

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A) (11)特許出願公開番号

特開2001 - 224385

(P2001 - 224385A)

(43)公開日 平成13年8月21日(2001.8.21)

(51)Int.Cl ⁷	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 15/09	ZNA		A 6 1 K 31/711	
A 6 1 K 31/711			48/00	
48/00			A 6 1 P 3/06	
A 6 1 P 3/06			C 0 7 K 16/18	
C 0 7 K 16/18			C 1 2 Q 1/68	A
審査請求 未請求 請求項の数 24 O L (全 40数) 最終頁に続く				

(21)出願番号	特願2000 - 374124(P2000 - 374124)	(71)出願人	000001856 三共株式会社 東京都中央区日本橋本町3丁目5番1号
(22)出願日	平成12年12月8日(2000.12.8)	(72)発明者	小石 龍太 東京都品川区広町1丁目2番58号 三共株式 会社内
(31)優先権主張番号	特願平11 - 349976	(72)発明者	安藤 洋介 静岡県袋井市堀越717 三共株式会社内
(32)優先日	平成11年12月9日(1999.12.9)	(72)発明者	小野 満 東京都品川区広町1丁目2番58号 三共株式 会社内
(33)優先権主張国	日本(JP)	(74)代理人	100081400 弁理士 大野 彰夫 (外 2 名) 最終頁に続く

(54)【発明の名称】 高脂血症の治療または予防剤の試験方法

(57)【要約】

【課題】 高脂血症の治療または予防剤としての効果を試験するための新規な方法および該方法に用いられるポリヌクレオチドおよび抗体を提供する。

【解決手段】 培養細胞を被検物質の存在下または非存在下で培養した細胞における、配列表の配列番号1のヌクレオチド番号47から1411または配列表の配列番号3のヌクレオチド番号78から1457に示されるヌクレオチド配列(ただし、配列中のtはuに読み替える)を有するmRNAの発現量を検出し、被検物質非存在下で培養した細胞よりも、被検物質存在下で培養した細胞において、検出されたmRNAの発現量が少なくなるような被検物質を選択する方法。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 物質の、高脂血症の治療または予防剤としての効果を試験する方法であって、下記の工程：

1) 培養細胞を被検物質の存在下または非存在下で培養する；

2) 上記 1) で得られた培養細胞における、下記の a) 乃至 e) のいずれか一つに記載のヌクレオチド配列（ただし、配列中の t は u に読み替える）を有する mRNA の発現量を検出する；

a) 配列表の配列番号 1 のヌクレオチド番号 47 から 1411 に示されるヌクレオチド配列；

b) 配列表の配列番号 3 のヌクレオチド番号 78 から 1457 に示されるヌクレオチド配列；

c) 形質転換大腸菌 *E. coli* pBK/m55-1 SANK 72199 (FERM BP-6940) が保持するファージミド中に挿入された DNA が有するヌクレオチド配列；

d) 形質転換大腸菌 *E. coli* pTrip/h55-1 SANK 72299 (FERM BP-6941) が保持するファージミド中に挿入された DNA が有するヌクレオチド配列；

e) 上記 a) 乃至 d) のいずれか一つに記載のヌクレオチド配列のアンチセンス配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、血中の中性脂肪濃度を上昇させる活性を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列；および

3) 上記工程 2) の結果、被検物質非存在下で培養した細胞と、被検物質存在下で培養した細胞との間で、検出された mRNA の発現量を比較する；を含む方法。

【請求項 2】 培養細胞が肝臓由来であることを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】 培養細胞が霊長類または齧歯類動物由来であることを特徴とする、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】 培養細胞がヒトまたはマウス由来であることを特徴とする、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】 請求項 1 乃至 4 のいずれか一つに記載の方法において、mRNA の発現量を検出する方法がノーザンブロット、ドットブロットまたはスロットブロットであることを特徴とする方法。

【請求項 6】 請求項 1 乃至 4 のいずれか一つに記載の方法において、mRNA の発現量を検出する方法が RT-PCR であることを特徴とする方法。

【請求項 7】 請求項 1 乃至 4 のいずれか一つに記載の方法において、mRNA の発現量を検出する方法がリボヌクレアーゼ保護アッセイであることを特徴とする方法。

【請求項 8】 請求項 1 乃至 4 のいずれか一つに記載の方法において、mRNA の発現量を検出する方法がランオン・アッセイであることを特徴とする方法。

【請求項 9】 下記の a) 乃至 d) のいずれか一つに記載のヌクレオチド配列（ただし、配列中の t は u に読み替える）を含む mRNA とストリンジェントな条件でハイブリダイズするヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチド（ただし、下記 a) 乃至 d) 記載のヌクレオチド配列を含むものを除く）；

a) 配列表の配列番号 1 のヌクレオチド番号 47 から 1411 に示されるヌクレオチド配列；

b) 配列表の配列番号 3 のヌクレオチド番号 78 から 1457 に示されるヌクレオチド配列；

c) 形質転換大腸菌 *E. coli* pBK/m55-1 SANK 72199 (FERM BP-6940) が保持するファージミド中に挿入された DNA が有するヌクレオチド配列；

d) 形質転換大腸菌 *E. coli* pTrip/h55-1 SANK 72299 (FERM BP-6941) が保持するファージミド中に挿入された DNA が有するヌクレオチド配列。

【請求項 10】 配列表の配列番号 1 のヌクレオチド番号 47 から 1411 に示されるヌクレオチド配列の一方または両方の末端が 1 ヌクレオチドもしくは 2 ヌクレオチド以上欠失した、少なくとも 15 ヌクレオチドからなる DNA。

【請求項 11】 配列表の配列番号 3 のヌクレオチド番号 78 から 1457 に示されるヌクレオチド配列の一方または両方の末端が 1 ヌクレオチドもしくは 2 ヌクレオチド以上欠失した、少なくとも 15 ヌクレオチドからなる DNA。

【請求項 12】 物質の、高脂血症の治療または予防剤としての効果を試験する方法であって、下記の工程：

1) 培養細胞を被検物質の存在下または非存在下で培養する；

2) 上記 1) で得られた培養細胞上清における、下記の a) 乃至 e) のいずれか一つに記載のヌクレオチド配列にコードされるアミノ酸配列またはその一部からなるポリペプチドの産生量を、該ポリペプチドを特異的に認識する抗体を用いて検出する；

a) 配列表の配列番号 1 のヌクレオチド番号 47 から 1411 に示されるヌクレオチド配列；

b) 配列表の配列番号 3 のヌクレオチド番号 78 から 1457 に示されるヌクレオチド配列；

c) 形質転換大腸菌 *E. coli* pBK/m55-1 SANK 72199 (FERM BP-6940) が保持するファージミド中に挿入された DNA が有するヌクレオチド配列；

d) 形質転換大腸菌 *E. coli* pTrip/h55-1 SANK 72299 (FERM BP-6941) が保持するファージミド中に挿入された DNA が有するヌクレオチド配列；

e) 上記 a) 乃至 d) のいずれか一つに記載のヌクレオ

チド配列のアンチセンス配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、血中の中性脂肪濃度を上昇させる活性を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列；および

3) 上記工程2)の結果、被検物質非存在下で培養した細胞と、被検物質存在下で培養した細胞との間で、検出されたポリペプチドの量を比較する；を含む方法。

【請求項13】 請求項12に記載の方法において、a)乃至e)のいずれか一つに記載のヌクレオチド配列にコードされるアミノ酸配列またはその一部からなるポリペプチドを特異的に認識する抗体が、配列表の配列番号2のアミノ酸番号17-455に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドまたはその一部、同19-455に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドまたはその一部もしくは配列番号4のアミノ酸番号17-460に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドまたはその一部を特異的に認識するものであることを特徴とする方法。

【請求項14】 請求項12または13に記載の方法において、a)乃至e)のいずれか一つに記載のヌクレオチド配列にコードされるアミノ酸配列またはその一部からなるポリペプチドを特異的に認識する抗体が、配列表の配列番号9のアミノ酸番号1から13に示されるアミノ酸配列または配列番号10のアミノ酸番号1から14に示されるアミノ酸配列を特異的に認識するものであることを特徴とする方法。

【請求項15】 請求項12乃至14のいずれか一つに記載の方法において、a)乃至e)のいずれか一つに記載のヌクレオチド配列にコードされるアミノ酸配列またはその一部からなるポリペプチドの産生量を該ポリペプチドを特異的に認識する抗体を用いて検出する操作が、ウエスタンブロット、ドットブロットまたはスロットブロットであることを特徴とする方法。

【請求項16】 請求項12乃至14のいずれか一つに記載の方法において、a)乃至e)のいずれか一つに記載のヌクレオチド配列にコードされるアミノ酸配列またはその一部からなるポリペプチドの産生量を該ポリペプチドを特異的に認識する抗体を用いて検出する操作が、固相酵素免疫定量法(ELISA法)または放射性同位元素免疫定量法(RIA法)であることを特徴とする方法。

【請求項17】 下記のa)乃至e)のいずれか一つに記載のヌクレオチド配列にコードされるアミノ酸配列またはその一部からなるポリペプチドを特異的に認識する抗体；

a) 配列表の配列番号1のヌクレオチド番号47から1411に示されるヌクレオチド配列；

b) 配列表の配列番号3のヌクレオチド番号78から1457に示されるヌクレオチド配列；

c) 形質転換大腸菌*E. coli* pBK/m55-1

SANK 72199 (FERM BP-6940) が保持するファージミド中に挿入されたDNAが有するヌクレオチド配列；

d) 形質転換大腸菌*E. coli* pTrip/h55-1 SANK 72299 (FERM BP-6941) が保持するファージミド中に挿入されたDNAが有するヌクレオチド配列；

e) 上記a)乃至d)のいずれか一つに記載のヌクレオチド配列のアンチセンス配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、血中の中性脂肪濃度を上昇させる活性を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列。

【請求項18】 請求項17に記載の抗体であって、配列表の配列番号9のアミノ酸番号1から13に示されるアミノ酸配列または配列番号10のアミノ酸番号1から14に示されるアミノ酸配列を特異的に認識することを特徴とする抗体。

【請求項19】 請求項17または18に記載の抗体を含むことからなる、高脂血症の治療または予防剤を試験するためのキット。

【請求項20】 物質の、高脂血症の治療または予防剤としての効果を試験する方法であって、下記の工程；

1) 遺伝子操作によって得られ、下記のa)乃至e)のいずれか一つに記載のヌクレオチド配列；

a) 配列表の配列番号1のヌクレオチド番号47から1411に示されるヌクレオチド配列；

b) 配列表の配列番号3のヌクレオチド番号78から1457に示されるヌクレオチド配列；

c) 形質転換大腸菌*E. coli* pBK/m55-1 SANK 72199 (FERM BP-6940) が保持するファージミド中に挿入されたDNAが有するヌクレオチド配列；

d) 形質転換大腸菌*E. coli* pTrip/h55-1 SANK 72299 (FERM BP-6941) が保持するファージミド中に挿入されたDNAが有するヌクレオチド配列；

e) 上記a)乃至d)のいずれか一つに記載のヌクレオチド配列のアンチセンス配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、血中の中性脂肪濃度を上昇させる活性を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む外来遺伝子が、該遺伝子を高発現することができるように導入されている非ヒト動物に被検物質を投与する；および

2) 1)の動物の血中の中性脂肪濃度を測定する；を含む方法。

【請求項21】 請求項20に記載の方法において、1)の非ヒト動物がマウスであることを特徴とする方法。

【請求項22】 請求項20に記載の方法において、1)記載の非ヒト動物への外来遺伝子の導入が、該遺伝

子が組み込まれたアデノウイルスベクターを含むアデノウイルスの該動物への感染によるものであることを特徴とする方法。

【請求項 23】 配列表の配列番号 3 のヌクレオチド番号 78 から 1457 に示されるヌクレオチド配列中の連続した 15 乃至 30 ヌクレオチドからなるヌクレオチド配列のアンチセンス配列からなる DNA または RNA。

【請求項 24】 請求項 23 に記載の DNA または RNA を有効成分として含有する高脂血症治療剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、高脂血症の治療または予防剤の新規試験方法、該方法において使用される核酸プローブ、プライマーおよび抗体に関する。

【0002】

【従来の技術】 最近の食生活の変化に伴う、脂肪およびコレステロールの過剰摂取による高脂血症の患者の増加は著しいものがある。高脂血症は血清脂質、すなわちコレステロール、中性脂肪（トリグリセリド、TG）、リン脂質、遊離脂肪酸等の血清濃度が高くなる疾患であり、動脈硬化症の重要な危険因子となっている。さらに高血圧症、狭心症および心筋梗塞といった冠動脈硬化症、脳梗塞等の合併症を招く可能性が高い。

【0003】 今日まで抗高脂血症作用を示す数多くの化合物が報告されているが、それらの多くは化学的手法で合成されたものであり、その性質上連続的に使用することによる様々な副作用を避けることができないのが現状である。

【0004】 一方、現在市販されているブラバスタチンナトリウムは、微生物代謝産物由来の、強力な高脂血症治療剤の一つであり、その作用はコレステロール生合成系の律速酵素である HMG-CoA 還元酵素の阻害剤である。このように、生体内に存在する高脂血症に関連する蛋白質またはそれをコードする遺伝子を同定することができれば、その機能を直接阻害するか、またはその発現を制御すること等により、副作用のない（または少ない）、より効果的な高脂血症治療剤を開発できると考えられるが、そのような高脂血症の発症に密接に関係する遺伝子は知られていなかった。

【0005】 また、本発明の方法において用いられる核酸プローブと同一の配列が Genbank データベース上に「アンジオポエチン関連タンパク質 3（angiopoietin-related protein 3）」をコードするヌクレオチド配列として開示されており、また国際特許出願公開 WO 99/55869 号公報には同じヌクレオチド配列が「 $\alpha 5$ 」をコードするものとして開示されているが、これらのヌクレオチド配列を有する遺伝子と高脂血症との関連については全く知られていない。したがって、「アンジオポエチン関連タンパク質 3」乃至「 $\alpha 5$ 」をコードするヌクレオチド配列の一部が、

高脂血症の治療または予防剤を試験するために有用であることも知られていない。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】 本発明の目的は、高脂血症の治療または予防剤を試験するための新規な方法および該方法において用いられる核酸プローブ、プライマーまたは抗体を提供することにある。

【0007】

【課題を解決するための手段】 本発明者らは、高脂血症の治療または予防剤の標的遺伝子を探索する目的で、10 先天的低脂血症マウスの遺伝子を高脂血症マウスの遺伝子と比較することにより、高脂血症の原因遺伝子の染色体上の位置を絞り込んだ結果、高脂血症マウスで高発現する遺伝子を特定することに成功した。この遺伝子由来の cDNA は、ホモロジー検索の結果、Genbank データベースに「アンジオポエチン関連タンパク質 3」をコードするヌクレオチド配列として開示されていたが、本発明者らは、該ヌクレオチド配列を有する遺伝子を低脂血症マウスに強制発現させると、血中の中性脂肪の濃度が上昇することを見出し、該遺伝子がこれまで報告されていない新規な機能を有することを確認した。そこで、該ヌクレオチド配列またはその一部をプローブもしくはプライマーとして用いた遺伝子発現の検出系を利用する、高脂血症の治療または予防剤の新規試験方法を構築することに成功した。また、該ヌクレオチド配列がコードするポリペプチドに特異的な抗体を調製し、該抗体を用いて該ポリペプチドの産生量を検出する実験系を利用する高脂血症の治療または予防剤の新規試験方法を構築した。そして、該ヌクレオチド配列を実験動物に導入したモデル動物を作成し、該モデル動物を利用した高脂血症の治療または予防剤の新規試験方法を構築することに成功して、本発明を完成させた。

【0008】 本発明は、

（1） 物質の、高脂血症の治療または予防剤としての効果を試験する方法であって、下記の工程：

1）培養細胞を被検物質の存在下または非存在下で培養する；

2）上記 1）で得られた培養細胞における、下記の a）乃至 e）のいずれか一つに記載のヌクレオチド配列（ただし、配列中の t は u に読み替える）を有する mRNA の発現量を検出する：

a）配列表の配列番号 1 のヌクレオチド番号 47 から 1411 に示されるヌクレオチド配列；

b）配列表の配列番号 3 のヌクレオチド番号 78 から 1457 に示されるヌクレオチド配列；

c）形質転換大腸菌 E.coli pBK/m55-SANK 72199 (FERM BP-6940) が保持するファージミド中に挿入された DNA が有するヌクレオチド配列；

d）形質転換大腸菌 E.coli pTrip/h55

- 1 SANK 72299 (FERM BP-6941) が保持するファージミド中に挿入された DNA が有するヌクレオチド配列；

e) 上記 a) 乃至 d) のいずれか一つに記載のヌクレオチド配列のアンチセンス配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、血中の中性脂肪濃度を上昇させる活性を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列；および

3) 上記工程 2) の結果、被検物質非存在下で培養した細胞と、被検物質存在下で培養した細胞との間で、検出された mRNA の発現量を比較する；を含む方法、

(2) 培養細胞が肝臓由来であることを特徴とする、

(1) に記載の方法、

(3) 培養細胞が霊長類または齧歯類動物由来であることを特徴とする、(1) または (2) に記載の方法、

(4) 培養細胞がヒトまたはマウス由来であることを特徴とする、(3) に記載の方法、

(5) (1) 乃至 (4) のいずれか一つに記載の方法において、mRNA の発現量を検出する方法がノーザンプロット、ドットプロットまたはスロットプロットであることを特徴とする方法、

(6) (1) 乃至 (4) のいずれか一つに記載の方法において、mRNA の発現量を検出する方法が RT-PCR であることを特徴とする方法、

(7) (1) 乃至 (4) のいずれか一つに記載の方法において、mRNA の発現量を検出する方法がリボヌクレアーゼ保護アッセイであることを特徴とする方法、

(8) (1) 乃至 (4) のいずれか一つに記載の方法において、mRNA の発現量を検出する方法がランオン・アッセイであることを特徴とする方法、

(9) 下記の a) 乃至 d) のいずれか一つに記載のヌクレオチド配列（ただし、配列中の t は u に読み替える）を含む mRNA とストリンジェントな条件でハイブリダイズするヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチド（ただし、下記 a) 乃至 d) 記載のヌクレオチド配列を含むものを除く）；

a) 配列表の配列番号 1 のヌクレオチド番号 47 から 411 に示されるヌクレオチド配列；

b) 配列表の配列番号 3 のヌクレオチド番号 78 から 457 に示されるヌクレオチド配列；

c) 形質転換大腸菌 E. coli pBK/m55-1 SANK 72199 (FERM BP-6940) が保持するファージミド中に挿入された DNA が有するヌクレオチド配列；

d) 形質転換大腸菌 E. coli pTrip/h55-1 SANK 72299 (FERM BP-6941) が保持するファージミド中に挿入された DNA が有するヌクレオチド配列、

(10) 配列表の配列番号 1 のヌクレオチド番号 47 から 411 に示されるヌクレオチド配列の一方または

両方の末端が 1 ヌクレオチドもしくは 2 ヌクレオチド以上欠失した、少なくとも 15 ヌクレオチドからなる DNA、

(11) 配列表の配列番号 3 のヌクレオチド番号 78 から 457 に示されるヌクレオチド配列の一方または両方の末端が 1 ヌクレオチドもしくは 2 ヌクレオチド以上欠失した、少なくとも 15 ヌクレオチドからなる DNA、

(12) 物質の、高脂血症の治療または予防剤としての効果を試験する方法であって、下記の工程；

1) 培養細胞を被検物質の存在下または非存在下で培養する；

2) 上記 1) で得られた培養細胞上清における、下記の a) 乃至 e) のいずれか一つに記載のヌクレオチド配列にコードされるアミノ酸配列またはその一部からなるポリペプチドの産生量を、該ポリペプチドを特異的に認識する抗体を用いて検出する；

a) 配列表の配列番号 1 のヌクレオチド番号 47 から 411 に示されるヌクレオチド配列；

b) 配列表の配列番号 3 のヌクレオチド番号 78 から 457 に示されるヌクレオチド配列；

c) 形質転換大腸菌 E. coli pBK/m55-1 SANK 72199 (FERM BP-6940) が保持するファージミド中に挿入された DNA が有するヌクレオチド配列；

d) 形質転換大腸菌 E. coli pTrip/h55-1 SANK 72299 (FERM BP-6941) が保持するファージミド中に挿入された DNA が有するヌクレオチド配列；

e) 上記 a) 乃至 d) のいずれか一つに記載のヌクレオチド配列のアンチセンス配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、血中の中性脂肪濃度を上昇させる活性を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列；および

3) 上記工程 2) の結果、被検物質非存在下で培養した細胞と、被検物質存在下で培養した細胞との間で、検出されたポリペプチドの量を比較する；を含む方法、

(13) (12) に記載の方法において、a) 乃至 e) のいずれか一つに記載のヌクレオチド配列にコード

されるアミノ酸配列またはその一部からなるポリペプチドを特異的に認識する抗体が、配列表の配列番号 2 のアミノ酸番号 17-455 に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドまたはその一部、同 19-455 に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドまたはその一部もしくは配列番号 4 のアミノ酸番号 17-460 に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドまたはその一部を特異的に認識するものであることを特徴とする方法、

(14) (12) または (13) に記載の方法において、a) 乃至 e) のいずれか一つに記載のヌクレオチド配列にコードされるアミノ酸配列またはその一部からな

るポリペプチドを特異的に認識する抗体が、配列表の配列番号 9 のアミノ酸番号 1 から 13 に示されるアミノ酸配列または配列番号 10 のアミノ酸番号 1 から 14 に示されるアミノ酸配列を特異的に認識するものであることを特徴とする方法、

(15) (12) 乃至 (14) のいずれか一つに記載の方法において、a) 乃至 e) のいずれか一つに記載のヌクレオチド配列にコードされるアミノ酸配列またはその一部からなるポリペプチドの産生量を該ポリペプチドを特異的に認識する抗体を用いて検出する操作が、ウエスタンブロット、ドットブロットまたはスロットブロットであることを特徴とする方法、

(16) (12) 乃至 (14) のいずれか一つに記載の方法において、a) 乃至 e) のいずれか一つに記載のヌクレオチド配列にコードされるアミノ酸配列またはその一部からなるポリペプチドの産生量を該ポリペプチドを特異的に認識する抗体を用いて検出する操作が、固相酵素免疫定量法 (ELISA 法) または放射性同位元素免疫定量法 (RIA 法) であることを特徴とする方法、

