC GATCTCTTT ACCCGGCTT CCGTATGCT TCCACTATTT CCGCTAGAA

2525 2530 2535 2540 2545 2550 2555 2560 2565 2570 2575 2580

TTCTAGAGC ACATTTGAG AGTATGAGT CCGAAAGCC AGCTTTTAG TTTATCACT
 AAGATCTCTG TGTACCTGTA TCTACTGTTA TCGGAAATG TCGGAAATG AAGTATGTA

2585 2590 2595 2600 2605 2610 2615 2620 2625 2630 2635 2640

CGTAGAACCT CCGTAGTCC ATCAGGATTT CTTGCGATTG GAATTTACT GGAAAAAAT
 CGATCTTGA GAGCATCAG TAGTGTAAA GACCTGTAC TTTAAGATGA CTTTTTTTA

2645 2650 2655 2660 2665 2670 2675 2680 2685 2690 2695 2700

ACAAAAGCA AAACAAACC CTGACAGTC TTACAGAGG CCAATTAAG ATCTTGTCT
 TGTTTTCTG TTTGTTTTG GAGTCTGAC AATGTTCTC GGTAAATCA TAGAACAGA

2705 2710 2715 2720 2725 2730 2735 2740 2745 2750 2755 2760

TCTTCAGTA CCGATPAGC AGTTTCTAT TGGTTTTGC TTGGCTCTC TTGACACTA
 AAGACTGAT GGTAAATCC TCCAAGATA ATCCAAGGC AACCCGGAG GACCTGTAC

2765 2770 2775 2780 2785 2790 2795 2800 2805 2810 2815 2820

ACCTTAGCT TTTATGACA GTGACAGCC ACTGTAGTGT GTTCAAGCA ACTGGAATAT
 TGGAAATCCA AAGTACTCT CACTCTCTG TACACTACT CAAATTTCTG TACCTTTATA

2825 2830 2835 2840 2845 2850 2855 2860 2865 2870 2875 2880

AAAACAGTCA TCGCTGAGA TCCAGTCTAT CCAATPAC AACCAAATG TGCACATAT
 TTTTCTAGT ACCGACTCT ACCTCACTA CCGTAAATG TTTGTTTAG ACCGTGATA

2885 2890 2895 2900 2905 2910 2915 2920 2925 2930 2935 2940

TCTGTCTCT CCGTCCAGG TGACAGTAT AAATACTCT AAACAATAA GCGGAATGG
 ACACACAGA GAGAGTCTC ACTGTAGTA TTTATGAGG TTTGTTATT CCGCTTACC

2945 2950 2955 2960 2965 2970 2975 2980 2985 2990 2995 3000

TCTTTTAAA AGTCACATC CTGTAAATG CAGAATCCA AAGTGATAT CTTCTGATC
 ACACAAATT TCGTGTAGG GACTTTTAC GTTATAGTT TTTCTAATA GAGAACTGG

3005 3010 3015 3020 3025 3030 3035 3040 3045 3050 3055 3060

TACTTGTCT ATTTCCTAT CTTCTCCCC AGGTATCTT AACCTTACA CTTCCACTG
 ATTAACGGG TAAAGGATA GAAGGGGGG TCCACTAGG TTTGAAATC GAGGGTTAC

3065 3070 3075 3080 3085 3090 3095 3100 3105 3110 3115 3120

【 8 F 】

TTCTAAAGC AAGCAATGCT CTATCTCTCC CTTGACACC AGCAAGCCAT CATCTCTAT
 AAGACTTTCC TCTGTAAAGA GATACAGAG GAAGCTGGT TCGTTGGTA GTAGAGGTA
 3125 3130 3135 3140 3145 3150 3155 3160 3165 3170 3175 3180

TCTCTCCGG GACTCAAGAG GAATCTGTTT CTTGCTCTC AACTTTCCAT CTTGCTCAG
 ACCAGGGCC CTGAGTTCT CTTAGACAA GAGACAGAG TCGAAGGTA GAGCGATCC

3185 3190 3195 3200 3205 3210 3215 3220 3225 3230 3235 3240

ATAGGCTAC TTTGCAATTA TGCAAATGA GATAAAAGA ATTTCCGGT CTTGAGGCT
 TATCCAGTG AAGCGTAAAT AGTTTACTCT CTATTTCTGT TAAAGCCAG AAGTCTGGA

3245 3250 3255 3260 3265 3270 3275 3280 3285 3290 3295 3300

AACTCAAGC TCTATTTGT TCGATGACA CATAAGAGG CAATTTTGT GTATTAACA
 TTAGACTCC AAGATAACG ACCTACTGT GTATTTCTC GTTAAATCA CATATTAAT

3305 3310 3315 3320 3325 3330 3335 3340 3345 3350 3355 3360

TAGATTATA TAAACTAAA ACTTAAGGG AAGGAGTTA TTACAATCA CTTTATATA
 ATCAATAAT ATTGATATT TCAATTTCC TTTCTCAAAT AATGTTAGAT AAAAAAT

3365 3370 3375 3380 3385 3390 3395 3400 3405 3410 3415 3420

AACAAAAGG TATATAGTT TCAACAATC TGAANAATG GTAAGAATC TACATTTGA
 TTTTCTTCC AAGATACCA AGTTTTAC ACTTTTACA CATTTCTGAC ATGTAACACT

3425 3430 3435 3440 3445 3450 3455 3460 3465 3470 3475 3480

CGCTGTTA TTTTCTCTT GTACCATGA AAAATGATA AAAATTATCA AAAAGCTAT
 CGAGACCAAT AAAAGAGAA CATGCTATC TTTTACATAT TTTTATAGT TTTTGGATA

3485 3490 3495 3500 3505 3510 3515 3520 3525 3530 3535 3540

GTGAGGAT ATTGCTTAT TTTCTGTAA AAAATGGAG TCAATTAAT AACTGCTCT
 CAGCTCTTA TACGGAATA AACAGAGAT TTTTACTCT AATCAATTA TCGAGGAA

3545 3550 3555 3560 3565 3570 3575

TGAGCTTTC GAATTTTTA TCTGTATTC TTTT (配列番号:9)
 ACTCGAAC CTTTAAAA AGGCATTAG AAAAA

【 9 A 】

70
 MKK7 HEP
 MKK1 MKK2
 MKK3 MKK4
 MKK5 MKK6
 コンセンサス

100
 MKK7 HEP
 MKK1 MKK2
 MKK3 MKK4
 MKK5 MKK6
 コンセンサス

140
 MKK7 HEP
 MKK1 MKK2
 MKK3 MKK4
 MKK5 MKK6
 コンセンサス

210
 MKK7 HEP
 MKK1 MKK2
 MKK3 MKK4
 MKK5 MKK6
 コンセンサス

【 9 B 】

211
 MKK7 HEP
 MKK1 MKK2
 MKK3 MKK4
 MKK5 MKK6
 コンセンサス

260
 MKK7 HEP
 MKK1 MKK2
 MKK3 MKK4
 MKK5 MKK6
 コンセンサス

350
 MKK7 HEP
 MKK1 MKK2
 MKK3 MKK4
 MKK5 MKK6
 コンセンサス

420
 MKK7 HEP
 MKK1 MKK2
 MKK3 MKK4
 MKK5 MKK6
 コンセンサス

【 10 A 】

MKK7
 配列の範囲(151~1623)

10 20 30 40 50 60
 GAAAGGCGAG CCGCTCTGATG GTGAAATATG TTTCTACTAC CTGGCCAGCT GCGCTGACTG
 CCTTCCTCGC GGAGGACATG CACTCTTAGG ACAAGTGTG GACCGGTGGA CCGGACTGAC

70 80 90 100 110 120
 ACCTTCAGAG CTTGATCATG TTTCTGAAGA GGCATTCAGG ATTCCTGCGA TCCCTACCCG
 TGGAGTGTGC GAACCTAGTG AAGGACTCTT CCGTAAAGTC TAGGGAGGT AAGGATGGGG

130 140 150 160 170 180
 TCTCGACACA AGTCTTCCAG GTTCTCTTCC TGGAGATTTG TTTCCAGGAA TGGAGATACC
 AAGACCTGTG TCGAAGAGTG GAAAGGAGAG ACCCTCAAAAG AAGCTCTCTG ACCCTGATGG

190 200 210 220 230 240
 CAGAGCCCTG CAACCTCCAG TGGCCCAAGG TGGGGCCAGC CGCTTACCAT TCTCCAGAGG
 GCTCGGGACG GTTGGATGTG ACCGCTTCTT AAGGCTCTCG GCGAGTGGTA GAGAGTCTTC

250 260 270 280 290
 CTCCTCCAGG CAGGCTACAG CCGCTCCAGC GCGCCGCCAC ATG CTG GGG CTC CCA
 GAGCGTGTG GTGGATGTG GGGGCTGGC CCGGGCCGCG TAC GAC GGG GGT
 Met Leu Gly Leu Phe

300 310 320 330 340
 TCA ACC TTG TTC ACA CCG CGC AGT ATG GAG GAG ATT GAC CAG CAG
 AGT TGG AAC AAG TGT GGC GGC TCA TAC CCG TCC TAG CTG TAA CAG GTC
 Ser Thr Leu Phe Thr Pro Arg Ser Met Met Glu Ser Ile Glu Ile Asp Glu

350 360 370 380 390
 AAG CTC CAG GAG ATC ATG AAG CAG CAG ACA GGG GAG TAC CTG ACT ATC GGG GGC
 TTC GAC GTC CTC TAG CAC TAC TGT CCG ATG GAG TGA TAG CCG CCG
 Lys Leu Gln Glu Ile Met Lys Gln Thr Gly Tyr Leu Thr Ile Glu Gly

400 410 420 430
 CAG CGT TAT CAG GCA GAA ATC AAT GAC TGG GAG AAC TTG GGT GAG ATG
 CTC GCA ATA GTC CTT TCG GAG TTA CCG TCG TCG TCG TCG TCG TCG TCG TCG
 Gln Arg Tyr Gln Ala Glu Ile Asn Arg Leu Glu Asn Leu Glu Gly Glu Met

