

(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2004-105167

(P2004-105167A)

(43) 公開日 平成16年4月8日(2004.4.8)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	Z N A A
A 6 1 K 38/00	A 6 1 K 39/395	D
A 6 1 K 39/395	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 K 45/00	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 K 48/00	A 6 1 K 49/00	Z
	審査請求 未請求 請求項の数 40 O L (全 137 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号	特願2003-133857 (P2003-133857)	(71) 出願人	000002934
(22) 出願日	平成15年5月13日 (2003.5.13)		武田薬品工業株式会社
(31) 優先権主張番号	特願2002-139184 (P2002-139184)		大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号
(32) 優先日	平成14年5月14日 (2002.5.14)	(74) 代理人	100114041
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		弁理士 高橋 秀一
(31) 優先権主張番号	特願2002-157669 (P2002-157669)	(74) 代理人	100106323
(32) 優先日	平成14年5月30日 (2002.5.30)		弁理士 関口 陽
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)	(72) 発明者	中西 淳
(31) 優先権主張番号	特願2002-218324 (P2002-218324)		茨城県つくば市花室1557-11
(32) 優先日	平成14年7月26日 (2002.7.26)	(72) 発明者	味谷 浩之
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		茨城県つくば市柴崎517-9
		(72) 発明者	岩間 斗史
			茨城県つくば市二の宮1丁目12-30-606
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規タンパク質およびそのDNA

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 K^+ イオンの透過などの活性を有する新規タンパク質、該タンパク質をコードするDNA、該タンパク質の活性を促進または阻害する化合物のスクリーニング方法、該スクリーニング方法で得られる化合物などの提供。

【解決手段】 特定の配列で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有するタンパク質は、例えば、消化器疾患、胸腺異常に伴う免疫疾患、膵臓疾患、糖尿病、生殖器疾患、中枢神経系疾患、循環器疾患、筋肉疾患または癌などの診断マーカー等として有用であり、該タンパク質を用いるスクリーニング法により得られる該タンパク質の活性を促進または阻害する化合物などは、例えば、上記疾患の予防・治療剤などとして使用することができる。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号：1、配列番号：8、配列番号：11または配列番号：15で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩。

【請求項 2】

配列番号：1、配列番号：8、配列番号：11または配列番号：15で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質が、配列番号：18、配列番号：23または配列番号：26で表わされるアミノ酸配列からなるタンパク質である請求項1記載のタンパク質またはその塩。

【請求項 3】

配列番号：1で表わされるアミノ酸配列からなるタンパク質またはその塩。

【請求項 4】

配列番号：8で表わされるアミノ酸配列からなるタンパク質またはその塩。

【請求項 5】

配列番号：11で表わされるアミノ酸配列からなるタンパク質またはその塩。

【請求項 6】

配列番号：15で表わされるアミノ酸配列からなるタンパク質またはその塩。

【請求項 7】

請求項1記載のタンパク質の部分ペプチドまたはその塩。

【請求項 8】

請求項1記載のタンパク質または請求項7記載の部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチド。

【請求項 9】

DNAである請求項8記載のポリヌクレオチド。

【請求項 10】

配列番号：2、配列番号：9、配列番号：12または配列番号：16で表わされる塩基配列からなるポリヌクレオチド。

【請求項 11】

配列番号：19、配列番号：24または配列番号：27で表わされる塩基配列からなるポリヌクレオチド。

【請求項 12】

請求項8記載のポリヌクレオチドを含有する組換えベクター。

【請求項 13】

請求項12記載の組換えベクターで形質転換された形質転換体。

【請求項 14】

請求項13記載の形質転換体を培養し、請求項1記載のタンパク質または請求項7記載の部分ペプチドを生成、蓄積せしめ、これを採取することを特徴とする請求項1記載のタンパク質もしくは請求項7記載の部分ペプチドまたはその塩の製造法。

【請求項 15】

請求項1記載のタンパク質もしくは請求項7記載の部分ペプチドまたはその塩を含有してなる医薬。

【請求項 16】

請求項8記載のポリヌクレオチドを含有してなる医薬。

【請求項 17】

請求項8記載のポリヌクレオチドを含有してなる診断薬。

【請求項 18】

請求項1記載のタンパク質もしくは請求項7記載の部分ペプチドまたはその塩に対する抗体。

【請求項 19】

請求項18記載の抗体を含有してなる診断薬。

10

20

30

40

50

【請求項 20】

請求項 18 記載の抗体を含有してなる医薬。

【請求項 21】

請求項 8 記載のポリヌクレオチドの塩基配列に相補的もしくは実質的に相補的な塩基配列またはその一部を含有するポリヌクレオチド。

【請求項 22】

請求項 21 記載のポリヌクレオチドを含有してなる医薬。

【請求項 23】

請求項 1 記載のタンパク質もしくは請求項 7 記載の部分ペプチドまたはその塩を用いることを特徴とする、請求項 1 記載のタンパク質もしくは請求項 7 記載の部分ペプチドまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法。 10

【請求項 24】

請求項 1 記載のタンパク質もしくは請求項 7 記載の部分ペプチドまたはその塩を含有してなる、請求項 1 記載のタンパク質もしくは請求項 7 記載の部分ペプチドまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キット。

【請求項 25】

請求項 23 記載のスクリーニング方法または請求項 24 記載のスクリーニング用キットを用いて得られる、請求項 1 記載のタンパク質もしくは請求項 7 記載の部分ペプチドまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩。

【請求項 26】

請求項 25 記載の化合物またはその塩を含有してなる医薬。 20

【請求項 27】

請求項 8 記載のポリヌクレオチドを用いることを特徴とする、請求項 1 記載のタンパク質遺伝子の発現を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法。

【請求項 28】

請求項 8 記載のポリヌクレオチドを含有してなる、請求項 1 記載のタンパク質遺伝子の発現を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キット。

【請求項 29】

請求項 27 記載のスクリーニング方法または請求項 28 記載のスクリーニング用キットを用いて得られる、請求項 1 記載のタンパク質遺伝子の発現を促進または阻害する化合物またはその塩。 30

【請求項 30】

請求項 29 記載の化合物またはその塩を含有してなる医薬。

【請求項 31】

請求項 18 記載の抗体を用いることを特徴とする請求項 1 記載のタンパク質の定量方法。

【請求項 32】

請求項 31 記載の定量方法を用いることを特徴とする請求項 1 記載のタンパク質の機能が関連する疾患の診断法。

【請求項 33】

請求項 18 記載の抗体を用いることを特徴とする、請求項 1 記載のタンパク質の発現を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法。 40

【請求項 34】

請求項 18 記載の抗体を含有してなる、請求項 1 記載のタンパク質の発現を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キット。

【請求項 35】

請求項 33 記載のスクリーニング方法または請求項 34 記載のスクリーニング用キットを用いて得られる、請求項 1 記載のタンパク質の発現を促進または阻害する化合物またはその塩。

【請求項 36】

請求項 35 記載の化合物またはその塩を含有してなる医薬。 50

【請求項 37】

消化器疾患、生殖器疾患または呼吸器疾患の予防・治療剤である請求項 15、請求項 16、請求項 20、請求項 22、請求項 26、請求項 30 または請求項 36 記載の医薬。

【請求項 38】

消化器疾患、生殖器疾患または呼吸器疾患の診断薬である請求項 17 または請求項 19 記載の診断薬。

【請求項 39】

哺乳動物に対して、請求項 25、請求項 29 または請求項 35 記載の化合物またはその塩の有効量を投与することを特徴とする消化器疾患、生殖器疾患または呼吸器疾患の予防・治療方法。

10

【請求項 40】

消化器疾患、生殖器疾患または呼吸器疾患の予防・治療剤を製造するための請求項 25、請求項 29 または請求項 35 記載の化合物またはその塩の使用。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、新規な Ca^{2+} 依存性 K^+ チャネルタンパク質、該タンパク質をコードするポリヌクレオチド、該タンパク質の活性を促進または阻害する化合物のスクリーニング方法、該スクリーニング方法で得られる化合物などを提供する。

【0002】

20

【従来の技術】

K^+ イオンを選択的に透過させる膜タンパクである K^+ チャネルは、原核生物からヒトまで普遍的に存在し、非常に多くのファミリーからなる。生体内では、広範な組織に分布しており、細胞の静止膜電位形成、再分極、活動電位発生頻度の調節など重要な生理機能に密接に関わっている。

K^+ チャネルの構造は多様であり、6 回膜貫通型、2 回膜貫通型、1 回膜貫通型などに加えて、これらの基本構造が 2 個連結した連結型のチャネル分子も存在する。

Ca^{2+} 依存性 K^+ チャネル (K_{Ca}) は電位依存性 K^+ チャネルとともに 6 回膜貫通型に属し、チャネルコンダクタンスに従ってさらに *Big-K* (*BK*)、*Intermediate-K* (*IK*) および *Small-K* (*SK*) の 3 つのファミリーに分類されている。30 *BK* はコンダクタンスが 100 - 220 pS で、*maxi-K* または *Slow* (ショウジョウバエの *Big-K* が変異株 *Slowpoke* の原因遺伝子であったことから) と呼ばれ、ヒト *Slow* は 1994 年にクローニングされている (*Mol. Brain Res.*, 27 巻、189 - 193 頁、1994 年)。 *IK* および *SK* は、コンダクタンスがそれぞれ 20 - 85 pS および 2 - 20 pS であり、ヒト *IK1* (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94 巻、11651 - 11656 頁、1997 年) およびヒト *SK1* (*Science* 273 巻、1709 - 1714 頁、1996 年) がクローニングされている。いずれのファミリーも、第 5 膜貫通領域と第 6 膜貫通領域との間にポア領域が存在し、また、細胞内に位置する C 末端側部分で Ca^{2+} 感受性を担っていると考えられている。この C 末端側部分は機能発現のために不可欠で、この領域の 40 スプライシングによって Ca^{2+} 依存性の異なるチャネルが形成される。 K_{Ca} でチャネル本体としての機能を果たすのはサブユニットであるが、最近になって本チャネルにも電位依存性 K^+ チャネルと同様サブユニットの存在することが見出された (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93 巻、9200 - 9205 頁、1996 年)。サブユニットは 2 つの膜貫通領域を持ち、N 末端と C 末端が細胞内に位置する構造をとると推定されており、サブユニットに対し調節的な役割を担っていると考えられている。

Ca^{2+} 依存性 K^+ チャネルの生理機能としては、ヒト *SK* がドーパミン作動性中脳神経細胞に高発現していることから本神経細胞で何らかの機能を果たしているものと考えられており、また本神経細胞の機能不全が精神分裂病で観察されることから精神分裂病とヒト 50

SKとの関連も指摘されている(J. Neurosci., 21巻、3443-3456頁、2001年)。ヒトIK1は、赤血球の体積調節との関連(Current. Opin. Hematol., 4巻、122-127頁、1997年)、および小腸のCl⁻分泌の調節との関連(J. Clin. Invest., 98巻、2066-2075頁、1996年)が報告されており、IK1阻害剤が分泌性下痢に対して緩和作用を持つことも知られている(J. Clin. Invest., 100巻、3111-3120頁、1997年)。

ニワトリのCa²⁺依存性K⁺チャンネルとしてcSlackが報告されている(非特許文献1 Genbank Accession No. AAM18770)。

【非特許文献1】

10

Genbank Accession No. AAM18770

【0003】

【発明が解決しようとする課題】

K_{Ca}は、細胞の膜電位と細胞内Ca²⁺イオン濃度とを感知してK⁺イオンの透過を制御していると考えられているが、チャンネルコンダクタンス、Ca²⁺イオンの感受性やタンパク質酸化酵素のようなチャンネル活性調節因子に対する応答などが異なった多種の分子種が存在し、発現部位も多様である。K_{Ca}は、筋収縮、内分泌、腎でのK⁺イオンの透過、神経情報伝達など生体にとって重要な種々の機能を担っていると考えられている。しかし、各分子種とそれら機能との関係は不確定な部分が多く、それを解明することがK_{Ca}が関与する種々の疾患の治療薬開発につながる。

20

【0004】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記の課題を解決するために鋭意研究を重ねた結果、新規なCa²⁺依存性K⁺チャンネルタンパク質を見出した。該タンパク質を調節する方法としては、例えばK⁺イオンの透過阻害または促進、該タンパク質遺伝子の転写抑制による発現レベル低下、該タンパク質遺伝子のプロモーターの活性化、mRNAの安定化による発現レベルの亢進などが考えられる。本発明者らは、これらの知見に基づいて、さらに検討を重ねた結果、本発明を完成するに至った。

【0005】

すなわち、本発明は、

30

(1) 配列番号：1、配列番号：8、配列番号：11または配列番号：15で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩、

(2) 配列番号：1、配列番号：8、配列番号：11または配列番号：15で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質が、配列番号：18、配列番号：23または配列番号：26で表わされるアミノ酸配列からなるタンパク質である上記(1)記載のタンパク質またはその塩、

(3) 配列番号：1で表わされるアミノ酸配列からなるタンパク質またはその塩、

(4) 配列番号：8で表わされるアミノ酸配列からなるタンパク質またはその塩、

(5) 配列番号：11で表わされるアミノ酸配列からなるタンパク質またはその塩、

40

(6) 配列番号：15で表わされるアミノ酸配列からなるタンパク質またはその塩、

(7) 上記(1)記載のタンパク質の部分ペプチドまたはその塩、

(8) 上記(1)記載のタンパク質または上記(7)記載の部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチド、

(9) DNAである上記(8)記載のポリヌクレオチド、

(10) 配列番号：2、配列番号：9、配列番号：12または配列番号：16で表わされる塩基配列からなるポリヌクレオチド、

(11) 配列番号：19、配列番号：24または配列番号：27で表わされる塩基配列からなるポリヌクレオチド、

(12) 上記(8)記載のポリヌクレオチドを含有する組換えベクター、

50

- (13) 上記(12)記載の組換えベクターで形質転換された形質転換体、
- (14) 上記(13)記載の形質転換体を培養し、上記(1)記載のタンパク質または上記(7)記載の部分ペプチドを生成、蓄積せしめ、これを採取することを特徴とする上記(1)記載のタンパク質もしくは上記(7)記載の部分ペプチドまたはその塩の製造法、
- (15) 上記(1)記載のタンパク質もしくは上記(7)記載の部分ペプチドまたはその塩を含有してなる医薬、
- (16) 上記(8)記載のポリヌクレオチドを含有してなる医薬、
- (17) 上記(8)記載のポリヌクレオチドを含有してなる診断薬、
- (18) 上記(1)記載のタンパク質もしくは上記(7)記載の部分ペプチドまたはその塩に対する抗体、
- (19) 上記(18)記載の抗体を含有してなる診断薬、
- (20) 上記(18)記載の抗体を含有してなる医薬、
- (21) 上記(8)記載のポリヌクレオチドの塩基配列に相補的もしくは実質的に相補的な塩基配列またはその一部を含有するポリヌクレオチド、
- (22) 上記(21)記載のポリヌクレオチドを含有してなる医薬、
- (23) 上記(1)記載のタンパク質もしくは上記(7)記載の部分ペプチドまたはその塩を用いることを特徴とする、上記(1)記載のタンパク質もしくは上記(7)記載の部分ペプチドまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法、
- (24) 上記(1)記載のタンパク質もしくは上記(7)記載の部分ペプチドまたはその塩を含有してなる、上記(1)記載のタンパク質もしくは上記(7)記載の部分ペプチドまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キット、
- (25) 上記(23)記載のスクリーニング方法または上記(24)記載のスクリーニング用キットを用いて得られる、上記(1)記載のタンパク質もしくは上記(7)記載の部分ペプチドまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩、
- (26) 上記(25)記載の化合物またはその塩を含有してなる医薬、
- (27) 上記(8)記載のポリヌクレオチドを用いることを特徴とする、上記(1)記載のタンパク質遺伝子の発現を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法、
- (28) 上記(8)記載のポリヌクレオチドを含有してなる、上記(1)記載のタンパク質遺伝子の発現を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キット、
- (29) 上記(27)記載のスクリーニング方法または上記(28)記載のスクリーニング用キットを用いて得られる、上記(1)記載のタンパク質遺伝子の発現を促進または阻害する化合物またはその塩、
- (30) 上記(29)記載の化合物またはその塩を含有してなる医薬、
- (31) 上記(18)記載の抗体を用いることを特徴とする上記(1)記載のタンパク質の定量方法、
- (32) 上記(31)記載の定量方法を用いることを特徴とする上記(1)記載のタンパク質の機能が関連する疾患の診断法、
- (33) 上記(18)記載の抗体を用いることを特徴とする、上記(1)記載のタンパク質の発現を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法、
- (34) 上記(18)記載の抗体を含有してなる、上記(1)記載のタンパク質の発現を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キット、
- (35) 上記(33)記載のスクリーニング方法または上記(34)記載のスクリーニング用キットを用いて得られる、上記(1)記載のタンパク質の発現を促進または阻害する化合物またはその塩、
- (36) 上記(35)記載の化合物またはその塩を含有してなる医薬、
- (37) 消化器疾患、生殖器疾患または呼吸器疾患の予防・治療剤である上記(15)

10

20

30

40

50

、(16)、(20)、(22)、(26)、(30)または(36)記載の医薬、
 (38) 消化器疾患、生殖器疾患または呼吸器疾患の診断薬である上記(17)または
 (19)記載の診断薬、
 (39) 哺乳動物に対して、上記(25)、(29)または(35)記載の化合物また
 はその塩の有効量を投与することを特徴とする消化器疾患、生殖器疾患または呼吸器疾患
 の予防・治療方法、
 (40) 消化器疾患、生殖器疾患または呼吸器疾患の予防・治療剤を製造するための上
 記(25)、(29)または(35)記載の化合物またはその塩の使用などを提供する。
 【0006】

【発明の実施の形態】

配列番号：1、配列番号：8、配列番号：11または配列番号：15で表されるアミノ酸
 配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質（以下、本発明の
 タンパク質または本発明で用いられるタンパク質と称することもある）は、ヒトや温血動
 物（例えば、モルモット、ラット、マウス、ニワトリ、ウサギ、ブタ、ヒツジ、ウシ、サル
 など）の細胞（例えば、肝細胞、脾細胞、神経細胞、グリア細胞、膵臓細胞、骨髄細胞、
 メサングウム細胞、ランゲルハンス細胞、表皮細胞、上皮細胞、杯細胞、内皮細胞、
 平滑筋細胞、繊維芽細胞、繊維細胞、筋細胞、脂肪細胞、免疫細胞（例、マクロファージ
 、T細胞、B細胞、ナチュラルキラー細胞、肥満細胞、好中球、好塩基球、好酸球、単球
 ）、巨核球、滑膜細胞、軟骨細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、乳腺細胞、肝細胞もし
 くは間質細胞、またはこれら細胞の前駆細胞、幹細胞もしくはガン細胞など）もしくはそ
 れらの細胞が存在するあらゆる組織、例えば、脳、脳の各部位（例、嗅球、扁桃核、大脳
 基底球、海馬、視床、視床下部、大脳皮質、延髄、小脳）、脊髄、下垂体、胃、膵臓、腎
 臓、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆のう、骨髄、副腎、皮膚、筋肉、肺、消化管（例、大腸、
 小腸）、血管、心臓、胸腺、脾臓、顎下腺、末梢血、前立腺、睪丸、卵巣、胎盤、子宮、
 骨、関節、骨格筋などに由来するタンパク質であってもよく、合成タンパク質であっても
 よい。