(17) 下記の a) 乃至 e) のいずれか一つに記載のヌクレオチド配列にコードされるアミノ酸配列またはその一部からなるポリペプチドを特異的に認識する抗体:

a) 配列表の配列番号 1 のヌクレオチド番号 47 から 1411 に示されるヌクレオチド配列;

b) 配列表の配列番号 3 のヌクレオチド番号 78 から 1457 に示されるヌクレオチド配列;

c) 形質転換大腸菌 *E. coli* pBK/m55-1 SANK 72199 (FERM BP-6940) が保持するファージミド中に挿入された DNA が有するヌクレオチド配列;

d) 形質転換大腸菌 *E. coli* pTrip/h55-1 SANK 72299 (FERM BP-6941) が保持するファージミド中に挿入された DNA が有するヌクレオチド配列;

e) 上記 a) 乃至 d) のいずれか一つに記載のヌクレオチド配列のアンチセンス配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、血中の中性脂肪濃度を上昇させる活性を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、

(18) (17) に記載の抗体であって、配列表の配列番号 9 のアミノ酸番号 1 から 13 に示されるアミノ酸配列または配列番号 10 のアミノ酸番号 1 から 14 に示されるアミノ酸配列を特異的に認識することを特徴とする抗体、

(19) (17) または (18) に記載の抗体を含むことからなる、高脂血症の治療または予防剤を試験するためのキット、

(20) 物質の、高脂血症の治療または予防剤としての効果を試験する方法であって、下記の工程:

1) 遺伝子操作によって得られ、下記の a) 乃至 e) の

いずれか一つに記載のヌクレオチド配列:

a) 配列表の配列番号 1 のヌクレオチド番号 47 から 1411 に示されるヌクレオチド配列;

b) 配列表の配列番号 3 のヌクレオチド番号 78 から 1457 に示されるヌクレオチド配列;

c) 形質転換大腸菌 *E. coli* pBK/m55-1 SANK 72199 (FERM BP-6940) が保持するファージミド中に挿入された DNA が有するヌクレオチド配列;

d) 形質転換大腸菌 *E. coli* pTrip/h55-1 SANK 72299 (FERM BP-6941) が保持するファージミド中に挿入された DNA が有するヌクレオチド配列;

e) 上記 a) 乃至 d) のいずれか一つに記載のヌクレオチド配列のアンチセンス配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、血中の中性脂肪濃度を上昇させる活性を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む外来遺伝子が、該遺伝子を高発現することができるように導入されている非ヒト動物に被検物質を投与する; および

2) 1) の動物の血中の中性脂肪濃度を測定する; を含む方法、

(21) (20) に記載の方法において、1) の非ヒト動物がマウスであることを特徴とする方法、

(22) (20) に記載の方法において、1) 記載の非ヒト動物への外来遺伝子の導入が、該遺伝子が組み込まれたアデノウイルスベクターを含むアデノウイルスの該動物への感染によるものであることを特徴とする方法、

(23) 配列表の配列番号 3 のヌクレオチド番号 78 から 1457 に示されるヌクレオチド配列中の連続した 15 乃至 30 ヌクレオチドからなるヌクレオチド配列のアンチセンス配列からなる DNA または RNA、

(24) (23) に記載の DNA または RNA を有効成分として含有する高脂血症治療剤、に関する。

【0009】すなわち、本発明は、配列表の配列番号 1 や配列番号 3 に示される、哺乳動物の血液中的中性脂肪濃度の調節に関与する遺伝子の発現を指標として、被検物質の高脂血症の治療または予防剤としての効果を試験する方法、該方法において用いられる核酸プローブ、プライマーおよび抗体を提供するものである。

【0010】本発明において、「ストリンジェントな条件でハイブリダイズする」とは、市販のハイブリダイゼーション溶液 ExpressHyb Hybridization Solution (クローンテック社製) 中、68℃ でハイブリダイズすること、またはそれと同等の条件でハイブリダイズすることをいう。

【0011】

【発明の実施の形態】本発明の方法は、具体的には例えば、配列表の配列番号 1 のヌクレオチド番号 47 から 1

411に示されるヌクレオチド配列、または配列表の配列番号3のヌクレオチド番号78から1457に示されるヌクレオチド配列を有する遺伝子、またはそれらがコードするポリペプチドと同じ活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子の発現を、当該核酸(mRNA)または当該ポリペプチドの特異的検出によって測定し、該遺伝子の発現量を低下させるような被検物質を高脂血症の治療または予防剤の候補物質として選択するものである。以下、核酸の検出を行う態様とポリペプチドの検出を行う態様とに分けて説明する。

【0012】(A)核酸の検出

1)プローブ

核酸の検出を行う態様のうち、核酸ハイブリダイゼーションを利用する方法において用いられるプローブは、DNAまたはRNAであって、そのヌクレオチド配列は、下記a)乃至e)：

- a) 配列表の配列番号1のヌクレオチド番号47から1411に示されるヌクレオチド配列；
- b) 配列表の配列番号3のヌクレオチド番号78から1457に示されるヌクレオチド配列；
- c) 形質転換大腸菌 *E. coli* pBK/m55-1 SANK 72199 (FERM BP-6940) が保持するファージミド中に挿入されたDNA断片が有するヌクレオチド配列；
- d) 形質転換大腸菌 *E. coli* pTrip/h55-1 SANK 72299 (FERM BP-6941) が保持するファージミド中に挿入されたDNA断片が有するヌクレオチド配列；
- e) 上記a)乃至d)のいずれか一つに記載のヌクレオチド配列のアンチセンス配列を有するポリヌクレオチドとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、血中の中性脂肪濃度を上昇させる活性を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列；のいずれか一つ(ただし、配列中のtはuに読み替える)を有するポリリボヌクレオチドとストリンジェントな条件でハイブリダイズするヌクレオチド配列であればよく、例えば、上記a)乃至e)のいずれか一つに記載のヌクレオチド配列のアンチセンス配列を有するポリヌクレオチド、該アンチセンス配列中の連続した少なくとも15ヌクレオチドからなる部分配列を有するポリヌクレオチド、もしくは該アンチセンス配列の改変体等、およそ上記a)乃至e)のいずれか一つに記載のヌクレオチド配列を有するポリリボヌクレオチドとストリンジェントな条件でハイブリダイズすることにより該ポリリボヌクレオチドを特異的に検出することが可能なものは全て本発明の方法に用いられ得る。それらのうち、上記a)に記載のヌクレオチド配列のアンチセンス配列を有するポリヌクレオチドは、例えばマウス肝臓由来のcDNAライブラリーから配列表の配列番号1に示すヌクレオチド配列情報に基づいて、周知の方法、例えばブラークハイブリダイゼーション法、

コロニーハイブリダイゼーション法またはPCR法等によりクローニングしたcDNAクローンを、周知の方法で直接標識するか、または該cDNAクローンを鋳型としたポリメラーゼ反応による複製または転写反応において標識することにより、標識プローブとして得ることができる。また、上記b)に記載のヌクレオチド配列のアンチセンス配列を有するポリヌクレオチドは、例えばヒト肝臓由来のcDNAライブラリーから配列表の配列番号3に示すヌクレオチド配列情報に基づいて、同様の操作を行うことによりクローニングしたcDNAクローンから標識プローブを得ることができる。一方、上記c)またはd)に記載のヌクレオチド配列のアンチセンス配列を有するポリヌクレオチドは、工業技術院生命工学工業技術研究所に平成11年11月19日付で国際寄託され、受託番号FERM BP-6940またはFERM BP-6941が付されている形質転換大腸菌株 *E. coli* pBK/m55-1 SANK 72199株または *E. coli* pTrip/h55-1 SANK 72299株が保持する組換えファージミドから得ることができる。

【0013】さらに、上記e)に記載のヌクレオチド配列のアンチセンス配列を有するポリヌクレオチドは、例えば上記のようにして得られる上記a)乃至d)に記載のヌクレオチド配列のアンチセンス配列を有するポリヌクレオチドをプローブとして、任意の哺乳動物(好ましくは肝臓)由来のcDNAライブラリーについてブラークハイブリダイゼーション法やコロニーハイブリダイゼーション法によるクローニングを行って単離したcDNAクローンから得ることができる。

【0014】さらにまた、上記a)乃至e)のいずれか一つに記載のヌクレオチド配列のアンチセンス配列中の連続した少なくとも15ヌクレオチドからなる部分配列を有するポリヌクレオチドは、数十ヌクレオチド程度のものであれば化学合成によって得ることが可能である。またあるいは、上記のようにして得られる上記a)乃至e)のいずれか一つに記載のヌクレオチド配列を有するcDNAクローン中の任意の部分配列を、例えばPCR等によってサブクローニングしてから、上記と同様の手法でアンチセンス配列を有するプローブとして調製することもできる。

【0015】例えば、配列表の配列番号1に記載のヌクレオチド配列のアンチセンス配列中の連続した数十ヌクレオチドからなる部分配列において、数ヌクレオチドが付加、欠失および/または付加されたようなヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドであっても、上記a)乃至e)のいずれか一つに記載のポリリボヌクレオチドとストリンジェントな条件でハイブリダイズする限り、本発明の方法に用いられ得る。そのようなポリヌクレオチドは、化学合成法や、ポリメラーゼ連鎖反応(以下「PCR」という)等の酵素反応を利用した本発明の属する

技術分野における周知の変異導入法を用いて作製することが可能である。

【0016】また、本発明の方法において用いられるプローブは単一のヌクレオチド配列からなるものに限定されない。すなわち本発明の方法においては、例えば上記の要件を満足する複数種類のヌクレオチド配列の混合物をプローブとして用いたり、もしくはそれら複数種類のヌクレオチド配列をそれぞれ個別に用いた多重検出を行ってもよい。

【0017】2) RT-PCR用プライマー

本発明における、核酸の検出を行うもう一つの態様は、まず mRNA を鋳型とする逆転写酵素反応を行ってから、PCR を実施して特異的に DNA 断片を増幅する、いわゆる RT-PCR を行う方法である。この方法において、目的のヌクレオチド配列を特異的に増幅するためには、目的の mRNA の特定の部分配列に相補的なアンチセンスプライマーと、該アンチセンスプライマーから逆転写酵素により生成される cDNA の配列中の特定の部分配列に相補的なセンスプライマーが用いられる。

【0018】逆転写酵素反応および PCR の両方に用いられるアンチセンスプライマーは、実質的に上記 a) 乃至 e) 記載のヌクレオチド配列のアンチセンス配列中の、連続した少なくとも 18 ヌクレオチド、好ましくは少なくとも 23 ヌクレオチドのヌクレオチド配列からなる。

【0019】一方、PCR において用いられるセンスプライマーの配列は、上記 a) 乃至 e) 記載のヌクレオチド配列において、上記アンチセンスプライマーの相補鎖にあたる配列中の最も 5' 末端側の位置よりもさらに 5' 末端側領域に存在する配列中の連続した少なくとも 18 ヌクレオチド、好ましくは少なくとも 21 ヌクレオチドの任意の部分配列からなる。ただし、センスプライマーとアンチセンスプライマーに互いに相補的な配列が存在すると、プライマー同士がアニーリングすることにより非特異的な配列が増幅され、特異的な遺伝子検出の妨げとなるおそれがあるので、そのような組み合わせを避けたプライマーの設計を行うことが好ましい。

【0020】これらアンチセンスプライマーおよびセンスプライマーには、いずれも上記で規定したそれらヌクレオチド配列の 5' 末端に、上記 a) 乃至 e) 記載のヌクレオチド配列とは無関係のヌクレオチド配列がリンカーとして付加されていてもよい。ただし、特異的な遺伝子検出の妨げとならないよう、該リンカーは反応中に反応液内の核酸と非特異的なアニーリングを起こさないようなものであることが好ましい。

【0021】3) 遺伝子発現を検出する細胞または動物次に、本発明の方法において用いられる培養細胞は、上記 a) 乃至 e) のいずれか一つに記載のヌクレオチド配列を有する遺伝子を発現する哺乳動物細胞であればよい。好ましくは哺乳動物肝臓由来の培養細胞（好ましく

は、初代培養肝細胞）であるが、例えば上記 a) 乃至 e) のいずれか一つに記載のヌクレオチド配列を有する遺伝子をそのプロモーター領域とともに導入した細胞など、人為的に形質転換された細胞（例えば、CHO 細胞）も使用することが可能である。哺乳動物種としては、ヒト、マウス、ラットまたはハムスターが好ましく、ヒトまたはマウスがより好ましく、さらに、好ましい細胞としては高脂血症マウスである KK マウス（日本クレア社より入手可能）の初代培養肝細胞を挙げることができるが、これらに限定されない。また、培養細胞を用いるよりも好適と判断される場合には、哺乳動物個体に被検物質を投与して、その後該動物個体から摘出されたその臓器または組織細胞における上記 a) 乃至 e) のいずれか一つに記載のヌクレオチド配列を有する遺伝子の発現を検出する方法も採用し得る。その際、遺伝子発現の検出対象となる臓器または組織は、上記 a) 乃至 e) のいずれか一つに記載のヌクレオチド配列を有する遺伝子を発現するものであればよいが、好ましくは肝臓である。この実施態様における好ましい哺乳動物種はヒト、マウス、ラットまたはハムスターが好ましく、ヒトまたはマウスがより好ましい。例えばマウスとしては前記 KK マウスが好ましく用いられるが、本発明はこれに限定されない。

【0022】本発明の方法において用いられる培養細胞は、上記 a) 乃至 e) のいずれか一つに記載のヌクレオチド配列を有する遺伝子を発現可能な条件（ただし被検物質を添加しない場合）であれば、いかなる条件で培養してもよい。例えば、該培養細胞について確立された培養条件が知られており、該条件下において該細胞が上記 a) 乃至 e) のいずれか一つに記載のヌクレオチド配列を有する遺伝子を発現する場合は、該条件で培養してもよい。

【0023】4) 被検物質の添加

上記細胞の培養中、被検物質を培養培地に添加し一定期間培養する。被検物質としては、化合物、微生物の代謝産物、植物や動物組織の抽出物、それらの誘導体またはそれらの混合物等が挙げられる。被検物質の投与量や濃度は適宜設定するか、または例えば希釈系列を作成するなどして複数種の投与量を設定してもよい。被検物質存在下で培養する期間も適宜設定してよいが、好ましくは 30 分乃至 24 時間である。哺乳動物個体に被検物質を投与する場合は、被検物質の物性等により経口投与、静脈注射、腹腔内注射、経皮投与、皮下注射等の投与形態を使い分ける。

【0024】5) 試料の調製

上記のようにして培養した細胞から RNA を抽出する際には、培養終了後直ちに細胞を RNA 抽出用の溶媒（例えばフェノール等リボヌクレアーゼを不活性化作用を有する成分を含むもの）で直接溶解するのが好ましい。または、細胞を破壊しないように、スクレーパー

で慎重に掻きとるか、もしくはトリブシン等の蛋白質分解酵素を用いて穏やかに培養基材から分離させるなどの方法により、細胞を回収した後、速やかにRNA抽出工程に移行する。

【0025】RNAの抽出方法としては、チオシアン酸グアニジン・塩化セシウム超遠心法、チオシアン酸グアニジン・ホットフェノール法、グアニジン塩酸法、酸性チオシアン酸グアニジン・フェノール・クロロホルム法 (Chomczynski, P. and Sacchi, N., (1987) Anal. Biochem., 162, 156-159) などを採用しうが、酸性チオシアン酸グアニジン・フェノール・クロロホルム法が好適である。

【0026】得られたRNAからさらにmRNAを精製する方法は以下に説明する通りである。すなわち、真核細胞の細胞質に存在するmRNAの多くは、その3'末端にポリ(A)配列を持つことが知られているので、この特徴を利用して例えばピオチン化したオリゴ(dT)プローブにmRNAを吸着させ、さらにストレプトアビジンを固定化した常磁性粒子に、ピオチン/ストレプトアビジン間の結合を利用してmRNAを捕捉し洗浄操作の後、mRNAを溶出することにより、mRNAを精製することができる。また、オリゴ(dT)セルロースカラムにmRNAを吸着させて、次にこれを溶出して精製する方法も採用し得る。さらにショ糖密度勾配遠心法などにより、mRNAをさらに分画することもできる。ただし、本発明の方法のためには、これらmRNAの精製工程は必須ではなく、上記a)乃至e)のいずれか一つに記載のヌクレオチド配列を有する遺伝子の発現の検出が可能である限りにおいて、全RNAをその後の工程に用いることもできる。

【0027】6) 試料の固相化

核酸ハイブリダイゼーションによる検出を行う場合、上記のようにして得られたRNA試料中の遺伝子の特異的に検出するため、該RNA試料をアガロース電気泳動を経てハイブリダイゼーション実験用メンブレン(以下単に「メンブレン」という)に転写する(ノーザンブロット法)か、または直接メンブレンに試料を染み込ませる、いわゆるドットブロット法やスロットブロット法により、メンブレンに固相化する。このメンブレンとしては、ニトロセルロースメンブレン(例えば、ハイボンド-Cピュア(アマシャム・ファルマシア社製)等)、ポジティブチャージ・ナイロンメンブレン(例えば、ハイボンド-N+アマシャム・ファルマシア社製)等)または親水性ナイロンメンブレン(例えば、ハイボンド-N/NX(アマシャム・ファルマシア社製)等)等が用いられる。

【0028】ノーザンブロット用のアガロース電気泳動方法としては、アガロースホルムアミドゲル電気泳動法、試料をグリオキサルとジメチルスルホキシドで処理し、変性させた後、リン酸緩衝液で作製したアガロー

スゲルで泳動させる方法およびアガロースゲルメチル水銀電気泳動法(以上Maniatis, T. et al. (1982) in "Molecular Cloning A Laboratory Manual" Cold Spring Harbor Laboratory, NY.)等を挙げることができるが、これらに限定されない。

【0029】電気泳動後のゲルからメンブレンにRNAを移す、いわゆるブロッティング方法としては、キャピラリートランスファー法(Maniatis, T. et al. (1982) in "Molecular Cloning A Laboratory Manual" Cold Spring Harbor Laboratory, NY.)、バキューム法、電気泳動法(Maniatis, T. et al. (1989) in "Molecular Cloning A Laboratory Manual, 2nd ed" Cold Spring Harbor Laboratory, NY.)等を挙げることができる。ドットブロット法やスロットブロット法のための器材も市販されている(例えば、バイオドット(バイオラッド社製)等)。

【0030】ブロッティング終了後、メンブレンに移し取られたRNAをメンブレンに固定する操作を行う(この操作はメンブレンの材質によって異なり、製品によっては固定操作不要の場合もある)。

【0031】7) プローブの標識

核酸ハイブリダイゼーションによる検出を行うにあたり、上記のようにして固相化させたRNA試料中の特定のmRNAを検出するためのプローブの標識方法と検出方法について以下に述べる:

i) 放射性同位元素標識

DNA断片またはそれを保持するベクター等を材料乃至鋳型として、ニックトランスレーション法(例えば、ニックトランスレーションキット(アマシャム・ファルマシア社製)等を使用)、ランダムプライム法(例えば、マルチプライムDNAラベリングシステム(アマシャム・ファルマシア社製)等を使用)、末端標識法(例えば、メガラベル(宝酒造(株)社製)、3'-末端ラベリングキット(アマシャム・ファルマシア社製)等を使用)で標識DNAプローブを調製するか、あるいは鋳型となるDNAをサブクロニングしたベクター中のSP6プロモーターやT7プロモーターを利用したイン・ビトロ転写法により標識RNAプローブを調製する。これらプローブの検出はX線フィルムまたはイメージングプレートを用いたオートラジオグラフィにより行うことができ、さらにX線フィルムの場合はデンストメトリー(例えば、GS-700イメージングデンストメーター(バイオラッド社製)を使用)を、イメージングプレートの場合はBAS2000II(富士フィルム製)システムをそれぞれ用いた定量も可能である。

【0032】ii) 酵素標識

DNAあるいはRNA断片を直接酵素標識する。標識に用いられる酵素は例えば、アルカリフォスファターゼ(AlkPhos Direct system for chemiluminescence(アマシャム・ファルマシア社製)等を使用)、西洋ワサビ

ペルオキシダーゼ (Horseradish Peroxidase) (ECLダイレクト・ヌクレイック・アッシド・ラベリング・アンド・ディテクション・システム (アマシャム・ファルマシア社製) 等を使用) を挙げることができる。プローブの検出は、標識した酵素の触媒反応が検出可能になるような基質、例えば該触媒反応により発色物質を生成したり、発光するような基質を含む酵素反応緩衝液にメンブレンを浸すことにより行う。発色基質を用いた場合は目視により検出することができ、発光基質を用いた場合は放射性同位元素標識の場合と同様にX線フィルムまたはイメージングプレートを用いたオートラジオグラフィ

【0033】iii) その他分子による標識

フルオレセイン標識：DNA断片にニックトランスレーション法、ランダムプライム法、または3'末端標識法 (アマシャム・ファルマシア社より市販されているECL 3'-オリゴラベリングシステムなど) で標識する。あるいはSP6、T7プロモーターによるイン・ビトロ転写によりRNAに標識する；ピオチン標識：DNAの5'末端を標識 (アマシャム・ファルマシア社より市販されているオリゴヌクレオチド・ピオチン・ラベリングキットなど使用) したり、DNA断片にニックトランスレーション法、ランダムプライム法などで標識する；ジゴキシゲニン修飾dUTP標識：DNA断片にニックトランスレーション法、ランダムプライム法などで標識する。

【0034】これら標識分子の検出は、いずれの場合も、標識された分子に特異的に結合する分子を放射性同位元素や酵素で標識したものをプローブに結合させる操作を含む。特異的に結合する分子とは、例えばフルオレセインやジゴキシゲニンの場合は抗フルオレセイン抗体や抗ジゴキシゲニン抗体であり、ピオチンの場合はアビジンまたはストレプトアビジンである。これらをプローブに結合させた以降は、その標識された放射性同位元素や酵素により上記i) またはii) 記載と同様の方法にしたがって検出を行うことができる。

【0035】8) ハイブリダイゼーション

ハイブリダイゼーションは、本発明が属する技術分野において周知の方法で行われ得る。本発明におけるハイブリダイゼーション溶液または洗浄液の組成と、ハイブリダイゼーション温度または洗浄温度の関係については、例えば文献 (バイオ実験イラストレイテッド4、p148、秀潤社刊) の記載に従うことができるが、好ましい条件は以下の通りである：