440 450 460 470 480
 GGC AGT GGT ACC TGT GGT CAG CTG TGG AAG AAG CAG CAG TTC CCG AAG ACA
 CCG TCA CCA TGG ACA CCA GTC CAC ACC TTC TAC GCG AAG GCG TGT TGT
 Gly Ser Gly Thr Cys Gly Gln Val Tyr Lys Met Arg Phe Arg Lys Thr

490 500 510 520 530
 GGT CAC ATC ATT GCT GGT AAG CAA ATG CCG GCG TCT GGG AAC AAG GAA
 CCG GTC TAG TAA CCA CAA TTT GGT TAC CCG GCG AGA CCG TCG TTC CTT
 Gly His Ile Ile Ala Val Lys Glu Met Arg Arg Ser Gly Asn Lys Glu

【 10 B 】

MKK7
 540 550 560 570 580
 GAG AAT AAG CCG ATT ATT GAG CAG CAG GAT GTA GTA CTT AAG ACC CAG CAT
 CTC TGA TAA TTT GGT TAA AAT GAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG
 Glu Asn Lys Arg Ile Leu Met Met Asp Leu Asp Val Val Leu Lys Ser His

590 600 610 620 630
 GAC TGC CCG TAC ATC GGT CAG TGG TTT GGC ACC TTC ATC ACC ACA ACA
 CTC ACC GSA ATG TAG CAA CTC GTC AAA CCG TGG AAG TAG TGG TGT TGT
 Asp Cys Pro Tyr Ile Val Gln Cys Phe Gly Thr Phe Ile Thr Asn Thr

640 650 660 670
 GAC GTC TTT ATT GGC ATG GAG CTC ATG GGC ACA TTT CCA GAG AAG CTO
 CCG CAG AAA TAA CCG TAC CAG CAG TAC CCG TGT ACA CPT CTC TTC GAC
 Asp Val Phe Ile Ala Met Glu Leu Met Gly Thr Cys Ala Glu Lys Leu

680 690 700 710 720
 AAG AAA CCA ATG CAG GGC CCG ATT CTA CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG
 TTC TTT GGT TAC CTC CCG GCG TAA GGT CTC GCT TAG CAG CCG TGT TAC
 Lys Lys Arg Met Gln Gly Pro Ile Pro Glu Arg Ile Leu Gly Lys Met

730 740 750 760 770
 ACT GTC GGC ATT GTG AAA GCA CTG TAC TAT CTC AAG GAG AAG CAT GAC
 TGA CAC CCG TAA CAC TTT CCG GAC ATG ATA GAT TTC CTC TCC CTA CCG
 Thr Val Ala Ile Val Lys Ala Leu Tyr Tyr Leu Lys Glu Lys His Gly

780 790 800 810 820
 GTC ATC CAT CCG GAT CTC AAA CCG TTT TTT AAC ATC CTC CTA GAT GAG CCG
 CAG TAG GTA GCG CTA CAG TTT GGG AAG TTT TAG TAG GAG GAT CTA CCG
 Val Ile His Arg Asp Val Lys Pro Ser Ser Asn Ile Leu Leu Asp Glu Arg

830 840 850 860 870
 GGC CAG ATC AAG CTC TGT GAC TTT GGC ATC AGT GGC CCG CTT TGT GAC
 CCG GTC TAG TTT GAG ACA CTC AAA CCG TAG TCA CCG GCG GAA CAA CTG
 Gly Gln Ile Lys Leu Cys Asp Phe Gly Ile Ser Gly Arg Leu Val Asp

880 890 900 910
 TTC AAA GGC AAA ACA CCG AGT GCT GGT TGT GCT GGC TAT ATG GCT CCG
 AGG TTT CCG TTT TGT CCG TCA CCA CCG ACA CCA CCG ATA TAC CCA GGG
 Ser Lys Ala Lys Thr Arg Ser Ala Gly Cys Ala Ala Tyr Met Ala Pro

920 930 940 950 960
 GAG CCG ATC GAC CCT CCA GAT CCG ACC AAG CCG GAC TAT GAC ATC CCA
 CTC GCG TAG CTG GGA GGT CTA GAT CCG TCG TCG GGA CTC ATA CTC TAG GCT
 Glu Arg Ile Asp Pro Tyr Asp Pro Thr Lys Pro Asp Tyr Asp Ile Arg

【 10C 】

MKK7
 970 980 990 1000 1010
 CCG GAT GTC TCG ACC TTT GGC ATC TCA CCG CTT GAG CCG GCA ACA GCA
 CCA CCA CAC ACC TCG GAC CCG TAG AGT CAC CAC CTC GAG CTT TGT CCG
 Ala Asp Val Trp Ser Leu Gly Ile Ser Leu Val Glu Leu Ala Thr Gly>

1020 1030 1040 1050 1060
 CAG TTC CCG TAT AAG AAC TGC AAG ACC GAC TTT GAG GTC CTC ACC AAA
 GTC AAG GGG ATA TTT TTT ACG TTC TCG CTG AAA CTC CAG GAG TCG TTT
 Gln Phe Pro Tyr Lys Asn Cys Lys Thr Asp Phe Glu Val Leu Thr Lys>

1070 1080 1090 1100 1110
 GTC CTA GAG GAA GAG CCG CCA CTC CTC CTT GAT CAC ATG GCG TTC TCA
 CAG GAT CTC CTC CTC GCG GGT GAG CAC CCA CCG GCA CCA GTC TAG CCG AAG AGT
 Val Leu Gln Glu Glu Pro Pro Leu Leu Pro Gly His Met Gly Phe Ser>

1120 1130 1140 1150
 GGG GAC TTT CAG TCA TTT GTC AAA GAC TGC CTT ACT AAA GAT CAC AGG
 CCG CTC AAG GTC AGT AAA CAG TTT CTG ACG GAA TGA TTT CTA GTC TCC
 Gly Asp Phe Gln Ser Phe Val Lys Asp Cys Leu Thr Lys Asp His Asp>

1160 1170 1180 1190 1200
 AAG AGA CCA AAG TAT AAT AAG CTA CTT GAA CAC AGC TTC ATC AAG CAC
 TTC TCT GGT TTC ATA TTA TTC GAT GAA CTT GTC TCG AAG TAG TTC CTG
 Lys Arg Pro Lys Tyr Asn Lys Leu Leu Glu His Ser Phe Ile Lys His>

1210 1220 1230 1240 1250
 TAT GAG ATA CTC GAG GTC GAT GTC GCG TCC TGG TTT AAG GAT GTC ATC
 ATA CTC TAT GAG CTC CAC CTA GAG CCG AGG ACC AAA TTC CTA CAG TAG
 Tyr Glu Ile Leu Glu Val Asp Val Ala Ser Trp Phe Lys Asp Val Met>

1260 1270 1280 1290 1300
 CCG AAG ACC GAG TCC CCA AGG ACT AGT GGA GTC CTC AGT CAG CAC GAT
 CCG TTC TGG CTC AGG GGT TCC TGA TCA CCG CAG GAC TCA GTC GTC GTA
 Ala Lys Thr Glu Ser Pro Arg Thr Ser Gly Val Leu Ser Gln His His>

1310 1320 1330 1340 1350 1360
 CTG CCG TTC TTC AGG TA GCGCATGGC AGCGCCGACG CCGCCAGGGC CCGCCGCGCA
 GAC GGG AAG AAG TCC AT CCGAGTACCG TCGCCCGTCC GGGCTCTCCC GGGCCCGCGT
 Leu Pro Phe Phe Asp>

1370 1380 1390 1400 1410 1420
 CCGCCACCGA CCGCCCGCGC AACCTGGCCA ACCGAGCTGC CCATCAGGGC ACCCTGGACC
 CCGGCTGGCT CCGCCCGCGC TCGACCCGCT TGGCTCGAGG GGTATCTCC TCGACCTGG

【 10D 】

MKK7
 1430 1440 1450 1460 1470 1480
 TGGACGACTG CCAAGGACTG AGGACAGAAA GTAGGGGGTT CCGATCCAGC TGTACTCC
 ACCTGCTGAC GGTTCGTGAC TCTCTCTTT CATCTCCCAA GGGTAGGTCC AGACTGAGGC

1490 1500 1510 1520 1530 1540
 TCGCTACCAG CTGTGGACAA AAGGCGATCG TGGTTCCTAA TCGCTCCAC TGTGGGTCA
 ACGGATGGTC GACAGCTGTT TTCCGCTAGC ACCAAGGAT AGGGAGGGTG AGACCCGAGT

1550 1560 1570 1580 1590 1600
 CCGAGGATGT TGAGCCGCA? CCGACCCGCA CAGACACTGT GAACGGAA GAAGCCGCA
 CCGTCTGAC ACTGGGGTA GGGTGGGCT GCTCTGACA CTTCCTCTCT GCTCTCGGT

1610 1620
 AAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAA (配列番号:17)
 TTTTTTTTTT TTTTTTTTTT CTT

【 11A 】

MKK7b
 配列の範囲: 1から1465

10 20 30 40 50
 GC ACG ACC CCG GGT CCG CCG TCG CAG CCA GCA GCG CTC CAA CTC CCA
 CG TCG TCG GGA CCA GGA CCG GCG AGT GGT AGG AGT CTC TCG AAG GGT
 Thr Ser Pro Ala Pro Ala Pro Ser Gln Arg Ala Ala Leu Gln Leu Pro>

60 70 80 90
 CTG GCG AAC GAT CCG GCG ACC CCG TCA CCA TCG TCA GAG ACC TCC CCA
 GAC CCG TTT CTA CCG CCG TCG GCG AGT GGT AGG AGT CTC TCG AAG GGT
 Leu Ala Asn Asp Gly Gly Ser Arg Ser Pro Ser Ser Glu Ser Ser Pro>

100 110 120 130 140
 CAG CAC CCG ACA CCG CCG ACC CCG CCG CCG CAG ATG GCG GCG CTC CCA
 GTC GTC GGA TGT CCG GCG TCG CCG GCG GCG GCG TAC GAC CCG GAG GGT
 Gln His Pro Thr Pro Pro Thr Arg Phe Arg His Met Leu Gly Leu Pro>