【0007】

配列番号：1で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、配列番号
 ：1で表わされるアミノ酸配列と例えば約75%以上、好ましくは約80%以上、好まし
 くは約85%以上、好ましくは約90%以上、好ましくは約95%以上の相同性を有する
 アミノ酸配列などが挙げられる。

配列番号：1で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク
 質としては、例えば、配列番号：1で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配
 列を含有し、配列番号：1で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質と実質的に同質
 の活性を有するタンパク質などが好ましい。

配列番号：8で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、配列番号
 ：8で表わされるアミノ酸配列と例えば約75%以上、好ましくは約80%以上、好まし
 くは約85%以上、好ましくは約90%以上、好ましくは約95%以上、好ましくは約9
 7%以上の相同性を有するアミノ酸配列などが挙げられる。

配列番号：8で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク
 質としては、例えば、配列番号：8で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配
 列を含有し、配列番号：8で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質と実質的に同質
 の活性を有するタンパク質などが好ましい。具体例としては、配列番号：18で表される
 アミノ酸配列を含有するタンパク質、配列番号：23で表されるアミノ酸配列を含有する
 タンパク質、配列番号：26で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質などが挙げら
 れる。

配列番号：11で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、配列番
 号：11で表わされるアミノ酸配列と例えば約75%以上、好ましくは約75%以上、好
 ましくは約80%以上、好ましくは約85%以上、好ましくは約90%以上、好ましくは
 約95%以上の相同性を有するアミノ酸配列などが挙げられる。

10

20

30

40

50

配列番号：11で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質としては、例えば、配列番号：11で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有し、配列番号：11で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質と実質的に同質の活性を有するタンパク質などが好ましい。配列番号：15で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、配列番号：15で表わされるアミノ酸配列と例えば約80%以上、好ましくは約85%以上、好ましくは約90%以上、好ましくは約95%以上の相同性を有するアミノ酸配列などが挙げられる。

配列番号：15で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質としては、例えば、配列番号：15で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有し、配列番号：15で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質と実質的に同質の活性を有するタンパク質などが好ましい。

実質的に同質の活性としては、例えば、 K^+ イオンの透過などが挙げられる。実質的に同質とは、それらの性質が性質的に(例、生理学的に、または薬理的に)同質であることを示す。したがって、 K^+ イオンの透過が同等(例、約0.01~100倍、好ましくは約0.1~10倍、より好ましくは0.5~2倍)であることが好ましいが、これらの活性の程度、タンパク質の分子量などの量的要素は異なってもよい。

K^+ イオンの透過の測定は、公知の方法に準じて行うことが出来、例えば、Receptors and Channels 6巻、337-350頁、1999年に記載の方法またはそれに準じる方法に従って測定することができる。

【0008】

また、本発明のタンパク質としては、例えば(1)(i)配列番号：1で表されるアミノ酸配列中の1または2個以上(例えば1~300個程度、好ましくは1~200個程度、好ましくは1~150個程度、好ましくは1~100個程度、好ましくは1~50個程度、好ましくは1~30個程度、好ましくは1~10個程度、さらに好ましくは数(1~5)個)のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、(ii)配列番号：1で表されるアミノ酸配列に1または2個以上(例えば1~300個程度、好ましくは1~200個程度、好ましくは1~150個程度、好ましくは1~100個程度、好ましくは1~50個程度、好ましくは1~30個程度、好ましくは1~10個程度、さらに好ましくは数(1~5)個)のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、(iii)配列番号：1で表されるアミノ酸配列に1または2個以上(例えば1~300個程度、好ましくは1~200個程度、好ましくは1~150個程度、好ましくは1~100個程度、好ましくは1~50個程度、好ましくは1~30個程度、好ましくは1~10個程度、さらに好ましくは数(1~5)個)のアミノ酸が挿入されたアミノ酸配列、(iv)配列番号：1で表されるアミノ酸配列中の1または2個以上(例えば1~300個程度、好ましくは1~200個程度、好ましくは1~150個程度、好ましくは1~100個程度、好ましくは1~50個程度、好ましくは1~30個程度、好ましくは1~10個程度、さらに好ましくは数(1~5)個)のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、または(v)それらを組み合わせたアミノ酸配列を含有するタンパク質などのいわゆるムテイン、

(2)(i)配列番号：8で表されるアミノ酸配列中の1または2個以上(例えば1~300個程度、好ましくは1~200個程度、好ましくは1~150個程度、好ましくは1~100個程度、好ましくは1~50個程度、好ましくは1~30個程度、好ましくは1~10個程度、さらに好ましくは数(1~5)個)のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、(ii)配列番号：8で表されるアミノ酸配列に1または2個以上(例えば1~300個程度、好ましくは1~200個程度、好ましくは1~150個程度、好ましくは1~100個程度、好ましくは1~50個程度、好ましくは1~30個程度、好ましくは1~10個程度、さらに好ましくは数(1~5)個)のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、(iii)配列番号：8で表されるアミノ酸配列に1または2個以上(例えば1~300個程度、好ましくは1~200個程度、好ましくは1~150個程度、好ましくは1~100個程度、好ましくは1~50個程度、好ましくは1~30個程度、好ましくは1~10個程度、さらに好ましくは数(1~5)個)のアミノ酸が挿入されたアミノ酸配列、(iv)

10

20

30

40

50

配列番号：8で表されるアミノ酸配列中の1または2個以上（例えば1～300個程度、好ましくは1～200個程度、好ましくは1～150個程度、好ましくは1～100個程度、好ましくは1～50個程度、好ましくは1～30個程度、好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数（1～5）個）のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、または（v）それらを組み合わせたアミノ酸配列を含有するタンパク質などのいわゆるムテイン、

（3）（i）配列番号：11で表されるアミノ酸配列中の1または2個以上（例えば1～300個程度、好ましくは1～200個程度、好ましくは1～150個程度、好ましくは1～100個程度、好ましくは1～50個程度、好ましくは1～30個程度、好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数（1～5）個）のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、

（ii）配列番号：11で表されるアミノ酸配列に1または2個以上（例えば1～300個程度、好ましくは1～200個程度、好ましくは1～150個程度、好ましくは1～100個程度、好ましくは1～50個程度、好ましくは1～30個程度、好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数（1～5）個）のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、

（iii）配列番号：11で表されるアミノ酸配列に1または2個以上（例えば1～300個程度、好ましくは1～200個程度、好ましくは1～150個程度、好ましくは1～100個程度、好ましくは1～50個程度、好ましくは1～30個程度、好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数（1～5）個）のアミノ酸が挿入されたアミノ酸配列、

（iv）配列番号：11で表されるアミノ酸配列中の1または2個以上（例えば1～300個程度、好ましくは1～200個程度、好ましくは1～150個程度、好ましくは1～100個程度、好ましくは1～50個程度、好ましくは1～30個程度、好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数（1～5）個）のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、または（v）それらを組み合わせたアミノ酸配列を含有するタンパク質などのいわゆるムテイン、

（4）（i）配列番号：15で表されるアミノ酸配列中の1または2個以上（例えば1～200個程度、好ましくは1～150個程度、好ましくは1～100個程度、好ましくは1～50個程度、好ましくは1～30個程度、好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数（1～5）個）のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、

（ii）配列番号：15で表されるアミノ酸配列に1または2個以上（例えば1～200個程度、好ましくは1～150個程度、好ましくは1～100個程度、好ましくは1～50個程度、好ましくは1～30個程度、好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数（1～5）個）のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、

（iii）配列番号：15で表されるアミノ酸配列に1または2個以上（例えば1～200個程度、好ましくは1～150個程度、好ましくは1～100個程度、好ましくは1～50個程度、好ましくは1～30個程度、好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数（1～5）個）のアミノ酸が挿入されたアミノ酸配列、

（iv）配列番号：15で表されるアミノ酸配列中の1または2個以上（例えば1～200個程度、好ましくは1～150個程度、好ましくは1～100個程度、好ましくは1～50個程度、好ましくは1～30個程度、好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数（1～5）個）のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、または（v）それらを組み合わせたアミノ酸配列を含有するタンパク質などのいわゆるムテインも含まれる。上記のようにアミノ酸配列が挿入、欠失または置換されている場合、その挿入、欠失または置換の位置は、とくに限定されない。

【0009】

本明細書におけるタンパク質は、ペプチド標記の慣例に従って左端がN末端（アミノ末端）、右端がC末端（カルボキシル末端）である。配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を含有するタンパク質をはじめとする、本発明のタンパク質は、C末端がカルボキシル基（-COOH）、カルボキシレート（-COO⁻）、アミド（-CONH₂）またはエステル（-COOR）のいずれであってもよい。

ここでエステルにおけるRとしては、例えば、メチル、エチル、n-プロピル、イソプロピル、n-ブチルなどのC₁₋₆アルキル基、例えば、シクロペンチル、シクロヘキシル

10

20

30

40

50

などの $C_3 - 8$ シクロアルキル基、例えば、フェニル、 $-$ ナフチルなどの $C_6 - 12$ アリール基、例えば、ベンジル、フェネチルなどのフェニル- $C_1 - 2$ アルキル基もしくは $-$ ナフチルメチルなどの $-$ ナフチル- $C_1 - 2$ アルキル基などの $C_7 - 14$ アラルキル基、ピバロイルオキシメチル基などが用いられる。

本発明のタンパク質がC末端以外にカルボキシル基（またはカルボキシレート）を有している場合、カルボキシル基がアミド化またはエステル化されているものも本発明で用いられるタンパク質に含まれる。この場合のエステルとしては、例えば上記したC末端のエステルなどが用いられる。

さらに、本発明のタンパク質には、N末端のアミノ酸残基（例、メチオニン残基）のアミノ基が保護基（例えば、ホルミル基、アセチル基などの $C_1 - 6$ アルカノイルなどの $C_1 - 6$ アシル基など）で保護されているもの、生体内で切断されて生成するN末端のグルタミン残基がピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基（例えば $-OH$ 、 $-SH$ 、アミノ基、イミダゾール基、インドール基、グアニジノ基など）が適当な保護基（例えば、ホルミル基、アセチル基などの $C_1 - 6$ アルカノイル基などの $C_1 - 6$ アシル基など）で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖タンパク質などの複合タンパク質なども含まれる。

本発明のタンパク質の具体例としては、例えば、配列番号：1で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質、配列番号：8で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質、配列番号：11で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質、配列番号：15で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質、配列番号：18で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質、配列番号：23で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質、配列番号：26で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質などがあげられる。

【0010】

本発明で用いられるタンパク質の部分ペプチドとしては、前記した本発明のタンパク質の部分ペプチドであって、好ましくは、前記した本発明のタンパク質と同様の性質を有するものであればいずれのものでもよい。

例えば、本発明で用いられるタンパク質の構成アミノ酸配列のうち少なくとも20個以上、好ましくは50個以上、さらに好ましくは70個以上、より好ましくは100個以上、最も好ましくは200個以上のアミノ酸配列を有するペプチドなどが用いられる。

また、本発明で用いられる部分ペプチドは、そのアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1~10個程度、さらに好ましくは数（1~5）個）のアミノ酸が欠失し、または、そのアミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは、1~20個程度、より好ましくは1~10個程度、さらに好ましくは数（1~5）個）のアミノ酸が付加し、または、そのアミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは、1~20個程度、より好ましくは1~10個程度、さらに好ましくは数（1~5）個）のアミノ酸が挿入され、または、そのアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1~10個程度、より好ましくは数個、さらに好ましくは1~5個程度）のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されていてもよい。

本発明の部分ペプチドとしては、例えば配列番号：1で表されるアミノ酸配列において例えば第1~63番目、第84~103または第271~1118番目のアミノ酸配列を有するペプチド、配列番号：8で表されるアミノ酸配列において例えば第1~63番目、第84~103または第271~1111番目のアミノ酸配列を有するペプチド、配列番号：11で表されるアミノ酸配列において例えば第1~63番目、第84~103または第271~1061番目のアミノ酸配列を有するペプチド、配列番号：15で表されるアミノ酸配列において例えば第1~63番目、第84~103または第271~759番目のアミノ酸配列を有するペプチド、配列番号：18で表されるアミノ酸配列において例えば第1~63番目、第84~103または第271~1,135番目のアミノ酸配列を有するペプチド、配列番号：23で表されるアミノ酸配列において例えば第1~63番目、第84~103または第271~1,142番目のアミノ酸配列を有するペプチド、配列番号：26で表されるアミノ酸配列において例えば第1~63番目、第84~103または第271~1,111番目のアミノ酸配列を有するペプチドなどがあげられる。

10

20

30

40

50

【0011】

また、本発明で用いられる部分ペプチドはC末端がカルボキシル基(-COOH)、カルボキシレート(-COO⁻)、アミド(-CONH₂)またはエステル(-COOR)の何れであってもよい。

さらに、本発明で用いられる部分ペプチドには、前記した本発明で用いられるタンパク質と同様に、C末端以外にカルボキシル基(またはカルボキシレート)を有しているもの、N末端のアミノ酸残基(例、メチオニン残基)のアミノ基が保護基で保護されているもの、N端側が生体内で切断され生成したグルタミン残基がピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基が適当な保護基で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖ペプチドなどの複合ペプチドなども含まれる。

本発明で用いられる部分ペプチドは抗体作成のための抗原としても用いることができる。たとえば、後述する本発明の抗体を調製する目的には、例えば配列番号：1で表されるアミノ酸配列において第22～35番目、第84～103番目、第282～302番目、第656～673番目のアミノ酸配列を有するペプチド、配列番号：8で表されるアミノ酸配列において第22～35番目、第84～103番目、第282～302番目または第649～666番目のアミノ酸配列を有するペプチド、配列番号：11で表されるアミノ酸配列において第22～35番目、第84～103番目、第282～302番目または第599～616番目のアミノ酸配列を有するペプチド、配列番号：15で表されるアミノ酸配列において第22～35番目、第84～103番目、第282～302番目または第649～666番目のアミノ酸配列を有するペプチド、配列番号：18で表されるアミノ酸配列において第22～35番目、第84～103番目、第282～302番目または第649～666番目のアミノ酸配列を有するペプチド、配列番号：23で表されるアミノ酸配列において第22～35番目、第84～103番目、第282～302番目または第649～666番目のアミノ酸配列を有するペプチド、配列番号：26で表されるアミノ酸配列において第22～35番目、第84～103番目、第282～302番目または第649～666番目のアミノ酸配列を有するペプチドなどがあげられる。

【0012】

本発明のタンパク質または部分ペプチドの塩としては、生理学的に許容される酸(例、無機酸、有機酸)や塩基(例、アルカリ金属塩)などとの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。このような塩としては、例えば、無機酸(例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸)との塩、あるいは有機酸(例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸)との塩などが用いられる。

本発明のタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩は、前述したヒトや温血動物の細胞または組織から公知のタンパク質の精製方法によって製造することもできるし、タンパク質をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによっても製造することができる。また、後述のペプチド合成法に準じて製造することもできる。

ヒトや哺乳動物の組織または細胞から製造する場合、ヒトや哺乳動物の組織または細胞をホモジナイズした後、酸などで抽出を行ない、該抽出液を逆相クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーなどのクロマトグラフィーを組み合わせることにより精製単離することができる。

【0013】

本発明のタンパク質もしくは部分ペプチドまたはその塩、またはそのアミド体の合成には、通常市販のタンパク質合成用樹脂を用いることができる。そのような樹脂としては、例えば、クロロメチル樹脂、ヒドロキシメチル樹脂、ベンズヒドリルアミン樹脂、アミノメチル樹脂、4-ベンジルオキシベンジルアルコール樹脂、4-メチルベンズヒドリルアミン樹脂、PAM樹脂、4-ヒドロキシメチルメチルフェニルアセトアミドメチル樹脂、ポリアクリルアミド樹脂、4-(2',4'-ジメトキシフェニル-ヒドロキシメチル)フェノキシ樹脂、4-(2',4'-ジメトキシフェニル-Fmocアミノエチル)フェノキシ樹脂などを挙げるることができる。このような樹脂を用い、-アミノ基と側鎖官能基

10

20

30

40

50

を適当に保護したアミノ酸を、目的とするタンパク質の配列通りに、公知の各種縮合方法に従い、樹脂上で縮合させる。反応の最後に樹脂からタンパク質または部分ペプチドを切り出すと同時に各種保護基を除去し、さらに高希釈溶液中で分子内ジスルフィド結合形成反応を実施し、目的のタンパク質もしくは部分ペプチドまたはそれらのアミド体を取得する。

上記した保護アミノ酸の縮合に関しては、タンパク質合成に使用できる各種活性化試薬を用いることができるが、特に、カルボジイミド類がよい。カルボジイミド類としては、DCC、N,N'-ジイソプロピルカルボジイミド、N-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロリル)カルボジイミドなどが用いられる。これらによる活性化にはラセミ化抑制添加剤(例えば、HOBT, HOOBT)とともに保護アミノ酸を直接樹脂に添加するかまたは、対称酸無水物またはHOBTエステルあるいはHOOBTエステルとしてあらかじめ保護アミノ酸の活性化を行なった後に樹脂に添加することができる。

【0014】

保護アミノ酸の活性化や樹脂との縮合に用いられる溶媒としては、タンパク質縮合反応に使用しうることが知られている溶媒から適宜選択されうる。例えば、N,N-ジメチルホルムアミド、N,N-ジメチルアセトアミド、N-メチルピロリドンなどの酸アミド類、塩化メチレン、クロロホルムなどのハロゲン化炭化水素類、トリフルオロエタノールなどのアルコール類、ジメチルスルホキシドなどのスルホキシド類、ピリジン、ジオキサン、テトラヒドロフランなどのエーテル類、アセトニトリル、プロピオニトリルなどのニトリル類、酢酸メチル、酢酸エチルなどのエステル類あるいはこれらの適宜の混合物などが用いられる。反応温度はタンパク質結合形成反応に使用され得ることが知られている範囲から適宜選択され、通常約-20 ~ 50の範囲から適宜選択される。活性化されたアミノ酸誘導体は通常1.5 ~ 4倍過剰で用いられる。ニンヒドリン反応を用いたテストの結果、縮合が不十分な場合には保護基の脱離を行なうことなく縮合反応を繰り返すことにより十分な縮合を行なうことができる。反応を繰り返しても十分な縮合が得られないときには、無水酢酸またはアセチルイミダゾールを用いて未反応アミノ酸をアセチル化することによって、後の反応に影響を与えないようにすることができる。