ハイブリダイゼーション溶液：ExpressHyb Hybridization Solution (クローンテック社製) ；

プローブの終濃度 (放射標識プローブの場合) ： 1乃

至 2×10^6 cpm/ml (好ましくは、 2×10^6 cpm/ml) ；

ハイブリダイゼーション温度および時間： 68、1乃至24時間。

【0036】メンブレンの洗浄条件：

i) 0.1乃至 $5 \times \text{SSC}$ (最も好ましくは $2 \times \text{SSC}$)、0.05乃至0.1% SDS (最も好ましくは0.05%) ドデシル硫酸ナトリウム (以下「SDS」という) 中、室温乃至42 (最も好ましくは室温) で20乃至60分間 (最も好ましくは20分間) 振盪する操作を、洗浄液を交換して2乃至6回 (最も好適には3回) 行う；

ii) 上記i) の後、 $0.1 \times \text{SSC}$ 、0.1% SDS中、50乃至65 で、20乃至60分間振盪する操作を、洗浄液を交換して2乃至6回行う。または、0.2乃至 $0.5 \times \text{SSC}$ 、0.1% SDS中、62乃至65 で、20乃至60分間振盪する操作を、洗浄液を交換して2乃至6回行う。最も好適には、 $0.1 \times \text{SSC}$ 、0.1% SDS中、50 で、20分間振盪する操作を、洗浄液を交換して3回行う。

【0037】洗浄終了後、上記7) に記載したように、プローブの標識法に合わせた検出・定量を行う。また、細胞あたりの発現量が安定していることが知られている遺伝子 (例えば、23kDa高塩基性タンパク質、 α -チューブリン、グリセルアルデヒド-3-デヒドロゲナーゼ、ヒポキサンチン・グアニン・ホスホリボシルトランスフェラーゼ、ホスホリパーゼA2、リボゾーマルタンパク質S9、ユビキチン等の遺伝子発現を検出するためのプローブが市販されている) の各試料における発現量を、各試料間のRNA量の差等に起因するばらつきを補正する目的で同時に測定しておき、この安定的発現遺伝子の発現量を基準とした、検出対象遺伝子発現量の相対値を、被検物質を投与した細胞群と投与しなかった細胞群との間で比較することにより、より精密な評価を行うことができる。

【0038】その結果、上記a) 乃至e) のいずれか一つに記載のヌクレオチド配列を有する遺伝子の発現量を低下させる被検物質は、高脂血症の治療または予防剤となり得る。

【0039】9) RT-PCR反応

RT-PCRによって核酸の検出を行う態様における、各反応の条件は以下に記載する通りである。なお、RT-PCRによる検出のための試料は、通常ポリ(A)⁺RNAにまで精製されている必要はない。

【0040】i) 逆転写酵素反応

反応液組成の例 (全量20 μ l)：

全RNA 適宜；

塩化マグネシウム 2.5乃至5mM (好ましくは5mM) ；

1 $\times$ RNA PCR緩衝液 (10mM トリス - 塩酸

(25におけるpH8.3乃至9.0(好ましくは8.3))、50mM 塩化カリウム)；
dNTPs 0.5乃至1mM(好ましくは1mM)；
アンチセンスプライマー 1μM (アンチセンスプライマーの代用として、市販のランダムプライマーやオリゴ(dT)プライマー(12-20ヌクレオチド)を2.5μM添加することもできる)；
逆転写酵素 0.25乃至1単位/μl(好ましくは0.25単位/μl)；
滅菌水で20μlに調整する。

【0041】反応温度条件：30で10分間保温(ランダムプライマー使用時のみ)した後、42乃至60(好ましくは42)で15乃至30分間(好ましくは30分間)保温し、さらに99で5分間加熱して酵素を失活させてから、4乃至5(好ましくは5)で5分間冷却する。

【0042】ii)PCR

反応液組成の例：

塩化マグネシウム 2乃至2.5mM(好ましくは2.5mM)；

1×PCR緩衝液(10mM トリス-塩酸(25におけるpH8.3乃至9.0(好ましくは8.3))、50mM 塩化カリウム)；

dNTPs 0.2乃至0.25mM(好ましくは0.25mM)；

アンチセンスプライマーおよびセンスプライマー 0.2乃至0.5μM(好ましくは0.2μM)；

Taqポリメラーゼ 1乃至2.5単位(好ましくは2.5単位)；

滅菌水を加えて全量を80μlに調整し、その全量を、逆転写反応を終了した反応液全量に加えてからPCRを開始する。

【0043】反応温度条件：まず94で2分間加熱した後、90乃至95(好ましくは94)で30秒間、40乃至60(好ましくは、プライマーの特性から算出される解離温度(Tm)からそれより20度低い温度までの範囲内で30秒間、70乃至75(好ましくは72)で1.5分間の温度サイクルを28乃至50サイクル(好ましくは28サイクル)繰り返してから、4に冷却する。

【0044】PCR終了後、反応液を電気泳動し、目的の大きさのバンドが増幅されているか否かを検出する。定量的検出を行うためには、予め段階希釈したcDNAクローンを標準の鋳型DNAとして同条件でPCRを実施し、定量的検出が可能な温度サイクル数を定めておくか、または、例えば5サイクル毎に一部反応液をサンプリングしてそれぞれ電気泳動を行う。また例えばPCR反応時に放射標識dCTPを用いることにより、バンド中に取り込まれた放射能の量を指標に定量を行うこともできる。

【0045】被検物質存在下で培養した細胞由来の試料と、被検物質非存在下で培養した細胞由来の試料との間で検出結果を比較し、上記a)乃至e)のいずれか一つに記載のヌクレオチド配列を有する遺伝子の発現量を低下させた被検物質は高脂血症の治療または予防剤となり得る。

【0046】10)その他の方法

上記a)乃至e)のいずれか一つに記載のヌクレオチド配列を有する遺伝子の発現量を測定する他の方法としては、以下に記載するものを挙げることができる。

【0047】i)リボヌクレアーゼ保護アッセイ(RNase protection assay)：RNA試料中の、上記a)乃至e)のいずれか一つに記載のヌクレオチド配列を有するmRNA(ただし配列中のtはuに読み替える)のみに標識プローブをハイブリダイズさせ、二本鎖ポリヌクレオチドを形成させておいてから、試料にリボヌクレアーゼを添加してインキュベーションすると、プローブがハイブリダイズしたmRNAは二本鎖を形成していることによりリボヌクレアーゼによる消化を免れ、それ以外のRNAは消化されるので、該二本鎖ポリヌクレオチドのみが残る(検出されるmRNAよりプローブが短ければ、プローブの鎖長に相当する二本鎖ポリヌクレオチドが残る)。この二本鎖ポリヌクレオチドを定量することにより、目的の遺伝子の発現量を測定する。具体的には、例えば以下に記載する方法に従う。

【0048】二本鎖を形成せずに余った標識プローブを二本鎖ポリヌクレオチドと確実に分離して定量を容易にするために、余った標識プローブはリボヌクレアーゼに消化されることが好ましいが、リボヌクレアーゼとして一本鎖DNAも消化できるようなものを使用すれば、標識プローブはDNAでもRNAでもよい。標識プローブの調製方法は上記1)および7)の記載に準ずるが、この方法において用いられるプローブの長さは50乃至500ヌクレオチド程度が好ましい。また、二本鎖DNAを直接標識して熱変性したのみのプローブ等、相補鎖が混在するようなプローブは本法には好適ではない。

【0049】RNAプローブは、例えば下記の方法に従って調製される。まず鋳型DNAをバクテリオファージのプロモーター(T7、SP6、T3プロモーター等)を有するプラスミドベクター(例えばpGEM-T(プロメガ社製)など)に挿入する。次にこの組換えプラスミドベクターを、制限酵素で、挿入断片のすぐ下流で一ヶ所だけ切断されるように消化する。得られた直鎖DNAを鋳型として、放射能標識されたりボヌクレオチド存在下で、インビトロ転写反応を行う。この反応には、ベクター中のプロモーターに合わせてT7、SP6、またはT3ポリメラーゼ等の酵素を用いる。以上の操作は例えばリボプローブシステム-T7、同-SP6または同-T3(いずれもプロメガ社製)を用いて行うことができる。

【0050】RNA試料を調製するまでの工程は上記3)乃至5)記載の通りである。調製された全RNA試料10乃至20 μ g相当分と、 5×10^5 cpm相当の過剰量の標識プローブとを用いてリボヌクレアーゼ保護アッセイを行う。この操作は市販のキット(HybSpeed RPA Kit、アンピオン社製)を用いて行うことができる。得られたリボヌクレアーゼ消化後の試料を、8M尿素を含む4乃至12%ポリアクリルアミドゲルで電気泳動した後、ゲルを乾燥させ、X線フィルムでオートラジオグラフィを行う。以上の操作により、リボヌクレアーゼ消化を免れた二本鎖リボヌクレオチドのバンドを検出することができ、またその定量は上記7)のi)記載の方法に従って実施することができる。さらに、ノーザンブロット解析の場合と同様、各試料間のRNA量の差等に起因するばらつきを補正する目的で、 β -アクチン遺伝子の発現量を同時に測定しておけば、より精密な評価を行うことができる。

【0051】このようにして、被検物質存在下で培養した細胞由来の試料と、被検物質非存在下で培養した細胞由来の試料との間で検出結果を比較し、上記a)乃至e)のいずれか一つに記載のヌクレオチド配列を有する遺伝子の発現量を低下させた被検物質は高脂血症の治療または予防剤となり得る。

【0052】ii)ランオン・アッセイ(Run-on assay、Greenberg, M. E. and Ziff, E.B. (1984) Nature 311, 433-438,およびGroudine, M. et al. (1981) Mol. Cell Biol. 1, 281-288参照)：本方法は、細胞から核を単離して目的の遺伝子の転写活性を測定する方法であり、これまでに述べたような細胞内のmRNAを検出する方法ではないが、本発明においては「遺伝子の発現量を検出する方法」に包含される。単離された細胞核を用いて、試験管内で転写反応を行わせると、核を単離する前に既に転写が開始されmRNA鎖が生成されている途中のものが伸長していく反応のみが進行する。この反応時に放射標識したリボヌクレオチドを添加して、伸長していくmRNAを標識しておき、その中に含まれる、非標識プローブにハイブリダイズするmRNAを検出することにより、核を単離した時点における目的の遺伝子の転写活性を測定することができる。被検物質の影響が最も顕著に現れる時間のデータを判定に用いるため、培養細胞に被検物質を添加してから核を単離するまでの時間について、例えば添加30分後、1時間後、2時間後、4時間後、8時間後および24時間後の細胞から核を単離してそれぞれアッセイを行うなどの方法をとることができる。なお具体的操作方法は、プローブを上記1)の記載に準じて標識しないものを調製する他は、上記参考文献の記載に準ずる。このようにして、被検物質存在下で培養した細胞由来の試料と、被検物質非存在下で培養した細胞由来の試料との間で検出結果を比較し、上記a)乃至e)のいずれか一つに記載のヌクレオチド配列

を有する遺伝子の転写活性を低下させた被検物質は高脂血症の治療または予防剤となり得る。

【0053】iii)DNAチップ解析、DNAマイクロアレイ解析

[1]プローブ取得用試料の調製

まず、被検物質存在下で培養した細胞由来の試料と、被検物質非存在下で培養した細胞由来の試料のmRNAを抽出精製する。RNA試料を調製するまでの工程は上記3)乃至5)記載の通りである。

【0054】[2]プローブの標識

DNAチップ解析またはDNAマイクロアレイ解析用のプローブを作製するための出発材料としては、精製していない全RNAを用いることもできるが、上記5)に記載された方法で精製されたポリ(A)⁺RNAであることがより好ましい。

【0055】核酸ハイブリダイゼーションによる検出を行うにあたり、プローブの標識方法と検出方法について以下に述べる。

【0056】アフィメトリクス社製DNAチップを用いる解析のためのプローブ：アフィメトリクス社製DNAチップに添付されたプロトコルに従い、ビオチン標識したcRNAプローブを用いる。

【0057】DNAマイクロアレイを用いる解析のためのプローブ：逆転写酵素反応でポリ(A)⁺RNAからcDNAを作製する際に、蛍光色素(例えばCy3、Cy5など)で標識されたd-UTPなどを加えておくことによりcDNAを蛍光標識する。このとき、被検物質存在下で培養した細胞由来の試料と、被検物質非存在下で培養した細胞由来の試料をそれぞれ異なる色素で標識しておけば、後のハイブリダイゼーション時には両者を混合して用いることができる。メンブレンフィルターを用いる解析のためのプローブ：逆転写酵素反応でポリ(A)⁺RNAからcDNAを作製する際に、放射性同位元素(例えば³²P、³³P)で標識されたd-CTPなどを加えておくことによりプローブを標識する。

【0058】[3]固相化試料

上記工程[2]で得られた標識プローブとハイブリダイズさせるための固相化試料としては、以下のようなものを挙げることができる。

【0059】データベース上のEST(expressed sequence tag)配列またはmRNA配列をもとに合成したアンチセンスオリゴヌクレオチドが固相化された遺伝子チップ(アフィメトリクス社製)(Lipshutz, R. J. et al. (1999) Nature genet. 21, suppliment, 20-24)：上記EST配列またはmRNA配列は、プローブの調製に用いた細胞と同種の動物由来のものであることが最も好ましいが、それに限定されず、例えば近縁種の動物由来のものも使用可能である。ただし、前述a)乃至e)のいずれか一つに記載のヌクレオチド配列を有する遺伝子、Genbankデータベース上に「アンジオポエチ

ン関連タンパク質3」をコードするヌクレオチド配列として公開されている遺伝子、またはそれらのいずれか一つの部分配列を含む配列が固相化されているものを用いる。

【0060】プローブ調製に用いた細胞と同種乃至近縁の動物の臓器組織（好ましくは肝臓）、もしくは該臓器組織から単離または株化された細胞から得られたmRNAより作製されたcDNA乃至RT-PCR産物が固相化されたDNAマイクロアレイまたはメンブレンフィルター：これらcDNAまたはRT-PCR産物は、例えばmRNAの材料とした動物のESTデータベース等の配列情報をもとに作製されたプライマーで逆転写酵素反応やPCRを実施することによりクローン化されたものである。試料調製のための材料としては、前述a)乃至e)のいずれか一つに記載のヌクレオチド配列を有する遺伝子、Genbankデータベース上に「アンジオポエチン関連タンパク質3」をコードするヌクレオチド配列として公開されている遺伝子を発現している細胞（好ましくは肝臓由来）を用いる。このcDNAやRT-PCR産物としては、予め発現量の異なるmRNAを、サブトラクション法（Diatchenko, L. et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93, 6025-6030）、ディファレンシャルディスプレイ法（Kato, K. (1995) Nucleic Acids Res. 23, 3685-3690）等を利用して選択しながら作製されたものも含む。また、DNAマイクロアレイやフィルターは、検出対象となる遺伝子、すなわちGenbankデータベース上に「アンジオポエチン関連タンパク質3」をコードするヌクレオチド配列として公開されている遺伝子を含む市販品を利用してもよいし、スポットターを用いて前述a)乃至e)のいずれか一つに記載のヌクレオチド配列を有する遺伝子を固相化したDNAマイクロアレイまたはフィルターを作製することもできる（例えば、宝酒造（株）社製、GMS417アレイヤー等）。

【0061】この固相化試料に、上記[2]で調製されたプローブを用いて、同じ条件で別個に、あるいは混合して同時にハイブリダイズさせる（Brown, P. O. et al. (1999) Nature genet. 21, suppliment, 33-37）。

【0062】[4]解析

アフィメトリクス社製DNAチップを用いる解析の場合：アフィメトリクス社製DNAチップに添付のプロトコルに従って、ハイブリダイゼーションおよび解析を行う。

【0063】DNAマイクロアレイを用いる解析の場合：例えば、宝酒造（株）社の市販DNAマイクロアレイを用いる場合、同社のプロトコルに従いハイブリダイゼーションおよび洗浄を行って、蛍光シグナル検出機（例えばGMS418アレイスキャナー（宝酒造（株）社製）等）で蛍光シグナルを検出後、解析を行う。

【0064】フィルターを用いる解析の場合：ハイブリダイゼーションは、本発明が属する技術分野において周知の方法で行われ得る。例えば、ハイブリダイゼーションおよび洗浄を行った後、解析装置（例えば、アトラスイメージ（クローンテック社製））を用いて解析を行う。

【0065】上記いずれの場合も、同一ロットの固相化試料に被検物質存在下で培養した細胞由来の試料由来のプローブと、被検物質非存在下で培養した細胞由来の試料由来のプローブをそれぞれハイブリダイズさせる。このとき、使用するプローブ以外のハイブリダイゼーションの条件は同じとする。上記[2]に記載したように、それぞれのプローブを異なる蛍光色素で標識した場合は、一つの固相化試料に両プローブの混合物をハイブリダイズさせることもできる（Brown, P. O. et al. (1999) Nature genet. 21, suppliment, 33-37）。

【0066】解析の結果、被検物質存在下で培養した細胞由来の試料由来のプローブと、被検物質非存在下で培養した細胞由来の試料由来のプローブとの間で、固相化試料の標的遺伝子、すなわち前述a)乃至e)のいずれか一つに記載のヌクレオチド配列を有する遺伝子またはアンジオポエチン関連タンパク質3をコードするヌクレオチド配列を有する遺伝子にハイブリダイズしたプローブ量を測定する。その結果、標的遺伝子にハイブリダイズしたプローブ量を比較して、被検物質存在下で培養した細胞由来の試料由来のプローブの方が被検物質非存在下で培養した細胞由来の試料由来のプローブよりも少なかった場合、該被検物質は、前述a)乃至e)のいずれか一つに記載のヌクレオチド配列を有する遺伝子の発現を抑制する物質であるので、高脂血症の治療または予防剤となり得る。

【0067】iv) その他

上記以外に、被検物質存在下で培養した細胞由来の試料で、被検物質非存在下で培養した細胞由来の試料に比べて前述a)乃至e)のいずれか一つに記載のヌクレオチド配列を有する遺伝子の発現量を低下させる被検物質の特定を検出する方法として、以下の方法を挙げることができる。

【0068】すなわち、単一の反応において、PCRをハイブリダイゼーションプロービング（以下「プロービング」という）と組み合わせた「Taqman」として知られる技術（Holland, P. M. et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 7276-7280）や、単一の反応においてPCRをプロービングと組み合わせた方法（Higuchi et al. Biotechnology, 10, 413-417 (1992)）を利用することもできる。後者の方法では、紫外線で励起されることにより蛍光を発する核酸検出試薬である臭化エチジウムをPCR反応液に添加する。2本鎖DNAの存在下で臭化エチジウムの蛍光は増加するので、励起光を照射したときに検出される蛍光の増加は2本鎖PCR産物の

蓄積に相関し得る。

【0069】さらに、PCRによる増幅とプロービングとを組み合わせた別の方法として、欧州特許出願公開第0601889号公報記載の方法を利用することもできる。さらに、ライトサイクラーシステム（ロシュ・ダイアグノスティクス社製、日本特許公開2000-312600号公報参照）を用いてmRNA量を定量することも可能である。

【0070】(B) ポリペプチドの検出

次に、本発明の方法の別の実施態様としては、上記した 10 遺伝子発現を検出する実施態様において検出対象となった遺伝子がコードするポリペプチドを検出する方法がある。この実施態様においては、試料中のポリペプチドを96穴プレートのウェル内底面やメンブレン等に固相化しておいてから、標的のポリペプチドを特異的に認識する抗体を用いた検出が行われる。このうち、96穴プレートを用いるのは一般に固相酵素免疫定量法（ELISA法）や放射性同位元素免疫定量法（RIA法）と呼ばれる方法である。一方、メンブレンに固相化する方法としては、試料のポリアクリルアミド電気泳動を経てメン 20 ブレンにポリペプチドを転写する方法（ウエスタンブロット法）か、または直接メンブレンに試料またはその希釈液を染み込ませる、いわゆるドットブロット法やスロットブロット法が挙げられる。

【0071】1) 試料の調製

上記のようなポリペプチドを検出する実施態様において用いられる培養細胞の種類に関する条件は、上記した遺伝子発現を検出する実施態様の場合と同様である。また、哺乳動物個体に被検物質を投与して、その後該動物 30 個体から採取された血清等を試料として用いる方法も採用し得る。この場合の好ましい哺乳動物種はヒト、マウス、ラットまたはハムスターが好ましく、ヒトまたはマウスがより好ましい。例えばマウスとしては高脂血症マウスであるKKマウスが好ましく用いられるが、本発明はこれに限定されない。培養細胞の培養条件、被検物質の投与方法についても、遺伝子発現を検出する実施態様の場合と同様である。また、高脂血症の治療または予防剤としての活性を調べようとする被検物質としては、化合物、微生物の代謝産物、植物や動物組織の抽出物、それらの誘導体またはそれらの混合物等を挙げることがで 40 きる。

【0072】本実施態様のための試料を調製するための材料としては、被検物質存在下または非存在下で培養した細胞培養の培養上清または細胞質画分が用いられ得るが、培養上清が好適である。培養上清は、培養終了後回収し、必要によりフィルター過滅菌処理を経て、ELISA / RIA用試料やウエスタンブロット用試料の調製工程に供される。

【0073】ELISA / RIA用試料としては、例えば回収した培養上清をそのまま使用するか、緩衝液で適 50

宜希釈したものを用いる。

【0074】ウエスタンブロット用（電気泳動用）試料の調製方法は以下の通りである。まず、例えば培養上清をトリクロロ酢酸処理して蛋白質を沈殿させ、遠心分離により沈殿を得る。この沈殿を氷冷したアセトンで洗浄し、風乾後、SDS - ポリアクリルアミド電気泳動用の2 -メルカトリエタノールを含むサンプル緩衝液（バイオラッド社製等）に溶解する。

【0075】ドット / スロットブロットの場合は、例えば回収した培養上清そのもの、または緩衝液で適宜希釈したものを、プロットング装置を使用するなどして、直接メンブレンへ吸着させる。

【0076】2) 試料の固相化

上記のようにして得られた試料中のポリペプチドを特異的に検出するため、該試料を固相化する。ウエスタンブロット法、ドットブロット法またはスロットブロット法に用いられるメンブレンとしては、ニトロセルロースメンブレン（例えば、バイオラッド社製等）、ナイロンメンブレン（例えば、ハイボンド - ECL（アマシャム・ファルマシア社製）等）、コットンメンブレン（例えば、ブロットアブソーベントフィルター（バイオラッド社製）等）またはポリビニリデン・ジフルオリド（PVDF）メンブレン（例えば、バイオラッド社製等）等が挙げられる。