150 160 170 180 190
 TCA ACC TTG TTT ACA CCG CCG AGT ATG GAG AGC ATT GAG ATT GAC CAG
 AGT TGG AAC AAG TGT GCG CCG TCA TAC CTC TCG TAG CTC TAA CTC GTC
 Ser Thr Leu Phe Thr Pro Arg Ser Met Glu Ser Ile Glu Ile Asp Gln>

200 210 220 230 240
 AAG CTC CAG GAG ATC ATG AAG CAG ACA GCG TAC CTC ACT ATC GCG GCG
 CTC GAC GTC CTC TAT TAC TTC CTC TGT CCG ATG GAC TGA TAG CCG CTC
 Lys Leu Gln Glu Ile Met Lys Gln Thr Gly Tyr Leu Thr Ile Gly Gly>

250 260 270 280 290
 CAG CCG TAT CAG GCA GAA ATC AAG GAC TCG GAG AAC TTT GGT TAG ATG
 GTC GCA ATA GTC CCG CTT TAG TTA CTC AAC CTC CTC AAC CCA CTC TAC
 Gln Arg Tyr Gln Ala Glu Ile Asn Asp Leu Glu Asn Leu Gly Glu Met>

300 310 320 330
 GCG AGT GGT ACC TGT GGT CAG GTC TGG AAG ATG CCG TTC CCG AAG ACA
 CCG TCA CCA TGG ACA CCA GTC CAC ACC TTC TAC CCG AAG GCG TTC TGT
 Gly Ser Gly Thr Cys Gly Gln Val Trp Lys Met Arg Phe Arg Lys Thr>

340 350 360 370 380
 GCG CAC ATC ATT GGT GGT AAG GAA ATG CCG CCG TTT GCG AAG AAG GAA
 CCG GTC TAG TAA CCA GAA TTC GTC TCG GCG GCG AGA CCG TTC TTC CTT
 Gly His Ile Ile Ala Val Lys Gln Met Arg Arg Ser Gly Asn Lys Glu>

390 400 410 420 430
 GAG AAT AAG CCG ATT TTG ATG GAC CCG GAT GTA GTA CTC AAG ACC GAT
 CTC TTA TTC CCG TAA AAC TAC CTC GAC CTA GAT GAT GAG TTC TCG GTA
 Glu Asn Lys Arg Ile Leu Met Asp Leu Asp Val Val Leu Lys Ser His>

【 11B 】

MKK7b
 440 450 460 470 480
 GAC TCG CCG TAC ATC GTC CAG TCC TTT GCG ACC TTC ATC ACC AAC ACA
 CTC ACC GGA ATG TAG CAA CTC ACC AAA CCG TCG AAG TAG TCG TTT TGT
 Asp Cys Pro Tyr Ile Val Gln Cys Phe Gly Thr Phe Ile Thr Asn Thr>

490 500 510 520 530
 GAC GTC TTT ATT GCG ATG GAG CTC ATG GCG ACA TGT GCA GAG AAG CTC
 CTC CAG AAA TAA CCG TAC CTC GAG TAC CCG TOT ACA CCG CTC TTC GAC
 Asp Val Phe Ile Ala Met Glu Leu Met Gly Thr Cys Ala Glu Lys Leu>

540 550 560 570
 AAG AAA CCA ATG CAG GCG CCG ATT CCA GAG CCA ATC CTC GCG AAG ATG
 TTC TTT GCT TAC GTC CCG GCG TAA GGT CTC GGT TAG GAC CCG TTC TAC
 Lys Lys Arg Met Gln Gly Pro Ile Pro Glu Arg Ile Leu Gly Leu Met>

580 590 600 610 620
 ACT GTC CCG ATT GTC AAA GCA CTC TAC TAT CTC AAG GAG AAG CAG CCG
 TGA CAC CCG TAA CAC TTT CCG GAC ATG ATA GAC TTC CTC CTC GTA CCG
 Thr Val Ala Ile Val Lys Ala Leu Tyr Tyr Leu Lys Glu Lys His Gly>

630 640 650 660 670
 GTC ATC CAT CCG GAT CTC AAA CCG TCC AAC ATC CTC CTA GAT GAG CCG
 CAG TAG GTA CCG CTA CAG TTT GCG AGG TTG TAG GAC CCG CTC CTC GCG
 Val Ile His Arg Asp Val Lys Pro Ser Asn Ile Leu Leu Asp Glu Arg>

680 690 700 710 720
 GCG CAG ATC AAG CTC TGT GAC TTT GCG ATC AGT GCG CCG CTC GTT GAC
 CCG GTC TAG TTC GAG ACA CTC AAA CCG TAG TCA CCG CCG GAA CAA CTC
 Gly Gln Ile Lys Leu Cys Asp Phe Gly Ile Ser Gly Arg Leu Val Asp>

730 740 750 760 770
 TCC AAA GCG AAA ACA CCG AGT GCT GCG TGT GCT CCG PAT GAT GCT CCG
 AGT TTT CCG TTT TGT GCG TCA CCA CCG ACA CCA CCG ATA TAC CCA GCG
 Ser Lys Ala Lys Thr Arg Ser Ala Gly Cys Ala Ala Tyr Met Ala Pro>

780 790 800 810
 GAG CCG ATC GAC CCG CCA GAT CCG ACC AAG CCG GAC GAT GAC ATC CCA
 CTC CCG TAG CTC GGA GGT CTA GCG TGG TTC CCA CTC ATA CTC TAG CCG
 Glu Arg Ile Asp Pro Pro Asp Pro Thr Lys Pro Asp Tyr Asp Ile Arg>

【 図 1 1 C 】

MKK7b

820 830 840 850 860
 CCT GAT GTC TGG AGG CTS GGC ATC TCA CTC GTG GAG CTC GCA ACA GGA
 CGA CTA CAC ACC TCG GAC CCG TAG AGT GAC CAC CTC GAG GGT TTT CTT
 Ala Asp Val Trp Ser Leu Gly Ile Ser Leu Val Leu Ala Thr Gly>

870 880 890 900 910
 CAG TTC CCG TAT AAG AAC TCC AAG AGC GAC TTT GAG GTC CTC ACC AAA
 CTC AAG GGG ATG TTC TCG ACC TTC TCC CCG AAA CTC CAG GAG TGG TTT
 Glu Phe Pro Tyr Lys Asn Cys Lys Thr Asp Phe Glu Val Leu Thr Lys>

920 930 940 950 960
 GTC CTA CAG GAA GAG CCG CCA CTC CTG CCG GAT CAC ATG GGC TTC TCA
 CAG GAT CTC CTT CCG GGT GAG GAC GGA CCA GTG TAC CCG AAG AGT
 Val Leu Glu Gln Glu Phe Pro Leu Leu Pro Gly His Met Gly Phe Ser>

970 980 990 1000 1010
 GGG GAC TTC CAG TCA TTT GTC AAA GAC TCC CTT ACT AAA GAT CAC AGC
 CCC CTG AAG GTC AGT AAA CAG TTT CTG ACC GAA TGA TTT CTA GTC CCG
 Gly Asp Phe Glu Ser Phe Val Lys Asp Cys Leu Thr Lys Asp His Arg>

1020 1030 1040 1050
 AAG AGA CCA AAG TAT AAT AAG CTA CTT GAA CAC AGC TTC ATC AAG CAC
 TTC TCT GAT TTT ATA TTA TTC GAT GAA CTT GTG TCG AAG TAG TTT GTC
 Lys Arg Pro Lys Tyr Asn Lys Leu Leu Glu His Ser Phe Ile Lys His>

1060 1070 1080 1090 1100
 TAT GAG ATA CTC GAG GTG GAT GTC CCG TCC TGG GTT AAG GAT GTC ATG
 ATA CTC TAT GAG CTC CAC CTA CAG CCG AGG ACC AAA TTC CTA CAG TAC
 Tyr Glu Ile Leu Val Asp Val Ala Ser Trp Phe Lys Asp Val Met>

1110 1120 1130 1140 1150
 GCG AAG ACC GAG TCC CCA AGC ACT AGT GGA GTC CTC AGT CAG CAC CAT
 CCG TTC TCG CCG AGG GGT TCC TGA TCA CTT GAT GAC TCA CTC CCG GGA
 Ala Lys Thr Glu Ser Pro Arg Thr Ser Gly Val Leu Ser Glu His His>

1160 1170 1180 1190 1200 1210
 CTC CCG TTC TTC AAG T AGCCTCATGG CAGCGGCGAG CCGCGGAGGG GCGCGCGGCG
 GAG GGG AAG AAG TTC A TCGCAATGAC GTCCCGGCTC CGCGCGTCCG CCGGGCGCGG
 Leu Pro Phe Phe Asp> (SEQ ID NO. 20)

1220 1230 1240 1250 1260 1270
 AGCGCCATCG ACCCGGCGCG CAACCTGGCG AACCGAGCTG CCGCATCAGG GAGCTGGGAC
 TCGCGGTCCG TCGCGGCGCG GTTGGAGCGG TTGGGTGAC GCGTACTCCG CTGGAGCTCG

1280 1290 1300 1310 1320 1330
 CTGGAGGAT CCGAAGGACT GAGACAGAA AGTAGCGGGT TCCCATCCAG CTTTGTCTCC
 GACCTGCTGA CCGTCTGTA CTCTCTCTT TCATCGCGCA AGGTAGGCTC GAGACTGAGC

【 図 1 1 D 】

MKK7b

1340 1350 1360 1370 1380 1390
 CTCGCTACCA CCGTGTGACA AAAGGCGATG CTGGTTCCTA ATCGTTCCCA CTCTGGGGTC
 GAGGATGCTT CGACACCTGT TTTCCCGTAC GACCAAGGAT TAGGGAGGGT GAGACCCAG