【0015】

原料のアミノ基の保護基としては、例えば、Z、Boc、t-ペンチルオキシカルボニル、イソボルニルオキシカルボニル、4-メトキシベンジルオキシカルボニル、Cl-Z、Br-Z、アダマンチルオキシカルボニル、トリフルオロアセチル、フタロイル、ホルミル、2-ニトロフェニルスルフェニル、ジフェニルホスフィノチオイル、Fmocなどが用いられる。

カルボキシル基は、例えば、アルキルエステル化(例えば、メチル、エチル、プロピル、ブチル、t-ブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、シクロオクチル、2-アダマンチルなどの直鎖状、分枝状もしくは環状アルキルエステル化)、アラキルエステル化(例えば、ベンジルエステル、4-ニトロベンジルエステル、4-メトキシベンジルエステル、4-クロロベンジルエステル、ベンズヒドリルエステル化)、フェナシルエステル化、ベンジルオキシカルボニルヒドラジド化、t-ブトキシカルボニルヒドラジド化、トリチルヒドラジド化などによって保護することができる。

セリンの水酸基は、例えば、エステル化またはエーテル化によって保護することができる。このエステル化に適する基としては、例えば、アセチル基などの低級(C₁₋₆)アルカノイル基、ベンゾイル基などのアロイル基、ベンジルオキシカルボニル基、エトキシカルボニル基などの炭酸から誘導される基などが用いられる。また、エーテル化に適する基としては、例えば、ベンジル基、テトラヒドロピラニル基、t-ブチル基などである。

チロシンのフェノール性水酸基の保護基としては、例えば、Bzl、Cl₂-Bzl、2-ニトロベンジル、Br-Z、t-ブチルなどが用いられる。

ヒスチジンのイミダゾールの保護基としては、例えば、Tos、4-メトキシ-2,3,6-トリメチルベンゼンスルホニル、DNP、ベンジルオキシメチル、Bum、Boc、Trt、Fmocなどが用いられる。

10

20

30

40

50

【0016】

原料のカルボキシル基の活性化されたものとしては、例えば、対応する酸無水物、アジド、活性エステル〔アルコール（例えば、ペンタクロロフェノール、2, 4, 5 - トリクロロフェノール、2, 4 - ジニトロフェノール、シアノメチルアルコール、パラニトロフェノール、HONB、N - ヒドロキシスクシミド、N - ヒドロキシフタルイミド、HOBt）とのエステル〕などが用いられる。原料のアミノ基の活性化されたものとしては、例えば、対応するリン酸アミドが用いられる。

保護基の除去（脱離）方法としては、例えば、Pd - 黒あるいはPd - 炭素などの触媒の存在下での水素気流中での接触還元や、また、無水フッ化水素、メタンスルホン酸、トリフルオロメタンスルホン酸、トリフルオロ酢酸あるいはこれらの混合液などによる酸処理や、ジイソプロピルエチルアミン、トリエチルアミン、ピペリジン、ピペラジンなどによる塩基処理、また液体アンモニア中ナトリウムによる還元なども用いられる。上記酸処理による脱離反応は、一般に約 - 20 ~ 40 の温度で行なわれるが、酸処理においては、例えば、アニソール、フェノール、チオアニソール、メタクレゾール、パラクレゾール、ジメチルスルフィド、1, 4 - ブタンジチオール、1, 2 - エタンジチオールなどのようなりガンド作動性カチオン捕捉剤の添加が有効である。また、ヒスチジンのイミダゾール保護基として用いられる2, 4 - ジニトロフェニル基はチオフェノール処理により除去され、トリプトファンのインドール保護基として用いられるホルミル基は上記の1, 2 - エタンジチオール、1, 4 - ブタンジチオールなどの存在下の酸処理による脱保護以外に、希水酸化ナトリウム溶液、希アンモニアなどによるアルカリ処理によっても除去される。

10

20

【0017】

原料の反応に関与すべきでない官能基の保護ならびに保護基、およびその保護基の脱離、反応に関与する官能基の活性化などは公知の基または公知の手段から適宜選択しうる。タンパク質または部分ペプチドのアミド体を得る別の方法としては、例えば、まず、カルボキシ末端アミノ酸の - カルボキシル基をアミド化して保護した後、アミノ基側にペプチド（タンパク質）鎖を所望の鎖長まで延ばした後、該ペプチド鎖のN末端の - アミノ基の保護基のみを除いたタンパク質または部分ペプチドとC末端のカルボキシル基の保護基のみを除去したタンパク質または部分ペプチドとを製造し、これらのタンパク質またはペプチドを上記したような混合溶媒中で縮合させる。縮合反応の詳細については上記と同様である。縮合により得られた保護タンパク質またはペプチドを精製した後、上記方法によりすべての保護基を除去し、所望の粗タンパク質またはペプチドを得ることができる。この粗タンパク質またはペプチドは既知の各種精製手段を駆使して精製し、主要画分を凍結乾燥することで所望のタンパク質またはペプチドのアミド体を得ることができる。タンパク質またはペプチドのエステル体を得るには、例えば、カルボキシ末端アミノ酸の - カルボキシル基を所望のアルコール類と縮合しアミノ酸エステルとした後、タンパク質またはペプチドのアミド体と同様にして、所望のタンパク質またはペプチドのエステル体を得ることができる。

30

【0018】

本発明で用いられる部分ペプチドまたはそれらの塩は、公知のペプチドの合成法に従って、あるいは本発明で用いられるタンパク質を適当なペプチダーゼで切断することによって製造することができる。ペプチドの合成法としては、例えば、固相合成法、液相合成法のいずれによっても良い。すなわち、本発明で用いられる部分ペプチドを構成し得る部分ペプチドもしくはアミノ酸と残余部分とを縮合させ、生成物が保護基を有する場合は保護基を脱離することにより目的のペプチドを製造することができる。公知の縮合方法や保護基の脱離としては、例えば、以下の(a) ~ (e)に記載された方法が挙げられる。

40

(a) M. Bodanszky および M. A. Ondetti、ペプチド・シンセシス (Peptide Synthesis), Interscience Publishers, New York (1966年)

(b) Schroeder および Luebke、ザ・ペプチド (The Peptide

50

-), Academic Press, New York (1965年)
 (c) 泉屋信夫他、ペプチド合成の基礎と実験、丸善(株) (1975年)
 (d) 矢島治明 および榊原俊平、生化学実験講座 1、タンパク質の化学IV、205、(1977年)
 (e) 矢島治明監修、続医薬品の開発、第14巻、ペプチド合成、広川書店

また、反応後は通常の前記した精製法、例えば、溶媒抽出・蒸留・カラムクロマトグラフィー・液体クロマトグラフィー・再結晶などを組み合わせて本発明で用いられる部分ペプチドを精製単離することができる。上記方法で得られる部分ペプチドが遊離体である場合は、公知の方法あるいはそれに準じる方法によって適当な塩に変換することができるし、逆に塩で得られた場合は、公知の方法あるいはそれに準じる方法によって遊離体または他の塩に変換することができる。

【0019】

本発明のタンパク質をコードするポリヌクレオチドとしては、前述した本発明のタンパク質をコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。好ましくはDNAである。DNAとしては、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、前記した細胞・組織由来のcDNA、前記した細胞・組織由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。

ライブラリーに使用するベクターは、バクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってもよい。また、前記した細胞・組織よりtotal RNAまたはmRNA画分を調製したものをを用いて直接Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction(以下、RT-PCR法と略称する)によって増幅することもできる。

本発明のタンパク質をコードするDNAとしては、例えば、(1)(i)配列番号：2で表される塩基配列を含有するDNA、または配列番号：2で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、配列番号：1で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質と実質的に同質の性質を有するタンパク質をコードするDNA、(ii)配列番号：7で表される塩基配列を含有するDNA、または配列番号：7で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、配列番号：1で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質と実質的に同質の性質を有するタンパク質をコードするDNA、(2)(i)配列番号：9で表される塩基配列を含有するDNA、または配列番号：9で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、配列番号：8で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質と実質的に同質の性質を有するタンパク質をコードするDNA、(ii)配列番号：10で表される塩基配列を含有するDNA、または配列番号：10で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、配列番号：8で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質と実質的に同質の性質を有するタンパク質をコードするDNA、(3)(i)配列番号：12で表される塩基配列を含有するDNA、または配列番号：12で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、配列番号：11で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質と実質的に同質の性質を有するタンパク質をコードするDNA、(ii)配列番号：13で表される塩基配列を含有するDNA、または配列番号：13で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、配列番号：11で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質と実質的に同質の性質を有するタンパク質をコードするDNA、(4)(i)配列番号：16で表される塩基配列を含有するDNA、または配列番号：16で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、配列番号：15で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質と実質的に同質の性質を有するタンパク質をコードするDNA、(ii)配列番号：17で表される塩基配列を含有するDNA、または配列番号：17で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、配列番号：15で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質と実質的に同質の性質を有するタンパク質を

10

20

30

40

50

コードするDNAであれば何れのものでもよい。

【0020】

配列番号：2または配列番号：7で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズできるDNAとしては、例えば、配列番号：2または配列番号：7で表される塩基配列と例えば約55%以上、好ましくは約60%以上、好ましくは約65%以上、好ましくは約70%以上、好ましくは約75%以上、好ましくは約80%以上、好ましくは約85%以上、好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の同一性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

配列番号：9または配列番号：10で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズできるDNAとしては、例えば、配列番号：9または配列番号：10で表される塩基配列と例えば約65%以上、好ましくは約70%以上、好ましくは約75%以上、好ましくは約80%以上、好ましくは約85%以上、好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の同一性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。具体的には、配列番号：19で表される塩基配列を含有するDNA、配列番号：24で表される塩基配列を含有するDNA、配列番号：27で表される塩基配列を含有するDNAなどが挙げられる。

配列番号：12または配列番号：13で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズできるDNAとしては、例えば、配列番号：12または配列番号：13で表される塩基配列と例えば約60%以上、好ましくは約65%以上、好ましくは約70%以上、好ましくは約75%以上、好ましくは約80%以上、好ましくは約85%以上、好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の同一性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

配列番号：16または配列番号：17で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズできるDNAとしては、例えば、配列番号：16または配列番号：17で表される塩基配列と例えば60%以上、好ましくは約65%以上、好ましくは約70%以上、好ましくは約75%以上、好ましくは約80%以上、好ましくは約85%以上、好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の同一性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

ハイブリダイゼーションは、公知の方法あるいはそれに準じる方法、例えば、モレキュラー・クローニング (Molecular Cloning) 2nd (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。より好ましくは、ハイストリンジェントな条件に従って行なうことができる。

ハイストリンジェントな条件とは、例えば、ナトリウム濃度が約19~40mM、好ましくは約19~20mMで、温度が約50~70、好ましくは約60~65の条件を示す。特に、ナトリウム濃度が約19mMで温度が約65の場合が最も好ましい。

より具体的には、配列番号：1で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質をコードするDNAとしては、配列番号：2で表される塩基配列を含有するDNA、または配列番号：7で表される塩基配列を含有するDNAなどが、配列番号：8で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質をコードするDNAとしては、配列番号：9で表される塩基配列を含有するDNA、または配列番号：10で表される塩基配列を含有するDNAなどが、配列番号：11で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質をコードするDNAとしては、配列番号：12で表される塩基配列を含有するDNA、または配列番号：13で表される塩基配列を含有するDNAなどが、配列番号：15で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質をコードするDNAとしては、配列番号：16で表される塩基配列を含有するDNA、または配列番号：17で表される塩基配列を含有するDNAなどが、配列番号：18で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質をコードするDNAとしては、配列番号：19で表される塩基配列を含有するDNAまたは配列番号：22で表される塩基配列を含有するDNAなどが、配列番号：23で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質

10

20

30

40

50

をコードするDNAとしては、配列番号：24で表される塩基配列を含有するDNAまたは配列番号：25で表される塩基配列を含有するDNAなどが、配列番号：26で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質をコードするDNAとしては、配列番号：27で表される塩基配列を含有するDNAまたは配列番号：28で表される塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

【0021】

本発明で用いられる部分ペプチドをコードするDNAとしては、前述した本発明で用いられる部分ペプチドをコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。また、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、前記した細胞・組織由来のcDNA、前記した細胞・組織由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。本発明で用いられる部分ペプチドをコードするDNAとしては、例えば、配列番号：2または配列番号：7で表される塩基配列を有するDNAの一部分を有するDNA、または配列番号：2または配列番号：7で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を含有し、配列番号：1で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質と実質的に同質の活性を有するタンパク質をコードするDNAの一部分を含有するDNA、配列番号：9または配列番号：10で表される塩基配列を有するDNAの一部分を有するDNA、または配列番号：9または配列番号：10で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を含有し、配列番号：8で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質と実質的に同質の活性を有するタンパク質をコードするDNAの一部分を含有するDNA、配列番号：12または配列番号：13で表される塩基配列を有するDNAの一部分を有するDNA、または配列番号：12または配列番号：13で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を含有し、配列番号：11で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質と実質的に同質の活性を有するタンパク質をコードするDNAの一部分を含有するDNA、配列番号：16または配列番号：17で表される塩基配列を有するDNAの一部分を有するDNA、または配列番号：16または配列番号：17で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を含有し、配列番号：15で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質と実質的に同質の活性を有するタンパク質をコードするDNAの一部分を含有するDNAなどが用いられる。

配列番号：2または配列番号：15で表される塩基配列とハイブリダイズできるDNA、配列番号：9または配列番号：10で表される塩基配列とハイブリダイズできるDNA、配列番号：12または配列番号：13で表される塩基配列とハイブリダイズできるDNA、配列番号：16または配列番号：17で表される塩基配列とハイブリダイズできるDNAは前記と同意義を示す。

ハイブリダイゼーションの方法およびハイストリンジェントな条件は前記と同様のものが用いられる。

【0022】

本発明のタンパク質、部分ペプチド（以下、これらをコードするDNAのクローニングおよび発現の説明においては、これらを単に本発明のタンパク質と略記する場合がある）を完全にコードするDNAのクローニングの手段としては、本発明のタンパク質をコードする塩基配列の一部分を有する合成DNAプライマーを用いてPCR法によって増幅するか、または適当なベクターに組み込んだDNAを本発明のタンパク質の一部あるいは全領域をコードするDNA断片もしくは合成DNAを用いて標識したものとハイブリダイゼーションによって選別することができる。ハイブリダイゼーションの方法は、例えば、モレキュラー・クローニング（Molecular Cloning）2nd（J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989）に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。DNAの塩基配列の変換は、PCRや公知のキット、例えば、MutantTM-super Express Km（宝酒造（株））、MutantTM-K（宝酒造（株））等を

用いて、ODA-LA PCR法やGapped duplex法やKunkel法等の公知の方法あるいはそれらに準じる方法に従って行なうことができる。

クローン化されたタンパク質をコードするDNAは目的によりそのまま、または所望により制限酵素で消化したり、リンカーを付加したりして使用することができる。該DNAはその5'末端側に翻訳開始コドンとしてのATGを有し、また3'末端側には翻訳終止コドンとしてのTAA、TGAまたはTAGを有していてもよい。これらの翻訳開始コドンや翻訳終止コドンは、適当な合成DNAアダプターを用いて付加することもできる。

本発明のタンパク質の発現ベクターは、例えば、(イ)本発明のタンパク質をコードするDNAから目的とするDNA断片を切り出し、(ロ)該DNA断片を適当な発現ベクター中のプロモーターの下流に連結することにより製造することができる。

10

【0023】

ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド(例、pBR322, pBR325, pUC12, pUC13)、枯草菌由来のプラスミド(例、pUB110, pTP5, pC194)、酵母由来プラスミド(例、pSH19, pSH15)、ファージなどのバクテリオファージ、レトロウイルス、ワクシニアウイルス、バキュロウイルスなどの動物ウイルスなどの他、pA1-11、pXT1、pRc/CMV、pRc/RSV、pcDNAI/Neoなどが用いられる。

本発明で用いられるプロモーターとしては、遺伝子の発現に用いる宿主に対応して適切なプロモーターであればいかなるものでもよい。例えば、動物細胞を宿主として用いる場合は、SRプロモーター、SV40プロモーター、LTRプロモーター、CMVプロモーター、HSV-TKプロモーターなどが挙げられる。

20

これらのうち、CMV(サイトメガロウイルス)プロモーター、SRプロモーターなどを用いるのが好ましい。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、trpプロモーター、lacプロモーター、recAプロモーター、PLプロモーター、lppプロモーター、T7プロモーターなどが、宿主がバチルス属菌である場合は、SPO1プロモーター、SPO2プロモーター、penPプロモーターなど、宿主が酵母である場合は、PHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーターなどが好ましい。宿主が昆虫細胞である場合は、ポリヘドリンプロモーター、P10プロモーターなどが好ましい。

【0024】

発現ベクターには、以上の他に、所望によりエンハンサー、スプライシングシグナル、ポリA付加シグナル、選択マーカー、SV40複製オリジン(以下、SV40oriと略称する場合がある)などを含有しているものを用いることができる。選択マーカーとしては、例えば、ジヒドロ葉酸還元酵素(以下、dhfrと略称する場合がある)遺伝子〔メソトレキセート(MTX)耐性〕、アンピシリン耐性遺伝子(以下、Amp^rと略称する場合がある)、ネオマイシン耐性遺伝子(以下、Neo^rと略称する場合がある、G418耐性)等が挙げられる。特に、dhfr遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞を用いてdhfr遺伝子を選択マーカーとして使用する場合、目的遺伝子をチミジンを含まない培地によっても選択できる。

30

また、必要に応じて、宿主に合ったシグナル配列を、本発明のタンパク質のN末端側に付加する。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、PhoA・シグナル配列、OmpA・シグナル配列などが、宿主がバチルス属菌である場合は、-アミラーゼ・シグナル配列、サブチリシン・シグナル配列などが、宿主が酵母である場合は、MF^r・シグナル配列、SUC2・シグナル配列など、宿主が動物細胞である場合には、インシュリン・シグナル配列、-インターフェロン・シグナル配列、抗体分子・シグナル配列などがそれぞれ利用できる。

40

このようにして構築された本発明のタンパク質をコードするDNAを含有するベクターを用いて、形質転換体を製造することができる。

【0025】

宿主としては、例えば、エシェリヒア属菌、バチルス属菌、酵母、昆虫細胞、昆虫、動物

50

細胞などが用いられる。

エシェリヒア属菌の具体例としては、例えば、エシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) K12・DH1〔プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 60巻, 160 (1968)〕, JM103〔ヌクレック・アシズ・リサーチ (Nucleic Acids Research), 9巻, 309 (1981)〕, JA221〔ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー (Journal of Molecular Biology), 120巻, 517 (1978)〕, HB101〔ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー, 41巻, 459 (1969)〕, C600〔ジェネティクス (Genetics), 39巻, 440 (1954)〕などが用いられる。 10