【0077】電気泳動後のゲルからメンブレンにポリペプチドを移す、いわゆるプロットング方法としては、ウェット式プロットング法（CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY volume2 ed by J. E. Coligan, A. M. Kruisbeek, D. H. Margulies, E.M. Shevach, W. Strober）、セミドライ式プロットング法（上記CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY volume2 参照）等を挙げることができる。ドットブロット法やスロットブロット法のための器材も市販されている（例えば、バイオドット（バイオラッド）等）。

【0078】一方、ELISA法 / RIA法で検出・定量を行うためには、専用の96穴プレート（例えば、イムノプレート・マキシソープ（ヌンク社製）等）に試料またはその希釈液（例えば0.05% アジ化ナトリウムを含むリン酸緩衝生理食塩水（以下「PBS」という）で希釈したもの）を入れて4乃至室温で一晩、または37で1乃至3時間静置することにより、ウェル内底面にポリペプチドを吸着させて固相化する。

【0079】3) 抗体

本実施態様に用いられる抗体は、上記（A）のa）からe）記載のヌクレオチド配列を含む遺伝子が動物細胞で発現することにより産生されるポリペプチド、好ましくは、配列表の配列番号2のアミノ酸番号17 - 455（より好ましくは同19 - 455）に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドまたはその一部、もしくは配列番号4のアミノ酸番号17 - 460に示されるアミノ

酸配列からなるポリペプチドまたはその一部を特異的に認識するものである。このような抗体として好適なものは例えば、配列表の配列番号 2 のアミノ酸番号 17 - 455 (より好ましくは、同 19 - 455) に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドおよび配列番号 4 のアミノ酸番号 17 - 460 に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドのいずれにも結合するが、他のいかなるマウスまたはヒト由来のタンパク質とも結合しないような抗体を挙げることができる。

【0080】本実施態様のための抗体は、常法を用いて (例えば、新生化学実験講座 1、タンパク質 1、p.389-397、1992)、抗原となる蛋白質、あるいはそのアミノ酸配列から選択される任意のポリペプチドを動物に免疫し、生体内に産生される抗体を採取、精製することによって得ることができる。また、公知の方法 (例えば、Kohler and Milstein, Nature 256, 495-497, 1975, Kennet, R. ed., Monoclonal Antibody p.365-367, 1980, Penum Press, N.Y.) に従って、本発明の蛋白質に対する抗体を産生する抗体産生細胞とミエロマ細胞とを融合させることによりハイブリドマを樹立し、モノクローナル抗体を得ることもできる。

【0081】本実施態様に用いられる抗体を作製するための抗原としては、配列表の配列番号 2 のアミノ酸番号 17 - 455 (好ましくは、同 19 - 455) に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドまたはその少なくとも 6 個の連続した部分アミノ酸配列からなるポリペプチド、もしくは配列番号 4 のアミノ酸番号 17 - 460 に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドまたはその少なくとも 6 個の連続した部分アミノ酸配列からなるポリペプチド、あるいはそれらポリペプチドに任意のアミノ酸配列や担体が付加された形の誘導体を挙げることができるが、好ましくは配列表の配列番号 9 のアミノ酸番号 1 - 14 からなるポリペプチドの C 末端または配列番号 10 のアミノ酸番号 1 - 14 に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドの N 末端に、キーホールリンペットヘモシアニンを担体として結合させたものである。

【0082】配列表の配列番号 2 のアミノ酸番号 17 - 455 (好ましくは、同 19 - 455) に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドまたは配列番号 4 のアミノ酸番号 17 - 460 に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドは、例えば、配列表の配列番号 1 のヌクレオチド番号 47 - 1411 に示されるヌクレオチド配列または配列表の配列番号 3 のヌクレオチド番号 78 - 1457 に示されるヌクレオチド配列にコードされるポリペプチドを遺伝子操作により宿主細胞に産生させることによって得ることができる。具体的には、上記ヌクレオチド配列を有する DNA を適当なベクター DNA に組み込むことにより、他の原核生物、または真核生物の宿主細胞を形質転換させることができる。さらにこれらのベクターに適当なプロモーター、および形質発現に関わる

配列を導入することにより、それぞれの宿主において遺伝子を発現させることが可能である。

【0083】原核細胞の宿主としては、例えば、大腸菌 (*Escherichia coli*) や枯草菌 (*Bacillus subtilis*) などが挙げられる。目的の遺伝子をこれらの宿主細胞内で形質転換させるには、宿主と適合し得る種由来のレプリコンすなわち複製起点と、調節配列を含んでいるプラスミドベクターで宿主細胞を形質転換させる。また、ベクターとしては、形質転換細胞に表現形質 (表現型) の選択性を付与することができる配列を有するものが好ましい。

【0084】例えば、大腸菌としては K12 株などがよく用いられ、ベクターとしては、一般に pBR322 や pUC 系のプラスミドが用いられるが、これらに限定されず、公知の各種菌株、およびベクターがいずれも使用できる。

【0085】プロモーターとしては、大腸菌においては、トリプトファン (*trp*) プロモーター、ラクトース (*lac*) プロモーター、トリプトファン・ラクトース (*tac*) プロモーター、リポプロテイン (*lpp*) プロモーター、ポリペプチド鎖伸張因子 Tu (*tufB*) プロモーター等が挙げられ、どのプロモーターも目的のポリペプチドの産生に使用することができる。

【0086】枯草菌としては、例えば 207 - 25 株が好ましく、ベクターとしては pTUB228 (Ohmura, K. et al. (1984) J. Biochem. 95, 87-93) などが用いられるが、これに限定されるものではない。枯草菌の α -アミラーゼのシグナルペプチド配列をコードする DNA 配列を連結することにより、菌体外での分泌発現も可能となる。

【0087】真核細胞の宿主細胞には、脊椎動物、昆虫、酵母などの細胞が含まれ、脊椎動物細胞としては、例えば、サルの細胞である COS 細胞 (Gluzman, Y. (1981) Cell 23, 175-182, ATCC CRL-1650) やチャイニーズ・ハムスター卵巣細胞 (CHO 細胞、ATCC CCL-61) のジヒドロ葉酸還元酵素欠損株 (Urlaub, G. and Chasin, L. A. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 4126-4220) 等がよく用いられているが、これらに限定されない。

【0088】脊椎動物細胞の発現プロモーターとしては、通常発現しようとする遺伝子の上流に位置するプロモーター、RNA のスプライス部位、ポリアデニル化部位、および転写終結配列等を有するものを使用でき、さらにこれは必要により複製起点を有してもよい。該発現ベクターの例としては、SV40 の初期プロモーターを有する pSV2dhfr (Subramani, S. et al. (1981) Mol. Cell. Biol. 1, 854-864) 等が挙げられるが、これに限定されない。

【0089】宿主細胞として、COS 細胞を用いる場合を例に挙げると、発現ベクターとしては、SV40 複製

起点を有し、C O S細胞において自立増殖が可能であり、さらに、転写プロモーター、転写終結シグナル、およびRNAプライス部位を具えたものを用いることができる。該発現ベクターは、ジエチルアミノエチル(D E A E) - デキストラン法(Luthman, H. and Magnusson, G. (1983) *Nucleic Acids Res*, 11, 1295-1308)、リン酸カルシウム - DNA共沈殿法(Graham, F. L. and van der Eb, A. J. (1973) *Virology* 52, 456-457)、および電気パルス穿孔法(Neumann, E. et al. (1982) *EMBO J.* 1, 841-845) などによりC O S細胞に取り込ま10
せることができ、かくして所望の形質転換細胞を得ることができる。また、宿主細胞としてC H O細胞を用いる場合には、発現ベクターと共に、抗生物質G 4 1 8耐性マーカーとして機能するneo遺伝子を発現し得るベクター、例えばp R S V neo(Sambrook, J. et al. (1989) : "Molecular CloningA Laboratory Manual" Cold Spring Harbor Laboratory, NY) やp S V 2 - neo(Southern, P. J. and Berg, P. (1982) *J. Mol. Appl. Genet.* 1, 327-341) などをコ・トランスフェクトし、G 4 1 8耐性のコロニーを選択することにより、目的15
的のポリペプチドを安定に産生する形質転換細胞を得ることができる。

【0090】昆虫細胞を宿主細胞として用いる場合には、鱗翅類やガ科のSpodoptera frugiperdaの卵巣細胞由来株化細胞(S f - 9またはS f - 21) やTrichoplusia niの卵細胞由来High Five細胞(Wickham, T. J. et al, (1992) *Biotechnol. Prog.* 1: 391-396) などが宿主細胞としてよく用いられ、バキュロウイルストランスファーベクターとしてはオートグラフィア核多角体ウイルス(A c N P V) のポリヘドリン蛋白質のプロモータ20
ーを利用したp V L 1 3 9 2 / 1 3 9 3がよく用いられる(Kidd, I. M. and V.C. Emery (1993) *The use of baculoviruses as expression vectors. Applied Biochemistry and Biotechnology* 42, 137-159)。この他にも、バキュロウイルスのP 1 0や同塩基性蛋白質のプロモーターを利用したベクターも使用できる。さらに、A c N P Vのエンベロープ表面蛋白質G P 6 7の分泌シグナル配列を目的蛋白質のN末端側に繋げるにより、組換え蛋白質を分泌蛋白質として発現させることも可能である(Zhe-mei Wang, et al. (1998) *Biol. Chem.*, 3 40
79, 167-174)。

【0091】真核微生物を宿主細胞とした発現系としては、酵母が一般によく知られており、その中でもサッカロミセス属酵母、例えばパン酵母Saccharomyces cerevisiaeや石油酵母Pichia pastorisが好ましい。該酵母などの真核微生物の発現ベクターとしては、例えば、アルコール脱水素酵素遺伝子のプロモーター(Bennetzen, J. L. and Hall, B. D. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 3018-3025) や酸性フォスファターゼ遺伝子のプロモーター(Miyahara, A. et al. (1983) *Proc. Natl. Acad. S* 50

ci. USA 80, 1-5) などを好ましく利用できる。また、分泌型蛋白質として発現させる場合には、分泌シグナル配列と宿主細胞の持つ内在性プロテアーゼあるいは既知のプロテアーゼの切断部位をN末端側に持つ組換え体として発現することも可能である。例えば、トリプシン型セリンプロテアーゼのヒトマスト細胞トリプターゼを石油酵母で発現させた系では、N末端側に酵母のαファクターの分泌シグナル配列と石油酵母の持つK E X 2プロテアーゼの切断部位をつなぎ発現させることにより、活性型トリプターゼが培地中に分泌されることが知られている(Andrew, L. Niles, et al. (1998) *Biotechnol. Appl. Biochem.* 28, 125-131)。

【0092】上記のようにして得られる形質転換体は、常法に従い培養することができ、該培養により細胞内、または細胞外に目的のポリペプチドが産生される。該培養に用いられる培地としては、採用した宿主細胞に応じて慣用される各種のものを適宜選択でき、例えば、上記C O S細胞であれば、R P M I 1 6 4 0培地やダルベッコ改変イーグル培地(以下「D M E M」という) などの培地に、必要に応じウシ胎児血清などの血清成分を添加したものを使用できる。

【0093】上記培養により、形質転換体の細胞内または細胞外に産生される組換え蛋白質は、該蛋白質の物理的性質や化学的性質などを利用した各種の公知の分離操作法により分離・精製することができる。該方法としては、具体的には例えば、通常の蛋白沈殿剤による処理、限外濾過、分子ふるいクロマトグラフィー(ゲル濾過)、吸着クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー(H P L C) などの各種液体クロマトグラフィー、透析法、これらの組合せなどを例示できる。また、発現させる組換え蛋白質に6残基からなるヒスチジンを繋げるにより、ニッケルアフィニティークラムで効率的に精製することができる。上記方法を組み合わせることにより容易に高収率、高純度で本発明のポリペプチドを大量に製造できる。

【0094】上記のようにして得られる抗体は、R I A法、E L I S A法、蛍光抗体法、受身血球凝集反応法などの各種免疫学的測定法や免疫組織染色などに用いることができる。

【0095】4) 検出

上記3) 記載の方法で得られる抗体は、それを直接標識するか、または該抗体を一次抗体とし、該抗体を特異的に認識する(抗体を作製した動物由来の抗体を認識する) 標識二次抗体と協同で検出に用いられる。

【0096】標識の種類として好ましいものは酵素(アルカリホスファターゼまたは西洋ワサビペルオキシダーゼ) またはビオチン(ただし二次抗体のビオチンにさらに酵素標識ストレプトアビジンを結合させる操作が加わる) であるが、これらに限定されない。標識二次抗体

(または標識ストレプトアビジン)を使用する方法のための、予め標識された抗体(またはストレプトアビジン)は種々のものが市販されている。RIAの場合は¹²⁵I等の放射性同位元素で標識された抗体を用い、測定は液体シンチレーションカウンター等を用いて行う。

【0097】これら標識された酵素の活性を検出することにより、抗原であるポリペプチドの量が測定される。アルカリホスファターゼまたは西洋ワサビペルオキシダーゼの場合、それら酵素の触媒により発色する基質や発光する基質が市販されている。

【0098】発色する基質を用いた場合、ウエスタンブロット法やドット/スロットブロット法においては目視で検出できる。ELISA法においては、好ましくは市販のマイクロプレートリーダーを用いて各ウェルの吸光度(測定波長は基質により異なる)を測定することにより定量する。また好ましくは上記3)において抗体作製のために使用した抗原の希釈系列を調製し、これを標準抗原試料として他の試料と同時に検出操作を行って、標準抗原濃度と測定値をプロットした標準曲線を作成することにより、他の試料中の抗原濃度を定量することが可能である。

【0099】一方、発光する基質を使用した場合は、ウエスタンブロット法やドット/スロットブロット法においてはX線フィルムまたはイメージングプレートを用いたオートラジオグラフィや、インスタントカメラを用いた写真撮影により検出することができ、デンシトメトリやBAS2000IIシステムを利用した定量も可能である。また、ELISA法で発光基質を用いる場合は、発光マイクロプレートリーダー(例えば、バイオラッド社製等)を用いて酵素活性を測定する。

【0100】5)測定操作

i)ウエスタンブロット、ドットブロットまたはスロットブロットの場合

まず、抗体の非特異的吸着を阻止するため、予めメンブレンをそのような非特異的吸着を阻害する物質(スキムミルク、ウシ血清アルブミン、ゼラチン、ポリビニルピロリドン等)を含む緩衝液中に一定時間浸しておく操作(ブロッキング)を行う。ブロッキング溶液の組成は、例えば5%スキムミルク、0.05乃至0.1%ツイーン20を含むリン酸緩衝生理食塩水(PBS)またはトリス緩衝生理食塩水(TBS)が用いられる。スキムミルクの代わりに、1乃至10%のウシ血清アルブミン、0.5乃至3%のゼラチンまたは1%のポリビニルピロリドン等を用いてもよい。ブロッキングの時間は、4で16乃至24時間、または室温で1乃至3時間である。

【0101】次に、メンブレンを0.05乃至0.1%ツイーン20を含むPBSまたはTBS(以下「洗浄液」という)で洗浄して余分なブロッキング溶液を除去した後、上記3)記載の方法で作製された抗体を洗浄液

で適宜希釈した溶液中に一定時間浸して、抗体をメンブレン上の抗原に結合させる。このときの抗体の希釈倍率は、例えば上記3)記載の組換え抗原を段階希釈したものを試料とした予備のウエスタンブロットング実験を行って決定することができる。この抗体反応操作は、好ましくは室温で1時間行う。抗体反応操作終了後、メンブレンを洗浄液で洗浄する。ここで、用いた抗体が標識されたものである場合は、ただちに検出操作を行うことができる。未標識の抗体を用いた場合には、引き続いて二次抗体反応を行う。標識二次抗体は、例えば市販のものを使用する場合は洗浄液で2000乃至20000倍に希釈して用いる(添付の指示書に好適な希釈倍率が記載されている場合は、その記載に従う)。一次抗体を洗浄除去した後のメンブレンを二次抗体溶液に室温で1乃至3時間浸し、洗浄液で洗浄してから、標識方法に合わせた検出操作を行う。洗浄操作は、例えばまずメンブレンを洗浄液中で15分間振盪してから、洗浄液を新しいものに交換して5分間振盪した後、再度洗浄液を交換して5分間振盪することにより行う。必要に応じてさらに洗浄液を交換して洗浄してもよい。

【0102】ii)ELISA/RIA

まず、上記2)の方法で試料を固相化させたプレートのウェル内底面への抗体の非特異的吸着を阻止するため、ウエスタンブロットの場合と同様、予めブロッキングを行っておく。ブロッキングの条件については、ウエスタンブロットの項に記載した通りである。

【0103】次に、ウェル内を0.05乃至0.1%ツイーン20を含むPBSまたはTBS(以下「洗浄液」という)で洗浄して余分なブロッキング溶液を除去した後、上記3)記載の方法で作製された抗体を洗浄液で適宜希釈した溶液を分注して一定時間インキュベーションし、抗体を抗原に結合させる。このときの抗体の希釈倍率は、例えば上記3)記載の組換え抗原を段階希釈したものを試料とした予備のELISA実験を行って決定することができる。この抗体反応操作は、好ましくは室温で1時間程度行う。抗体反応操作終了後、ウェル内を洗浄液で洗浄する。ここで、用いた抗体が標識されたものである場合は、ただちに検出操作を行うことができる。未標識の抗体を用いた場合には、引き続いて二次抗体反応を行う。標識二次抗体は、例えば市販のものを使用する場合は洗浄液で2000乃至20000倍に希釈して用いる(添付の指示書に好適な希釈倍率が記載されている場合は、その記載に従う)。一次抗体を洗浄除去した後のウェルに二次抗体溶液を分注して室温で1乃至3時間インキュベーションし、洗浄液で洗浄してから、標識方法に合わせた検出操作を行う。洗浄操作は、例えばまずウェル内に洗浄液を分注して5分間振盪してから、洗浄液を新しいものに交換して5分間振盪した後、再度洗浄液を交換して5分間振盪することにより行う。必要に応じてさらに洗浄液を交換して洗浄してもよい。

【0104】また本発明において、いわゆるサンドイッチ法のE L I S Aは例えば以下に記載する方法により実施することができる。まず、配列表の配列番号2のアミノ酸番号17-455（好ましくは、同19-455）に示されるアミノ酸配列および配列番号4のアミノ酸番号17-460に示されるアミノ酸配列のいずれか一つにおいて、親水性に富む領域を2箇所選んで、それぞれの領域中のアミノ酸6残基以上からなる部分ペプチドを合成し、該部分ペプチドを抗原とした2種類の抗体を取得する。このうち一方の抗体を上記4）記載のように標識しておく。標識しなかった方の抗体は、上記2）記載の方法に準じて96穴E L I S A用プレートのウェル内底面に固相化する。ブロッキングの後、試料液をウェル内に入れて常温で1時間インキュベーションする。ウェル内を洗浄後、標識した方の抗体希釈液を各ウェルに分注してインキュベーションする。再びウェル内を洗浄後、標識方法に合わせた検出操作を行う。

【0105】6） 評価

以上に記載した方法で、被検物質存在下で培養した細胞由来の試料と、被検物質非存在下で培養した細胞由来の試料との間で検出結果を比較し、その結果上記3）記載の方法で作製された抗体が特異的に結合するポリペプチドの産生量を低下させた被検物質は、高脂血症の治療または予防剤となり得る。また、上記3）記載の方法で作製された抗体、およびその他上記の一連の方法に用いられる試薬をまとめることにより、高脂血症の治療または予防剤を試験するためのキットが提供される。

【0106】本発明の方法において検出の対象となるポリペプチドは、上記の抗体作製用の抗原を得る方法の記載に従って得られる他、配列表の配列番号1のヌクレオチド番号47-1411に示されるヌクレオチド配列または配列表の配列番号3のヌクレオチド番号78-1457に示されるヌクレオチド配列を有するDNAを組み込んだアデノウイルスベクターを利用して動物細胞に産生させることもできる。そのような組換えアデノウイルスベクターを構築する方法として、市販のキット（例えば、アデノウイルス・エクスプレッション・ベクター・キット、宝酒造（株）社製）を用いる方法を例示できる。本発明の方法において検出対象となる遺伝子が哺乳動物の血中中性脂肪濃度と密接に相関していることは、例えば上記のようにして得られる組換えアデノウイルスベクターを有する組換えアデノウイルスを哺乳動物、例えばマウスに感染させて、該組換えアデノウイルスベクターが保持する遺伝子を発現させると、血中中性脂肪濃度の上昇が観察されること、および先天性低脂血症マウスにおいて配列表の配列番号1のヌクレオチド番号47-1411に示されるヌクレオチド配列を有する遺伝子の発現量が高脂血症マウスよりも少ないことから証拠付けられる。

【0107】また、遺伝子操作によって得られる、上記

a）乃至e）のいずれか一つに記載のヌクレオチド配列を含む外来遺伝子が、該遺伝子を高発現することができるように導入されている非ヒト動物を用いた高脂血症の治療または予防剤の試験方法も本発明に包含される。この方法で用いられる動物は、例えば、上記組換えアデノウイルスを感染させたK K / S a nマウスや、配列表の配列番号1のヌクレオチド番号47-1411に示されるヌクレオチド配列または配列表の配列番号3のヌクレオチド番号78-1457に示されるヌクレオチド配列を有するDNAをマウスに導入したトランスジェニックマウス等であるが、これらに限定されない。