1400 1410 1420 1430 1440 1450
 AGCCAGCACT GTAGGCGCCA TCCCACCCCG ACAGAGACTG TGAACGGGAG ACAGCAAAAA
 TCGGTGCTCA CACTCGGGGT AGGCTGGGCG TGTCTGTGAC ACTTGCCTTC TCTCGTTTT

1460
 AAAAAAAAAA AAAAA (配列番号:19)
 TTTTTTTTTT TTTTTT

【 図 1 2 A 】

ヒト MKK7
 配列の範囲: 1から813

10 20 30 40 50 60
 TGTTCCTCTG CCGGACTGAC GCGCGGCGCG GCGCTGCGCG CCGCGCGTGG CCGCGCGGAA
 ACAACACAGC GCGCTGACTG CCGCGGCGCG CCGCGCGGCG CCGCGCGGCG CCGCGCGGCT

70 80 90 100
 G ATG CCG GCG TTC TCC CTG GAA CAG AAG CTC TCC GCG CTG GAA GCA AAG
 C TAC CCG GCG AGG AGG GAC CTT GTC TTC GAC AAG GCG GAC CTT CGT TTC
 Met Ala Ala Ser Ser Leu Glu Lys Leu Ser Arg Leu Glu Ala Lys>

110 120 130 140 150
 CTS AAG CAG GAG AAC CCG GAG CCG CCG AGG ATC GAC CTC AAC CTS
 GAC TTC GTC CTC TCG GCG CTC CCG GCG CCG TCC TAG CTG GAG TTC GAC
 Leu Lys Glu Glu Asn Arg Glu Ala Arg Arg Arg Ile Asp Leu Asn Leu>

160 170 180 190 200
 GAT ATC ACG CCC CAG CCG CCC AGG CCC ACC CTG CAG CTC CCG CTG CCG
 CTA TAG TCG GGG GTC CCG GCG TCC GGG TCG GAG GTC GAG GCG GAC CCG
 Asp Ile Ser Pro Gln Arg Pro Arg Pro Thr Leu Gln Leu Pro Leu Ala>

210 220 230 240 250
 AAC GAT GGG GGC AGC CCG TCC CCA TCC TCA GAG AGC TCC CCG CAG CAC
 TTG CTA CCG CCG TCG GCG AGC GGT AGG AGT CTC TCG AAG GGC GTC GTG
 Asn Asp Gly Gly Ser Arg Ser Pro Ser Ser Glu Ser Ser Pro Gln His>

260 270 280 290 300
 CCC ACG CCC CCG GCG GCG CCG CCG CAC ATG CTG GGG CTC CCG TCA ACC
 GGG TCG GGG GCG GCG CCG GCG GCG GTG TAC GAC CCG GAG CCG AGT TGG
 Pro Thr Pro Pro Ala Arg Pro Arg His Met Leu Gly Leu Pro Ser Thr>

310 320 330 340
 CTG TTC ACA CCC CCG AGC ATG GAG AGC ATT GAG ATT GAC CAG AAG CTC
 GAC AAG TGT GGG GCG TCG TAC CTC TCG TAA CTC TAA CTC GTC TTC GAC
 Leu Phe Thr Pro Arg Ser Met Ser Ile Glu Ile Asp Gln Lys Leu>

350 360 370 380 390
 CAG GAG ATC ATG AAG CAG ACG GGC TAC CTC ACC ATC GGG GCG CAG CCG
 GTC CTC TAG TAC TTC GTC TCC CCG ATG GAC TGG TAG CCG CCG GTC CCG
 Gln Glu Ile Met Lys Glu Thr Gly Tyr Leu Thr Ile Gly Gly Gln Asp>

400 410 420 430 440
 TAC CAG GCA GAA ATC AAG CAG CTG GAG AAC TTG GCG GAG ATG GCG AGC
 ATG GTC CCG CTT TAG TTG CTG GAC CTC TTG AAC CCG CTC TAC CCG TCG
 Tyr Gln Ala Glu Ile Asn Asp Leu Glu Asn Leu Gly Glu Met Gly Ser>

【 図 1 2 B 】

ヒト MKK7

450 460 470 480 490
 GGC ACC TTC GCG CAG GTC TGG AAG ATG CCG TTC CCG AAG ACC GCG CAC
 CCG TCG ACC CCG GTC CAG ACC TTC TAC CCG AAG CCG TTC TCG CCG GTC
 Gly Thr Cys Gly Gln Val Trp Lys Met Arg Phe Arg Lys Thr Gly His>

500 510 520 530 540
 GTC ATT GCG GTT AAG CAA ATG CCG CCG TCC GGG AAC AAG GAG GAG AAC
 CAG TAA CCG CAA TTC GTT TAC CCG GCG AGG CCG TTC TTC CTC CTT TCG
 Val Ile Ala Val Lys Gln Met Arg Arg Ser Gly Asn Lys Glu Glu Asn>

550 560 570 580
 AAG CCG ATC CTC ATG GAC CTG GAT GTC GTG CTG AAG AGC CAC GAC TCG
 TTC CCG TAG GAG TAC CTG GAC CTA CAC CAC GAC TTC TCG GTG CTG ACG
 Lys Arg Ile Leu Met Asp Leu Asp Val Val Leu Lys Ser His Asp Cys>

590 600 610 620 630
 CCG TAC ATG GTC CAG TGC TTT GGG ACC TTC ATT ACC AAC ACC GAC GTC
 GGG ATG TAG CAC GTC ACG AAA CCC TCC AAG TAG GGG TGG TCC CTC CAG
 Pro Tyr Ile Val Gln Cys Phe Gly Thr Phe Ile Thr Asn Thr Asp Val>

640 650 660 670 680
 TTC ATC GCG ATG GAG CTC ATG GGC ACC TCG GCT GAG AAG CTC AAG AAG
 AAG TAG CCG TAC CTC GAG TAC CCG TGG ACG CGA CTC TTC GAG TTC TTC
 Phe Ile Ala Met Glu Leu Met Gly Thr Cys Ala Glu Lys Leu Lys Lys>

690 700 710 720 730
 GGG ATG CAG GCG CCG ATC CCG GAG CCG ATT CTC GCG AAG ATG ACA GTG
 CCG TAC GTC CCG GGG TAG GGG CTC GCG TAA GAC CCG TTC TAC TGT CAC
 Arg Met Glu Gly Pro Ile Pro Glu Arg Ile Leu Gly Lys Ser Thr Val>

740 750 760 770 780
 GCG ATT GTG AAG GCG CTG TAC CAC CTG AAG GAG AAG CAC CCG CTC ATC
 CCG TAA CAC TTC CCG GAC ATG ATG GAC TTC CCG TTC GTC CCA CAG TAG
 Ala Ile Val Lys Ala Leu Tyr Tyr Leu Lys Glu Lys His Gly Val Ile>

790 800 810 820
 CAC CCG GAC GTC AAG CCC TCC AAC ATC CTC CTG GAC GAG CCG GCG CAC
 GTC GCG CTC CAG TTC GCG AAG TCG TAG GAC GAC CTG CTC CCG CCG CTG
 His Arg Asp Val Lys Pro Ser Asn Ile Leu Leu Asp Glu Arg Gly Gln>

830 840
 ATC AAG CTC TCC GA (配列番号:25)
 TAG TTC GAG ACG CT
 Ile Lys Leu Cys> (配列番号:26)

【 図 1 3 A 】

マウスMKK7c
配列の範囲：19から1613

```

10      20      30      40      50      60
AGCGGAGGGG CAGTGGGGTG TTTGTGTACC CCGGACTGAC GGGTGGGGCT GCGGTGAGGG
TCGGCTCCCG GTGACGGGAC AAACAGAGTG GCGCTGACTC CCGACGGGAC CCGGACTGCG

70      80      90      100     110
CGCGGAGGGG CCGCGGGGAA G ATG GCG GCG TCC TCC CTG GAG CAG AAG CTG
CGCGGTCCCG CCGCGGGCTTT C TAC CCG CCG AGG AGG GAC CTC GTC TTC GAC
Met Ala Ala Ser Ser Leu Glu Gln Lys Leu>

120     130     140     150
TCC CCG CTG GAA GGC AAG CTG AAG CAG GAG AAC CTT GAG GCG CCG AGG
AGG CCG GAC CTT CCG TTC GAC TTC GTC CTC TCG GCA CTC CCG GCG TTC
Ser Arg Leu Glu Ala Lys Leu Lys Gln Glu Asn Arg Glu Ala Arg Asp>

160     170     180     190     200
AGG ATC GAG CTC AAC TTG GAT ATG AGC CCA CAG CCG CCG AGG CCG ACC
TCC TAG CTG GAG TTG AAC CTA TAG TCG GGT GTC GCC GCG TCC CCG TGG
Arg Ile Asp Leu Asn Leu Asp Ile Ser Pro Gln Arg Pro Arg Pro Thr>

210     220     230     240     250
CTG CAA CTC CCA CTG GGC AAC GAT GGG GGC AGC CCG TCA CCA TCC TCA
GAC CTT GAG GGT GAC CCG TCG CTG GCG GCG TCA TAC CTC TCG TAG
Leu Gln Leu Pro Leu Ala Asn Asp Gly Gly Ser Arg Ser Pro Ser Ser>

260     270     280     290     300
GAG AGC TCC CCA CAG CAC GGT ACA CCC CCG ACC CCG CCG CCG CAC ATG
CTC TCG AGG GGT GTC GTS GGA TGT GGG GCG TCG GCG GCG GCG CTG TAC
Glu Ser Ser Pro Gln His Pro Thr Pro Pro Thr Arg Pro Arg His Met>

310     320     330     340     350
CTG GGG CTC CCA TCA ACC TTG TTC ACA CCG CCG AGT ATG GAG ACC ATC
GAC CTC GAG GGT AGT TCG AAC AAG TGT GCG CCG TCA TAC CTC TCG TAG
Leu Gly Leu Pro Ser Thr Leu Phe Thr Pro Arg Ser Met Glu Ser Ile>

360     370     380     390
GAG ATT CAC CAG AAG CTS CAG GAG ATC ATG AAG CAG ACA GGG TAC CTG
CTC TAA CTG GTC TTC GAC GTC CTC TAG TAC TTC GTC TGT CCC ATG CAG
Glu Ile Asp Gln Lys Leu Gln Glu Ile Met Lys Gln Thr Gly Tyr Leu>

400     410     420     430     440
ACT ATC GGG GGC CAG CTT TAT CAG CCA GAA ATC AAT GAC TTG GAG AAC
TGA TAG CCG CCG GTC CCA ATA GTC CTT CTT TAG TTA CTG AAC CTC CTG
Thr Ile Gly Gly Gln Arg Tyr Gln Ala Glu Ile His Asp Leu Glu Asn>