バチルス属菌としては、例えば、バチルス・サブチルス (*Bacillus subtilis*) MI114〔ジーン, 24巻, 255 (1983)〕, 207-21〔ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (Journal of Biochemistry), 95巻, 87 (1984)〕などが用いられる。

酵母としては、例えば、サッカロマイセス セレビスイエ (*Saccharomyces cerevisiae*) AH22, AH22R⁻, NA87-11A, DKD-5D, 20B-12、シゾサッカロマイセス ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*) NCYC1913, NCYC2036、ピキア パストリス (*Pichia pastoris*) KM71などが用いられる。 20

【0026】

昆虫細胞としては、例えば、ウイルスがAcNPVの場合は、夜盗蛾の幼虫由来株化細胞 (*Spodoptera frugiperda* cell; Sf細胞)、*Trichoplusia ni*の中腸由来のMG1細胞、*Trichoplusia ni*の卵由来のHigh Five^{T^M}細胞、*Mamestra brassicae*由来の細胞または*Estigmena acrea*由来の細胞などが用いられる。ウイルスがBmNPVの場合は、蚕由来株化細胞 (*Bombyx mori* N細胞; BmN細胞)などが用いられる。該Sf細胞としては、例えば、Sf9細胞 (ATCC CRL1711)、Sf21細胞 (以上、Vaughn, J. L.ら、イン・ヴィボ (In Vivo), 13, 213-217, (1977))などが用いられる。 30

昆虫としては、例えば、カイコの幼虫などが用いられる〔前田ら、ネイチャー (Nature), 315巻, 592 (1985)〕。

動物細胞としては、例えば、サル細胞COS-7, Ver0, チャイニーズハムスター細胞CHO (以下、CHO細胞と略記), dhfr遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞CHO (以下、CHO (dhfr⁻)細胞と略記), マウスL細胞, マウスAtT-20, マウスミエローマ細胞, ラットGH3, ヒトFL細胞などが用いられる。

エシェリヒア属菌を形質転換するには、例えば、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 69巻, 2110 (1972)やジーン (Gene), 17巻, 107 (1982)などに記載の方法に従って行なうことができる。 40

【0027】

バチルス属菌を形質転換するには、例えば、モレキュラー・アンド・ジェネラル・ジェネティクス (Molecular & General Genetics), 168巻, 111 (1979)などに記載の方法に従って行なうことができる。

酵母を形質転換するには、例えば、メソズ・イン・エンザイモロジー (Methods in Enzymology), 194巻, 182-187 (1991)、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 75巻, 1929 (1978)などに記載の方法に従って行なうことができる。

昆虫細胞または昆虫を形質転換するには、例えば、バイオテクノロジー (Bio/Te 50

chnology), 6, 47-55 (1988)などに記載の方法に従って行なうことができる。

動物細胞を形質転換するには、例えば、細胞工学別冊8 新細胞工学実験プロトコール・263-267(1995)(秀潤社発行)、ウイルス学(Virology), 52巻, 456(1973)に記載の方法に従って行なうことができる。このようにして、タンパク質をコードするDNAを含有する発現ベクターで形質転換された形質転換体を得ることができる。

宿主がエシェリヒア属菌、バチルス属菌である形質転換体を培養する際、培養に使用される培地としては液体培地が適当であり、その中には該形質転換体の生育に必要な炭素源、窒素源、無機物その他が含有せしめられる。炭素源としては、例えば、グルコース、デキストリン、可溶性澱粉、ショ糖など、窒素源としては、例えば、アンモニウム塩類、硝酸塩類、コーンステープ・リカー、ペプトン、カゼイン、肉エキス、大豆粕、バレイショ抽出液などの無機または有機物質、無機物としては、例えば、塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウムなどが挙げられる。また、酵母エキス、ビタミン類、生長促進因子などを添加してもよい。培地のpHは約5~8が望ましい。

【0028】

エシェリヒア属菌を培養する際の培地としては、例えば、グルコース、カザミノ酸を含むM9培地〔ミラー(Miller), ジャーナル・オブ・エクスペリメンツ・イン・モレキュラー・ジェネティクス(Journal of Experiments in Molecular Genetics), 431-433, Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1972〕が好ましい。ここに必要によりプロモーターを効率よく働かせるために、例えば、3-インドリルアクリル酸のような薬剤を加えることができる。宿主がエシェリヒア属菌の場合、培養は通常約15~43で約3~24時間行ない、必要により、通気や攪拌を加えることもできる。

宿主がバチルス属菌の場合、培養は通常約30~40で約6~24時間行ない、必要により通気や攪拌を加えることもできる。

宿主が酵母である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、バークホルダー(Burkholder)最小培地〔Bostian, K. L. ら、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー(Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 77巻, 4505(1980)〕や0.5%カザミノ酸を含有するSD培地〔Bitter, G. A. ら、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー(Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 81巻, 5330(1984)〕が挙げられる。培地のpHは約5~8に調整するのが好ましい。培養は通常約20~35で約24~72時間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

宿主が昆虫細胞または昆虫である形質転換体を培養する際、培地としては、Grace's Insect Medium(Grace, T.C.C., ネイチャー(Nature), 195, 788(1962))に非動化した10%ウシ血清等の添加物を適宜加えたものなどが用いられる。培地のpHは約6.2~6.4に調整するのが好ましい。培養は通常約27で約3~5日間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

宿主が動物細胞である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、約5~20%の胎児牛血清を含むMEM培地〔サイエンス(Science), 122巻, 501(1952)〕, DMEM培地〔ウイルス学(Virology), 8巻, 396(1959)〕, RPMI 1640培地〔ジャーナル・オブ・ザ・アメリカン・メディカル・アソシエーション(The Journal of the American Medical Association) 199巻, 519(1967)〕, 199培地〔プロシーディング・オブ・ザ・ソサイエティ・フォー・ザ・バイオリジカル・メディスン(Proceeding of the Society for the Biologica

10

20

30

40

50

1 Medicine), 73巻, 1(1950)]などが用いられる。pHは約6~8であるのが好ましい。培養は通常約30~40で約15~60時間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

以上のようにして、形質転換体の細胞内、細胞膜または細胞外に本発明のタンパク質を生成せしめることができる。

【0029】

上記培養物から本発明のタンパク質を分離精製するには、例えば、下記の方法により行なうことができる。

本発明のタンパク質を培養菌体あるいは細胞から抽出するに際しては、培養後、公知の方法で菌体あるいは細胞を集め、これを適当な緩衝液に懸濁し、超音波、リゾチームおよび/または凍結融解などによって菌体あるいは細胞を破壊したのち、遠心分離やろ過によりタンパク質の粗抽出液を得る方法などが適宜用いられる。緩衝液の中に尿素や塩酸グアニジンなどのタンパク質変性剤や、トリトンX-100^{T M}などの界面活性剤が含まれていてもよい。培養液中にタンパク質が分泌される場合には、培養終了後、公知の方法で菌体あるいは細胞と上清とを分離し、上清を集める。

このようにして得られた培養上清、あるいは抽出液中に含まれるタンパク質の精製は、公知の分離・精製法を適切に組み合わせて行なうことができる。これらの公知の分離、精製法としては、塩析や溶媒沈澱法などの溶解度を利用する方法、透析法、限外ろ過法、ゲルろ過法、およびSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法などの主として分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィーなどの荷電の差を利用する方法、アフィニティクロマトグラフィーなどの特異的親和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィーなどの疎水性の差を利用する方法、等電点電気泳動法などの等電点の差を利用する方法などが用いられる。

【0030】

かくして得られるタンパク質が遊離体で得られた場合には、公知の方法あるいはそれに準じる方法によって塩に変換することができ、逆に塩で得られた場合には公知の方法あるいはそれに準じる方法により、遊離体または他の塩に変換することができる。

なお、組換え体が産生するタンパク質を、精製前または精製後に適当なタンパク修飾酵素を作用させることにより、任意に修飾を加えたり、ポリペプチドを部分的に除去することもできる。タンパク修飾酵素としては、例えば、トリプシン、キモトリプシン、アルギニルエンドペプチダーゼ、プロテインキナーゼ、グリコシダーゼなどが用いられる。

かくして生成する本発明のタンパク質の存在は、特異抗体を用いたエンザイムイムノアッセイやウエスタンブロッティングなどにより測定することができる。

【0031】

本発明で用いられるタンパク質もしくは部分ペプチドまたはその塩に対する抗体は、本発明で用いられるタンパク質もしくは部分ペプチドまたはその塩を認識し得る抗体であれば、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体の何れであってもよい。

本発明で用いられるタンパク質もしくは部分ペプチドまたはその塩(以下、抗体の説明においては、これらを単に本発明のタンパク質と略記する場合がある)に対する抗体は、本発明のタンパク質を抗原として用い、公知の抗体または抗血清の製造法に従って製造することができる。

〔モノクローナル抗体の作製〕

(a)モノクローナル抗体産生細胞の作製

本発明のタンパク質は、温血動物に対して投与により抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は通常2~6週毎に1回ずつ、計2~10回程度行われる。用いられる温血動物としては、例えば、サル、ウサギ、イヌ、モルモット、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギ、ニワトリが挙げられるが、マウスおよびラットが好ましく用いられる。

モノクローナル抗体産生細胞の作製に際しては、抗原で免疫された温血動物、例えばマウ

10

20

30

40

50

スから抗体価の認められた個体を選択し最終免疫の2～5日後に脾臓またはリンパ節を採取し、それらに含まれる抗体産生細胞を同種または異種動物の骨髓腫細胞と融合させることにより、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを調製することができる。抗血清中の抗体価の測定は、例えば、後記の標識化タンパク質と抗血清とを反応させたのち、抗体に結合した標識剤の活性を測定することにより行なうことができる。融合操作は既知の方法、例えば、ケーラーとミルスタインの方法〔ネイチャー(Nature)、256、495(1975)〕に従い実施することができる。融合促進剤としては、例えば、ポリエチレングリコール(PEG)やセンダイウィルスなどが挙げられるが、好ましくはPEGが用いられる。

【0032】

骨髓腫細胞としては、例えば、NS-1、P3U1、SP2/0、AP-1などの温血動物の骨髓腫細胞が挙げられるが、P3U1が好ましく用いられる。用いられる抗体産生細胞(脾臓細胞)数と骨髓腫細胞数との好ましい比率は1:1～20:1程度であり、PEG(好ましくはPEG1000～PEG6000)が10～80%程度の濃度で添加され、20～40、好ましくは30～37で1～10分間インキュベートすることにより効率よく細胞融合を実施できる。モノクローナル抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングには種々の方法が使用できるが、例えば、タンパク質抗原を直接あるいは担体とともに吸着させた固相(例、マイクロプレート)にハイブリドーマ培養上清を添加し、次に放射性物質や酵素などで標識した抗免疫グロブリン抗体(細胞融合に用いられる細胞がマウスの場合、抗マウス免疫グロブリン抗体が用いられる)またはプロテインAを加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法、抗免疫グロブリン抗体またはプロテインAを吸着させた固相にハイブリドーマ培養上清を添加し、放射性物質や酵素などで標識したタンパク質を加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法などが挙げられる。

モノクローナル抗体の選別は、公知あるいはそれに準じる方法に従って行なうことができる。通常HAT(ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン)を添加した動物細胞用培地で行なうことができる。選別および育種用培地としては、ハイブリドーマが生育できるものならばどのような培地を用いても良い。例えば、1～20%、好ましくは10～20%の牛胎児血清を含むRPMI 1640培地、1～10%の牛胎児血清を含むGIT培地(和光純薬工業(株))あるいはハイブリドーマ培養用無血清培地(SFM-101、日水製薬(株))などを用いることができる。培養温度は、通常20～40、好ましくは約37である。培養時間は、通常5日～3週間、好ましくは1週間～2週間である。培養は、通常5%炭酸ガス下で行なうことができる。ハイブリドーマ培養上清の抗体価は、上記の抗血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。

【0033】

(b)モノクローナル抗体の精製

モノクローナル抗体の分離精製は、公知の方法、例えば、免疫グロブリンの分離精製法(例、塩析法、アルコール沈殿法、等電点沈殿法、電気泳動法、イオン交換体(例、DEAE)による吸脱着法、超遠心法、ゲルろ過法、抗原結合固相あるいはプロテインAあるいはプロテインGなどの活性吸着剤により抗体のみを採取し、結合を解離させて抗体を得る特異的精製法)に従って行なうことができる。

【0034】

〔ポリクローナル抗体の作製〕

本発明のポリクローナル抗体は、公知あるいはそれに準じる方法に従って製造することができる。例えば、免疫抗原(タンパク質抗原)自体、あるいはそれとキャリアータンパク質との複合体をつくり、上記のモノクローナル抗体の製造法と同様に温血動物に免疫を行ない、該免疫動物から本発明のタンパク質に対する抗体含有物を採取して、抗体の分離精製を行なうことにより製造することができる。

温血動物を免疫するために用いられる免疫抗原とキャリアータンパク質との複合体に関し、キャリアータンパク質の種類およびキャリアーとハプテンとの混合比は、キャリアーに

10

20

30

40

50

架橋させて免疫したハプテンに対して抗体が効率良くできれば、どのようなものをどのような比率で架橋させてもよいが、例えば、ウシ血清アルブミンやウシサイログロブリン、ヘモシアニン等を重量比でハプテン1に対し、約0.1~20、好ましくは約1~5の割合でカプルさせる方法が用いられる。また、ハプテンとキャリアーのカプリングには、種々の縮合剤を用いることができるが、グルタルアルデヒドやカルボジイミド、マレイミド活性エステル、チオール基、ジチオピリジル基を含有する活性エステル試薬等が用いられる。縮合生成物は、温血動物に対して、抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は、通常約2~6週毎に1回ずつ、計約3~10回程度行なわれる。

10

ポリクローナル抗体は、上記の方法で免疫された温血動物の血液、腹水など、好ましくは血液から採取することができる。

抗血清中のポリクローナル抗体価の測定は、上記の抗血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。ポリクローナル抗体の分離精製は、上記のモノクローナル抗体の分離精製と同様の免疫グロブリンの分離精製法に従って行なうことができる。

【0035】

本発明のタンパク質または部分ペプチドをコードするDNA（以下、アンチセンスヌクレオチドの説明においては、これらのDNAを本発明のDNAと略記する場合がある）の塩基配列に相補的な、または実質的に相補的な塩基配列またはその一部を有するアンチセンスヌクレオチドとしては、本発明のDNAの塩基配列に相補的な、または実質的に相補的な塩基配列またはその一部を有し、該DNAの発現を抑制し得る作用を有するものであれば、いずれのアンチセンスヌクレオチドであってもよいが、アンチセンスDNAが好ましい。

20

本発明のDNAに実質的に相補的な塩基配列とは、例えば、本発明のDNAに相補的な塩基配列（すなわち、本発明のDNAの相補鎖）の全塩基配列あるいは部分塩基配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列などが挙げられる。特に、本発明のDNAの相補鎖の全塩基配列うち、本発明のタンパク質のN末端部位をコードする部分の塩基配列（例えば、開始コドン付近の塩基配列など）の相補鎖と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有するアンチセンスヌクレオチドが好適である。

30

具体的には、（1）配列番号：2または配列番号：7で表わされる塩基配列を有するDNAの塩基配列に相補的な、もしくは実質的に相補的な塩基配列、またはその一部分を有するアンチセンスヌクレオチド、好ましくは例えば、配列番号：2または配列番号：7で表わされる塩基配列を有するDNAの塩基配列に相補的な塩基配列、またはその一部分を有するアンチセンスヌクレオチド、

（2）配列番号：9または配列番号：10で表わされる塩基配列を有するDNAの塩基配列に相補的な、もしくは実質的に相補的な塩基配列、またはその一部分を有するアンチセンスヌクレオチド、好ましくは例えば、配列番号：9または配列番号：10で表わされる塩基配列を有するDNAの塩基配列に相補的な塩基配列、またはその一部分を有するアンチセンスヌクレオチド、

40

（3）配列番号：12または配列番号：13で表わされる塩基配列を有するDNAの塩基配列に相補的な、もしくは実質的に相補的な塩基配列、またはその一部分を有するアンチセンスヌクレオチド、好ましくは例えば、配列番号：12または配列番号：13で表わされる塩基配列を有するDNAの塩基配列に相補的な塩基配列、またはその一部分を有するアンチセンスヌクレオチド、

（4）配列番号：16または配列番号：17で表わされる塩基配列を有するDNAの塩基配列に相補的な、もしくは実質的に相補的な塩基配列、またはその一部分を有するアンチセンスヌクレオチド、好ましくは例えば、配列番号：16または配列番号：17で表わされる塩基配列を有するDNAの塩基配列に相補的な塩基配列、またはその一部分を有する

50

アンチセンスヌクレオチド、

(5) 配列番号：19または配列番号：22で表わされる塩基配列を有するDNAの塩基配列に相補的な、もしくは実質的に相補的な塩基配列、またはその一部分を有するアンチセンスヌクレオチド、好ましくは例えば、配列番号：19または配列番号：22で表わされる塩基配列を有するDNAの塩基配列に相補的な塩基配列、またはその一部分を有するアンチセンスヌクレオチド、

(6) 配列番号：24または配列番号：25で表わされる塩基配列を有するDNAの塩基配列に相補的な、もしくは実質的に相補的な塩基配列、またはその一部分を有するアンチセンスヌクレオチド、好ましくは例えば、配列番号：24または配列番号：25で表わされる塩基配列を有するDNAの塩基配列に相補的な塩基配列、またはその一部分を有するアンチセンスヌクレオチド、

(7) 配列番号：27または配列番号：28で表わされる塩基配列を有するDNAの塩基配列に相補的な、もしくは実質的に相補的な塩基配列、またはその一部分を有するアンチセンスヌクレオチド、好ましくは例えば、配列番号：27または配列番号：28で表わされる塩基配列を有するDNAの塩基配列に相補的な塩基配列、またはその一部分を有するアンチセンスヌクレオチドなどが挙げられる。

アンチセンスヌクレオチドは通常、10～40個程度、好ましくは15～30個程度の塩基から構成される。

ヌクレアーゼなどの加水分解酵素による分解を防ぐために、アンチセンスDNAを構成する各ヌクレオチドのりん酸残基(ホスフェート)は、例えば、ホスホロチオエート、メチルホスホネート、ホスホロジチオネートなどの化学修飾りん酸残基に置換されていてもよい。これらのアンチセンスヌクレオチドは、公知のDNA合成装置などを用いて製造することができる。