【0108】トランスジェニック動物は、動物から受精卵を取得し、遺伝子導入の後、偽妊娠動物に移植し発生させることにより得ることができ、その手順については、既に確立されている方法に従うことができる〔発生工学実験マニュアル（野村達次監修、勝木元也 編、1987年刊）、マウス胚の操作マニュアル（"Manipulating the Mouse Embryo, A Laboratory Manual" B. Hogan, F. Costantini and E. Lacy著、山内一也、豊田裕、森庸厚、岩倉洋一郎 訳、1989年刊）、特公平5-48093号公報等参照〕。具体的には、例えばマウスの場合、まず雌マウス（血中中性脂肪濃度が通常より低いマウスであることが好ましく、例えばK K / S a nマウスが好ましいがそれに限定されない）に排卵誘起剤を投与後、同系統の雄と交配し、翌日雌マウスの卵管より前核受精卵を採取する。次いで、導入するDNA断片溶液を微小ガラス管を用いて受精卵の前核に注入する。なお、導入する遺伝子を動物細胞内で発現させるための、プロモーターやエンハンサー等の調節遺伝子としては、導入された動物の細胞内で機能するものであればいずれも使用することができる。DNAを注入した受精卵は、偽妊娠仮親雌マウス（S l c : I C R等）の卵管に移植し、約20日後に自然分娩又は帝王切開により出生させる。このようにして得られた動物が導入した遺伝子を保持していることを確認する方法としては、該動物の尾等からDNAを抽出し、該DNAを鋳型として導入遺伝子に特異的なセンスおよびアンチセンスプライマーを用いたPCRを行う方法、該DNAを数種の制限酵素で消化後ゲル電気泳動し、ゲル中のDNAをニトロセルロース膜やナイロン膜等にブロッティングしたものについて導入遺伝子の全部または一部を標識したものをプローブとしたサザンブロット解析を行なう方法等を挙げることができる。また、導入された遺伝子が実際に動物体内で発現しているか否かは、末梢血中の中性脂肪濃度を測定することにより確認することができる。導入された遺伝子が実際に動物体内で発現している場合は、遺伝子を導入しない動物よりも血中中性脂肪濃度が高くなる。

【0109】そのようにして得られた遺伝子導入動物に被検物質を投与して、血中中性脂肪濃度を低下させる物質を選択する（好ましくは、遺伝子導入しない動物にも

被検物質を投与して結果を比較し、遺伝子導入した動物で顕著に血中中性脂肪濃度を低下させる物質を選択する)。この方法では、導入された遺伝子の発現を抑制または阻害する物質のみならず、該遺伝子にコードされるポリペプチド自体の機能や、該ポリペプチドと相互作用して該ポリペプチドの機能発現に寄与する因子(例えば、レセプター)等、該ポリペプチドの作用による血中中性脂肪濃度の上昇に関わる生体反応のいずれかを阻害する物質を見出すことができる。そのような物質も高脂血症の治療または予防剤となり得る。

【0110】本発明はまた、本発明の方法において検出対象とするポリペプチド(以下、単に「検出対象ポリペプチド」という)に特異的に結合する、抗体以外のポリペプチド、すなわち検出対象ポリペプチドのレセプターに関する。該レセプターが細胞膜に存在する蛋白質である場合は、該レセプターは例えば以下に記載する方法に従ってクローニングすることができる。まず、配列表の配列番号1のヌクレオチド番号47から1411に示されるヌクレオチド配列または配列表の配列番号3のヌクレオチド番号78から1457に示されるヌクレオチド配列からなるDNAを哺乳動物細胞で発現可能な組換えベクターを構築し、COS-1に導入してその培養上清を回収し、検出対象ポリペプチドの組換えポリペプチドを精製する。得られた組換えポリペプチドはフルオレsein・イソチオシアネート(以下「FITC」という)で標識しておく。次に、種々の哺乳動物組織由来の培養細胞に標識組換えポリペプチドを添加して、標識組換えポリペプチドが細胞膜上に特異的に結合する細胞、すなわちレセプターを発現する細胞を同定する。同定された細胞由来のcDNAライブラリーを哺乳動物細胞で発現可能なベクター中に組み込み、レセプターを発現しない細胞(好ましくはCOS-1またはCHO細胞、より好ましくはCHO細胞)で発現させる。このcDNAライブラリーを発現させた細胞に上記のFITC標識した組換えポリペプチドを添加し、一定時間培養後、細胞を回収して、セルソーターでFITC標識された組換えポリペプチドが結合した細胞を選別する。得られた細胞から導入されたcDNAをPCR等によりクローニングする。必要に応じ、以上の操作を繰り返して、最終的にFITC標識組換えポリペプチドに特異的に結合するレセプターをコードするcDNAをクローニングする。またレセプター自体は、このようにしてクローン化された細胞から回収することができる。

【0111】このようにして、検出対象ポリペプチドのレセプターをコードするcDNAが得られれば、そのcDNAライブラリーの材料となった細胞を利用して、さらに検出対象ポリペプチドと該レセプターとの相互作用を阻害する物質や、該レセプターに結合することによって検出対象ポリペプチドと同様の機能を発揮する物質、あるいは検出対象ポリペプチドと該レセプターとの相互

作用によって開始されるシグナル伝達を阻害する物質のスクリーニングに利用することができる。具体的には、例えばマウスゲノムDNAを制限酵素消化等により適宜断片化して、それらの一端に緑色蛍光タンパク質(green-fluorescent protein: レポーターアッセイ用のベクターとしてpEGFP-1(クロンテック社製)が市販されている)をコードするDNAが連結されたベクターを、上記cDNAライブラリーの材料となった細胞に導入する。この細胞の培養中に、検出対象ポリペプチドの組換えポリペプチド(標識しないもの)を添加して、緑色蛍光タンパク質を産生する細胞をセルソーターで選別する。選別された細胞は該組換えポリペプチドの存在下で緑色蛍光タンパク質を産生する。この細胞を96穴培養プレートに1ウェルあたりの細胞数がほぼ同じになるように培養し、被検物質のみを添加するか、あるいは該組換えポリペプチドと被検物質を同時添加して一定時間培養した後、蛍光プレートリーダー等を用いて緑色蛍光タンパク質の産生量を測定する。被検物質単独で培養したときに緑色蛍光タンパク質の産生を引き起こす場合、該物質は検出対象ポリペプチドのアゴニストと考えられる。一方、該組換えポリペプチドと被検物質を同時添加したウェルにおける緑色蛍光タンパク質の産生量が、該組換えポリペプチド単独添加のウェルよりも少ない場合、該物質は検出対象ポリペプチドのアнтаゴニストまたは該ポリペプチドのシグナル伝達阻害剤であり、高脂血症の治療または予防剤として有用であると考えられる。

【0112】このようにして得られたアンタゴニストがタンパク質またはペプチドである場合、該タンパク質またはペプチドをコードするヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドは、高脂血症の遺伝子治療に用いることができる。そのようなポリヌクレオチドは、例えば同定されたアンタゴニストタンパク質またはポリペプチドのアミノ酸配列を解析し、該アミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列からなるオリゴヌクレオチドプローブを合成して種々のcDNAライブラリーやゲノムライブラリーのスクリーニングを行うことにより取得できる。また、アンタゴニスト活性を有するペプチドが、ランダムに合成された人工ペプチドライブラリー由来である場合は、該ペプチドのアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列からなるDNAを化学合成する。遺伝子治療においては、このようにして得られたアンタゴニストをコードするポリヌクレオチドを、例えばウイルスベクターに組み込んで、該組換えウイルスベクターを有するウイルス(無毒化されたもの)を患者に感染させる。患者体内ではアンタゴニストが産生され、配列表の配列番号4に示すアミノ酸配列からなるポリペプチドの機能を阻害するので、血中の中性脂肪濃度を低減することができる。

【0113】遺伝子治療剤を細胞内に導入する方法としては、ウイルスベクターを利用した遺伝子導入方法、あ

るいは非ウイルス性の遺伝子導入方法（日経サイエンス, 1994年4月号, 20-45頁、実験医学増刊, 12(15)(1994)、実験医学別冊「遺伝子治療の基礎技術」, 羊土社（1996））のいずれの方法も適用することができる。

【0114】ウイルスベクターによる遺伝子導入方法としては、例えばレトロウイルス、アデノウイルス、アデノ関連ウイルス、ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルス、ポックスウイルス、ポリオウイルス、シンピスウイルス等のDNAウイルスまたはRNAウイルスに、TR4あるいは変異TR4をコードするDNAを組み込んで導入する方法が挙げられる。このうち、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ関連ウイルス、ワクシニアウイルスを用いた方法が、特に好ましい。非ウイルス性の遺伝子導入方法としては、発現プラスミドを直接筋肉内に投与する方法（DNAワクチン法）、リボソーム法、リポフェクション法、マイクロインジェクション法、リン酸カルシウム法、エレクトロポレーション法等が挙げられ、特にDNAワクチン法、リボソーム法が好ましい。

【0115】また遺伝子治療剤を実際に医薬として作用させるには、DNAを直接体内に導入するインビボ（*in vivo*）法およびヒトからある種の細胞を取り出し体外でDNAを該細胞に導入し、その細胞を体内に戻すエキスピボ（*ex vivo*）法がある（日経サイエンス, 1994年4月号, 20-45頁、月刊薬事, 36(1), 23-48（1994）、実験医学増刊, 12（15）(1994)）。

【0116】例えば、該遺伝子治療剤がインビボ法により投与される場合は、疾患、症状等に応じ、静脈、動脈、皮下、皮内、筋肉内等、適当な投与経路により投与される。またインビボ法により投与する場合は、該遺伝子治療剤は一般的には注射剤等とされるが、必要に応じて慣用の担体を加えてもよい。また、リボソームまたは膜融合リボソーム（センダイウイルス-リボソーム等）の形態にした場合は、懸濁剤、凍結剤、遠心分離濃縮凍結剤等のリボソーム製剤とすることができる。

【0117】配列表の配列番号3のヌクレオチド番号78-1457に示されるヌクレオチド配列の部分配列に相補的なヌクレオチド配列は、いわゆるアンチセンス治療に用いることができる。アンチセンス分子は、配列表の配列番号3のヌクレオチド番号78-1457に示されるヌクレオチド配列の一部に相補的な、通常15乃至30merからなるDNA、もしくはそのホスホロチオエート、メチルホスホネートまたはモルフォリノ誘導体などの安定なDNA誘導体、2'-O-アルキルRNAなどの安定なRNA誘導体として用いられ得る。そのようなアンチセンス分子を、微量注入、リボソームカプセル化により、あるいはアンチセンス配列を有するベクターを利用して発現させるなど、本発明の技術分野において周知の方法で、細胞に導入することができる。このようなアンチセンス療法は、配列表の配列番号3のヌクレ

オチド番号78-1457に示されるヌクレオチド配列がコードするタンパク質の活性を減少させることが有用な病気、特に、高脂血症の治療に有用である。

【0118】上記アンチセンスオリゴヌクレオチドを含む医薬として有用な組成物は、医薬として許容できる担体の混合などの公知の方法によって製造され得る。このような担体と製造方法の例は、レミントンのPharmaceutical Sciencesに記載されている。そして、配列番号3のヌクレオチド番号78-1457に示されるヌクレオチド配列を含む遺伝子の発現やその遺伝子産物の活性に異常の認められる高脂血症の治療に十分な量を各人に投与される。その有効量は、各人の状態、体重、性別、及び年齢などの種々の因子や、皮下、局所、経口、及び筋肉内といった投与方法の違いによって変化し得る。例えば、静脈注射する場合には、0.02乃至0.2mg/kg/時間で2時間、また、皮下投与の場合には、1乃至200mg/m²/日のように変化し得る。

【0119】

【実施例】 以下、実施例をもって本発明をさらに詳しく説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。なお、下記実施例において、遺伝子操作に関する各操作は特に明示がない限り、「モレキュラークローニング（MolecularCloning）」[Sambrook, J., Fritsch, E. F. および Maniatis, T. 著、Cold Spring Harbor Laboratory Pressより1989年に発刊]に記載の方法により行うか、または、市販の試薬やキットを用いる場合には市販品の指示書に従って使用した。

【0120】参考例1. cDNAのクローニング

マウス肝臓を材料として、下記の方法に従って配列表の配列番号1に示されるヌクレオチド配列を有するcDNAを取得した。

【0121】a) マウス肝臓からのmRNAの抽出
9週齢のKKマウス（雄、浜松医科大学付属動物実験施設より入手）2匹より解剖して肝臓を摘出後、速やかに液体窒素中に入れて急速凍結させた。この重量を測定し、3.1gを乳鉢上で液体窒素存在下で粉碎した。5.5M グアニジンチオシアネート（以下GT）緩衝液（5.5M グアニジンチオシアネート、25mM クエン酸ナトリウム（pH7.0）、0.5% サルコシル、0.2M β-メルカプトエタノール）（30ml）を加え、乳鉢で破碎し、新たにGT緩衝液（10ml）を加え、乳鉢で破碎後、溶解液を回収した。また、GT緩衝液（20ml）で乳鉢を洗浄しこの溶液も回収した。36mlの回収液を3000rpm、10分で10分間遠心後、上清を新しいチューブに移し、各々18ゲージの注射針で20回吸引排出を繰り返した。次にセシウム・トリフルオロ酢酸（CsTFA）を用いた密度勾配遠心による全RNAの分離を行った。CsTFA原液（19ml）をリボヌクレアーゼ不含有蒸留水（18.924ml）で希釈し、この希釈液（6.18m

1) を6本の13PA(ベックマン製)チューブに入れ、先に回収したサンプル(1チューブあたり5.2ml)を重層した。このものをスイングローター(日立工機(株)社製P40ST)を用い超遠心機(日立SCP70H型)で30000rpm(約125000g)、20で20.5時間遠心した後、上清を除去して得られたペレットをmRNA精製キット(アマシャム・ファルマシア社製クイックプレップmRNA精製キット)添付の抽出緩衝液 3.3mlに懸濁した。mRNAの精製は該精製キットを添付プロトコールに従って用いることにより行った。このようにして得られた5μgのmRNAを鋳型とし、cDNAライブラリー作製キット(ストラタジーン社製ZAPエクспレス・cDNA・ギガバックIIIGールド・クロニングキット)をその添付プロトコールに従って用いることにより、λファージcDNAライブラリーを作製した。

【0122】b) cDNAライブラリーの1次スクリーニング

上記a)記載の方法で得られたλファージcDNAライブラリーを感染させた大腸菌を、直径9cmの培養シャーレに作成した寒天培地プレート(NZY培地: 0.5% 塩化ナトリウム、0.2% 硫酸マグネシウム7水和物、0.5% イーストエキストラクト、1% カゼイン加水分解物、1.5% 寒天)に、プレート1枚あたり 1.8×10^5 個のプラークが形成されるように分散させ、37で8時間培養した。このプラーク形成された寒天培地の14ヶ所について、250μl用の広径ピペットチップ(RAININ社製)の底部を用いて寒天培地をプラークごと抜き取り、それら寒天培地片をそれぞれ100μlのSM緩衝液(0.1M 塩化ナトリウム、8mM 硫酸マグネシウム、50mM トリス-塩酸(pH7.5)、0.01% ゼラチン)の入ったプラスチック遠心管に入れ、ボルテックスミキサーを用いて激しく混濁させてから4で1~2時間放置した後、12000×gで5分間遠心分離して上清を回収し、ファージ懸濁液とした。

【0123】一方、PCRに用いるプライマーとして、下記のヌクレオチド配列:

プライマー1: 5'-gactgatcaa atatgttgag ctt -3'
(配列表の配列番号5);

およびプライマー2: 5'-tgcatccaga gtggatccag a -3'
(配列表の配列番号6)

を有するオリゴヌクレオチドを、自動DNA合成機(モデル394: (株)パーキンエルマー・ジャパン・アプライドバイオシステムズ事業部製)を用い、ホスホアミダイト法(Matteucci, M. D., and Caruthers, M. H. (1981) J. Am. Chem. Soc. 103, 3185-3191)に従って合成した。

【0124】上記のようにして得られたファージ懸濁液5μlを、2.5μlの10×PCR用緩衝液(宝酒造

(株)社製のTaqポリメラーゼに添付)、4μlのdNTP混液(各2.5mM、宝酒造(株)社製のTaqポリメラーゼに添付)、各1μlの各7.5μMに調整した上記プライマー1および2、0.25μlのTaqポリメラーゼ(宝酒造(株)社製)、11.25μlの滅菌水と混和し、まず94で5分加熱した後、引き続き94で30秒、55で30秒、72で30秒の温度サイクルを30回繰り返し、最後に72で7分間保温してから、4に保存した。反応物は4%のアガロースゲル(NuSieve 3:1アガロース(FMCバイオプロダクツ社製)で調製した)で電気泳動して、特異的断片の増幅を解析した。このようにして14のファージ懸濁液をスクリーニングした結果、目的のcDNAの断片が特異的に増幅される2つの陽性サンプルを得た。

【0125】c) 2次スクリーニング

マウスゲノムDNA(クローンテック社製)100ngを鋳型にして上記b)に記載した条件でPCRを行い、アガロース電気泳動を行って増幅されたDNA断片を回収した。このDNA断片を鋳型として、マルチプライムDNAラベリングシステム(アマシャム・ファルマシア社)を用いて³²Pで標識されたDNA断片を生成する反応を行った後、反応液をニックカラム(アマシャム・ファルマシア社製)に注入した。このカラムに400μlのTE(10mM トリス-塩酸(pH7.5)、1mM EDTA)を流して一回洗浄し、さらに400μlのTEを流して溶出液を回収した。この溶出画分全量を以下の2次スクリーニングに標識プローブとして用いた。

【0126】一方、上記b)で陽性と判定されたファージ懸濁液をSM緩衝液で100倍希釈し、そのうち2μl分のファージを感染させた大腸菌を、直径9cmの培養シャーレに作成した寒天培地プレートに分散させ、37で8時間培養した。このプラーク形成された寒天培地上に、シャーレ内径に合わせた円形のナイロンメンブレン(アマシャム・ファルマシア社製、ハイボンドN+)をのせて、4にて5分間放置することによりプラークを移しとった。18Gの注射針を用いてメンブレンの3ヶ所を寒天培地まで貫通することにより位置合わせ用の目印をつけた後、メンブレンを剥がしてアルカリ溶液(1.5M 塩化ナトリウム、0.5M水酸化ナトリウム)に2分間、次いで中和溶液(1.5M 塩化ナトリウム、0.5M トリス-塩酸(pH8.0))に5分間、さらに2×SSC、0.2M トリス-塩酸(pH7.5)を含む溶液に30秒間浸した後、室温で完全に風乾させた。

【0127】このメンブレンを20mlのハイブリダイゼーション溶液(ExpressHyb Hybridization Solution、クローンテック社製)中で68、1時間インキュベーション(プレハイブリダイゼーション)した後、標

識プローブを含む8mlのハイブリダイゼーション溶液に交換して68、6時間インキュベーションした。次いで、このメンブレンを2×SSC、0.05% SDSを含む溶液で、室温下、15分間緩やかに振盪しながら洗浄する操作を3回繰り返した後、さらに0.1×SSC、0.1% SDSを含む溶液で50、30分間洗浄する操作を3回繰り返した。

【0128】洗浄後のメンブレンについてオートラジオグラフィーを行い、陽性と認められた位置の元のブランクを寒天培地から回収して、そのファージ懸濁液について上記b)に記載した条件でPCRを実施した結果、陽性ブランク試料10個中6個においてDNA断片の特異的増幅が認められた。

【0129】このうちもっとも強く増幅が認められた試料のファージ懸濁液について、ZAPエクスプレス・cDNA・ギガパックII I Iゴールド・クローニングキット(ストラタジーン社製)に添付されたヘルパーファージおよび宿主菌を用いて、該キットに添付のプロトコルに従ってインビボ切り出し(In Vivo Excision)を行い、寒天培地上にファージミドを含む大腸菌コロニーを形成させた。これらのコロニーを単離してそれぞれファージミドを抽出し、上記b)に記載の方法でPCRを実施した結果、DNA断片の特異的増幅が見られたコロニーを選択、培養し、1.6kbpのcDNAインサートを有するファージミド#55-1を保持する形質転換大腸菌E. coli pBK/m55-1 SANK 72199を単離した。

【0130】得られたファージミド#55-1に挿入されているcDNAの全ヌクレオチド配列を(株)パーキンエルマー・ジャパン・アプライドバイオシステムズ事業部製ABIプリズム377DNAシーケンサー、あるいは3700DNAシーケンサーを用いて解析した結果、配列表の配列番号1に示される配列であることが判明した(ただし配列表の配列番号1のヌクレオチド番号1-8はベクター由来のアダプター配列である)。この配列はGenBankデータベースにマウス・アンジオポエチン関連タンパク質3として登録されている配列(登録番号:AF162224)と同一であった。なお、このファージミド#55-1を保持する形質転換大腸菌E. coli pBK/m55-1 SANK 72199は、1999(平成11)年11月19日付で工業技術院生命工学工業技術研究所に国際寄託され、受託番号FERM BP-6940が付された。

【0131】実施例1. ノーザンブロット解析

a) マウス臓器からの全RNAの抽出

参考例1で得られたcDNAの発現している組織を調べる目的でノーザンブロット解析を実施した。まず、KKマウス(高脂血症マウス)およびKK/Sanマウス(低脂血症変異マウス。白木ら、第7回糖尿病動物研究会(1993年))の精巣(testis)、脾臓(splee

n)、腎臓(kidney)、小腸(small intestine)、肝臓(liver)および脳(brain)から全RNAの抽出を行った。18週齢のKKマウスおよびKK/Sanマウスを解剖してそれぞれ各臓器を摘出後、速やかに液体窒素内に入れ急凍した後-80に保存した。臓器0.5gに対し約15mlのTRIzol試薬(ギブコ・ビーアールエル社製)を加え、超高速ホモジナイザーポリトロノ(キネマティカ社製)を用いて氷上でホモジナイズを行った(目盛6で2分間)。これを室温で5分間静置した後、3mlのクロロホルムを加え、手で15秒間激しく転倒混和した。再び室温で3分間静置してから、12000×g、4で15分間遠心分離した。遠心後、上層を回収し、0.8容量のリボヌクレアーゼ不含イソプロピルアルコールを加えて混和した。これを室温で10分間静置後、12000×g、4で10分間遠心分離した後、上清を除去してリボヌクレアーゼ不含70%エタノールを加えた。これを12000×g、4で10分間遠心分離し、上清を除去して、沈殿を乾燥させてから、-80に保存した。