```

【 図 1 3 B 】

マウスMKK7c

```

450     460     470     480     490
TTG GGT GAG ATG GGC AGT GGT ACC TGT GGT CAG GTG TGG AAG ATG CCG
AAC CCA CTC TAC CCG TCA CCA TGG ACA CCA GTC CAC ACC TTC TAC GGC
Leu Gly Glu Met Gly Ser Gly Thr Cys Gly Gln Val Trp Lys Met Arg>

500     510     520     530     540
TTC CCG AAG ACA GGC GAC ATC ATT GCT GTT AAG CAA ATG CCG CCG TTT
AAG CCG TTC TTT CCG GTG TAA CCA CAA GAA TTC GTT TAC CCG CCG AAG
Phe Arg Lys Thr Gly His Ile Ile Ala Val Lys Gln Met Arg Arg Ser>

550     560     570     580     590
GGG AAC AAG GAA GAG AAT AAG CCG ATT TTG ATG GAC CTG GAT GTA GTA
CCC TTG TTC CTT CTT TTA TTC GCG TAA AAC TAC CTC GAG CTA CAT CAT
Gly Asn Lys Glu Glu Asn Lys Arg Ile Leu Met Asp Leu Asp Val Val>

600     610     620     630
CTC AAG AGC CAT GAC TGC CTT TAC ATC GTT CAG TCC TTT GCG ACC TTC
GAG TTC TCG GTA CTC ACG GGA ATG TAG GAA CTC ACG AAA CCG TGG AAG
Leu Lys Ser His Asp Cys Pro Tyr Ile Val Gln Cys Phe Gly Thr Phe>

640     650     660     670     680
ATC ACC AAC ACA GAC GTC TTT ATT GCC ATG GAG CTC ATG GCG ACA TGT
TAG TGG TTG TGT CTG CAG AAA TAA CCG TAC CTC GAG TAC CCG TGT ACA
Ile Thr Asn Thr Asp Val Phe Ile Ala Met Glu Leu Met Gly Thr Cys>

690     700     710     720     730
GCA GAG AAG CTG AAG AAA CCA ATG CAG GCG CCG ATT CCA GAG CCA ATC
CGT CTC TTC GAC TTC TTT GCT TAC GTC CCG GGG TAA GGT CCG TGT TAG
Ala Glu Lys Leu Lys Lys Arg Met Gln Gly Pro Ile Pro Glu Arg Ile>

740     750     760     770     780
CTG GCG AAG ATG ACT GTC GCG ATT GTC AAA GCA CTG TAC TAT CTG AAG
GAC CCG TTC TAC TGA CAC CCG TAA CAC TTT CGT GAC ATG ATA GAC TTC
Leu Gly Lys Met Thr Val Ala Ile Val Lys Ala Leu Tyr Tyr Leu Lys>

790     800     810     820     830
GAG AAG CAT GGC GTC ATC CAT CCG GAT CTC AAA CCG TTC ACA ATC CTG
CTC TTC GTA CCG CAG TAG GTA CCG CTA CAG TTT GCG AAG TTG TAG GAC
Glu Lys His Gly Val Ile His Arg Asp Val Lys Pro Ser Asn Ile Leu>

840     850     860     870
CTA GAT GAG CCG GGC CAG ATC AAG CTC TGT GAC TTT GGC ATC AGT GGC
GAT CTA CTG GCG CCG GTC TAG TTC GAG ACA CTG AAA CCG TAG TCA CCG
Leu Asp Glu Arg Gly Gln Ile Lys Leu Cys Asp Phe Gly Ile Ser Gly>

```

【 図 1 3 C 】

マウスMKK7c

```

880     890     900     910     920
CGC CTT CTT GAC TTC AAA GGC AAA ACA CCG AGT GCT GGC TGT GCT GGC
CGC GAA CAA CTG AGG TTT CCG TTT TGT GGC TGA CCA CTT ACA CAA GGG
Arg Leu Val Asp Ser Lys Ala Lys Thr Arg Ser Ala Gly Cys Ala Ala>

930     940     950     960     970
TAT ATG GCT CCG GAG CCG ATC GAC CCG CCA GAT CCG ACC AAG CCG GAC
ATA TAC CCA GGG CTC CCG TAG CTG GGA GGT CTA GGG TGG TTC GGA CTG
Tyr Met Ala Pro Glu Arg Ile Asp Pro Pro Asp Pro Thr Lys Pro Asp>

980     990     1000    1010    1020
TAT GAC ATC CCA GCT GAT CTG TGG AGC CTG GGC ATC TCA CTG GTS GAG
ATA CTG TAG GCT CCA CTA CAC ACC TCG GAC CCG TAG ATG GAG CAG CTC
Tyr Asp Ile Arg Ala Asp Val Trp Ser Leu Glu Ile Ser Leu Val Glu>

1030    1040    1050    1060    1070
CTG GCA ACA CCA CAG TTC CCG TAT AAG AAC TGC AAG ACG GAC TTT GAG
GAC CPT TGT CCT CTC AAG GGG ATA TTC TTG AGG TTC TGC CTG AAA CTC
Leu Ala Thr Gly Gln Phe Pro Tyr Lys Asn Cys Lys Thr Asp Phe Gly>

1080    1090    1100    1110
GTC CTC ACC AAA GTC CTA CAG GAA GAG CCG CCA CTC CTG CTT GGT CAC
CAG GAG TGG TTT CAG GAT CTC CTT CTC GGG GGT GAG GAC GGA CCA GTG
Val Leu Thr Lys Val Leu Gln Glu Glu Pro Pro Leu Leu Pro Gly His>

1120    1130    1140    1150    1160
ATG GGC TTC TCA GGG GAC TTC CAG TCA TTT GTC AAA GAC TGC CTT ACT
TAC CCG AAG AGT CCG CTG AAG GTC AGT AAA CAG TTT CTG ACG GAA TGA
Met Gly Phe Ser Gly Asp Phe Gln Ser Phe Val Lys Asp Cys Lys Thr>

1170    1180    1190    1200    1210
AAA GAT CAC AGG AAG AGA CCA AAG TAT AAT AAG CTA CTT GAA CAC AGC
TTT CTA GTG TCC TTC TCT GGT TTC ATA TTA TTC GAT GAA CTT GTG TCG
Lys Asp His Arg Lys Arg Pro Lys Tyr Asn Lys Leu Leu Glu His Ser>

1220    1230    1240    1250    1260
TTC ATC AAG CAC TAT GAG ATA CTC GAG CTG GAT GTC GCG TCC TGG TTT
AAG CAG TTC CTG ATA CTC TAT GAG CTC CAC CTA CAG CCG AGG ACC AAA
Phe Ile Lys His Tyr Glu Ile Leu Glu Val Asp Val Ala Ser Trp Phe>

1270    1280    1290    1300    1310
AAG GAT GTC ATG GCG AAG ACC GAG TCC CCA AAG ACT AGT GGA GTC CTG
TTC CTA CAG TAC CCG TTC TCG CTC ACG GGT TCC TGA TCA CTT CAG GAC

```

【 図 1 3 D 】

マウスMKK7c

```

Lys Asp Val Met Ala Lys Thr Glu Ser Pro Arg Thr Ser Gly Val Leu>

1320    1330    1340    1350    1360
AGT CAG CAC CAT CTD CCG TTC TTC AGG TA GCCTGATGCC AGCGGCCAGC
TCA CTC GTG GTA GAC GGG AAG AAG TCC AT CCGGATCCG TCGGCGGTG
Ser Gln His His Leu Pro Phe Phe Arg> (配列番号:28)

1370    1380    1390    1400    1410    1420
CGCGGAGGGG CCGCGGGGCA CCGCCACCGA CCGCCCGCCC AACCTGGCCA ACCGAGTGC
GGCGTCCCGG GGGGCGCGGT GCGCGTGGCT GGGGGGGGGG TTGGACCGGT TGGGTGAGC

1430    1440    1450    1460    1470    1480
CCATCAGGGG ACCTGGGACC TGGACCGTGC CCAAGGACTG AGGACAGAAA GTAGGGGTT
GGTAGTCCCG TGGACCGTGG ACCTGCTGAC GGTTCCTGAC TCCTGTCTTT CATCCGCCAA

1490    1500    1510    1520    1530    1540
CCCATCCAGC TCTGACTCCC TGCGTACCAG CTGTGGACAA AAGGCGATCG TGGTCTTAA
GGGTAGGTCC AGACTGAGGG ACGGATGGTC GACACTCTTT TTCCCGTAGG ACCAAGGATT

1550    1560    1570    1580    1590    1600
TCCTTCCAC TCTGGGTTCA GCGAGCAGTG TGAGCCCAT CCGACCCCGA CAGCACTGT
AGGGAGGGTG AGACTCGAGT CCGTGTCCAC ACTCGGGGTA GGGTGGGGCT GTCTGTGACA

1610    1620    1630    1640
GAACGGAGA CAGCAGGCCA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAA (配列番号:27)
CTTGGCTTCT GTGCTCGGTT TTTTTTTTTT TTTTTTTTTT TTT

```

【 図 1 4 A 】

MKK7d
配列の範囲：1から1578

10 20 30 40 50 60
GGAAAGGCAG CCTCTCTAG GTGAAATTC TGTTCATAC CTGGCCACCT GCGCTACGTC
CCTTTCCGTC GGAGGACATC CACTTTTAAG ACAAGATGAT GACCCGTGGA CCGGACTGAC