本発明に従えば、本発明のタンパク質遺伝子の複製または発現を阻害することのできるアンチセンス・ポリヌクレオチド(核酸)を、クローン化した、あるいは決定されたタンパク質をコードするDNAの塩基配列情報に基づき設計し、合成しうる。かかるポリヌクレオチド(核酸)は、本発明のタンパク質遺伝子のRNAとハイブリダイズすることができ、該RNAの合成または機能を阻害することができるか、あるいは本発明のタンパク質関連RNAとの相互作用を介して本発明のタンパク質遺伝子の発現を調節・制御することができる。本発明のタンパク質関連RNAの選択された配列に相補的なポリヌクレオチド、および本発明のタンパク質関連RNAと特異的にハイブリダイズすることができるポリヌクレオチドは、生体内および生体外で本発明のタンパク質遺伝子の発現を調節・制御するのに有用であり、また病気などの治療または診断に有用である。用語「対応する」とは、遺伝子を含めたヌクレオチド、塩基配列または核酸の特定の配列に相同性を有するあるいは相補的であることを意味する。ヌクレオチド、塩基配列または核酸とペプチド(タンパク質)との間で「対応する」とは、ヌクレオチド(核酸)の配列またはその相補体から誘導される指令にあるペプチド(タンパク質)のアミノ酸を通常指している。タンパク質遺伝子の5'端ヘアピンループ、5'端6-ベースペア・リピート、5'端非翻訳領域、ポリペプチド翻訳開始コドン、タンパク質コード領域、ORF翻訳終止コドン、3'端非翻訳領域、3'端パリンドローム領域、および3'端ヘアピンループは好ましい対象領域として選択しうるが、タンパク質遺伝子内の如何なる領域も対象として選択しうる。

目的核酸と、対象領域の少なくとも一部に相補的なポリヌクレオチドとの関係は、対象物とハイブリダイズすることができるポリヌクレオチドとの関係は、「アンチセンス」であるということができる。アンチセンス・ポリヌクレオチドは、2-デオキシ-D-リボースを含有しているポリヌクレオチド、D-リボースを含有しているポリヌクレオチド、プリンまたはピリミジン塩基のN-グリコシドであるその他のタイプのポリヌクレオチド、あるいは非ヌクレオチド骨格を有するその他のポリマー(例えば、市販のタンパク質核酸および合成配列特異的な核酸ポリマー)または特殊な結合を含有するその他のポリマー(但し、該ポリマーはDNAやRNA中に見出されるような塩基のペアリングや塩基の付着を許容する配置をもつヌクレオチドを含有する)などが挙げられる。それらは、二本鎖D

10

20

30

40

50

RNA、一本鎖DNA、二本鎖RNA、一本鎖RNA、さらにDNA:RNAハイブリッドであることができ、さらに非修飾ポリヌクレオチド(または非修飾オリゴヌクレオチド)、さらには公知の修飾の付加されたもの、例えば当該分野で知られた標識のあるもの、キャップの付いたもの、メチル化されたもの、1個以上の天然のヌクレオチドを類縁物で置換したもの、分子内ヌクレオチド修飾のされたもの、例えば非荷電結合(例えば、メチルホスホネート、ホスホトリエステル、ホスホルアミデート、カルバメートなど)を持つもの、電荷を有する結合または硫黄含有結合(例えば、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエートなど)を持つもの、例えばタンパク質(ヌクレアーゼ、ヌクレアーゼ・インヒビター、トキシン、抗体、シグナルペプチド、ポリ-L-リジンなど)や糖(例えば、モノサッカライドなど)などの側鎖基を有しているもの、インターカレート化合物(例えば、アクリジン、ソラレンなど)を持つもの、キレート化合物(例えば、金属、放射活性をもつ金属、ホウ素、酸化性の金属など)を含有するもの、アルキル化剤を含有するもの、修飾された結合を持つもの(例えば、アノマー型の核酸など)であってもよい。ここで「ヌクレオシド」、「ヌクレオチド」および「核酸」とは、プリンおよびピリミジン塩基を含有するのみでなく、修飾されたその他の複素環型塩基をもつようなものを含んでいてよい。こうした修飾物は、メチル化されたプリンおよびピリミジン、アシル化されたプリンおよびピリミジン、あるいはその他の複素環を含むものであってよい。修飾されたヌクレオチドおよび修飾されたヌクレオチドはまた糖部分が修飾されていてよく、例えば、1個以上の水酸基がハロゲンとか、脂肪族基などで置換されていたり、あるいはエーテル、アミンなどの官能基に変換されていてよい。

10

20

【0036】

本発明のアンチセンス・ポリヌクレオチド(核酸)は、RNA、DNA、あるいは修飾された核酸(RNA、DNA)である。修飾された核酸の具体例としては核酸の硫黄誘導体やチオホスフェート誘導体、そしてポリヌクレオシドアミドやオリゴヌクレオシドアミドの分解に抵抗性のものが挙げられるが、それに限定されるものではない。本発明のアンチセンス核酸は次のような方針で好ましく設計されうる。すなわち、細胞内でのアンチセンス核酸をより安定なものにする、アンチセンス核酸の細胞透過性をより高める、目標とするセンス鎖に対する親和性をより大きなものにする、そしてもし毒性があるならアンチセンス核酸の毒性をより小さなものにする。

こうした修飾は当該分野で数多く知られており、例えば J. Kawakami et al., Pharm Tech Japan, Vol. 8, pp. 247, 1992; Vol. 8, pp. 395, 1992; S. T. Crooke et al. ed., Antisense Research and Applications, CRC Press, 1993 などに開示がある。

30

本発明のアンチセンス核酸は、変化せしめられたり、修飾された糖、塩基、結合を含有していて良く、リポゾーム、ミクロスフェアのような特殊な形態で供与されたり、遺伝子治療により適用されたり、付加された形態で与えられることができる。こうして付加形態で用いられるものとしては、リン酸基骨格の電荷を中和するように働くポリリジンのようなポリカチオン体、細胞膜との相互作用を高めたり、核酸の取込みを増大せしめるような脂質(例えば、ホスホリピド、コレステロールなど)といった疎水性のものが挙げられる。付加するに好ましい脂質としては、コレステロールやその誘導体(例えば、コレステリルクロロホルメート、コール酸など)が挙げられる。こうしたものは、核酸の3'端あるいは5'端に付着させることができ、塩基、糖、分子内ヌクレオシド結合を介して付着させることができる。その他の基としては、核酸の3'端あるいは5'端に特異的に配置されたキャップ用の基で、エキソヌクレアーゼ、RNaseなどのヌクレアーゼによる分解を阻止するためのものが挙げられる。こうしたキャップ用の基としては、ポリエチレングリコール、テトラエチレングリコールなどのグリコールをはじめとした当該分野で知られた水酸基の保護基が挙げられるが、それに限定されるものではない。

40

アンチセンス核酸の阻害活性は、本発明の形質転換体、本発明の生体内や生体外の遺伝子発現系、あるいは本発明のタンパク質の生体内や生体外の翻訳系を用いて調べることがで

50

きる。該核酸は公知の各種の方法で細胞に適用できる。

【0037】

以下に、本発明のタンパク質もしくは部分ペプチドまたはその塩（以下、本発明のタンパク質と略記する場合がある）、本発明のタンパク質または部分ペプチドをコードするDNA（以下、本発明のDNAと略記する場合がある）、本発明のタンパク質もしくは部分ペプチドまたはその塩に対する抗体（以下、本発明の抗体と略記する場合がある）、および本発明のDNAのアンチセンスヌクレオチド（以下、本発明のアンチセンスヌクレオチドと略記する場合がある）の用途を説明する。

本発明のタンパク質の活性を阻害する化合物もしくはその塩を含有する医薬は、例えば、 K^+ イオンの透過を抑制することで、例えば、消化器疾患（例、過敏性腸症候群、潰瘍性大腸炎、クローン病、虚血性大腸炎、胃炎、消化性潰瘍、直腸炎、下痢、逆流性食道炎、十二指腸炎など）、生殖器疾患（例、前立腺肥大症、前立腺炎、精巣神経症、卵巣嚢腫など）、呼吸器疾患（例、慢性閉塞性肺疾患、喘息など）、中枢神経系疾患（例、アルツハイマー病、パーキンソン症候群、精神分裂病（統合失調症）、脳血管性痴呆、脳虚血、てんかんなど）、糖尿病、高血圧症、循環器疾患（例、心不全、不整脈、QT延長症候群、動脈硬化、狭心症など）、膵臓疾患（例、膵炎、膵嚢胞性線維症などの膵機能不全など）、肝臓疾患（例、肝硬変など）、腎疾患（例、腎不全、尿毒症など）、癌（例、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、非小細胞肺癌、卵巣癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、乳癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌、膵臓癌、胸腺腫、精巣腫瘍、食道癌、筋肉腫など）などの予防・治療剤として使用することができる。好ましくは、消化器疾患、生殖器疾患、呼吸器疾患などの予防・治療剤である。

10

20

一方、本発明のタンパク質の活性を促進する化合物もしくはその塩を含有する医薬は、例えば、 K^+ イオンの透過を促進することで、例えば、消化器疾患（例、過敏性腸症候群、潰瘍性大腸炎、クローン病、虚血性大腸炎、胃炎、消化性潰瘍、直腸炎、下痢、逆流性食道炎、十二指腸炎など）、生殖器疾患（例、前立腺肥大症、前立腺炎、精巣神経症、卵巣嚢腫など）、呼吸器疾患（例、慢性閉塞性肺疾患、喘息など）、中枢神経系疾患（例、アルツハイマー病、パーキンソン症候群、精神分裂病（統合失調症）、脳血管性痴呆、脳虚血、てんかんなど）、糖尿病、高血圧症、循環器疾患（例、心不全、不整脈、QT延長症候群、動脈硬化、狭心症など）、膵臓疾患（例、膵炎、膵嚢胞性線維症などの膵機能不全など）、肝臓疾患（例、肝硬変など）、腎疾患（例、腎不全、尿毒症など）、癌（例、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、非小細胞肺癌、卵巣癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、乳癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌、膵臓癌、胸腺腫、精巣腫瘍、食道癌、筋肉腫など）などの予防・治療剤として使用することができる。好ましくは、消化器疾患、生殖器疾患、呼吸器疾患などの予防・治療剤である。

30

【0038】

〔1〕本発明のタンパク質が関与する各種疾病の予防・治療剤

本発明のタンパク質は、 K^+ イオンの透過活性（例、細胞の膜電位または細胞内 Ca^{2+} イオン濃度を感知し、 K^+ イオンの透過を調節する活性）などを有し、細胞の興奮の制御などに重要な役割を果たしている。

したがって、本発明のタンパク質をコードするDNAに異常があったり、欠損している場合あるいは本発明のタンパク質の発現量が減少している場合には、例えば、消化器疾患（例、過敏性腸症候群、潰瘍性大腸炎、クローン病、虚血性大腸炎、胃炎、消化性潰瘍、直腸炎、下痢、逆流性食道炎、十二指腸炎など）、生殖器疾患（例、前立腺肥大症、前立腺炎、精巣神経症、卵巣嚢腫など）、呼吸器疾患（例、慢性閉塞性肺疾患、喘息など）、中枢神経系疾患（例、アルツハイマー病、パーキンソン症候群、精神分裂病（統合失調症）、脳血管性痴呆、脳虚血、てんかんなど）、糖尿病、高血圧症、循環器疾患（例、心不全、不整脈、QT延長症候群、動脈硬化、狭心症など）、膵臓疾患（例、膵炎、膵嚢胞性線維症などの膵機能不全など）、肝臓疾患（例、肝硬変など）、腎疾患（例、腎不全、尿毒症など）、癌（例、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、非小細胞肺癌、卵巣癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、乳癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌、膵臓癌、胸腺腫、精巣腫瘍、食道癌、筋肉腫

40

50

など)などの種々の疾患が発症する。

したがって、本発明のタンパク質および本発明のDNAは、例えば、消化器疾患(例、過敏性腸症候群、潰瘍性大腸炎、クローン病、虚血性大腸炎、胃炎、消化性潰瘍、直腸炎、下痢、逆流性食道炎、十二指腸炎など)、生殖器疾患(例、前立腺肥大症、前立腺炎、精巣神経症、卵巣嚢腫など)、呼吸器疾患(例、慢性閉塞性肺疾患、喘息など)、中枢神経系疾患(例、アルツハイマー病、パーキンソン症候群、精神分裂病(統合失調症)、脳血管性痴呆、脳虚血、てんかんなど)、糖尿病、高血圧症、循環器疾患(例、心不全、不整脈、QT延長症候群、動脈硬化、狭心症など)、膵臓疾患(例、膵炎、膵嚢胞性線維症などの膵機能不全など)、肝臓疾患(例、肝硬変など)、腎疾患(例、腎不全、尿毒症など)、癌(例、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、非小細胞肺癌、卵巣癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、乳癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌、膵臓癌、胸腺腫、精巣腫瘍、食道癌、筋肉腫など)などの予防・治療剤などの医薬として使用することができる。

10

例えば、生体内において本発明のタンパク質が減少あるいは欠損しているために、 K^+ イオンの透過が十分に、あるいは正常に発揮されない患者がいる場合に、(イ)本発明のDNAを該患者に投与し、生体内で本発明のタンパク質を発現させることによって、(ロ)細胞に本発明のDNAを挿入し、本発明のタンパク質を発現させた後に、該細胞を患者に移植することによって、または(ハ)本発明のタンパク質を該患者に投与することなどによって、該患者における本発明のタンパク質の役割を十分に、あるいは正常に発揮させることができる。

本発明のDNAを上記の予防・治療剤として使用する場合は、該DNAを単独あるいはレトロウィルスベクター、アデノウィルスベクター、アデノウィルスアソシエーテッドウィルスベクターなどの適当なベクターに挿入した後、常套手段に従って、ヒトまたは温血動物に投与することができる。本発明のDNAは、そのまま、あるいは摂取促進のための補助剤などの生理学的に認められる担体とともに製剤化し、遺伝子銃やハイドロゲルカテーテルのようなカテーテルによって投与できる。

20

本発明のタンパク質を上記の予防・治療剤として使用する場合は、少なくとも90%、好ましくは95%以上、より好ましくは98%以上、さらに好ましくは99%以上に精製されたものを使用するのが好ましい。

【0039】

本発明のタンパク質は、例えば、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、本発明のタンパク質等を生理学的に認められる担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般に認められた製剤実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な用量が得られるようにするものである。

30

錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えば、ゼラチン、コーンスターチ、トラガント、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸などのような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのような香味剤などが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、前記タイプの材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などのような天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施に従って処方することができる。

40

注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液(例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなど)などが挙げられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール(例えば、エタノールなど)、ポリアルコール(例えば、プロピレングリコール、ポリエチレングリコールなど)、非イオン性界面活性剤(例えば、ポリソルベート80TM、HCO-50など)などと併用してもよい。油性

50

液としては、例えば、ゴマ油、大豆油などが挙げられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。また、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液など）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど）、保存剤（例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど）、酸化防止剤などと配合してもよい。調製された注射液は、通常、適当なアンプルに充填される。

本発明のDNAが挿入されたベクターも上記と同様に製剤化され、通常、非経口的に使用される。

【0040】

このようにして得られる製剤は、安全で低毒性であるので、例えば、温血動物（例えば、ヒト、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、トリ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サル、チンパンジーなど）に対して投与することができる。

本発明のタンパク質等の投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、過敏性腸症候群の治療目的で本発明のタンパク質等を経口投与する場合、一般的に成人（体重60kgとして）においては、一日につき該タンパク質等を約0.1～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mg投与する。非経口的に投与する場合は、該タンパク質等の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、過敏性腸症候群の治療目的で本発明のタンパク質等を注射剤の形で成人（体重60kgとして）に投与する場合、一日につき該タンパク質等を約0.01～30mg、好ましくは約0.1～20mg、より好ましくは約0.1～10mgを患部に注射することにより投与するのが好都合である。他の動物の場合も、体重60kg当たりに換算した量を投与することができる。

【0041】

〔2〕疾病に対する医薬候補化合物のスクリーニング

本発明のタンパク質は、本発明のタンパク質の活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニングのための試薬として有用である。

本発明は、（1）本発明のタンパク質を用いることを特徴とする本発明のタンパク質の活性（例えば、 K^+ イオンの透過など）を促進または阻害する化合物またはその塩（以下、それぞれ促進剤、阻害剤と略記する場合がある）のスクリーニング方法を提供する。より具体的には、例えば、

（2）（i）本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞の K^+ イオンの透過（活性）と（ii）本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞と試験化合物の混合物の K^+ イオンの透過（活性）の比較を行なうことを特徴とする促進剤または阻害剤のスクリーニング方法を提供する。

具体的には、上記スクリーニング方法においては、例えば、（i）と（ii）の場合において、 K^+ イオンの透過に伴う膜電位の変化を蛍光色素で測定し、 K^+ イオンの透過の指標として比較することの特徴とするものである。

【0042】

試験化合物としては、例えば、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液などが挙げられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

上記のスクリーニング方法を実施するには、本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞をスクリーニングに適したバッファーに浮遊して調製する。バッファーには、pH約4～10（望ましくは、pH約6～8）のリン酸バッファー、ほう酸バッファーなどの、本発明のタンパク質の K^+ イオンの透過（活性）を阻害しないバッファーであればいずれでもよい。

本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞としては、例えば、前述した本発明のタンパク質をコードするDNAを含有するベクターで形質転換された宿主（形質転換体）が用いられる。宿主としては、例えば、CHO細胞などの動物細胞が好ましく用いられる。該スクリーニングには、例えば、前述の方法で培養することによって、本発明のタンパク

質を細胞膜上に発現させた形質転換体が好ましく用いられる。

【0043】

本発明のタンパク質の K^+ イオンの透過は、公知の方法、例えば、Receptors and Channels 6巻、337-350頁、1999年に記載の方法あるいはそれに準じる方法に従って測定することができる。

例えば、上記(ii)の場合における K^+ イオンの透過を、上記(i)の場合に比べて、約20%以上、好ましくは30%以上、より好ましくは約50%以上促進する試験化合物を本発明のタンパク質の活性を促進する化合物またはその塩として選択することができる。

また、例えば、上記(ii)の場合における K^+ イオンの透過を、上記(i)の場合に比べて、約20%以上、好ましくは30%以上、より好ましくは約50%以上阻害(または抑制)する試験化合物を本発明のタンパク質の活性を阻害する化合物またはその塩として選択することができる。

また、本発明のタンパク質遺伝子のプロモーター下流に分泌型アルカリホスファターゼ、ルシフェラーゼなどの遺伝子を挿入し、上記の各種細胞に発現させ、該細胞に上記試験化合物を接触させた場合における酵素活性を賦活化または阻害する化合物またはその塩を探索することによって本発明のタンパク質の発現を促進または抑制(すなわち、本発明のタンパク質の活性を促進または阻害)する化合物またはその塩をスクリーニングすることができる。

【0044】

本発明のタンパク質をコードするポリヌクレオチドは、本発明のタンパク質遺伝子の発現を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニングのための試薬として有用である。

本発明は、(3)本発明のタンパク質をコードするポリヌクレオチドを用いることを特徴とする本発明のタンパク質遺伝子の発現を促進または阻害する化合物またはその塩(以下、それぞれ促進剤、阻害剤と略記する場合がある)のスクリーニング方法を提供し、より具体的には、例えば、