【0132】b) 全RNAの電気泳動およびプロッティング

回収した各臓器の全RNAをリボヌクレアーゼ不含再蒸留水で4μg/μlに調整した後、このRNA液5μlとRNA試料緩衝液(1.15×MOPS緩衝液(1×MOPS緩衝液は20mM MOPS、5mM 酢酸ナトリウム、1mM エチレンジアミン四酢酸(以下「EDTA」という)を含む)、2.4Mホルムアルデヒド、57%ホルムアミド、7%グリセロール、18μg/ml ブロモフェノールブルー、18μg/ml キシレンシアノール、0.18mM EDTA)16μlを混合し、65で10分間保温した後、氷上で5分間放置した。この試料液全量を、1.17%ホルマリンを含む電気泳動用アガロースゲル(1×MOPS緩衝液、1.17%アガロース(高強度、分析用、バイオラッド社製)、0.66Mホルムアルデヒド)の1つのウェルへ注入し電気泳動した。電気泳動は、500ng/ml 臭化エチジウムの入った1×MOPS緩衝液の入ったサブマリン電気泳動槽中、50Vで約1時間通電した後、さらに100Vで約1.5時間通電することにより行った。電気泳動終了後、アガロースゲル中のRNAをキャピラリートランスファー法(Manatis, T. et al.(1982) in "Molecular Cloning A Laboratory Manual" Cold Spring Harbor Laboratory, NY)に従ってナイロンメンブレン(ハイボンドN+、アマシャム・ファルマシア社製)に一晩かけて転写した(転写用溶液は20×SSCを使用した)。このメンブレンを2×SSCで5分間洗浄し、風乾させ、クロスリンク用紫外線照射装置(スペクトロリンクーXL-1000、トミー精工(株)社製)で紫外線を照射(1200J/cm²)してRNAを固定した。

【0133】c) プローブの調製

参考例1のb)で合成したプライマーを用い、サーマルサイクラー(ジーンアンプPCRシステム9600、(株)パーキンエルマー・ジャパン・アプライドバイオシステムズ事業部製)を使用して以下の条件でPCRを行った。まずプライマー(終濃度各0.5 μM)とツイン20(シグマ社製、終濃度0.1%)に滅菌水を加えて7.5 μlとした後、2×PCRソリューション・プレミックスTaq(宝酒造(株)社製:0.05単位/μl、Taqポリメラーゼ、0.4 mM dNTPs、20 mM トリス-塩酸(pH 8.3)、100 mM 塩化カリウム、3 mM 塩化マグネシウムを含む)を7.5 μl添加した。さらにマウスゲノムDNA(クローンテック社製)を1 μl(100 ng相当)に加え、反応液を調製した。この反応液を、まず94 で3分間加熱した後、94 で30秒、55 で1分、72 で45秒の温度サイクルを35回繰り返してから、4 で保温した。

【0134】このPCR後の反応液1 μlをとり、TAKAクローニングキット(デュアルプロモーターバージョンA、インビトロジェン社製)を添付のプロトコールに従って用いて、増幅されたDNA断片をプラスミドベクターにクローニングした。この組換えプラスミドベクターでコンピテント大腸菌を形質転換し、50 μg/mlのアンピシリンを含むLB寒天培地上で培養した。その結果アンピシリン耐性を示して生育してきた大腸菌コロニーを選択して、4 mlの50 μg/mlのアンピシリンを含む液体LB培地で37 で一晩培養した。このうち3.5 mlの培養液からプラスミド自動抽出装置(PI-50、クラボウ社製)を使用してプラスミドDNAを回収した。得られたプラスミドDNAについてヌクレオチド配列解析を行い、目的のPCR産物が挿入されていたプラスミドを以下の操作に用いた。

【0135】選択されたプラスミドDNA 8 μgを、制限酵素EcoRIで消化した後、フェノール/クロロホルム抽出、エタノール沈殿を行い、得られた沈殿を滅菌水10 μlに溶解した。この溶液に色素液(0.25% プロモフェノールブルー、0.25% キシレンシアノール、15% フィコール(タイプ400))を2 μl加えて、全量をポリアクリルアミドゲル電気泳動(ゲル濃度8%、100 V、室温、3時間)した。電気泳動後のゲルを臭化エチジウムで染色した後、紫外線照射下で目的のDNAに相当するバンド(約200 bp、配列表の配列番号11)部分のゲル片を剃刀で切り取り、微量遠心チューブに移して粉碎した。このものに300 μlの溶出緩衝液(0.5 M 酢酸アンモニウム、10 mM EDTA(pH 8.0)、0.1% SDS)を加え、37 で一晩保温した後、フェノール/クロロホルム抽出を2回、エタノール沈殿を1回行って、沈殿を滅菌水20 μlに溶解した。

【0136】得られたDNA溶液5 μlについて、参考例1のc)記載の方法で、³²Pで標識されたプローブ(400 μl)を調製した。

【0137】d) ハイブリダイゼーション

上記b)で作成したメンブレンを20 mlのハイブリダイゼーション溶液(ExpressHyb Hybridization Solution、クローンテック社製)の中に入れて68 で1時間インキュベーション(プレハイブリダイゼーション)した後、³²P標識プローブを含む20 mlのハイブリダイゼーション溶液中で、68 で一晩インキュベーションした。その後、メンブレンを2×SSC、0.05% SDSを含む溶液中、室温で20分間、3回洗浄し、さらに0.1×SSC、0.1% SDSを含む溶液中、50 で20分間、3回洗浄してから、オートラジオグラフィを行った。

【0138】その結果、検出した遺伝子の発現は肝臓のみでみられ、またその発現量はKKマウス(高脂血症マウス)よりもKK/Sanマウス(低脂血症マウス)で著しく低下していることが明らかとなった(図1)。

【0139】上記実験系において、例えば被検物質存在下または非存在下で培養したKKマウス初代培養肝細胞からRNA試料を調製し、以下同様の操作を行うことにより、被検物質の高脂血症の治療または予防剤としての効果を調べることができる。この実験において検出される遺伝子の発現量を低下させるような被検物質は高脂血症の治療または予防剤となり得る。多検体処理を行う場合には、電気泳動を省略してドットプロットやスロットプロットを行うこともできる。

【0140】参考例2. ヒトcDNAのクローニング

1) プローブの調製

配列表の配列番号1に示されるマウスcDNAに対応するヒトcDNAを取得するため、下記のヌクレオチド配列:

5'- tcctctagtt atttcctcca g -3' (配列表の配列番号7); および

5'- tgggttgcca gcgatagatc -3' (配列表の配列番号8)

を有するオリゴヌクレオチドプライマーを合成した。

【0141】次に、ヒトゲノムDNA(ベーリンガー・マンハイム社製、200 mg/ml)1 μl、Taqポリメラーゼ(rTaq、宝酒造(株)社製、5単位/μl)1 μl、10×PCR用緩衝液(宝酒造(株)社製)10 μl、dNTP混合液(各2.5 mM)16 μl、20 μMのプライマー各2 μl、および滅菌水68 μlを混合した。この反応液を、94 で5分間加熱した後、引き続き94 で30秒、55 で30秒、72 で30秒の温度サイクルを30回繰り返し、最後に72 で10分間保温してから、4 に保存した。この反応液を2% アガロースゲルにて電気泳動した後、増幅されたDNAバンド部分のゲルを切り出して精製した。

このようにして得られたDNAをDNA標識キット (BcaBestラベリングキット、宝酒造(株)社製)を用いて³²Pで標識したものを下記2)においてプローブとして用いた。

【0142】2)cDNAライブラリーの1次スクリーニング

市販のヒト肝臓由来cDNAライブラリー (Human Liver 5'-STRETCH cDNA Library、クローンテック社製)のうち、 1×10^6 プラークのDNAをナイロンメンブレンに固定した。すなわち、cDNAライブラリーを感染させた大腸菌を直径9cmの培養シャーレに作成した寒天培地プレート20枚に、1枚あたり 5×10^4 個のプラークが形成されるように分散させ、37℃で8時間培養した。このプラーク形成された寒天培地上に、シャーレ内径に合わせた円形のナイロンメンブレン (アマシャム・ファルマシア社製、ハイボンドN+)をのせて、4にて5分間放置することによりプラークを移しとった。18Gの注射針を用いてメンブレンの3ヶ所を寒天培地まで貫通することにより位置合わせ用の目印をつけた後、メンブレンを剥がしてアルカリ溶液 (1.5M塩化ナトリウム、0.5M水酸化ナトリウム)に2分間、次いで中和溶液 (1.5M塩化ナトリウム、0.5Mトリス-塩酸 (pH8.0))に5分間、さらに $2 \times \text{SSC}$ 、0.2Mトリス-塩酸 (pH7.5)を含む溶液に30秒間浸した後、室温で完全に風乾させた。次いで、クロスリンク用紫外線照射装置 (スペクトロリンカーXL-1000、トミー精工(株)社製)で紫外線を照射 (1200 J/cm^2)してDNAを固定した。

【0143】このようにして調製されたメンブレンを、上記1)で得られた標識プローブを含むハイブリダイゼーション溶液 (ExpressHyb solution、クローンテック社製)中で65℃で一晩インキュベーションした。その後、メンブレンを $2 \times \text{SSC}$ 、0.05% SDSを含む溶液で15分ずつ3回、室温で洗浄してから、さらに $0.1 \times \text{SSC}$ 、0.1% SDSを含む溶液で30分ずつ3回、50℃で洗浄した後、オートラジオグラフィを行った。

【0144】その結果判明した陽性のシグナルの位置にあったプラークを、上記寒天培地プレートから培地ごと採取し、それぞれ $100 \mu\text{l}$ のSM緩衝液 (0.1M塩化ナトリウム、8mM硫酸マグネシウム、50mMトリス-塩酸 (pH7.5)、0.01%ゼラチン)中に入れてよく懸濁してから4℃で2時間放置した後、 $12000 \times g$ で5分間遠心分離して上清を回収した。

【0145】このようにして得られた1次陽性ファージ液を再び大腸菌に感染させたものを、直径9cmの培養用シャーレに作製した寒天培地上に、シャーレ1枚あたり500個のプラークが形成されるように培養し、上記

の手法を繰り返すことにより2次スクリーニングを行った。得られた2次陽性クローンファージを大腸菌株BM25.8 (クローンテック社製)に感染させたものを寒天培地上で37℃で培養して、ファージミドを含む大腸菌コロニーを形成させた。コロニーを単離し、液体培地で少量培養してファージミドを抽出し、制限酵素消化による挿入断片の解析を行った結果、1.6kbpの挿入断片を有する、クローン#h5-1を有する大腸菌E. coli pTrip/h55-1 SANK 72299を単離した。このクローンの挿入断片のヌクレオチド配列を解析した結果、GenBankにヒト・アンジオポエチン関連タンパク質3として登録されているのcDNA配列 (登録番号: AF152562)と一致した (配列表の配列番号3。ただし、配列表の配列番号3のヌクレオチド番号1-14はベクター由来のアダプター配列である)。なお、このファージミド#h5-1を保持する形質転換大腸菌E. coli pTrip/h55-1 SANK 72299は、1999年11月19日付で工業技術院生命工学工業技術研究所に国際寄託され、受託番号FERM BP-6941が付された。

【0146】実施例2. ポリクローナル抗体の作製
配列表の配列番号1および配列番号3に示されるヌクレオチド配列にコードされるアミノ酸配列、すなわち配列表の配列番号2および配列表の配列番号4に示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドをいずれも認識する抗体を作製する目的で、抗原として、それらマウスおよびヒトのポリペプチドの間で保存されている領域から選ばれた2種類のアミノ酸配列:

Glu-Pro-Lys-Ser-Arg-Phe-Ala-Met-Leu-Asp-Asp-Val-Lys-Cys (55-1-N1、配列表の配列番号9); および

Cys-Gly-Glu-Asn-Asn-Leu-Asn-Gly-Lys-Tyr-Asn-Lys-Pro-Arg (55-1-C1、配列表の配列番号10)

を有するペプチドを化学合成法で合成した (使用機器: パーキンエルマージャパン社製モデル433)。ただし、55-1-N1のアミノ酸配列は、後に担体としてキーホールリンペットヘモシアニン (以下「KLH」という)を結合させるため、本来のアミノ酸配列のC末端にシステイン残基が付加されたものである。一方、55-1-C1でKLHが結合されるN末端のシステインは本来のアミノ酸配列由来のものである。

【0147】次に、合成ペプチド55-1-N1 1.1mgおよびKLH 21.5mg、または55-1-C1 10.2mgとKLH 21.2mgを、それぞれN-(6-マレイミドカプロイロキシ)スクシニミド (EMCS、同仁化学研究所(株)社製)試薬を用いて縮合させた (縮合反応溶媒として8M尿素および0.9%塩化ナトリウムを含む0.02Mリン酸緩衝液 (pH7.5)を用い、室温で15時間保温した)。この反応液を8M尿素溶液の中に入れた後、流水に

対して透析し、さらに純水に対して透析を行ってから凍結乾燥し、KLHが結合したペプチド抗原を得た。これらのペプチド抗原約10mgに1mlの生理食塩水を加え、超音波発振機(ソニケーター)、ボルテックスミキサー、ガラス棒等を用いて細かい懸濁液にした。その後、生理的食塩水で全量を各7.5mlとし、さらに1mlずつバイアルに小分けして凍結保存した。

【0148】免疫の際には、上記バイアル1本分の抗原溶液を融解し、同量のアジュバンドと混合してそれぞれウサギ2羽の背中に皮下、または皮内に注射した。アジュバンドはフロイント完全アジュバンドを用いて行い、2回目以降の免疫ではフロイントの不完全アジュバンドを用いた。免疫は2週間おきに4回行い、2回めの免疫以降、試験採血を行い血清中の抗体価を固層法による酵素免疫測定法(ELISA)で調べた。96穴のELISA用プレート(住友ベークライト(株)社製、96穴Hタイプ)におおのの抗原ペプチドをコーティングし、西洋ワサビペルオキシダーゼ標識抗ウサギIgG抗体を二次抗体として使用した。4回目の免疫から13日後に全採血を行った。

【0149】採血後、抗体をアフィニティーカラムを用いて精製した。すなわち、N-(6-マレイミドカプロイロキシ)スクシニミド(EMCS、同仁化学研究所(株)社製)とアミノアルキルアガロース(バイオラッド社製、アフィゲル102)とを反応させて活性化した担体EMC-アガロース(約5ml)にペプチド(55-1-N1:7.82mg、55-1-C1:8.07mg)を結合させた。未反応のEMC基は0.1M塩酸メルカプトエチルアミン(5mMEDTAを含む)で処理することにより不活化させた。抗血清85mlをPBS(0.02Mリン酸緩衝液(pH7.0)、0.9%塩化ナトリウム含有)で2倍希釈し、硫酸沈殿(終濃度40%)法により沈殿物を得、この沈殿物をPBSに溶解し、脱塩後PBSで透析し、この透析内液を粗IgG画分とした。アフィニティーカラムへは3回に分けてクロマト操作をした。すなわち、アフィニティーカラムへ粗IgG画分1/3量をチャージし、素通り画分をカラムに再注入する操作を3回繰り返した。素通り部分および洗液を合わせた40mlを非吸着フラクションとして集めた。非特異的にカラムに結合したものを除去するために、1M塩化ナトリウム含有PBSで十分洗浄した後、4M塩化マグネシウム溶液、3.5Mチオシアン酸カリウム溶液および0.1Mグリシン-塩酸緩衝液(pH2.3)を順次カラムに流して、カラム担体上に結合しているペプチドに特異的に結合していた抗体をアフィニティー精製抗体として溶出した。4M塩化マグネシウム溶液および3.5Mチオシアン酸カリウム溶液の溶出液中に目的の抗体が含まれていたもので、それぞれの溶出液をPBSに対して透析したものを、以下の操作で抗体として使用した。

【0150】実施例3. COS-1細胞での発現およびウエスタンブロット解析

参考例2で得られた#h5-1ファージミドDNAを制限酵素EcoRIとXbaIで消化し、8%ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行って、実施例1のc)に記載した方法で、cDNAを含む約1.6kbの断片を単離、精製した。一方、高発現ベクターpME18S(Hara, T. et al.(1992)EMBO.J. 11, 1875-、横田崇、新井賢一編集、バイオマニユアルシリーズ3、遺伝子クローニング実験法、羊土社、p18-20)を同様にEcoRIとXbaIで消化し、末端を脱リン酸化した後、上記cDNA断片とDNAライゲーションキット(バージョン2、宝酒造(株)社製)を用いて連結した。このDNAで大腸菌を形質転換し、得られた形質転換株についてそれが保有するプラスミドDNAの制限酵素による解析を行い、1.6kbのDNA断片を有する株を選択してpMEh55-1と命名した。

【0151】次に、pMEh55-1を保有する形質転換大腸菌を50μg/mlのアンピシリンを含む100mlの液体LB培地中で、37℃で一晩培養した。この培養液から、プラスミド精製キット(ウィザード・ピュアフェクション・プラスミドDNA精製システム、プロメガ社製)を用いてpMEh55-1DNAを回収し、塩化セシウム法で精製した。

【0152】このようにして得られたプラスミドpMEh55-1でCOS-1細胞をトランスフェクションした。COS-1細胞へのトランスフェクションは(株)島津製作所製の遺伝子導入装置GTE-1を用いて電機穿孔法により行った。すなわち、まずCOS-1細胞をセミコンフルエントになるまで増殖させたフラスコより、トリプシン-EDTA処理により細胞を回収し、PBS(-)緩衝液(宝酒造(株)社製)で洗浄した。次にその細胞をPBS(-)緩衝液で 6×10^7 細胞/mlに懸濁した。上記方法にて回収したプラスミドDNA(pMEh55-1)をPBS(-)緩衝液で200μg/mlに調製した。細胞懸濁液とDNA溶液を20μlずつ混合し、これを電極間隔2mmのチャンバーに入れ、600V-30μsecのパルスを1秒間隔で2回与えた。そのチャンバーを4℃で5分間冷却した後、中の細胞-DNA混合液を10%ウシ胎児血清を含むDMEM10mlに加え、シャーレに移して37℃、5%CO₂下で一晩培養した。その後、培養上清を除き、無血清培地(DMEM)で細胞を洗浄し、DMEM10mlを加えて3日間培養した。

【0153】このようにして得られた細胞培養物より培養上清を回収した。cDNAを含まないネガティブコントロールプラスミドpME18SまたはpMEh55-1でトランスフェクトして得たCOS-1細胞の無血清培養上清0.3mlをそれぞれトリクロロ酢酸(以下「TCA」という)処理してタンパク質を沈殿させ、遠

心分離により沈殿を得た。この沈殿を氷冷したアセトンで洗浄し、風乾後、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動(SDS-PAGE)用の2-メルカプトエタノールを含むサンプル緩衝液(バイオラッド社製)に溶解し、4-20%ポリアクリルアミド密度勾配ゲル(マルチゲル4/20、第一化学薬品(株)社製)を用いて、還元条件下でSDS-PAGEを行った。

【0154】電気泳動後、ポリアクリルアミドゲルからバンドを転写緩衝液(192mMグリシン、20%メタノール、25mMトリス)中でゲルメンブレン転写装置(マリソル社製、NP7513)を用いて4、90分、200mAの条件でニトロセルロースメンブレン(バイオラッド社製)に転写した。

【0155】転写後のニトロセルロースメンブレンについて、実施例2で得られた抗体(以下「55-1-N1抗体」または「55-1-C1抗体」という)を用いたウエスタンブロット解析を行った。すなわち、まずニトロセルロースメンブレンを0.05%のツイーン20を含むPBS(以下「0.05% Tween20-PBS」という)で洗浄した(室温で15分間を1回、次いで5分間を2回)後、プラスチックバッグ(商品名ハイブリバック、コスモバイオ(株)社製)に入れ、5%スキムミルク(雪印乳業(株)社製)を含む0.05%

Tween20-PBSを20ml加え、室温で1時間振とうした。1時間後、メンブレンを取り出し、0.05% Tween20-PBS中で、15分間×1回、次いで5分間×2回洗浄した。洗浄後、メンブレンを新しいプラスチックバッグに移し、55-1-N1抗体または55-1-C1抗体(100倍希釈)、1%ウシ血清アルブミン(以下「BSA」という。シグマ社製)を含む0.05% Tween20-PBSを20ml添加して室温で1時間振とうした。1時間後、メンブレンを取り出し0.05% Tween20-PBS溶液で15分間×1回、5分間×2回洗浄した。その後、メンブレンを新しいプラスチックバッグに移し、西洋ワサビペルオキシダーゼ標識抗ウサギIgG抗体(アマシャム・ファルマシア社製)を1% BSAを含む0.05% Tween20-PBSで2000倍に希釈した溶液20mlを入れ、を室温で1時間振とうした。1時間後、メンブレンを取り出し、0.05% Tween20-PBSで15分間×1回、次いで5分間×4回洗浄した。洗浄後、メンブレンをラップフィルム上に置き、ECLウエスタンブロットティング検出溶液(アマシャム・ファルマシア社製)を用いて、55-1-N1抗体または55-1-C1抗体が結合するバンドの検出を行った(メンブレンをラップフィルム上に置き、ECLウエスタンブロットティング検出溶液に1分間浸した後、1時間室温で放置してバックグラウンドを減衰させてから、X線フィルムを感光させた(3秒間))。その結果、両方の抗体により、pMEh55-

1プラスミドDNAを導入して得られたCOS-1培養上清中に特異的なバンドが検出された(図2)。

【0156】同様の実験は、参考例1で得られたマウスcDNAを発現させたCOS-1細胞培養上清についても実施できる。すなわち、参考例1で得られたファージミド#55-1 DNAを制限酵素EcoRIとXbaIで消化して得られる、約1.6kbの挿入DNA断片をpME18Sに組み込んで得られたクローン(pME55-1)を構築し、上記と同様の方法でCOS-1細胞に導入し、培養上清を回収する。この培養上清から調製した試料について、55-1-N1抗体および55-1-C1抗体を用いたウエスタンブロット解析を行うと、いずれの抗体で検出した場合もpME55-1プラスミドDNAを導入して得られたCOS-1培養上清中に特異的なバンドが検出される。

【0157】上記実験系において、例えば被検物質存在下または非存在下で培養したKKマウス初代培養肝細胞の培養上清から試料を調製し、以下同様の操作を行うことにより、被検物質の高脂血症の治療または予防剤としての効果を調べることができる。この実験において検出される抗原量を低下させるような被検物質は、高脂血症の治療または予防剤となり得る。多検体処理を行う場合には、電気泳動を省略してドットブロットやスロットブロットを行うこともできる。

【0158】実施例4. 組換えアデノウイルスの作製および培養細胞における発現

参考例1で得られたマウス由来のcDNAを強制発現させるため組換えアデノウイルスは、市販のキット(アデノウイルス・エクスペクション・ベクター・キット、宝酒造(株)社製)を用いて作製した。すなわち、参考例1で得られたファージミドクローン#55-1を、制限酵素EcoRIおよびNotIで消化し、得られた約1.7kbのDNA断片の末端をを平滑化したものを挿入DNA断片として以下の操作に用いた。