70 80 90 100 110 120
ACCTTCACAG GTTGATCATC TTCTGGAAGA GGCATTCAGG ATTCTCTCCA TCCCTACCC
TGGAAAGTTC GAAGTATGAG AAGACTTTCT CCGTAAGTCC AAAGGAGGT AGGATGSGG

130 140 150 160 170 180
TTCTGGACAA AGTCTGCAAC GTTCTCTTCC TGGAGTCTTC TTCCAGGAAC TGGAGATACC
AAGACTCTTT TCAGAAGGTG CAAGAGGAGG ACCCTCAAG AAAGTCTCTT ACCTCTATGG

190 200 210 220 230 240
CAGAGCCCTG CAACCTCCAC TGGCCACCGA TGGGGGCGCC CCGTCCACAT CCGCAGAGAG
TCTCGGGGAC GTTGAAGGTG ACCGTTTCTT ACCCCGCTCC CCGAGTGGTA GGAGTCTCTC

250 260 270 280 290
CTCCCCACAG CACCTCAGAC CCGCCACCCG GCGCCGCGAC ATG CTG GGG CTC CCA
GAGGGTCTC GTGGATGTG GGGGTGGCC CGGGCGGCTC TAC GAC CCG GAG GGT
Met Leu Gly Leu Prop

300 310 320 330 340
TCA ACC TTG TTC ACA CCG CGC AGT ATG GAG ACC ATC GAG ATT GAC CAG
AGT TGG AAC AAG TGT GGC GCG TCA TAC CTC TCG TAG CTC TAA CTG GTC
Ser Thr Leu Phe Thr Pro Arg Ser Met Glu Ser Ile Glu Ile Asp Glu

350 360 370 380 390
AAG CTC CAG GAG ATC ATG AAG CAG ACA GGG TAC CTG ACT ATC GGG GGC
TTC GAC CTC CTC TAG TAC TTC CTC TGT CCG ATG GAC TGA TAG CCG CGC
Lys Leu Gln Glu Ile Met Lys Gln Thr Gly Tyr Leu Thr Ile Gly Gly

400 410 420 430
CAG CGT TAT CAG GCA GAA ATC AAT GAC TTG GAG AAC TTG GGT GAG ATG
GTC GCA ATA CTC GGT CTT TAG TTA CTG AAC CTC TTG AAC CCA CTC TAC
Gln Arg Tyr Gln Ala Glu Ile Asn Asp Leu Glu Asn Leu Gly Glu Met

440 450 460 470 480
GCC AGT GGT ACC TGT GGT CAG GTG TGG AAG ATG CCG TTC CGR AAG ACA
CCG TCA CCA TGG ACA CCA GTC CAG ACC TTC TAC GGC AAC GGC CTC TGT
Gly Ser Gly Thr Cys Gly Gln Val Trp Lys Met Arg Phe Arg Lys Thr

490 500 510 520 530
GCC CAC ATC ATT GCT GTT AAG CAA ATG CCG CGC TGT GGG AAC AAG GAA
CCG GTC TAG TAA CCA CAA TTC GTT TAC GCC GCG AGA CCG TTG TTC CTT
Gly His Ile Ile Ala Val Lys Gln Met Arg Ser Gly Asn Lys Glu

【 図 1 4 B 】

MKK7d
540 550 560 570 580
GAG AAT AAG CGC ATT TTG ATG GAC CTG GAT GTA GTA CTC AAG ACC CAT
CTC TTA TTC GCG TAA AAC TAC CTG GAC CTA CAT CAT GAG TTC TCG GTA
Glu Asn Lys Arg Ile Leu Met Asp Leu Asp Val Val Leu Lys Ser His

590 600 610 620 630
GAC TCG CCT TAC ATC GTT CAG TCC TTT GGC ACC TTC ATC ACC AAC ACA
CTG ACC GGA ATG TAG CAA CTC ACG AAA CCG TGG AAG TAG TGG TTG TGT
Asp Cys Pro Tyr Ile Val Gln Cys Phe Gly Thr Phe Ile Thr Asn Thr

640 650 660 670
GAC CTC TTT ATT GCC ATG GAG CTC ATG GGC ACA TGT GCA GAG AAG CTC
CTG CAG AAA TAA CCG TAC CTC GAG TAC CCG TGT ACA CGT CTC TTC GAC
Asp Val Phe Ile Ala Met Glu Leu Met Gly Thr Cys Ala Glu Lys Leu

680 690 700 710 720
AAG AAA CGA ATG CAG GGC CCC ATT CCA GAG CGA ATC CTC GGC AAG ATG
TTC TTT GCT TAC CTC GCG GGG TAA GGT CTC GCT TAG GAC CCG TTC TAC
Lys Lys Arg Met Glu Gly Pro Ile Pro Glu Arg Ile Leu Gly Lys Met

730 740 750 760 770
ACT GTG GCG ATT CTG AAA GCA CTG TAC TAT CTC AAG GAG AAG CAT GGC
TGA CAC CCG TAA CAC TTT CGT GAC ATG ATA GAC CTC TTC GTA CCG
Thr Val Ala Ile Val Lys Ala Leu Tyr Tyr Leu Lys Glu Lys His Gly

780 790 800 810 820
GTC ATC CAT CCG GAT GTC AAA CCC TCC AAC ATC CTC CTA GAT CAG GCG
CAG TAG GTA CCG CTA CAG TTT GGG AGG TTG TAG CAG GAT CTA CTC GCC
Val Ile His Arg Asp Val Lys Pro Ser Asn Ile Leu Leu Asp Glu Arg

830 840 850 860 870
GGC CAG ATC AAG CTC TGT GAC TTT GGC ATC AGT GGC CCG CTT GTT GAC
CCG GTC TAG TTC GAG ACA CTG AAA CCG TAG TCA CCG GAT CCA CTC GCG
Gly Glu Ile Lys Leu Cys Asp Phe Gly Ile Ser Gly Arg Leu Val Asp

880 890 900 910
TCC AAA GCC AAA ACA CCG AGT GCT GGC TGT GCT GCT TAT ATG GCT CCG
AGG TTT CCG TTT TGT GCT TCA CGA CCG ACA CGA CCG ATA TAC CGA GGG
Ser Lys Ala Lys Thr Arg Ser Ala Gly Cys Ala Ala Tyr Met Ala Pro

920 930 940 950 960
GAG CCG ATC GAC CTT CCA GAT CCC ACC AAG CCT GAC TAT GAC ATC CCA
CTC CCG TAG CTG GCA GGT CTA GGG TGG TTC GGA CTG ATA CTG TAG GCT

【 図 1 4 C 】

MKK7d
Glu Arg Ile Asp Pro Pro Asp Pro Thr Lys Pro Asp Tyr Asp Ile Arg

970 980 990 1000 1010
GCT GAT GTG TGG ACC CTG GGC ATC TCA CTG GTG GAG CTG GCA ACA GGA
CGA CTA CAC ACC TCG GAC CCG TAG AGT GAC CAC CTC GAC CGT TGT CCA
Ala Asp Val Trp Ser Leu Gly Ile Ser Leu Val Glu Leu Ala Thr Gly

1020 1030 1040 1050 1060
CAG TTC CCC TAT AAG AAC TGC AAG ACC GAC TTT GAG GTC CTC ACC AAA
GTC AAG GGG ATA TTG TTG ACC TTC TCC CTG AAA CTC CAG GAG TGG TTT
Gln Phe Pro Tyr Lys Asn Cys Lys Thr Asp Phe Glu Val Leu Thr Lys

1070 1080 1090 1100 1110
GTC CTA CAG GAA GAG CCC CCA CTC CTG CCT GGT CAC ATG GGC TTC TCA
CAG GAT GTC CTT CTT GGG GGT GAG GAC GGA CCA GTC GTC CCG AAG AGT
Val Leu Gln Glu Glu Pro Pro Leu Leu Pro Gly His Met Gly Phe Ser

1120 1130 1140 1150
GGG GAC TTC CAG TCA TTT CTC AAA GAC TCC CTT ACT AAA GAT CAC AGG
CCC CTG AAG GTC AGT AAA CAG TTT CTG ACG GAA TCA TTT CTA GTG TCC
Gly Asp Phe Gln Ser Phe Val Lys Asp Cys Leu Thr Lys Asp His Arg

1160 1170 1180 1190 1200
AAG AGA CCA AAG TAT AAT AAG CTA CTT GAA CAC AGC TTC ATC ATC AAG
TTC TCT GGT TTC ATA TTA TTC GAT GAA CTT GCG TCG AAG TAG TAG TTC
Lys Arg Pro Lys Tyr Asn Lys Leu Leu Glu His Ser Phe Ile Ile Lys

1210 1220 1230 1240 1250
CAC TAT GAG ATA CTC GAG GTG GAT GTC GCG TCC TGG TTT AAG GAT GTC
GTG ATA CTC TAT GAG CTC CAC CTA CAG CCG AGG ACC AAA TTC CTA CAG
His Tyr Glu Ile Leu Glu Val Asp Val Ala Ser Trp Phe Lys Asp Val

1260 1270 1280 1290 1300
ATG GCG AAG ACC GAG TCC CCA AGG ACT AGT GGA GTC CTG AGT CAG CAC
TAC CCG TTC TGG CTC AAG GGT TCC TGA TCA CCT CAG GAG TCA GTC GTG
Met Ala Lys Thr Glu Ser Pro Arg Thr Ser Gly Val Leu Ser Gln His

1310 1320 1330 1340 1350
CAT CTG CCC TTC TTC AGT GGG AGT CTG GAG GAG TCT CCC ACT TCC CCA
GTA CAC GGG AAG AAG TCA CCC TCA GAC CTC CTC AGA GGG TGA AAG GGT
His Leu Pro Phe Phe Ser Gly Ser Leu Glu Glu Ser Pro Thr Ser Pro