(4)(iii)本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞を培養した場合と(iv)本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞と試験化合物の混合物を培養した場合との比較を行うことを特徴とする促進剤または阻害剤のスクリーニング方法を提供する

。上記スクリーニング方法においては、例えば、(iii)と(iv)の場合における、本発明のタンパク質遺伝子の発現量(具体的には、本発明のタンパク質量または前記タンパク質をコードするmRNA量)を測定して、比較する。

試験化合物としては、例えば、ペプチド、タンパク質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液などが挙げられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

上記のスクリーニング方法を実施するには、本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞をスクリーニングに適したバッファーに浮遊して調製する。バッファーには、pH約4~10(望ましくは、pH約6~8)のリン酸バッファー、ほう酸バッファーなどの、本発明のタンパク質の K^+ イオンの透過を阻害しないバッファーであればいずれでもよい

。本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞としては、例えば、前述した本発明のタンパク質をコードするDNAを含有するベクターで形質転換された宿主(形質転換体)が用いられる。宿主としては、例えば、CHO細胞などの動物細胞が好ましく用いられる。該スクリーニングには、例えば、前述の方法で培養することによって、本発明のタンパク質を細胞膜上に発現させた形質転換体が好ましく用いられる。

本発明のタンパク質量の測定は、公知の方法、例えば、本発明のタンパク質を認識する抗体を用いて、細胞抽出液中などに存在する前記タンパク質を、ウェスタン解析、ELISA法などの方法またはそれに準じる方法に従い測定することができる。

10

20

30

40

50

本発明のタンパク質遺伝子の発現量は、公知の方法、例えば、ノーザンブロッティングや Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)、リアルタイムPCR解析システム (ABI社製、TaqMan polymerase chain reaction) などの方法あるいはそれに準じる方法にしたがって測定することができる。

例えば、上記 (iv) の場合における本発明のタンパク質遺伝子の発現量を、上記 (iii) の場合に比べて、約 20% 以上、好ましくは 30% 以上、より好ましくは約 50% 以上促進する試験化合物を本発明のタンパク質遺伝子の発現を促進する化合物またはその塩として選択することができる。

例えば、上記 (iv) の場合における本発明のタンパク質遺伝子の発現量を、上記 (iii) の場合に比べて、約 20% 以上、好ましくは 30% 以上、より好ましくは約 50% 以上阻害する試験化合物を本発明のタンパク質遺伝子の発現を阻害する化合物またはその塩として選択することができる。

さらに、本発明の抗体は、本発明のタンパク質の発現を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニングのための試薬として有用である。

本発明は、(5) 本発明の抗体を用いることを特徴とする本発明のタンパク質の発現を促進または阻害する化合物またはその塩 (以下、それぞれ促進剤、阻害剤と略記する場合がある) のスクリーニング方法を提供し、より具体的には、例えば、

(6) (v) 本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞を培養した場合と (vi) 本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞と試験化合物の混合物を培養した場合との比較を行うことを特徴とする促進剤または阻害剤のスクリーニング方法を提供する。上記スクリーニング方法においては、例えば、本発明の抗体を用いて (v) と (vi) の場合における、本発明のタンパク質の発現量 (具体的には、本発明のタンパク質量) を測定 (例、本発明のタンパク質の発現を検出、本発明のタンパク質の発現量を定量等) して、比較する。

試験化合物としては、例えば、ペプチド、タンパク質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液などが挙げられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

上記のスクリーニング方法を実施するには、本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞をスクリーニングに適したバッファーに浮遊して調製する。バッファーには、pH 約 4 ~ 10 (望ましくは、pH 約 6 ~ 8) のリン酸バッファー、ほう酸バッファーなどの、本発明のタンパク質の K^+ イオンの透過を阻害しないバッファーであればいずれでもよい。

本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞としては、例えば、前述した本発明のタンパク質をコードする DNA を含有するベクターで形質転換された宿主 (形質転換体) が用いられる。宿主としては、例えば、CHO 細胞などの動物細胞が好ましく用いられる。該スクリーニングには、例えば、前述の方法で培養することによって、本発明のタンパク質を細胞膜上に発現させた形質転換体が好ましく用いられる。

本発明のタンパク質量の測定は、公知の方法、例えば、本発明のタンパク質を認識する抗体を用いて、細胞抽出液中などに存在する前記タンパク質を、ウェスタン解析、ELISA 法などの方法またはそれに準じる方法に従い測定することができる。

例えば、上記 (vi) の場合における本発明のタンパク質の発現量を、上記 (v) の場合に比べて、約 20% 以上、好ましくは 30% 以上、より好ましくは約 50% 以上促進する試験化合物を本発明のタンパク質の発現を促進する化合物またはその塩として選択することができる。

例えば、上記 (vi) の場合における本発明のタンパク質の発現量を、上記 (v) の場合に比べて、約 20% 以上、好ましくは 30% 以上、より好ましくは約 50% 以上阻害する試験化合物を本発明のタンパク質の発現を阻害する化合物またはその塩として選択することができる。

【0045】

本発明のスクリーニング用キットは、本発明で用いられるタンパク質もしくは部分ペプチドまたはその塩、または本発明で用いられるタンパク質もしくは部分ペプチドを産生する能力を有する細胞を含有するものである。

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩は、上記した試験化合物、例えば、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液、血漿などから選ばれた化合物またはその塩であり、本発明のタンパク質の活性（例、 K^+ イオンの透過など）を促進または阻害する化合物またはその塩である。

該化合物の塩としては、前記した本発明のタンパク質の塩と同様のものが用いられる。

本発明のタンパク質の活性を促進する化合物またはその塩は、例えば、消化器疾患（例、過敏性腸症候群、潰瘍性大腸炎、クローン病、虚血性大腸炎、胃炎、消化性潰瘍、直腸炎、下痢、逆流性食道炎、十二指腸炎など）、生殖器疾患（例、前立腺肥大症、前立腺炎、精巣神経症、卵巣嚢腫など）、呼吸器疾患（例、慢性閉塞性肺疾患、喘息など）、中枢神経系疾患（例、アルツハイマー病、パーキンソン症候群、精神分裂病（統合失調症）、脳血管性痴呆、脳虚血、てんかんなど）、糖尿病、高血圧症、循環器疾患（例、心不全、不整脈、QT延長症候群、動脈硬化、狭心症など）、膵臓疾患（例、膵炎、膵嚢胞性線維症などの膵機能不全など）、肝臓疾患（例、肝硬変など）、腎疾患（例、腎不全、尿毒症など）、癌（例、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、非小細胞肺癌、卵巣癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、乳癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌、膵臓癌、胸腺腫、精巣腫瘍、食道癌、筋肉腫など）などの予防・治療剤などの医薬として有用である。

また、本発明のタンパク質の活性を阻害する化合物またはその塩は、例えば、消化器疾患（例、過敏性腸症候群、潰瘍性大腸炎、クローン病、虚血性大腸炎、胃炎、消化性潰瘍、直腸炎、下痢、逆流性食道炎、十二指腸炎など）、生殖器疾患（例、前立腺肥大症、前立腺炎、精巣神経症、卵巣嚢腫など）、呼吸器疾患（例、慢性閉塞性肺疾患、喘息など）、中枢神経系疾患（例、アルツハイマー病、パーキンソン症候群、精神分裂病（統合失調症）、脳血管性痴呆、脳虚血、てんかんなど）、糖尿病、高血圧症、循環器疾患（例、心不全、不整脈、QT延長症候群、動脈硬化、狭心症など）、膵臓疾患（例、膵炎、膵嚢胞性線維症などの膵機能不全など）、肝臓疾患（例、肝硬変など）、腎疾患（例、腎不全、尿毒症など）、癌（例、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、非小細胞肺癌、卵巣癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、乳癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌、膵臓癌、胸腺腫、精巣腫瘍、食道癌、筋肉腫など）などの予防・治療剤などの医薬として有用である。

本発明のタンパク質遺伝子の発現を促進する化合物またはその塩は、例えば、消化器疾患（例、過敏性腸症候群、潰瘍性大腸炎、クローン病、虚血性大腸炎、胃炎、消化性潰瘍、直腸炎、下痢、逆流性食道炎、十二指腸炎など）、生殖器疾患（例、前立腺肥大症、前立腺炎、精巣神経症、卵巣嚢腫など）、呼吸器疾患（例、慢性閉塞性肺疾患、喘息など）、中枢神経系疾患（例、アルツハイマー病、パーキンソン症候群、精神分裂病（統合失調症）、脳血管性痴呆、脳虚血、てんかんなど）、糖尿病、高血圧症、循環器疾患（例、心不全、不整脈、QT延長症候群、動脈硬化、狭心症など）、膵臓疾患（例、膵炎、膵嚢胞性線維症などの膵機能不全など）、肝臓疾患（例、肝硬変など）、腎疾患（例、腎不全、尿毒症など）、癌（例、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、非小細胞肺癌、卵巣癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、乳癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌、膵臓癌、胸腺腫、精巣腫瘍、食道癌、筋肉腫など）などの予防・治療剤などの医薬として有用である。

また、本発明のタンパク質遺伝子の発現を阻害する化合物またはその塩は、例えば、消化器疾患（例、過敏性腸症候群、潰瘍性大腸炎、クローン病、虚血性大腸炎、胃炎、消化性潰瘍、直腸炎、下痢、逆流性食道炎、十二指腸炎など）、生殖器疾患（例、前立腺肥大症、前立腺炎、精巣神経症、卵巣嚢腫など）、呼吸器疾患（例、慢性閉塞性肺疾患、喘息など）、中枢神経系疾患（例、アルツハイマー病、パーキンソン症候群、精神分裂病（統合失調症）、脳血管性痴呆、脳虚血、てんかんなど）、糖尿病、高血圧症、循環器疾患（例、心不全、不整脈、QT延長症候群、動脈硬化、狭心症など）、膵臓疾患（例、膵炎、膵嚢胞性線維症などの膵機能不全など）、肝臓疾患（例、肝硬変など）、腎疾患（例、腎不

10

20

30

40

50

全、尿毒症など)、癌(例、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、非小細胞肺癌、卵巣癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、乳癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌、膵臓癌、胸腺腫、精巣腫瘍、食道癌、筋肉腫など)などの予防・治療剤などの医薬として有用である。

本発明のタンパク質の発現を促進する化合物またはその塩は、例えば、消化器疾患(例、過敏性腸症候群、潰瘍性大腸炎、クローン病、虚血性大腸炎、胃炎、消化性潰瘍、直腸炎、下痢、逆流性食道炎、十二指腸炎など)、生殖器疾患(例、前立腺肥大症、前立腺炎、精巣神経症、卵巣嚢腫など)、呼吸器疾患(例、慢性閉塞性肺疾患、喘息など)、中枢神経系疾患(例、アルツハイマー病、パーキンソン症候群、精神分裂病(統合失調症)、脳血管性痴呆、脳虚血、てんかんなど)、糖尿病、高血圧症、循環器疾患(例、心不全、不整脈、QT延長症候群、動脈硬化、狭心症など)、膵臓疾患(例、膵炎、膵嚢胞性線維症などの膵機能不全など)、肝臓疾患(例、肝硬変など)、腎疾患(例、腎不全、尿毒症など)、癌(例、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、非小細胞肺癌、卵巣癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、乳癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌、膵臓癌、胸腺腫、精巣腫瘍、食道癌、筋肉腫など)などの予防・治療剤などの医薬として有用である。

また、本発明のタンパク質の発現を阻害する化合物またはその塩は、例えば、消化器疾患(例、過敏性腸症候群、潰瘍性大腸炎、クローン病、虚血性大腸炎、胃炎、消化性潰瘍、直腸炎、下痢、逆流性食道炎、十二指腸炎など)、生殖器疾患(例、前立腺肥大症、前立腺炎、精巣神経症、卵巣嚢腫など)、呼吸器疾患(例、慢性閉塞性肺疾患、喘息など)、中枢神経系疾患(例、アルツハイマー病、パーキンソン症候群、精神分裂病(統合失調症)、脳血管性痴呆、脳虚血、てんかんなど)、糖尿病、高血圧症、循環器疾患(例、心不全、不整脈、QT延長症候群、動脈硬化、狭心症など)、膵臓疾患(例、膵炎、膵嚢胞性線維症などの膵機能不全など)、肝臓疾患(例、肝硬変など)、腎疾患(例、腎不全、尿毒症など)、癌(例、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、非小細胞肺癌、卵巣癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、乳癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌、膵臓癌、胸腺腫、精巣腫瘍、食道癌、筋肉腫など)などの予防・治療剤などの医薬として有用である。

【0046】

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩を上述の予防・治療剤として使用する場合、常套手段に従って製剤化することができる。例えば、錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤、無菌性溶液、懸濁液剤などとすることができる。

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトまたは温血動物(例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、トリ、ネコ、イヌ、サル、チンパンジーなど)に対して経口的にまたは非経口的に投与することができる。

該化合物またはその塩の投与量は、その作用、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、過敏性腸症候群の治療の目的で本発明のタンパク質の活性を促進する化合物またはその塩を経口投与する場合、一般的に成人(体重60kgとして)においては、一日につき該化合物またはその塩を約0.1~100mg、好ましくは約1.0~50mg、より好ましくは約1.0~20mg投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物またはその塩の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、過敏性腸症候群の治療の目的で本発明のタンパク質の活性を促進する化合物またはその塩を注射剤の形で通常成人(体重60kgとして)に投与する場合、一日につき該化合物またはその塩を約0.01~30mg、好ましくは約0.1~20mg、より好ましくは約0.1~10mgを静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、体重60kg当りに換算した量を投与することができる。

【0047】

〔3〕本発明のタンパク質、その部分ペプチドまたはその塩の定量

本発明の抗体は、本発明のタンパク質を特異的に認識することができるので、被検液中の本発明のタンパク質の定量、特にサンドイッチ免疫測定法による定量などに使用することができる。

すなわち、本発明は、

10

20

30

40

50

(i) 本発明の抗体と、被検液および標識化された本発明のタンパク質とを競合的に反応させ、該抗体に結合した標識化された本発明のタンパク質の割合を測定することを特徴とする被検液中の本発明のタンパク質の定量法、および

(i i) 被検液と担体上に不溶化した本発明の抗体および標識化された本発明の別の抗体とを同時あるいは連続的に反応させたのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することを特徴とする被検液中の本発明のタンパク質の定量法を提供する。

上記 (i i) の定量法においては、一方の抗体が本発明のタンパク質の N 端部を認識する抗体で、他方の抗体が本発明のタンパク質の C 端部に反応する抗体であることが望ましい。

【 0 0 4 8 】

また、本発明のタンパク質に対するモノクローナル抗体（以下、本発明のモノクローナル抗体と称する場合がある）を用いて本発明のタンパク質の定量を行なえるほか、組織染色等による検出を行なうこともできる。これらの目的には、抗体分子そのものを用いてもよく、また、抗体分子の F (a b ')₂、F a b '、あるいは F a b 画分を用いてもよい。

本発明の抗体を用いる本発明のタンパク質の定量法は、特に制限されるべきものではなく、被測定液中の抗原量（例えば、タンパク質量）に対応した抗体、抗原もしくは抗体 - 抗原複合体の量を化学的または物理的手段により検出し、これを既知量の抗原を含む標準液を用いて作製した標準曲線より算出する測定法であれば、いずれの測定法を用いてもよい。例えば、ネフロメトリー、競合法、イムノメトリック法およびサンドイッチ法が好適に

用いられるが、感度、特異性の点で、後述するサンドイッチ法を用いるのが特に好ましい。

標識物質を用いる測定法に用いられる標識剤としては、例えば、放射性同位元素、酵素、蛍光物質、発光物質などが用いられる。放射性同位元素としては、例えば、[^{1 2 5} I]、[^{1 3 1} I]、[³ H]、[^{1 4} C]などが用いられる。上記酵素としては、安定で比活性の大きなものが好ましく、例えば、 α -ガラクトシダーゼ、 β -グルコシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、パーオキシダーゼ、リンゴ酸脱水素酵素などが用いられる。蛍光物質としては、例えば、フルオレスカミン、フルオレッセンイソチオシアネートなどが用いられる。発光物質としては、例えば、ルミノール、ルミノール誘導体、ルシフェリン、ルシゲニンなどが用いられる。さらに、抗体あるいは抗原と標識剤との結合にビオチン - アビジン系を用いることもできる。

【 0 0 4 9 】

抗原あるいは抗体の不溶化に当っては、物理吸着を用いてもよく、また通常タンパク質あるいは酵素等を不溶化、固定化するのに用いられる化学結合を用いる方法でもよい。担体としては、アガロース、デキストラン、セルロースなどの不溶性多糖類、ポリスチレン、ポリアクリルアミド、シリコン等の合成樹脂、あるいはガラス等が挙げられる。

サンドイッチ法においては不溶化した本発明のモノクローナル抗体に被検液を反応させ（1次反応）、さらに標識化した別の本発明のモノクローナル抗体を反応させ（2次反応）たのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することにより被検液中の本発明のタンパク質量を定量することができる。1次反応と2次反応は逆の順序に行っても、また、同時に行なってもよいし時間をずらして行なってもよい。標識化剤および不溶化の方法は前記のそれらに準じることができる。また、サンドイッチ法による免疫測定法において、固相用抗体あるいは標識用抗体に用いられる抗体は必ずしも1種類である必要はなく、測定感度を向上させる等の目的で2種類以上の抗体の混合物を用いてもよい。

本発明のサンドイッチ法による本発明のタンパク質の測定法においては、1次反応と2次反応に用いられる本発明のモノクローナル抗体は、本発明のタンパク質の結合する部位が相異なる抗体が好ましく用いられる。すなわち、1次反応および2次反応に用いられる抗体は、例えば、2次反応で用いられる抗体が、本発明のタンパク質の C 端部を認識する場合、1次反応で用いられる抗体は、好ましくは C 端部以外、例えば N 端部を認識する抗体が用いられる。

10

20

30

40

50

【0050】

本発明のモノクローナル抗体をサンドイッチ法以外の測定システム、例えば、競合法、イムノメトリック法あるいはネフロメトリーなどに用いることができる。

競合法では、被検液中の抗原と標識抗原とを抗体に対して競合的に反応させたのち、未反応の標識抗原（F）と、抗体と結合した標識抗原（B）とを分離し（B/F分離）、B、Fいずれかの標識量を測定し、被検液中の抗原量を定量する。本反応法には、抗体として可溶性抗体を用い、B/F分離をポリエチレングリコール、前記抗体に対する第2抗体などを用いる液相法、および、第1抗体として固相化抗体を用いるか、あるいは、第1抗体は可溶性のものを用い第2抗体として固相化抗体を用いる固相化法とが用いられる。