【0159】また、サイトメガロウイルスエンハンサーとニワトリβ-アクチンプロモーターにより発現されるように設計されているコスミドベクターpAxCAwt(アデノウイルス・エクスペクション・ベクター・キットに添付)の制限酵素SwaI認識部位にインサートDNA断片を挿入したコスミドpAxCA/mAP5を作製した。pAxCA/mAP5 DNAおよび末端タンパク質結合ウイルスDNA(DNA-TPC、アデノウイルス・エクスペクション・ベクター・キットに添付)をリン酸カルシウムトランスフェクションシステム(ライフテック社製)を用いて293細胞(ATCC CRL1573)にコ・トランスフェクションして、組換えアデノウイルスAd/mAP-5を単離し、さらに293細胞中で増幅させた。また、コントロールコスミドpAxCAiLacZから切り出したLacZ遺伝子が組み込まれた組換えアデノウイルスベクターを有する

アデノウイルスAd/LacZを同様に作製し293細胞で増幅させた。増幅させたウイルスの293細胞からの回収は、まずウイルス感染293細胞に30秒×4回の超音波処理（ブランソン社製B-1200を使用）を行い、次いで塩化セシウム密度勾配遠心による精製を2回繰り返すことによって行った。得られたウイルス液を、10%グリセロールを添加したPBSに対して4で透析した後、使用するまで-70以下で凍結保存した。

【0160】このようにして得られた組換えアデノウイルスを、HeLa細胞(ATCCCL2)に約5m.o.i.(multiplicity of infection:多重感染度)で感染させ、無血清培地(ダルベッコ修正イーグル培地(DMEM))で3~4日培養した後の培養上清を回収した。この上清1mlを1.5ml容エプペンドルフチューブに入れ、100μlのトリクロロ酢酸を添加して室温で3分放置した後、卓上遠心機にて1500rpmで5分間遠心した。上清を除去し、氷冷したアセトンを0.5ml加えて良く攪拌し、再度卓上遠心機にて1500rpmで2分間遠心した。上清を除去し、再び氷冷したアセトンを0.5ml加えて良く攪拌し、卓上遠心機にて1500rpmで2分間遠心して、上清を除いた後、沈殿物を真空乾燥させた。この沈殿物を10μlの蒸留水に溶解させ、2-メルカプトエタノールを含むSDS-PAGE試料緩衝液(バイオラッド社製)と混合した後、99で5分間加熱して、電気泳動用試料を調製した。試料を中でゲル濃度4-20%のポリアクリルアミド密度勾配ゲルにて電気泳動した(電気泳動用緩衝液:25mM トリス、192mM グリシン、0.1% SDS)後、転写緩衝液中で4、1時間、200mAの条件でニトロセルロースメンブレンに転写した。転写したメンブレンは0.5% スキムミルクを添加したPBS液で4で一晩ブロッキングし、洗浄液(0.05% Tween20-PBS)で3回洗浄した。次いで、メンブレンを、55-1-N1抗体の精製前の抗血清と55-1-C1抗体の精製前の抗血清を混合したものを5% ウシ胎児血清を含む0.05% Tween20-PBSで10000倍希釈した反応液の中に入れて室温で1時間インキュベーションした後、洗浄液で3回洗浄した。さらに、メンブレンを西洋ワサビペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ウサギIgG(H+L)(バイオラッド社製)を5% ウシ胎児血清を含む0.05% Tween20-PBSで10000倍希釈した反応液中で室温で1時間インキュベーションした後、洗浄液で5回洗浄した。このメンブレンをラップフィルム上に置き、ECLウエスタンブロットティング検出溶液に1分間浸した後、1時間室温で放置してバックグラウンドを減衰させてから、X線フィルムを感光させた(3秒間)。その結果、組換えアデノウイルスAd/mAP-5を感染させたHeLa細胞培養上清由来のサンプルの

レーン中に特異的なバンドが検出された(図3)。

【0161】一方、ファージミドクローン#h5-1が保持するcDNAがアデノウイルスベクターに組み込まれたものを有する組換えアデノウイルス(Ad/hAP5)を調製して同様の実験を行い、HeLa細胞に発現させた培養上清のウエスタンブロット解析を行った結果、同様に特異的なバンドが検出された(図3)。

【0162】実施例5. 組換えアデノウイルスを用いたインビボでの発現

上記のようにして精製された組換えアデノウイルスAd/mAP-5またはAd/LacZを、10%グリセロールを含むPBSで 2×10^{10} pfu (plaqueforming unit)/mlに希釈し、それぞれ3匹(Ad/mAP-5)または2匹(Ad/LacZ)の13-14週齢の雄KK/Sanマウスに100μl(2×10^9 pfu)ずつ尾静脈注射により接種した。接種1日後に各マウスの眼底よりヘマトクリット管で採血して、卓上遠心機で5200rpmで15分遠心して血漿を分離し、中性脂肪測定用キット(トリグリセリドE-テストワコー、和光製薬(株)社製)を用いて中性脂肪濃度を測定した。Ad/LacZ接種マウス群では血中の中性脂肪濃度に有意な差が認められなかったのに対し、Ad/mAP-5接種マウス群と他の2群の間には血中の中性脂肪濃度に有意な差が認められた(図4)。

【0163】一方、ファージミドクローン#h5-1が保持するcDNAがアデノウイルスベクターに組み込まれたものを有する組換えアデノウイルス(Ad/hAP5)で同様の実験を行い、雄KK/Sanマウスに発現させた結果、血中の中性脂肪濃度の有意な上昇がみられ、ヒト型分子がマウス体内でも機能することが判明した(図4)。

【0164】また、これら血中の中性脂肪濃度に有意差が認められたアデノウイルス感染マウス群の肝臓から全RNAを回収し、実施例1記載の方法でノーザンブロット解析を行ったところ、導入した遺伝子が実際に高発現していることが確認された(図5)。アデノウイルス感染KK/Sanマウス群で検出されるバンドは、遺伝子操作を行っていないKKマウスで検出されるバンドよりも大きい。これは組換えアデノウイルスベクター中で有効な転写開始点またはポリ(A)付加シグナルが本来の遺伝子上のものとは異なることに起因すると考えられる。いずれにせよ、組換えアデノウイルスベクターに組み込まれたcDNA中の最初の翻訳開始コドンのすぐ5'末端側には、該翻訳開始コドンと同一読み枠上に終始コドンが存在するため、このmRNAの大きさの違いは翻訳されるアミノ酸配列には影響しない。

【0165】実施例6. 組換えタンパク質の精製およびN末端アミノ酸配列の決定

以下に記載する方法に従って、実施例3で作成された、配列表の配列番号3に示されるヌクレオチド配列を有す

るヒトcDNAが挿入された発現ベクターpMEh55-1で動物細胞を形質転換し、該形質転換細胞の培養上清中に分泌される組換えタンパク質を精製して、そのN末端アミノ酸配列を決定した。

【0166】(1)形質転換体の取得および培養上清の調製

10% FCS (ギブコ・ビーアールエル社製)、10単位/ml ペニシリンおよび10 µg/ml ストレptomycin (ギブコ・ビーアールエル社製)を含むαMEM (ギブコ・ビーアールエル社製)培地でジヒドロ葉酸還元酵素欠損CHO細胞(ATCC CRL-9096)を増殖させた後、トランスフェクション試薬(FUGENE 6: ロシュ・ダイアグノスティクス社製)を使用し、pMEh55-1プラスミドを1 µg/10⁶細胞の割合でトランスフェクトした。具体的には、細胞は200枚の細胞培養用シャーレ(150 mmφ、コニング社製)に1.5 × 10⁷細胞/シャーレで培養し、トランスフェクションにはシャーレ1枚あたり15 µgのpMEh55-1プラスミドを使用した。トランスフェクション操作後の細胞を上記のFCSを含む培地中で24時間培養後、培地を無血清αMEM培地(30 ml/シャーレ)に交換してから、さらに3日間培養し、無血清培養上清6リットルを回収した。

【0167】(2)組換えタンパク質の精製

1) カラム(ストリームラインC-100: アマシャム・ファルマシア・バイオテク社製)に充填したセファデックスG25 (アマシャム・ファルマシア・バイオテク社製)1.6リットル分のゲルに、上記(1)で得られた培養上清を600 ml注入した(流速: 20 ml/分)。次いで、溶離緩衝液(20 mM トリス-塩酸(pH 7.5)、0.01% アジ化ナトリウム(シグマ社製)、0.05% プロテアーゼインヒビター混合液(シグマ社製)、0.05% Tween 20 (シグマ社製)。以下「A液」という)を流速50 ml/分でカラムに流し、初めの1500 ml分の溶出液を回収した。この操作を10回実施して、上記(1)で得られた6リットルの培養上清の脱塩および低分子除去を行った。

【0168】2) 次に、上記(1)で得られた溶出液をFPLC装置(バイオパイロットシステム、アマシャム・ファルマシア・バイオテク社製)を用い、以下に記載する条件によりイオン交換クロマトグラフィーを行って分画した。カラム: Qセファロース・ファストフロー(アマシャム・ファルマシア・バイオテク社製)100 mlをXK50/100カラム(アマシャム・ファルマシア・バイオテク社製)に充填した。

溶離緩衝液組成:

[A液] 上記参照

[B液] 20 mM トリス-塩酸、1 M 塩化ナトリウム(pH 7.5)、0.01% アジ化ナトリウム、

0.05% プロテアーゼインヒビター混合液、0.05% Tween 20

流速: 10 ml/分

分画: 各10 ml/チューブ

温度: 4

溶出条件: 100% A液から100% B液への直線濃度勾配(60分間)塩化ナトリウム濃度 0.3~0.4 Mで溶出された画分を回収した。

【0169】3) さらに、上記(2)のイオン交換クロマトグラフィーで回収された画分について、FPLC装置を用いて、以下に記載する条件の群特異的アフィニティークロマトグラフィーを実施した。

カラム: アフィゲル ブルー(バイオラッド社製)10 mlをXK16/40カラム(アマシャム・ファルマシア・バイオテク社製)に充填した。

溶離緩衝液組成:

[C液] 20 mM トリス-塩酸、0.5 M 塩化ナトリウム(pH 7.5)、0.01% アジ化ナトリウム、0.05% プロテアーゼインヒビター混合液、0.05% Tween 20

[D液] 20 mM トリス-塩酸、1 M 塩化ナトリウム(pH 7.5)、0.01% アジ化ナトリウム、0.05% プロテアーゼインヒビター混合液、0.05% Tween 20

流速: 1.5 ml/分

温度: 4

上記(2)で回収された画分をカラムに通した後、C液を60 ml流して洗浄してから、D液を100 ml流して、D液による溶出液を回収した。

【0170】4) 上記(3)で得られた溶出液に等量(100 ml)のA液を加えた。このものについて、FPLC装置を用いて、以下に記載する条件の群特異的アフィニティークロマトグラフィーを実施した。

カラム: レンチル・レクチン・セファロース4B (アマシャム・ファルマシア・バイオテク社製)10 mlをXK16/40カラムに充填した。

溶離緩衝液組成:

[C液] 上記参照

[F液] 20 mM トリス-塩酸、0.5 M 塩化ナトリウム、0.3 M メチルマンノピラノシド(pH 7.5)、0.01% アジ化ナトリウム、0.05% プロテアーゼインヒビター混合液、0.05% Tween 20

流速: 1 ml/分

温度: 4

サンプルをカラムに通した後、C液を50 ml流して洗浄してから、F液を50 ml流して、F液による溶出液を回収した。

【0171】この溶出液を透析チューブ(排除限界分子量10 kDa: ギブコ・ビーアールエル社製)に移し、

0.01% アジ化ナトリウムおよび0.1% プロテアーゼインヒビター混合液を含むダルベッコPBS (-) (日水製薬 (株) 社製) 2 リットルに対して、4 で一晩透析した。その後、透析チューブ内の溶液を回収して、そのうち4 ml に、4 mg / ml デオキシコール酸ナトリウムを含むTCAを1 / 10容量 (0.4 ml) 加え、得られた沈殿を回収し、続いてアセトンを加えて得られた沈殿を回収し、50 μ l の滅菌超純水に溶解した。

【0172】(3) N末端アミノ酸配列の決定

上記(2)で精製された試料にPNGase F (ニューイングランド・バイオラブ社製) を加え、N結合型糖鎖を切断した。具体的には、まず50 μ l の試料に6 μ l の10×変性バッファー (PNGase F 試薬に添付) を添加して攪拌し、10分間煮沸水浴中で加熱した。これを室温に戻した後、6 μ l の10% ノニデットP-40および6 μ l の10×G7バッファー (以上PNGase F 試薬に添付) を順に加えて攪拌した。このものにPNGase Fを3 μ l 添加し、攪拌してから37 の水浴で2時間以上保温した。

【0173】このN結合型糖鎖切断反応後の反応液について、4~20%濃度勾配アクリルアミドゲル (マルチゲル4/20、第一化学薬品 (株) 社製) およびミニスラブ式電気泳動装置 (日本エイドー (株) 社製) を用いた還元条件下のSDS-PAGEを実施した。電気泳動後、ゲルメンブラン転写装置 (マリソル社製) を用い、ゲル内で分離されたタンパク質を0.2 μ m孔径のポリビニリデン・ジフルオリド (PVDF) 膜 (バイオラッド社製) に転写した (2 mA / cm²、4 で2時間)。転写後の膜を100% メタノール (和光純薬 (株) 社製) で10秒間濡らした後、超純水で2分間洗浄してから、クーマシー染色液 (バイオラッド社製) で5分間染色し、さらに膜をメタノールに浸して2分間脱色した結果、約50 kDaに相当するバンドがみられた。このバンド部分の膜を切り出し、プロテインシーケンサー (PPSQ-10: 島津製作所 (株) 社製) にてN末端配列の解析を実施した。

【0174】その結果、上記約50 kDaのバンドのN末端アミノ酸配列は

Ser-Arg-Ile-Asp-Gln-Asp-Asn-Ser-Ser-Phe-Asp (配 *40

SEQUENCE LISTING

<110> Sankyo Company, Limited
<120> Method of Testing Anti-hyperlipidemia Substances
<130> 2000178SS
<140>
<141>
<150> JP H11-349976
<151> 1999-12-09
<160> 11
<170> PatentIn Ver. 2.0

*列表の配列番号4のアミノ酸番号17から27) であった。このことから、配列表の配列番号3のヌクレオチド番号78から1457に示されるヌクレオチド配列にコードされるタンパク質は、哺乳動物細胞では、N末端の16個のペプチド (配列表の配列番号4のアミノ酸番号1から16) が切り落とされて、その直後に続くセリン残基 (配列表の配列番号4のアミノ酸番号17) をN末端とする成熟体として分泌されることが明らかとなった。

10 【0175】

【発明の効果】 以上述べたように、本発明により、配列表の配列番号1のヌクレオチド番号47から1411に示されるヌクレオチド配列または配列表の配列番号3のヌクレオチド番号78から1457に示されるヌクレオチド配列からなる遺伝子が、血中の中性脂肪濃度を上昇させる遺伝的素因の一つであり、したがって該遺伝子の発現量を抑制する物質が高脂血症の治療または予防剤となり得ることが確かめられた。すなわち、本発明の方法、該方法のうち核酸の検出を行う態様においてプローブまたはプライマーとして使用されるポリヌクレオチドおよび同じくポリペプチドの検出を行う態様において使用される抗体は、高脂血症の治療または予防剤の探索に有用である。

【図面の簡単な説明】

【図1】 KKマウス臓器由来の試料についてのノーザンブロット解析の結果を表す図。

【図2】 遺伝子導入COS-1細胞培養上清を試料としたウエスタンブロット解析の結果を表す図。

30 【図3】 遺伝子導入HeLa細胞培養上清を試料としたウエスタンブロット解析の結果を表す図。

【図4】 組換えアデノウイルスを感染させたKK/Sa nマウスの末梢血中の中性脂肪濃度測定結果を表す図。

【図5】 KKマウスおよび組換えアデノウイルスを感染させたKK/Sa nマウスの肝臓由来の試料についてのノーザンブロット解析の結果を表す図。

【配列表フリーテキスト】配列番号9: ポリクローナル抗体を取得するための抗原として使用された合成オリゴペプチド

【配列表】

<210> 1
 <211> 1604
 <212> DNA
 <213> Mus musculus
 <220>
 <221> CDS
 <222> (47)..(1411)
 <400> 1
 ggcacgaggt tccaaattgc ttaaaattga ataa
 ttgaga caaaaa atg cac aca 55
 Met His Thr
 1
 att aaa tta ttc ctt ttt gtt gtt cct tta
 gta att gca tcc aga gtg 103
 Ile Lys Leu Phe Leu Phe Val Val Pro Leu
 Val Ile Ala Ser Arg Val
 5 10 15
 gat cca gac ctt tca tca ttt gat tct gca
 cct tca gag cca aaa tca 151
 Asp Pro Asp Leu Ser Ser Phe Asp Ser Ala
 Pro Ser Glu Pro Lys Ser
 20 25 30 35
 aga ttt gct atg ttg gat gat gtc aaa att
 tta gcg aat ggc ctc ctg 199
 Arg Phe Ala Met Leu Asp Asp Val Lys Ile
 Leu Ala Asn Gly Leu Leu
 40 45 50
 cag ctg ggt cat gga ctt aaa gat ttt gtc
 cat aag act aag gga caa 247
 Gln Leu Gly His Gly Leu Lys Asp Phe Val
 His Lys Thr Lys Gly Gln
 55 60 65
 att aac gac ata ttt cag aag ctc aac ata
 ttt gat cag tct ttt tat 295
 Ile Asn Asp Ile Phe Gln Lys Leu Asn Ile
 Phe Asp Gln Ser Phe Tyr
 70 75 80
 gac cta tca ctt cga acc aat gaa atc aaa
 gaa gag gaa aag gag cta 343
 Asp Leu Ser Leu Arg Thr Asn Glu Ile Lys
 Glu Glu Glu Lys Glu Leu
 85 90 95
 aga aga act aca tct aca cta caa gtt aaa
 aac gag gag gtg aag aac 391
 Arg Arg Thr Thr Ser Thr Leu Gln Val Lys
 Asn Glu Glu Val Lys Asn
 100 105 110 1
 15
 atg tca gta gaa ctg aac tca aag ctt gag
 agt ctg ctg gaa gag aag 439
 Met Ser Val Glu Leu Asn Ser Lys Leu Glu

tca gaa aat tct ctt tct tct aaa tca aga
 gca cca aga act act ccc 727
 Ser Glu Asn Ser Leu Ser Ser Lys Ser Arg
 Ala Pro Arg Thr Thr Pro
 215 220 225
 cct ctt caa ctg aac gaa aca gaa aat aca
 gaa caa gat gac ctt cct 775
 Pro Leu Gln Leu Asn Glu Thr Glu Asn Thr
 Glu Gln Asp Asp Leu Pro
 230 235 240
 gcc gac tgc tct gcc gtt tat aac aga ggc
 gaa cat aca agt ggc gtg 823
 Ala Asp Cys Ser Ala Val Tyr Asn Arg Gly
 Glu His Thr Ser Gly Val
 245 250 255
 tac act att aaa cca aga aac tcc caa ggg
 ttt aat gtc tac tgt gat 871
 Tyr Thr Ile Lys Pro Arg Asn Ser Gln Gly
 Phe Asn Val Tyr Cys Asp
 260 265 270 2
 75
 acc caa tca ggc agt cca tgg aca tta att
 caa cac cgg aaa gat ggc 919
 Thr Gln Ser Gly Ser Pro Trp Thr Leu Ile
 Gln His Arg Lys Asp Gly
 280 285 290
 tca cag gac ttc aac gaa aca tgg gaa aac
 tac gaa aag ggc ttt ggg 967
 Ser Gln Asp Phe Asn Glu Thr Trp Glu Asn
 Tyr Glu Lys Gly Phe Gly
 295 300 305
 agg ctc gat gga gaa ttt tgg ttg ggc cta
 gag aag atc tat gct ata 1015
 Arg Leu Asp Gly Glu Phe Trp Leu Gly Leu
 Glu Lys Ile Tyr Ala Ile
 310 315 320
 gtc caa cag tct aac tac att tta cga ctc
 gag cta caa gac tgg aaa 1063
 Val Gln Gln Ser Asn Tyr Ile Leu Arg Leu
 Glu Leu Gln Asp Trp Lys
 325 330 335
 gac agc aag cac tac gtt gaa tac tcc ttt
 cac ctg ggc agt cac gaa 1111
 Asp Ser Lys His Tyr Val Glu Tyr Ser Phe
 His Leu Gly Ser His Glu
 340 345 350 3
 55
 acc aac tac acg cta cat gtg gct gag att
 gct ggc aat atc cct ggg 1159
 Thr Asn Tyr Thr Leu His Val Ala Glu Ile
 Ala Gly Asn Ile Pro Gly
 360 365 370

taaattaaat attaaagtcc tcccgatcac tgta
 gtaatc tggattataa attttaatgg 1511
 aaagcttgag aattgaattt caattaggtt taaa
 ctcatt gttaatgca gatatcaccg 1571
 aatcaacgta aacaaaattt atctttttca atc