1360 1370 1380 1390
CCT TCT CCC AAG TTC TCC CTT CTG TCA CCA GCC ATC CCT CAG CCG CAG

【 図 1 4 D 】

MKK7d
GSA AGA GGC TTC AGG AAG GGA GAC AGT GGT CCG TAG GGA GTC CCG GTC
Pro Ser Pro Lys Ser Phe Pro Leu Ser Pro Ala Ile Pro Gln Ala Glu

1400 1410 1420 1430 1440 1450
GCA GAG TGG GTC TCG GGC AGG TAGGACCTG GAGTGGCCTG GTCCACCTT
GCT CTC ACC CAG AGC CCG TCC ATCCCTGAC CTCACCGGAC CAGGGTGGGA
Ala Glu Trp Val Ser Gly Asp (配列番号:30)

1460 1470 1480 1490 1510
CTGACTCTCT CTTGAGCCCA CCACTGTTC CTTCTTCCCT TTTTAAACA AAATACCTT
GACTGGAGGA GGAGTCCGCT GGTCAACAAC GGAGAAGGA AAATATTCT TTAATGGGA

1520 1530 1540 1550 1570
GTTTATTAT CCTTAGACCC TTGAGATTA AACCTTCCC TTTTCTCCC AAALAAAAA
CAACATTA GGATCTGCG AACCTTAT TTGGAAAGG AAAGAAGGC TTTTTTTTT

AAAAAAAA (配列番号:29)
TTTTTTTT

【 図 1 5 A 】

MKK7e
配列の範囲：1から1598

10 20 30 40 50 60
AGCGGAGGCG CAGTGGCGTG TTTTCTACG CCGCACTGAC GGGTGGCCTG GCGGTGAGCG
TCGCTCCGCG CTCACGCGAC AAACAGATGG GCGCTGACTG CCGACTCGAC CCGCACTGCG

70 80 90 100 110
CGCGGAGGCG CCGCGGCGAA G ATG GCG GCG TCC TCC CTG GAG CAG AAG CTG
CGCCGCTCCG CCGCGCGCTT C TAC CCG CGC AGG AGG GAC CTC CTC TTC GAC
Met Ala Ala Ser Ser Leu Glu Gln Lys Leu

120 130 140 150
TCC GCG CTG GAA GCC AAG CTG AAG CAG GAG AAC CGT GAG GCC CGC AGG
AGG GCG GAC CTT CGG TTC GAC TTC CTC CTC TTG GCA CTC CGG GCG TCC
Ser Arg Leu Glu Ala Lys Leu Lys Gln Glu Asn Arg Glu Ala Arg Arg

160 170 180 190 200
AGG ATC GAC CTC AAC TTG GAT ATC AGC GCA CAG CGG CCC AGG CCG ACC
TCC TAG CTG GAG TTG AAC CTA TAG TCG GGT GTC GCG GCG TCC GGG TGG
Arg Ile Asp Leu Asn Leu Asp Ile Ser Pro Gln Arg Pro Arg Pro Thr

210 220 230 240 250
CTG CAA CTC CCA CTG GCC AAC GAT GGG GCG AGC CGC TCA CCA TCC TCA
GAC CTT GAG GGT GAC CGG TTG CTA CCC CGC TCG GCG AGT GGT AGG AGT
Leu Gln Leu Pro Leu Ala Asn Asp Gly Ser Arg Ser Pro Ser Ser

260 270 280 290 300
GAG AGC TCC CCA CAG CAC CTT ACA CCC CGC ACC CGG CCC GCG CAG ATG
CTC TCG AGG GGT CTC GCG GAA TTT GGG GGG TGG GCG GCG GCG CTG TAC
Glu Ser Ser Pro Gln His Pro Thr Pro Pro Thr Arg Pro Arg His Met

310 320 330 340 350
CTG GCG CTC CCA TCA ACC TTG TTC ACA CCG CGC AGT ATG GAG AGC ATC
GAC CCC GAG GGT AGT TGG AAC AAG TGT GCG GCG TCA TAC CTC TCG TAG
Leu Gly Leu Pro Ser Thr Leu Phe Thr Pro Arg Ser Met Glu Ser Ile

360 370 380 390
GAG ATT GAC CAG AAG CTG CAG GAG ATC ATG AAG CAG ACA GGG TAC CTG
CTC TAA CTG GTC GAC GTC CTC TAG TAC TTC GTC TGT CCG ATG GAC
Glu Ile Asp Gln Lys Leu Gln Glu Ile Met Lys Gln Thr Gly Tyr Leu

【 図 1 5 B 】

マウス MKK7e

450 460 470 480 490
TTG GGT GAG ATG GCG AGT GGT ACC TGT GGT CAG GTG TGG AAG ATG CGG
AAC CCA CTC TAC CCG TCA CCA TGG ACA CCA GTC CAC ACC TTC TAC GCC
Leu Gly Glu Met Gly Ser Gly Thr Cys Gly Gln Val Trp Lys Met Arg

500 510 520 530 540
TTC CGG AAG ACA GGC CAC ATC ATT GCT GTC AAG CAA ATG CGG CGC TCT
AAG GCC TTC TGT CCG GTG TAG TAA CGA CAA TTC GTT TAC GCC GCG AGA
Phe Arg Lys Thr Gly His Ile Ile Ala Val Lys Gln Met Arg Arg Ser

550 560 570 580 590
GGG AAC AAG GAA GAG AAT AAG CGC ATT TTG ATG GAC CTG GAT GTA GTA
CCC TTG TTC CTT CTC TTA TTC GGG TAA AAC TAC CTC GAC CTA CAT CAT
Gly Asn Lys Glu Glu Asn Lys Arg Ile Leu Met Asp Leu Asp Val Val

600 610 620 630
CTC AAG AGC CAT GAC TGC CCT TAC ATC GGT CAG TGC TTT GCC ACC TTC
GAG TTC TCG GTA CTG ACG GGA ATG TAG CAA GTC ACG AAA CCG TGG AAG
Leu Lys Ser His Asp Cys Pro Tyr Ile Val Gln Cys Phe Gly Thr Phe

640 650 660 670 680
ATC ACC AAC ACA GAC GTC TTT ATT GCC ATG GAG CTC ATG GCC ACA TGT
TAG TGG TTS TTT CTG CAG AAA TAA CCG TAC CTC GAG TAC CCG TGT ACA
Ile Thr Asn Thr Asp Val Phe Ile Ala Met Glu Leu Met Gly Thr Cys

690 700 710 720 730
GCA GAG AAG CTG AAG AAA GGA ATG CAG GCG CCC ATT CCA GAG CGA ATC
CCT CTC TTC GAC TTC TTT GCT TAC GTC CCG GGG TAA GGT CTC GCT TAG
Ala Glu Lys Leu Lys Lys Arg Met Gln Gly Pro Ile Pro Glu Arg Ile

740 750 760 770 780
CTG GCG AAG AGC ACT GTG GCG ATT CTG AAA CCA CTG TAC Phe CTG AAG
GAC CCG TTC TAC TGA CAC CGC TAA CAC TTT CTT GAG ATT ATA GAC TTC
Leu Gly Lys Met Thr Val Ala Ile Val Lys Ala Leu Tyr Tyr Leu Lys

790 800 810 820 830
GAG AAG CAT GCG GTC ATC CAT CCG GAT GTC AAA CCC TCC AAC ATC CTG
CTC TTC GTA CCG CAG TAG GTA GCG CTA CAG TTT GGG AGG TTG TAG GAC
Glu Lys His Gly Val Ile His Arg Asp Val Lys Pro Ser Asn Ile Leu

840 850 860 870
CTA GAT GAG CCG GCG CAG ATC AAG CTC TGT GAC TTT GCG ATC ATG GCG
GAT CTA CTC GCG CCG GTC TAG TTC GAG ACA CTG AAA CCG TAG TCA CCG
Leu Asp Glu Arg Gly Gln Ile Lys Leu Cys Asp Phe Gly Ile Ser Gly

【 図 1 5 C 】

マウスMKK7e

880 890 900 910 920
CGC CTT GTT GAC TCC AAA GCG AAA ACA CCG AGT GCT GGC TGT GGT GCC
CGG GAA CAA CTG AGG TTT CCG TTT TGT GCG TCA CCA CCG ACA CGA GGG
Arg Leu Val Asp Ser Lys Ala Lys Thr Arg Ser Ala Gly Cys Ala Ala

930 940 950 960 970
TAT ATG GCT CCC GAG CGC ATC GAG CCG CCA GAT CCC ACC AAG CCT GAC
ATA TAC CCA GGG CTC GCG TAG CTG GGA GGT CTA GCG TCG TCC GGA CTG
Tyr Met Ala Pro Glu Arg Ile Asp Pro Pro Asp Pro Thr Lys Pro Asp

980 990 1000 1010 1020
TAT GAC ATC CCA GGT GAT CCG TGG AGC GTC GGC ATC TCA CTG GTG GAG
ATA CTG TAG GCT CCA CTA CAC ACC TCG GAC CCG TAG AGT GAC CAC CTC
Tyr Asp Ile Arg Ala Asp Val Trp Ser Leu Gly Ile Ser Leu Val Glu

1030 1040 1050 1060 1070
CTG GCA ACA GGA CAG TTC CCC TAT AAG AAC TCC AAG ACG GAC TTT GAG
GAC CTT TGT CTT GTC AAG GGG ATA TTC TCG AGG TTC GCG CTG AAA CTC
Leu Ala Thr Gly Gln Phe Pro Tyr Lys Asn Cys Lys Thr Asp Phe Glu

1080 1090 1100 1110
GTC CTC ACC AAA GTC CTA CAG GAA GAG CCC CCA CTC CTG CCG GGT CAC
CAG GAG TGG TTT CAG GAT CTC CTT CTC GCG GGT GAG GAC GGA CCA CTG
Val Leu Thr Lys Val Leu Gln Glu Glu Pro Pro Leu Leu Pro Gly His

1120 1130 1140 1150 1160
ATG GCG TTC TCA GGG GAC TTC CAG TGA TTT GTC AAA GAC TCG CTT ACT
TAC CCG AAG AGT CCC CTG AAG GTC AGT AAA CAG TTT CTG ACC GAA TGA
Met Gly Phe Ser Gly Asp Phe Gln Ser Phe Val Lys Asp Cys Leu Thr