イムノメトリック法では、被検液中の抗原と固相化抗原とを一定量の標識化抗体に対して競合反応させた後固相と液相を分離するか、あるいは、被検液中の抗原と過剰量の標識化抗体とを反応させ、次に固相化抗原を加え未反応の標識化抗体を固相に結合させたのち、固相と液相を分離する。次に、いずれかの相の標識量を測定し被検液中の抗原量を定量する。

また、ネフロメトリーでは、ゲル内あるいは溶液中で抗原抗体反応の結果生じた不溶性の沈降物の量を測定する。被検液中の抗原量が僅かであり、少量の沈降物しか得られない場合にもレーザーの散乱を利用するレーザーネフロメトリーなどが好適に用いられる。

【0051】

これら個々の免疫学的測定法を本発明の定量方法に適用するにあたっては、特別の条件、操作等の設定は必要とされない。それぞれの方法における通常の方法、操作法に当業者の通常技術的配慮を加えて本発明のタンパク質の測定系を構築すればよい。これらの一般的な技術手段の詳細については、総説、成書などを参照することができる。

例えば、入江 寛編「ラジオイムノアッセイ」（講談社、昭和49年発行）、入江 寛編「続ラジオイムノアッセイ」（講談社、昭和54年発行）、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」（医学書院、昭和53年発行）、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」（第2版）（医学書院、昭和57年発行）、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」（第3版）（医学書院、昭和62年発行）、「Methods in ENZYMOLOGY」Vol. 70 (Immunochemical Techniques (Part A))、同書 Vol. 73 (Immunochemical Techniques (Part B))、同書 Vol. 74 (Immunochemical Techniques (Part C))、同書 Vol. 84 (Immunochemical Techniques (Part D: Selected Immunoassays))、同書 Vol. 92 (Immunochemical Techniques (Part E: Monoclonal Antibodies and General Immunoassay Methods))、同書 Vol. 121 (Immunochemical Techniques (Part I: Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies))（以上、アカデミックプレス社発行）などを参照することができる。

以上のようにして、本発明の抗体を用いることによって、本発明のタンパク質を感度良く定量することができる。

さらには、本発明の抗体を用いて本発明のタンパク質の濃度を定量することによって、本発明のタンパク質の濃度の減少が検出された場合、例えば消化器疾患（例、過敏性腸症候群、潰瘍性大腸炎、クローン病、虚血性大腸炎、胃炎、消化性潰瘍、直腸炎、下痢、逆流性食道炎、十二指腸炎など）、生殖器疾患（例、前立腺肥大症、前立腺炎、精巣神経症、卵巣嚢腫など）、呼吸器疾患（例、慢性閉塞性肺疾患、喘息など）、中枢神経系疾患（例、アルツハイマー病、パーキンソン症候群、精神分裂病（統合失調症）、脳血管性痴呆、脳虚血、てんかんなど）、糖尿病、高血圧症、循環器疾患（例、心不全、不整脈、QT延長症候群、動脈硬化、狭心症など）、膵臓疾患（例、膵炎、膵嚢胞性線維症などの膵機能不全など）、肝臓疾患（例、肝硬変など）、腎疾患（例、腎不全、尿毒症など）、癌（例、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、非小細胞肺癌、卵巣癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、乳癌、子宮

10

20

30

40

50

頸部癌、結腸癌、直腸癌、膵臓癌、胸腺腫、精巣腫瘍、食道癌、筋肉腫など)などが発症している可能性が高いと診断することが出来る。また、本発明のタンパク質の濃度の上昇が検出された場合、例えば消化器疾患(例、過敏性腸症候群、潰瘍性大腸炎、クローン病、虚血性大腸炎、胃炎、消化性潰瘍、直腸炎、下痢、逆流性食道炎、十二指腸炎など)、生殖器疾患(例、前立腺肥大症、前立腺炎、精巣神経症、卵巣嚢腫など)、呼吸器疾患(例、慢性閉塞性肺疾患、喘息など)、中枢神経系疾患(例、アルツハイマー病、パーキンソン症候群、精神分裂病(統合失調症)、脳血管性痴呆、脳虚血、てんかんなど)、糖尿病、高血圧症、循環器疾患(例、心不全、不整脈、QT延長症候群、動脈硬化、狭心症など)、膵臓疾患(例、膵炎、膵嚢胞性線維症などの膵機能不全など)、肝臓疾患(例、肝硬変など)、腎疾患(例、腎不全、尿毒症など)、癌(例、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、非小細胞肺癌、卵巣癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、乳癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌、膵臓癌、胸腺腫、精巣腫瘍、食道癌、筋肉腫など)などの可能性が高いと診断することが出来る。

10

また、本発明の抗体は、体液や組織などの被検体中に存在する本発明のタンパク質を検出するために使用することができる。また、本発明のタンパク質を精製するために使用する抗体カラムの作製、精製時の各分画中の本発明のタンパク質の検出、被検細胞内における本発明のタンパク質の挙動の分析などのために使用することができる。

【0052】

〔4〕遺伝子診断剤

本発明のDNAは、例えば、プローブとして使用することにより、ヒトまたは温血動物(例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、トリ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サル、チンパンジーなど)における本発明のタンパク質またはその部分ペプチドをコードするDNAまたはmRNAの異常(遺伝子異常)を検出することができるので、例えば、該DNAまたはmRNAの損傷、突然変異あるいは発現低下や、該DNAまたはmRNAの増加あるいは発現過多などの遺伝子診断剤として有用である。

20

本発明のDNAを用いる上記の遺伝子診断は、例えば、公知のノーザンハイブリダイゼーションやPCR-SSCP法(ゲノミクス(Genomics),第5巻,874~879頁(1989年)、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ユーエスエー(Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America),第86巻,2766~2770頁(1989年))などにより実施することができる。

30

例えば、ノーザンハイブリダイゼーションにより発現増加が検出された場合、例えば消化器疾患(例、過敏性腸症候群、潰瘍性大腸炎、クローン病、虚血性大腸炎、胃炎、消化性潰瘍、直腸炎、下痢、逆流性食道炎、十二指腸炎など)、生殖器疾患(例、前立腺肥大症、前立腺炎、精巣神経症、卵巣嚢腫など)、呼吸器疾患(例、慢性閉塞性肺疾患、喘息など)、中枢神経系疾患(例、アルツハイマー病、パーキンソン症候群、精神分裂病(統合失調症)、脳血管性痴呆、脳虚血、てんかんなど)、糖尿病、高血圧症、循環器疾患(例、心不全、不整脈、QT延長症候群、動脈硬化、狭心症など)、膵臓疾患(例、膵炎、膵嚢胞性線維症などの膵機能不全など)、肝臓疾患(例、肝硬変など)、腎疾患(例、腎不全、尿毒症など)、癌(例、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、非小細胞肺癌、卵巣癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、乳癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌、膵臓癌、胸腺腫、精巣腫瘍、食道癌、筋肉腫など)などである可能性が高いと診断することが出来る。反対に、発現低下が検出された場合やPCR-SSCP法によりDNAの突然変異が検出された場合は、例えば、消化器疾患(例、過敏性腸症候群、潰瘍性大腸炎、クローン病、虚血性大腸炎、胃炎、消化性潰瘍、直腸炎、下痢、逆流性食道炎、十二指腸炎など)、生殖器疾患(例、前立腺肥大症、前立腺炎、精巣神経症、卵巣嚢腫など)、呼吸器疾患(例、慢性閉塞性肺疾患、喘息など)、中枢神経系疾患(例、アルツハイマー病、パーキンソン症候群、精神分裂病(統合失調症)、脳血管性痴呆、脳虚血、てんかんなど)、糖尿病、高血圧症、循環器疾患(例、心不全、不整脈、QT延長症候群、動脈硬化、狭心症など)、膵臓疾患(例、膵

40

50

炎、膵嚢胞性線維症などの膵機能不全など)、肝臓疾患(例、肝硬変など)、腎疾患(例、腎不全、尿毒症など)、癌(例、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、非小細胞肺癌、卵巣癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、乳癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌、膵臓癌、胸腺腫、精巣腫瘍、食道癌、筋肉腫など)などである可能性が高いと診断することができる。

【0053】

〔5〕アンチセンスヌクレオチドを含有する医薬

本発明のDNAに相補的に結合し、該DNAの発現を抑制することができる本発明のアンチセンスヌクレオチドは低毒性であり、生体内における本発明のタンパク質または本発明のDNAの機能(例、 K^+ イオンの透過)を抑制することができるので、例えば、消化器疾患(例、過敏性腸症候群、潰瘍性大腸炎、クローン病、虚血性大腸炎、胃炎、消化性潰瘍、直腸炎、下痢、逆流性食道炎、十二指腸炎など)、生殖器疾患(例、前立腺肥大症、前立腺炎、精巣神経症、卵巣嚢腫など)、呼吸器疾患(例、慢性閉塞性肺疾患、喘息など)、中枢神経系疾患(例、アルツハイマー病、パーキンソン症候群、精神分裂病(統合失調症)、脳血管性痴呆、脳虚血、てんかんなど)、糖尿病、高血圧症、循環器疾患(例、心不全、不整脈、QT延長症候群、動脈硬化、狭心症など)、膵臓疾患(例、膵炎、膵嚢胞性線維症などの膵機能不全など)、肝臓疾患(例、肝硬変など)、腎疾患(例、腎不全、尿毒症など)、癌(例、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、非小細胞肺癌、卵巣癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、乳癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌、膵臓癌、胸腺腫、精巣腫瘍、食道癌、筋肉腫など)などの予防・治療剤として使用することができる。好ましくは、消化器疾患、生殖器疾患、呼吸器疾患などの予防・治療剤である。

上記アンチセンスヌクレオチドを上記の予防・治療剤として使用する場合、公知の方法に従って製剤化し、投与することができる。

例えば、該アンチセンスヌクレオチドを用いる場合、該アンチセンスヌクレオチドを単独あるいはレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルスアソシエータドウイルスベクターなどの適当なベクターに挿入した後、常套手段に従って、ヒトまたは哺乳動物(例、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど)に対して経口的または非経口的に投与することができる。該アンチセンスヌクレオチドは、そのまま、あるいは摂取促進のために補助剤などの生理学的に認められる担体とともに製剤化し、遺伝子銃やハイドロゲルカテーテルのようなカテーテルによって投与できる。

該アンチセンスヌクレオチドの投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、過敏性腸症候群の治療の目的で本発明のアンチセンスヌクレオチドを大腸に局所投与する場合、一般的に成人(体重60kg)においては、一日につき該アンチセンスヌクレオチドを約0.1~100mg投与する。

さらに、該アンチセンスヌクレオチドは、組織や細胞における本発明のDNAの存在やその発現状況を調べるための診断用オリゴヌクレオチドプローブとして使用することもできる。

【0054】

さらに、本発明は、

(i)本発明のタンパク質をコードするRNAの一部とそれに相補的なRNAを含有する二重鎖RNA、

(ii)前記二重鎖RNAを含有してなる医薬、

(iii)本発明のタンパク質をコードするRNAの一部を含有するリボザイム、

(iv)前記リボザイムを含有してなる医薬、

(v)前記リボザイムをコードする遺伝子(DNA)を含有する発現ベクターなども提供する。

上記アンチセンスポリヌクレオチドと同様に、二重鎖RNA、リボザイムなども、本発明のDNAから転写されるRNAを破壊またはその機能を抑制することができ、生体内における本発明で用いられるタンパク質または本発明で用いられるDNAの機能を抑制することができるので、例えば、消化器疾患(例、過敏性腸症候群、潰瘍性大腸炎、クローン病、虚血性大腸炎、胃炎、消化性潰瘍、直腸炎、下痢、逆流性食道炎、十二指腸炎など)、

10

20

30

40

50

生殖器疾患（例、前立腺肥大症、前立腺炎、精巣神経症、卵巣嚢腫など）、呼吸器疾患（例、慢性閉塞性肺疾患、喘息など）、中枢神経系疾患（例、アルツハイマー病、パーキンソン症候群、精神分裂病（統合失調症）、脳血管性痴呆、脳虚血、てんかんなど）、糖尿病、高血圧症、循環器疾患（例、心不全、不整脈、QT延長症候群、動脈硬化、狭心症など）、膵臓疾患（例、膵炎、膵嚢胞性線維症などの膵機能不全など）、肝臓疾患（例、肝硬変など）、腎疾患（例、腎不全、尿毒症など）、癌（例、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、非小細胞肺癌、卵巣癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、乳癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌、膵臓癌、胸腺腫、精巣腫瘍、食道癌、筋肉腫など）などの予防・治療剤として使用することができる。好ましくは、消化器疾患、生殖器疾患、呼吸器疾患などの予防・治療剤である。

二重鎖RNAは、公知の方法（例、Nature, 411巻, 494頁, 2001年）に準じて、本発明のポリヌクレオチドの配列を基に設計して製造することができる。リボザイムは、公知の方法（例、TRENDS in Molecular Medicine, 7巻, 221頁, 2001年）に準じて、本発明のポリヌクレオチドの配列を基に設計して製造することができる。例えば、公知のリボザイムの配列の一部を本発明のタンパク質をコードするRNAの一部に置換することによって製造することができる。本発明のタンパク質をコードするRNAの一部としては、公知のリボザイムによって切断され得るコンセンサス配列NUX（式中、Nはすべての塩基を、XはG以外の塩基を示す）の近傍の配列などが挙げられる。

10

上記の二重鎖RNAまたはリボザイムを上記予防・治療剤として使用する場合、アンチセンスポリヌクレオチドと同様にして製剤化し、投与することができる。また、前記(v)の発現ベクターは、公知の遺伝子治療法などと同様に用い、上記予防・治療剤として使用する。

20

〔6〕本発明の抗体を含有する医薬

本発明のタンパク質の活性を中和する作用を有する本発明の抗体は、例えば、消化器疾患（例、過敏性腸症候群、潰瘍性大腸炎、クローン病、虚血性大腸炎、胃炎、消化性潰瘍、直腸炎、下痢、逆流性食道炎、十二指腸炎など）、生殖器疾患（例、前立腺肥大症、前立腺炎、精巣神経症、卵巣嚢腫など）、呼吸器疾患（例、慢性閉塞性肺疾患、喘息など）、中枢神経系疾患（例、アルツハイマー病、パーキンソン症候群、精神分裂病（統合失調症）、脳血管性痴呆、脳虚血、てんかんなど）、糖尿病、高血圧症、循環器疾患（例、心不全、不整脈、QT延長症候群、動脈硬化、狭心症など）、膵臓疾患（例、膵炎、膵嚢胞性線維症などの膵機能不全など）、肝臓疾患（例、肝硬変など）、腎疾患（例、腎不全、尿毒症など）、癌（例、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、非小細胞肺癌、卵巣癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、乳癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌、膵臓癌、胸腺腫、精巣腫瘍、食道癌、筋肉腫など）などの予防・治療剤として使用することができる。好ましくは消化器疾患、生殖器疾患、呼吸器疾患などの予防・治療剤である。

30

本発明の抗体を含有する上記疾患の治療・予防剤は低毒性であり、そのまま液剤として、または適当な剤型の医薬組成物として、ヒトまたは哺乳動物（例、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して経口的または非経口的（例、静脈注射等）に投与することができる。投与量は、投与対象、対象疾患、症状、投与ルートなどによっても異なるが、例えば、成人の過敏性腸症候群の予防・治療のために使用する場合には、本発明の抗体を1回量として、通常0.01~20mg/kg体重程度、好ましくは0.1~10mg/kg体重程度、さらに好ましくは0.1~5mg/kg体重程度を、1日1~5回程度、好ましくは1日1~3回程度、静脈注射により投与するのが好都合である。他の非経口投与および経口投与の場合もこれに準ずる量を投与することができる。症状が特に重い場合には、その症状に応じて増量してもよい。

40

本発明の抗体は、それ自体または適当な医薬組成物として投与することができる。上記投与に用いられる医薬組成物は、上記抗体またはその塩と薬理的に許容され得る担体、希釈剤もしくは賦形剤とを含むものである。かかる組成物は、経口または非経口投与（例、静脈注射）に適する剤形として提供される。

なお前記した各組成物は、上記抗体との配合により好ましくない相互作用を生じない限り

50

他の活性成分を含有してもよい。

【0055】

〔7〕本発明のDNAを有する動物の作出

本発明は、外来性の本発明のタンパク質をコードするDNA（以下、本発明の外来性DNAと略記する）またはその変異DNA（本発明の外来性変異DNAと略記する場合がある）を有する非ヒト哺乳動物を提供する。

すなわち、本発明は、

- (1) 本発明の外来性DNAまたはその変異DNAを有する非ヒト哺乳動物、
- (2) 非ヒト哺乳動物がゲッ歯動物である上記(1)記載の動物、
- (3) ゲッ歯動物がマウスまたはラットである上記(2)記載の動物、および
- (4) 本発明の外来性DNAまたはその変異DNAを含有し、哺乳動物において発現しうる組換えベクターなどを提供する。

10

本発明の外来性DNAまたはその変異DNAを有する非ヒト哺乳動物（以下、本発明のDNA導入動物と略記する）は、未受精卵、受精卵、精子およびその始原細胞を含む胚芽細胞などに対して、好ましくは、非ヒト哺乳動物の発生における胚発生の段階（さらに好ましくは、単細胞または受精卵細胞の段階でかつ一般に8細胞期以前）に、リン酸カルシウム法、電気パルス法、リポフェクション法、凝集法、マイクロインジェクション法、パーティクルガン法、DEAE-デキストラン法などにより目的とするDNAを導入することによって作出することができる。また、該DNA導入方法により、体細胞、生体の臓器、組織細胞などに目的とする本発明の外来性DNAを導入し、細胞培養、組織培養などに利用することもでき、さらに、これら細胞を上述の胚芽細胞と公知の細胞融合法により融合させることにより本発明のDNA導入動物を作出することもできる。

20

非ヒト哺乳動物としては、例えば、ウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、マウス、ラットなどが用いられる。なかでも、病体動物モデル系の作成の面から個体発生および生物サイクルが比較的短く、また、繁殖が容易なゲッ歯動物、とりわけマウス（例えば、純系として、C57BL/6系統、DBA2系統など、交雑系として、B6C3F₁系統、BDF₁系統、B6D2F₁系統、BALB/c系統、ICR系統など）またはラット（例えば、Wistar、SDなど）などが好ましい。

哺乳動物において発現しうる組換えベクターにおける「哺乳動物」としては、上記の非ヒト哺乳動物の他にヒトなどがあげられる。

30

【0056】

本発明の外来性DNAとは、非ヒト哺乳動物が本来有している本発明のDNAではなく、いったん哺乳動物から単離・抽出された本発明のDNAをいう。

本発明の変異DNAとしては、元の本発明のDNAの塩基配列に変異（例えば、突然変異など）が生じたもの、具体的には、塩基の付加、欠損、他の塩基への置換などが生じたDNAなどが用いられ、また、異常DNAも含まれる。

該異常DNAとしては、異常な本発明のタンパク質を発現させるDNAを意味し、例えば、正常な本発明のタンパク質の機能を抑制するタンパク質を発現させるDNAなどが用いられる。