1604

<210> 2

<211> 455

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 2

Met His Thr Ile Lys Leu Phe Leu Phe Val
 Val Pro Leu Val Ile Ala

1 5 10 15

Ser Arg Val Asp Pro Asp Leu Ser Ser Phe
 Asp Ser Ala Pro Ser Glu

20 25 30

Pro Lys Ser Arg Phe Ala Met Leu Asp Asp
 Val Lys Ile Leu Ala Asn

35 40 45

Gly Leu Leu Gln Leu Gly His Gly Leu Lys
 Asp Phe Val His Lys Thr

50 55 60

Lys Gly Gln Ile Asn Asp Ile Phe Gln Lys
 Leu Asn Ile Phe Asp Gln

65 70 75 80

Ser Phe Tyr Asp Leu Ser Leu Arg Thr Asn
 Glu Ile Lys Glu Glu Glu

85 90 95

Lys Glu Leu Arg Arg Thr Thr Ser Thr Leu
 Gln Val Lys Asn Glu Glu

100 105 110

Val Lys Asn Met Ser Val Glu Leu Asn Ser
 Lys Leu Glu Ser Leu Leu

115 120 125

Glu Glu Lys Thr Ala Leu Gln His Lys Val
 Arg Ala Leu Glu Glu Gln

130 135 140

Leu Thr Asn Leu Ile Leu Ser Pro Ala Gly
 Ala Gln Glu His Pro Glu

145 150 155 1

60

Val Thr Ser Leu Lys Ser Phe Val Glu Gln
 Gln Asp Asn Ser Ile Arg

165 170 175

Glu Leu Leu Gln Ser Val Glu Glu Gln Tyr
 Lys Gln Leu Ser Gln Gln

180 185 190

His Met Gln Ile Lys Glu Ile Glu Lys Gln
 Leu Arg Lys Thr Gly Ile

195 200 205

Tyr Ala Ile Val Gln Gln Ser Asn Tyr Ile
 Leu Arg Leu Glu Leu Gln
 325 330 335
 Asp Trp Lys Asp Ser Lys His Tyr Val Glu
 Tyr Ser Phe His Leu Gly
 340 345 350
 Ser His Glu Thr Asn Tyr Thr Leu His Val
 Ala Glu Ile Ala Gly Asn
 355 360 365
 Ile Pro Gly Ala Leu Pro Glu His Thr Asp
 Leu Met Phe Ser Thr Trp
 370 375 380
 Asn His Arg Ala Lys Gly Gln Leu Tyr Cys
 Pro Glu Ser Tyr Ser Gly
 385 390 395 4
 00
 Gly Trp Trp Trp Asn Asp Ile Cys Gly Glu
 Asn Asn Leu Asn Gly Lys
 405 410 415
 Tyr Asn Lys Pro Arg Thr Lys Ser Arg Pro
 Glu Arg Arg Arg Gly Ile
 420 425 430
 Tyr Trp Arg Pro Gln Ser Arg Lys Leu Tyr
 Ala Ile Lys Ser Ser Lys
 435 440 445
 Met Met Leu Gln Pro Thr Thr
 450 455
 <210> 3
 <211> 1716
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> CDS
 <222> (78)..(1457)
 <400> 3
 gcggccgcgt cgacgtctag gtctgcttcc agaa
 gaaaac agttccacgt tgcttgaaat 60

 tgaaaatcaa gataaaa atg ttc aca att aag
 ctc ctt ctt ttt att gtt 110
 Met Phe Thr Ile Lys Leu Leu L
 eu Phe Ile Val
 1 5 10
 cct cta gtt att tcc tcc aga att gat caa
 gac aat tca tca ttt gat 158
 Pro Leu Val Ile Ser Ser Arg Ile Asp Gln
 Asp Asn Ser Ser Phe Asp
 15 20 25
 tct cta tct cca gag cca aaa tca aga ttt
 gct atg tta gac gat gta 206
 Ser Leu Ser Pro Glu Pro Lys Ser Arg Phe
 Ala Met Leu Asp Asp Val
 30 35 40

gtc aaa aat gaa gag gta aag aat atg tca
 ctt gaa ctc aac tca aaa 446
 Val Lys Asn Glu Glu Val Lys Asn Met Ser
 Leu Glu Leu Asn Ser Lys
 110 115 120
 ctt gaa agc ctc cta gaa gaa aaa att cta
 ctt caa caa aaa gtg aaa 494
 Leu Glu Ser Leu Leu Glu Glu Lys Ile Leu
 Leu Gln Gln Lys Val Lys
 125 130 135
 tat tta gaa gag caa cta act aac tta att
 caa aat caa cct gaa act 542
 Tyr Leu Glu Glu Gln Leu Thr Asn Leu Ile
 Gln Asn Gln Pro Glu Thr
 140 145 150 1
 55
 cca gaa cac cca gaa gta act tca ctt aaa
 act ttt gta gaa aaa caa 590
 Pro Glu His Pro Glu Val Thr Ser Leu Lys
 Thr Phe Val Glu Lys Gln
 160 165 170
 gat aat agc atc aaa gac ctt ctc cag acc
 gtg gaa gac caa tat aaa 638
 Asp Asn Ser Ile Lys Asp Leu Leu Gln Thr
 Val Glu Asp Gln Tyr Lys
 175 180 185
 caa tta aac caa cag cat agt caa ata aaa
 gaa ata gaa aat cag ctc 686
 Gln Leu Asn Gln Gln His Ser Gln Ile Lys
 Glu Ile Glu Asn Gln Leu
 190 195 200
 aga agg act agt att caa gaa ccc aca gaa
 att tct cta tct tcc aag 734
 Arg Arg Thr Ser Ile Gln Glu Pro Thr Glu
 Ile Ser Leu Ser Ser Lys
 205 210 215
 cca aga gca cca aga act act ccc ttt ctt
 cag ttg aat gaa ata aga 782
 Pro Arg Ala Pro Arg Thr Thr Pro Phe Leu
 Gln Leu Asn Glu Ile Arg
 220 225 230 2
 35
 aat gta aaa cat gat ggc att cct gct gaa
 tgt acc acc att tat aac 830
 Asn Val Lys His Asp Gly Ile Pro Ala Glu
 Cys Thr Thr Ile Tyr Asn
 240 245 250
 aga ggt gaa cat aca agt ggc atg tat gcc
 atc aga ccc agc aac tct 878
 Arg Gly Glu His Thr Ser Gly Met Tyr Ala
 Ile Arg Pro Ser Asn Ser
 255 260 265
 caa gtt ttt cat gtc tac tgt gat gtt ata

365 370 375
 gtg ttt tct act tgg gat cac aaa gca aaa
 gga cac ttc aac tgt cca 1262
 Val Phe Ser Thr Trp Asp His Lys Ala Lys
 Gly His Phe Asn Cys Pro
 380 385 390 3
 95
 gag ggt tat tca gga ggc tgg tgg tgg cat
 gat gag tgt gga gaa aac 1310
 Glu Gly Tyr Ser Gly Gly Trp Trp Trp His
 Asp Glu Cys Gly Glu Asn
 400 405 410
 aac cta aat ggt aaa tat aac aaa cca aga
 gca aaa tct aag cca gag 1358
 Asn Leu Asn Gly Lys Tyr Asn Lys Pro Arg
 Ala Lys Ser Lys Pro Glu
 415 420 425
 agg aga aga gga tta tct tgg aag tct caa
 aat gga agg tta tac tct 1406
 Arg Arg Arg Gly Leu Ser Trp Lys Ser Gln
 Asn Gly Arg Leu Tyr Ser
 430 435 440
 ata aaa tca acc aaa atg ttg atc cat cca
 aca gat tca gaa agc ttt 1454
 Ile Lys Ser Thr Lys Met Leu Ile His Pro
 Thr Asp Ser Glu Ser Phe
 445 450 455

 gaa tgaactgagg caaatttaaa aggcaataat
 ttaaacatta acctcattcc 1507
 Glu
 460
 aagttaatgt ggtctaataa tctggtatta aatc
 cttaag agaaagcttg agaaatagat 1567
 tttttttatc ttaaagtcac tgtctattta agat
 taaaca tacaatcaca taaccttaaa 1627
 gaataccggt tacatttctc aatcaaaatt ctta
 taatac tatttgtttt aaattttgtg 1687
 atgtgggaat caattttaga tggtcacaa
 1716

 <210> 4
 <211> 460
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 4
 Met Phe Thr Ile Lys Leu Leu Leu Phe Ile
 Val Pro Leu Val Ile Ser
 1 5 10 15
 Ser Arg Ile Asp Gln Asp Asn Ser Ser Phe
 Asp Ser Leu Ser Pro Glu
 20 25 30
 Pro Lys Ser Arg Phe Ala Met Leu Asp Asp
 Val Lys Ile Leu Ala Asn

Val Thr Ser Leu Lys Thr Phe Val Glu Lys
 Gln Asp Asn Ser Ile Lys
 165 170 175
 Asp Leu Leu Gln Thr Val Glu Asp Gln Tyr
 Lys Gln Leu Asn Gln Gln
 180 185 190
 His Ser Gln Ile Lys Glu Ile Glu Asn Gln
 Leu Arg Arg Thr Ser Ile
 195 200 205

 Gln Glu Pro Thr Glu Ile Ser Leu Ser Ser
 Lys Pro Arg Ala Pro Arg
 210 215 220
 Thr Thr Pro Phe Leu Gln Leu Asn Glu Ile
 Arg Asn Val Lys His Asp
 225 230 235 2
 40
 Gly Ile Pro Ala Glu Cys Thr Thr Ile Tyr
 Asn Arg Gly Glu His Thr
 245 250 255
 Ser Gly Met Tyr Ala Ile Arg Pro Ser Asn
 Ser Gln Val Phe His Val
 260 265 270
 Tyr Cys Asp Val Ile Ser Gly Ser Pro Trp
 Thr Leu Ile Gln His Arg
 275 280 285
 Ile Asp Gly Ser Gln Asn Phe Asn Glu Thr
 Trp Glu Asn Tyr Lys Tyr
 290 295 300
 Gly Phe Gly Arg Leu Asp Gly Glu Phe Trp
 Leu Gly Leu Glu Lys Ile
 305 310 315 3
 20
 Tyr Ser Ile Val Lys Gln Ser Asn Tyr Val
 Leu Arg Ile Glu Leu Glu
 325 330 335
 Asp Trp Lys Asp Asn Lys His Tyr Ile Glu
 Tyr Ser Phe Tyr Leu Gly
 340 345 350
 Asn His Glu Thr Asn Tyr Thr Leu His Leu
 Val Ala Ile Thr Gly Asn
 355 360 365
 Val Pro Asn Ala Ile Pro Glu Asn Lys Asp
 Leu Val Phe Ser Thr Trp
 370 375 380
 Asp His Lys Ala Lys Gly His Phe Asn Cys
 Pro Glu Gly Tyr Ser Gly
 385 390 395 4
 00
 Gly Trp Trp Trp His Asp Glu Cys Gly Glu
 Asn Asn Leu Asn Gly Lys
 405 410 415
 Tyr Asn Lys Pro Arg Ala Lys Ser Lys Pro

tgcatccaga gtggatccag a

21

<210> 7

<211> 21

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 7

tcctctagtt atttcctcca g

21

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 8

tggtttgccca gcgatagatc

20

<210> 9

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial

Sequence: Synthetic

oligopeptide which is used as an antigen to obtain

polyclonal antibody

<400> 9

Glu Pro Lys Ser Arg Phe Ala Met Leu Asp

Asp Val Lys Cys

1

5

10

<210> 10

<211> 14

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 10

Cys Gly Glu Asn Asn Leu Asn Gly Lys Tyr

Asn Lys Pro Arg

1

5

10

<210> 11

<211> 199

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 11

ttgcatccag agtggatcca gacctttcat catt

tgattc tgcaccttca gagccaaaat 60

caagatttgc tatgttggat gatgtcaaaa tttt

agcgaa tggcctcctg cagctgggtc 120

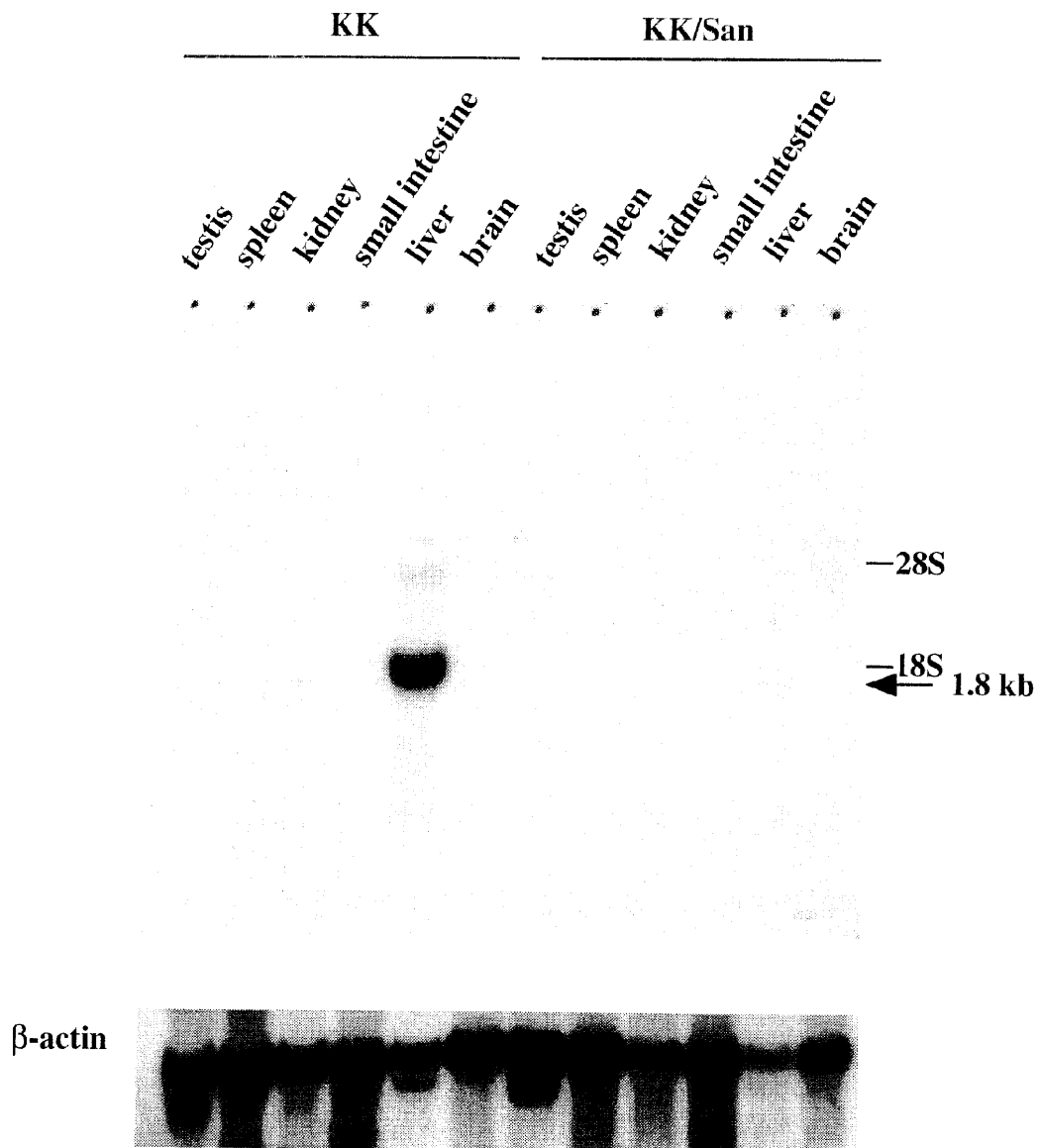
atggacttaa agattttgtc cataagacta aggg

acaaat taacgacata tticagaagc 180

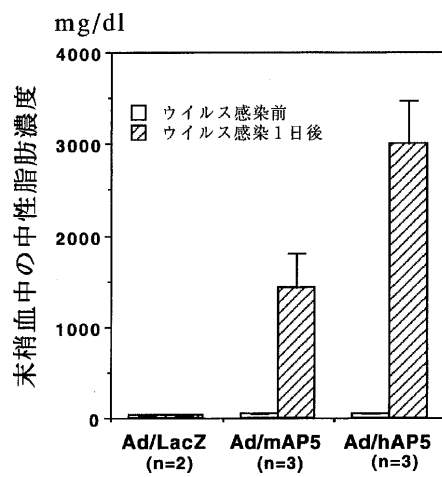
tcaacatatt tgatcagtc

199

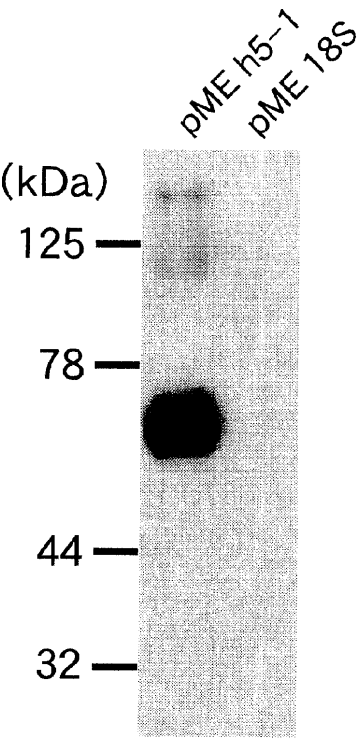
【図1】



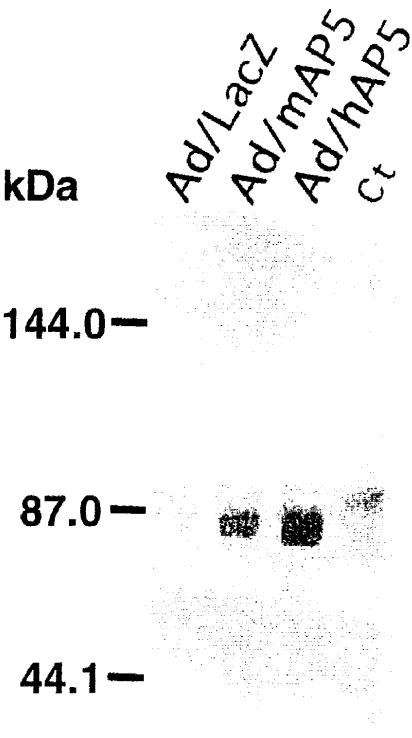
【図4】



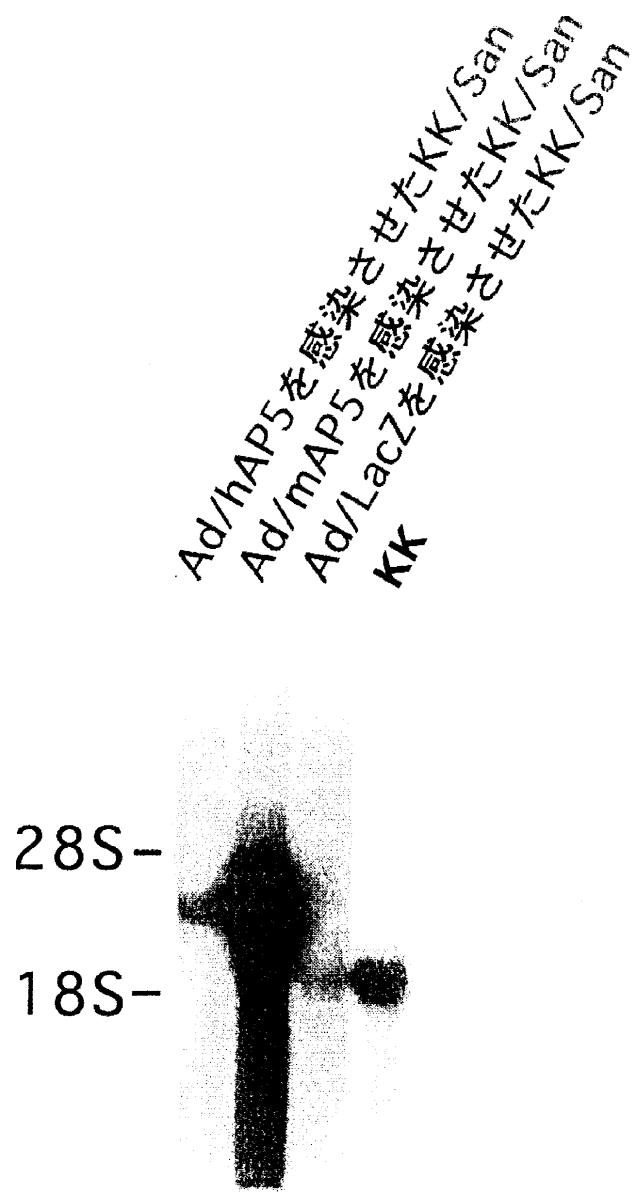
【図2】



【図3】



【図5】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マコ-ド ⁷ (参考)
C 1 2 N 5/06		G 0 1 N 33/53	D
C 1 2 Q 1/68		C 1 2 N 15/00	Z N A A
G 0 1 N 33/53		5/00	E
(72)発明者 古川 秀比古		(72)発明者 藤原 俊彦	
東京都品川区広町1丁目2番58号 三共株		東京都品川区広町1丁目2番58号 三共株	
式会社内		式会社内	
		(72)発明者 堀越 大能	
		東京都品川区広町1丁目2番58号 三共株	
		式会社内	

专利名称(译)	治疗或预防高脂血症的试验方法		
公开(公告)号	JP2001224385A	公开(公告)日	2001-08-21
申请号	JP2000374124	申请日	2000-12-08
[标]申请(专利权)人(译)	株式会社三共		
申请(专利权)人(译)	三共株式会社		
[标]发明人	小石龍太 安藤洋介 小野満 古川秀比古 藤原俊彦 掘越大能		
发明人	小石 龍太 安藤 洋介 小野 満 古川 秀比古 藤原 俊彦 掘越 大能		
IPC分类号	G01N33/53 A61K31/711 A61K48/00 A61P3/06 C07K16/18 C12N5/07 C12N5/071 C12N15/09 C12Q1/68 G01N37/00 C12N5/06		
FI分类号	A61K31/711 A61K48/00 A61P3/06 C07K16/18 C12Q1/68.A G01N33/53.D C12N15/00.ZNA.A C12N5/00.E C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A C12N5/00.202.A C12N5/071 G01N33/53.M G01N37/00.102		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA41 4B024/CA01 4B024/GA11 4B024/GA18 4B024/HA11 4B024/HA14 4B024/HA15 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ42 4B063/QQ79 4B063/QQ96 4B063/QR48 4B063/QR55 4B063/QR77 4B063/QS22 4B063/QS33 4B063/QS34 4B063/QX02 4B065/AA91X 4B065/AA93X 4B065/AB01 4B065/BA02 4B065/BB01 4B065/CA23 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA46 4C084/AA13 4C084/NA14 4C084/ZA512 4C084/ZC332 4C086/AA01 4C086/AA03 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/ZA51 4C086/ZC33 4H045/AA11 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA50 4H045/FA74		
优先权	1999349976 1999-12-09 JP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

解决的问题：提供一种测试作为高脂血症的治疗剂或预防剂的效果的新颖方法，以及用于该方法的多核苷酸和抗体。SOLUTION：这在序列表中SEQ ID NO：1的第47至1411位核苷酸或序列表中SEQ ID NO：3的第78至1457位核苷酸在通过在有或没有受试物质的情况下培养培养细胞而获得的细胞中显示。检测具有核苷酸序列的mRNA的表达水平（但是，该序列中的t读作u），并且在存在测试物质的情况下培养的细胞而不是在没有测试物质的情况下培养的细胞中检测到mRNA的表达水平。一种选择测试物质的方法，该方法可降低表达的mRNA的表达水平。