1170 1180 1190 1200 1210
AAA GAT CAC AGG AAG AGA CCA AAG TAT AAT AAG CTA CTT GAA CAC AGC
TPT CTA GTG TCC TTC TCT GGT TTC ATA TTA TTC GAT GAA CTT GTG TCG
Lys Asp His Arg Lys Arg Pro Lys Tyr Asn Lys Leu Leu Glu His Ser

1220 1230 1240 1250 1260
TTC ATC ATC AAG CAC TAT GAG ATA CTC GAG GTG GAT GTC GCG TCC TGG
AAG TAG TAG TTC GTG ATA CTC TAT GAG CTC GAC CTA CAG CCG AGG ACC
Phe Ile Ile Lys His Tyr Glu Ile Leu Glu Val Asp Val Ala Ser Trp

1270 1280 1290 1300 1310
TPT AAG GAT GTC ATG CCG AAG ACC GAG TCC CCA AGG ACT AGT GGA GTC
AAA TTC CTA CAG TAC CCG TTC TGG CTC AGG GGT TCC TGA TCA CCT CAG

【 図 1 5 D 】

マウスMKK7e

Phe Lys Asp Val Met Ala Lys Thr Glu Ser Pro Arg Thr Ser Gly Val

1320 1330 1340 1350
CTG AGT CAG CAC CAT CTG CCC TTC TTC AGT GGG AGT CTG GAG GAG TCT
GAC TCA GTC GTG GTA GAC GGG AAG AAG TCA CCC TCA CAC CTC CTC AGA
Leu Ser Gln His His Leu Pro Phe Phe Ser Gly Ser Leu Glu Glu Ser

1360 1370 1380 1390 1400
CCC ACT TCC CCA CTT TCT CCC AAG TCC TTC CCT CTG TCA CCA GCC ATC
GGG TGA AGG GGT GGA AGA GGG TTC AGG AAG GGA GAC AGT GGT CCG TAG
Pro Thr Ser Pro Pro Ser Pro Lys Ser Phe Pro Leu Ser Pro Ala Ile

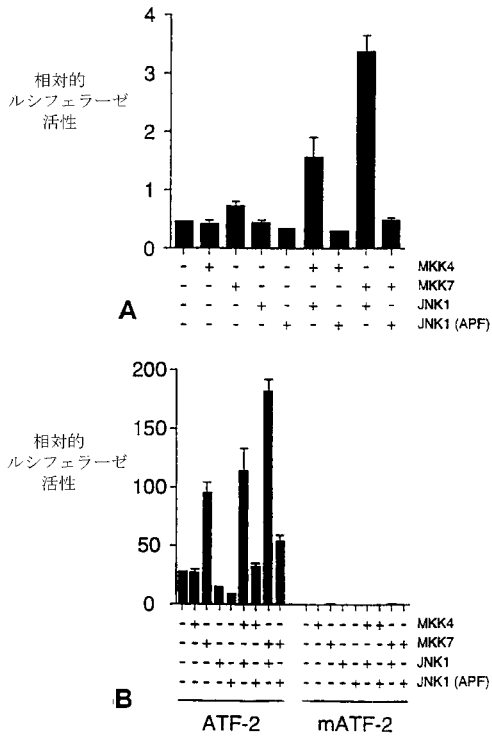
1410 1420 1430 1440 1450 1460
CCT CAG GCG CAG GCA GAG TGG GTC TCG GCG AGG TAGGGAGCTG GAGTGGCTCG
GGA CTT CCG CTC CTT CTC ACC CAG AGG CCG TCC ATCCCTGAGC CTCACCGGAC
Pro Gln Ala Gln Ala Glu Trp Val Ser Gly Arg (配列番号:32)

1470 1480 1490 1500 1510 1520
GTCCACCGCT CTGAGCTCCT CCTCAGGCCA CCGGTGTTCG CCTCTTCCT TTTRAAACA
CAGGGTGGCA GACTGGAGGA GGACTCGGT GGTACACAGC GGAGAGGGA AAAATTPTGT

1530 1540 1550 1560 1570 1580
AAATAGCCTT GTTGTAAAT CCTTAGACCG TTGGAATAA AACCCCTGCC TTTCCTCCG
TTTATGGGAA CAACATTTA GGAATCTGGC AACTCTTATT TTGGGAAGG AAAGAAGGC

1590
AAAAAAAAAAAAAAAA (配列番号:31)
TTTTTTTTTTTTTTTT

【 図 1 6 】



【 配 列 表 】

2009131261000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I			テーマコード(参考)
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/00	A	4 H 0 4 5
C 0 7 K	16/18	(2006.01)	C 0 7 K	16/18		
C 1 2 Q	1/48	(2006.01)	C 1 2 Q	1/48	Z	
C 1 2 Q	1/68	(2006.01)	C 1 2 Q	1/68	A	
C 1 2 Q	1/02	(2006.01)	C 1 2 Q	1/02		
A 6 1 K	45/00	(2006.01)	A 6 1 K	45/00		
A 6 1 K	38/45	(2006.01)	A 6 1 K	37/52		
A 6 1 P	9/10	(2006.01)	A 6 1 P	9/10		
A 6 1 P	1/16	(2006.01)	A 6 1 P	1/16		
A 6 1 P	13/12	(2006.01)	A 6 1 P	13/12		
A 6 1 P	11/00	(2006.01)	A 6 1 P	11/00		
A 6 1 P	17/02	(2006.01)	A 6 1 P	17/02		
A 6 1 P	31/04	(2006.01)	A 6 1 P	31/04		
A 6 1 P	29/00	(2006.01)	A 6 1 P	29/00	1 0 1	
A 6 1 P	19/02	(2006.01)	A 6 1 P	19/02		
A 6 1 P	37/06	(2006.01)	A 6 1 P	29/00		
G 0 1 N	33/573	(2006.01)	A 6 1 P	37/06		
			G 0 1 N	33/573	A	

(72)発明者 ターナー キャシー

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ウォーセスター リスコム 1 0

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA10 BA61 CA02 CA09 CA11 CA12 EA04 HA12
 HA15
 4B050 CC03 CC04 DD07 LL01 LL03
 4B063 QA01 QA18 QA19 QQ27 QQ61 QR32 QR48 QR55 QS33 QS34
 4B065 AA90Y AB01 AC14 BA02 CA24 CA29 CA44 CA46
 4C084 AA02 AA07 DC25 NA14 ZA392 ZA592 ZA752 ZA812 ZA892 ZA962
 ZB022 ZB112 ZB152 ZB352
 4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 CA40 DA89 EA20 EA50 FA74

专利名称(译)	细胞因子，应激和癌蛋白激活人类蛋白激酶激酶		
公开(公告)号	JP2009131261A	公开(公告)日	2009-06-18
申请号	JP2008309904	申请日	2008-12-04
[标]申请(专利权)人(译)	马萨诸塞大学		
申请(专利权)人(译)	马萨诸塞大学		
[标]发明人	デイビスロジャージェイ ウイトマーシュアラン ターナーキャシー		
发明人	デイビス ロジャー ジェイ. ウイトマーシュ アラン ターナー キャシー		
IPC分类号	C12N15/09 C12N9/12 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C07K16/18 C12Q1/48 C12Q1/68 C12Q1/02 A61K45/00 A61K38/45 A61P9/10 A61P1/16 A61P13/12 A61P11/00 A61P17/02 A61P31/04 A61P29/00 A61P19/02 A61P37/06 G01N33/573 A61K31/7088 A61K38/00 A61K48/00 A61P9/02 A61P37/00 A61P43/00 C07K14/075 C07K14/47 C07K14/82 C07K16/40 C12N15/54 G01N33/53		
CPC分类号	A61K38/00 A61P1/16 A61P9/02 A61P9/10 A61P11/00 A61P13/12 A61P17/02 A61P19/02 A61P29/00 A61P31/04 A61P37/00 A61P37/06 A61P43/00 C07K14/005 C07K14/4705 C07K14/4736 C07K14/82 C12N9/12 C12N9/1205 C12N2710/10322 C12N2710/10332 C12Q1/485 C12Q1/6883 C12Q2600/158 G01N2500/02		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C12N9/12 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.A C07K16/18 C12Q1/48.Z C12Q1/68.A C12Q1/02 A61K45/00 A61K37/52 A61P9/10 A61P1/16 A61P13/12 A61P11/00 A61P17/02 A61P31/04 A61P29/00.101 A61P19/02 A61P29/00 A61P37/06 G01N33/573.A A61K38/45 C12N15/00. A C12N15/00.AZN.A C12N5/00.101 C12N5/10 C12Q1/6883.C C12Q1/6883.Z		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA10 4B024/BA61 4B024/CA02 4B024/CA09 4B024/CA11 4B024 /CA12 4B024/EA04 4B024/HA12 4B024/HA15 4B050/CC03 4B050/CC04 4B050/DD07 4B050/LL01 4B050/LL03 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ27 4B063/QQ61 4B063/QR32 4B063 /QR48 4B063/QR55 4B063/QS33 4B063/QS34 4B065/AA90Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA29 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA07 4C084/DC25 4C084 /NA14 4C084/ZA392 4C084/ZA592 4C084/ZA752 4C084/ZA812 4C084/ZA892 4C084/ZA962 4C084 /ZB022 4C084/ZB112 4C084/ZB152 4C084/ZB352 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045 /AA30 4H045/CA40 4H045/DA89 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74		
代理人(译)	清水初衷		
优先权	08/888429 1997-07-07 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

解决的问题：提供人促分裂原活化蛋白 (MAP) 激酶激酶同工型 (MKK) 及其使用方法。MKK介导激活人MAP激酶p38和JNK的独特信号通路，JNK诱导激活转录因子2 (ATF2) 和其他因子 (包括c-Jun) 的激活。以及鉴定调节MKK功能或活性的试剂的方法，以及在MKK介导的疾病的治疗中使用此类试剂的方法。[选择图]图2B