本発明の外来性DNAは、対象とする動物と同種あるいは異種のどちらの哺乳動物由来のものであってもよい。本発明のDNAを対象動物に導入するにあたっては、該DNAを動物細胞で発現させうるプロモーターの下流に結合したDNAコンストラクトとして用いるのが一般に有利である。例えば、本発明のヒトDNAを導入する場合、これと相同性が高い本発明のDNAを有する各種哺乳動物（例えば、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスなど）由来のDNAを発現させうる各種プロモーターの下流に、本発明のヒトDNAを結合したDNAコンストラクト（例、ベクターなど）を対象哺乳動物の受精卵、例えば、マウス受精卵へマイクロインジェクションすることによって本発明のDNAを高発現するDNA導入哺乳動物を作出することができる。

40

【0057】

本発明のタンパク質の発現ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド、枯草菌由来のプ

50

ラスミド、酵母由来のプラスミド、ファージなどのバクテリオファージ、モロニー白血
病ウイルスなどのレトロウイルス、ワクシニアウイルスまたはバキュロウイルスなどの動
物ウイルスなどが用いられる。なかでも、大腸菌由来のプラスミド、枯草菌由来のプラス
ミドまたは酵母由来のプラスミドなどが好ましく用いられる。

上記のDNA発現調節を行なうプロモーターとしては、例えば、(i)ウイルス(例、シ
ミアンウイルス、サイトメガロウイルス、モロニー白血病ウイルス、JCウイルス、乳癌
ウイルス、ポリオウイルスなど)に由来するDNAのプロモーター、(ii)各種哺乳動
物(ヒト、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスなど)由来の
プロモーター、例えば、アルブミン、インスリンII、ウロプラキンII、エラストラーゼ
、エリスロポエチン、エンドセリン、筋クレアチンキナーゼ、グリア線維性酸性タンパク
質、グルタチオンS-トランスフェラーゼ、血小板由来成長因子、ケラチンK1, K1
0およびK14、コラーゲンI型およびII型、サイクリックAMP依存タンパク質キナ
ーゼIサブユニット、ジストロフィン、酒石酸抵抗性アルカリフォスファターゼ、心房
ナトリウム利尿性因子、内皮レセプターチロシンキナーゼ(一般にTie2と略される)
、ナトリウムカリウムアデノシン3リン酸化酵素(Na, K-ATPase)、ニューロ
フィラメント軽鎖、メタロチオネインIおよびIIA、メタロプロティナーゼ1組織イン
ヒビター、MHCクラスI抗原(H-2L)、H-ras、レニン、ドーパミン-水酸
化酵素、甲状腺ペルオキシダーゼ(TPO)、ポリペプチド鎖延長因子1(EF-1
)、アクチン、およびミオシン重鎖、ミオシン軽鎖1および2、ミエリン基礎タン
パク質、チログロブリン、Thy-1、免疫グロブリン、H鎖可変部(VNP)、血清ア
ミロイドPコンポーネント、ミオグロビン、トロポニンC、平滑筋アクチン、プレプロ
エンケファリンA、バソプレシンなどのプロモーターなどが用いられる。なかでも、全身
で高発現することが可能なサイトメガロウイルスプロモーター、ヒトポリペプチド鎖延長
因子1(EF-1)のプロモーター、ヒトおよびニワトリアクチンプロモーターな
どが好適である。

10

20

上記ベクターは、DNA導入哺乳動物において目的とするmRNAの転写を終結する配列
(一般にターミネターと呼ばれる)を有していることが好ましく、例えば、ウイルス由来
および各種哺乳動物由来の各DNAの配列を用いることができ、好ましくは、シミアンウ
イルスのSV40ターミネターなどが用いられる。

【0058】

その他、目的とする外来性DNAをさらに高発現させる目的で各DNAのスプライシング
シグナル、エンハンサー領域、真核DNAのイントロンの一部などをプロモーター領域の
5'上流、プロモーター領域と翻訳領域間あるいは翻訳領域の3'下流に連結することも
目的により可能である。

30

正常な本発明のタンパク質の翻訳領域は、ヒトまたは各種哺乳動物(例えば、ウサギ、イ
ヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスなど)由来の肝臓、腎臓、甲状腺細
胞、線維芽細胞由来DNAおよび市販の各種ゲノムDNAライブラリーよりゲノムDNA
の全てあるいは一部として、または肝臓、腎臓、甲状腺細胞、線維芽細胞由来RNAより
公知の方法により調製された相補DNAを原料として取得することが出来る。また、外来
性の異常DNAは、上記の細胞または組織より得られた正常なポリペプチドの翻訳領域を
点突然変異誘発法により変異した翻訳領域を作製することができる。

40

該翻訳領域は導入動物において発現しうるDNAコンストラクトとして、前記のプロモ
ーターの下流および所望により転写終結部位の上流に連結させる通常のDNA工学的手法に
より作製することができる。

受精卵細胞段階における本発明の外来性DNAの導入は、対象哺乳動物の胚芽細胞および
体細胞のすべてに存在するように確保される。DNA導入後の作出動物の胚芽細胞におい
て、本発明の外来性DNAが存在することは、作出動物の後代がすべて、その胚芽細胞お
よび体細胞のすべてに本発明の外来性DNAを保持することを意味する。本発明の外来性
DNAを受け継いだこの種の動物の子孫はその胚芽細胞および体細胞のすべてに本発明の
外来性DNAを有する。

50

本発明の外來性正常DNAを導入した非ヒト哺乳動物は、交配により外來性DNAを安定に保持することを確認して、該DNA保有動物として通常の飼育環境で継代飼育することが出来る。

受精卵細胞段階における本発明の外來性DNAの導入は、対象哺乳動物の胚芽細胞および体細胞の全てに過剰に存在するように確保される。DNA導入後の作出動物の胚芽細胞において本発明の外來性DNAが過剰に存在することは、作出動物の子孫が全てその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の外來性DNAを過剰に有することを意味する。本発明の外來性DNAを受け継いだこの種の動物の子孫はその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の外來性DNAを過剰に有する。

導入DNAを相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得し、この雌雄の動物を交配することによりすべての子孫が該DNAを過剰に有するように繁殖継代することができる。

【0059】

本発明の正常DNAを有する非ヒト哺乳動物は、本発明の正常DNAが高発現させられており、内在性の正常DNAの機能を促進することにより最終的に本発明のタンパク質の機能亢進症を発症することがあり、その病態モデル動物として利用することができる。例えば、本発明の正常DNA導入動物を用いて、本発明のタンパク質の機能亢進症や、本発明のタンパク質が関連する疾患の病態機序の解明およびこれらの疾患の治療方法の検討を行なうことが可能である。

また、本発明の外來性正常DNAを導入した哺乳動物は、遊離した本発明のタンパク質の増加症状を有することから、本発明のタンパク質に関連する疾患に対する治療薬のスクリーニング試験にも利用可能である。

一方、本発明の外來性異常DNAを有する非ヒト哺乳動物は、交配により外來性DNAを安定に保持することを確認して該DNA保有動物として通常の飼育環境で継代飼育することが出来る。さらに、目的とする外來DNAを前述のプラスミドに組み込んで原料として用いることができる。プロモーターとのDNAコンストラクトは、通常のDNA工学的手法によって作製することができる。受精卵細胞段階における本発明の異常DNAの導入は、対象哺乳動物の胚芽細胞および体細胞の全てに存在するように確保される。DNA転移後の作出動物の胚芽細胞において本発明の異常DNAが存在することは、作出動物の子孫が全てその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の異常DNAを有することを意味する。本発明の外來性DNAを受け継いだこの種の動物の子孫は、その胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の異常DNAを有する。導入DNAを相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得し、この雌雄の動物を交配することによりすべての子孫が該DNAを有するように繁殖継代することができる。

【0060】

本発明の異常DNAを有する非ヒト哺乳動物は、本発明の異常DNAが高発現させられており、内在性の正常DNAの機能を阻害することにより最終的に本発明のタンパク質の機能不活性型不応症となることがあり、その病態モデル動物として利用することができる。例えば、本発明の異常DNA導入動物を用いて、本発明のタンパク質の機能不活性型不応症の病態機序の解明およびこの疾患を治療方法の検討を行なうことが可能である。

また、具体的な利用可能性としては、本発明の異常DNA高発現動物は、本発明のタンパク質の機能不活性型不応症における本発明の異常タンパク質による正常タンパク質の機能阻害(dominant negative作用)を解明するモデルとなる。

また、本発明の外來異常DNAを導入した哺乳動物は、遊離した本発明のタンパク質の増加症状を有することから、本発明のタンパク質またはその機能不活性型不応症に対する治療薬スクリーニング試験にも利用可能である。

また、上記2種類の本発明のDNA導入動物のその他の利用可能性として、例えば、

(i) 組織培養のための細胞源としての使用、

(ii) 本発明のDNA導入動物の組織中のDNAもしくはRNAを直接分析する、またはDNAにより発現されたポリペプチド組織を分析することによる、本発明のタンパク質

により特異的に発現あるいは活性化するタンパク質との関連性についての解析、
 (i i i) D N A を有する組織の細胞を標準組織培養技術により培養し、これらを使用して、一般に培養困難な組織からの細胞の機能の研究、

(i v) 上記 (i i i) 記載の細胞を用いることによる細胞の機能を高めるような薬剤のスクリーニング、および

(v) 本発明の変異タンパク質を単離精製およびその抗体作製などが考えられる。

さらに、本発明の D N A 導入動物を用いて、本発明のタンパク質の機能不活性型不応症などを含む、本発明のタンパク質に関連する疾患の臨床症状を調べることができ、また、本発明のタンパク質に関連する疾患モデルの各臓器におけるより詳細な病理学的所見が得られ、新しい治療方法の開発、さらには、該疾患による二次的疾患の研究および治療に貢献

10

することができる。
 また、本発明の D N A 導入動物から各臓器を取り出し、細切後、トリプシンなどのタンパク質分解酵素により、遊離した D N A 導入細胞の取得、その培養またはその培養細胞の系統化を行なうことが可能である。さらに、本発明のタンパク質産生細胞の特定化、アポトーシス、分化あるいは増殖との関連性、またはそれらにおけるシグナル伝達機構を調べ、それらの異常を調べることができ、本発明のタンパク質およびその作用解明のための有効な研究材料となる。

さらに、本発明の D N A 導入動物を用いて、本発明のタンパク質の機能不活性型不応症を含む、本発明のタンパク質に関連する疾患の治療薬の開発を行なうために、上述の検査法および定量法などを用いて、有効で迅速な該疾患治療薬のスクリーニング法を提供することが可能となる。また、本発明の D N A 導入動物または本発明の外来性 D N A 発現ベクターを用いて、本発明のタンパク質が関連する疾患の D N A 治療法を検討、開発することが可能である。

20

【 0 0 6 1 】

〔 8 〕 ノックアウト動物

本発明は、本発明の D N A が不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞および本発明の D N A 発現不全非ヒト哺乳動物を提供する。

すなわち、本発明は、

- (1) 本発明の D N A が不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞、
- (2) 該 D N A がレポーター遺伝子 (例、大腸菌由来の - ガラクトシダーゼ遺伝子) を
- 導入することにより不活性化された上記 (1) 記載の胚幹細胞、
- (3) ネオマイシン耐性である上記 (1) 記載の胚幹細胞、
- (4) 非ヒト哺乳動物がゲッ歯動物である上記 (1) 記載の胚幹細胞、
- (5) ゲッ歯動物がマウスである上記 (4) 記載の胚幹細胞、
- (6) 本発明の D N A が不活性化された該 D N A 発現不全非ヒト哺乳動物、
- (7) 該 D N A がレポーター遺伝子 (例、大腸菌由来の - ガラクトシダーゼ遺伝子) を
- 導入することにより不活性化され、該レポーター遺伝子が本発明の D N A に対するプロモーターの制御下で発現しうる上記 (6) 記載の非ヒト哺乳動物、
- (8) 非ヒト哺乳動物がゲッ歯動物である上記 (6) 記載の非ヒト哺乳動物、
- (9) ゲッ歯動物がマウスである上記 (8) 記載の非ヒト哺乳動物、および
- (1 0) 上記 (7) 記載の動物に、試験化合物を投与し、レポーター遺伝子の発現を検出
- することを特徴とする本発明の D N A に対するプロモーター活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

30

40

本発明の D N A が不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞とは、該非ヒト哺乳動物が有する本発明の D N A に人為的に変異を加えることにより、D N A の発現能を抑制するか、あるいは該 D N A がコードしている本発明のタンパク質の活性を実質的に喪失させることにより、D N A が実質的に本発明のタンパク質の発現能を有さない (以下、本発明のノックアウト D N A と称することがある) 非ヒト哺乳動物の胚幹細胞 (以下、E S 細胞と略記する) をいう。

非ヒト哺乳動物としては、前記と同様のものが用いられる。

50

【 0 0 6 2 】

本発明のDNAに人為的に変異を加える方法としては、例えば、遺伝子工学的手法により該DNA配列の一部又は全部の削除、他DNAを挿入または置換させることによって行なうことができる。これらの変異により、例えば、コドンの読み取り枠をずらしたり、プロモーターあるいはエキソンの機能を破壊することにより本発明のノックアウトDNAを複製すればよい。

本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞（以下、本発明のDNA不活性化ES細胞または本発明のノックアウトES細胞と略記する）の具体例としては、例えば、目的とする非ヒト哺乳動物が有する本発明のDNAを単離し、そのエキソン部分にネオマイシン耐性遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子を代表とする薬剤耐性遺伝子、あるいはlacZ（ β -ガラクトシダーゼ遺伝子）、cat（クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子）を代表とするレポーター遺伝子等を挿入することによりエキソンの機能を破壊するか、あるいはエキソン間のイントロン部分に遺伝子の転写を終結させるDNA配列（例えば、polyA付加シグナルなど）を挿入し、完全なmRNAを合成できなくすることによって、結果的に遺伝子を破壊するように構築したDNA配列を有するDNA鎖（以下、ターゲティングベクターと略記する）を、例えば相同組換え法により該動物の染色体に導入し、得られたES細胞について本発明のDNA上あるいはその近傍のDNA配列をプローブとしたサザンハイブリダイゼーション解析あるいはターゲティングベクター上のDNA配列とターゲティングベクター作製に使用した本発明のDNA以外の近傍領域のDNA配列をプライマーとしたPCR法により解析し、本発明のノックアウトES細胞を選別することにより得ることができる。

【 0 0 6 3 】

また、相同組換え法等により本発明のDNAを不活化させる元のES細胞としては、例えば、前述のような既に樹立されたものを用いてもよく、また公知のEvansとKauffmanの方法に準じて新しく樹立したものでもよい。例えば、マウスのES細胞の場合、現在、一般的には129系のES細胞が使用されているが、免疫学的背景がはっきりしていないので、これに代わる純系で免疫学的に遺伝的背景が明らかなES細胞を取得するなどの目的で例えば、C57BL/6マウスやC57BL/6の採卵数の少なさをDBA/2との交雑により改善したBDF₁マウス（C57BL/6とDBA/2とのF₁）を用いて樹立したものなども良好に用いる。BDF₁マウスは、採卵数が多く、かつ、卵が丈夫であるという利点に加えて、C57BL/6マウスを背景に持つので、これを用いて得られたES細胞は病態モデルマウスを作出したとき、C57BL/6マウスとバッククロスすることでその遺伝的背景をC57BL/6マウスに代えることが可能である点で有利に用い得る。

また、ES細胞を樹立する場合、一般には受精後3、5日目の胚盤胞を使用するが、これ以外に8細胞期胚を採卵し胚盤胞まで培養して用いることにより効率よく多数の初期胚を取得することができる。

また、雌雄いずれのES細胞を用いてもよいが、通常雄のES細胞の方が生殖系列キメラを作出するのに都合が良い。また、煩雑な培養の手間を削減するためにもできるだけ早く雌雄の判別を行なうことが望ましい。

ES細胞の雌雄の判定方法としては、例えば、PCR法によりY染色体上の性決定領域の遺伝子を増幅、検出する方法が、その1例としてあげることができる。この方法を使用すれば、従来、核型分析をするのに約10⁶個の細胞数を要していたのに対して、1コロニー程度のES細胞数（約50個）で済むので、培養初期におけるES細胞の第一次セクションを雌雄の判別で行なうことが可能であり、早期に雄細胞の選定を可能にしたことにより培養初期の手間は大幅に削減できる。

【 0 0 6 4 】

また、第二次セクションとしては、例えば、G-バンディング法による染色体数の確認等により行うことができる。得られるES細胞の染色体数は正常数の100%が望ましいが、樹立の際の物理的操作等の関係上困難な場合は、ES細胞の遺伝子をノックアウトし

10

20

30

40

50

た後、正常細胞（例えば、マウスでは染色体数が $2n = 40$ である細胞）に再びクローニングすることが望ましい。

このようにして得られた胚幹細胞株は、通常その増殖性は大変良いが、個体発生できる能力を失いやすいので、注意深く継代培養することが必要である。例えば、STO 繊維芽細胞のような適当なフィーダー細胞上で LIF (1 - 10000 U/ml) 存在下に炭酸ガス培養器内（好ましくは、5% 炭酸ガス、95% 空気または 5% 酸素、5% 炭酸ガス、90% 空気）で約 37 で培養するなどの方法で培養し、継代時には、例えば、トリプシン / EDTA 溶液（通常 0.001 ~ 0.5% トリプシン / 0.1 ~ 5 mM EDTA、好ましくは約 0.1% トリプシン / 1 mM EDTA）処理により単細胞化し、新たに用意したフィーダー細胞上に播種する方法などがとられる。このような継代は、通常 1 ~ 3 日 10

毎に行なうが、この際に細胞の観察を行い、形態的に異常な細胞が見受けられた場合はその培養細胞は放棄することが望まれる。

ES 細胞は、適当な条件により、高密度に至るまで単層培養するか、または細胞集塊を形成するまで浮遊培養することにより、頭頂筋、内臓筋、心筋などの種々のタイプの細胞に分化させることが可能であり〔M. J. Evans 及び M. H. Kaufman, ナチャー (Nature) 第 292 巻、154 頁、1981 年; G. R. Martin プロシーディングス・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・ユ ーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.) 第 78 巻、7634 頁、1981 年; T. C. Doetschman ら、ジャーナル・オブ・エンブリオロジー・アンド・エクスペリメンタル・モルフォロジー、第 87 巻、27 頁、1985 年〕、本発明の ES 細胞を分化させて得られる本発明の DNA 発現不全細胞は、インビトロにおける本発明のタンパク質の細胞生物学的検討において有用である。

本発明の DNA 発現不全非ヒト哺乳動物は、該動物の mRNA 量を公知方法を用いて測定して間接的にその発現量を比較することにより、正常動物と区別することが可能である。該非ヒト哺乳動物としては、前記と同様のものが用いられる。

【0065】

本発明の DNA 発現不全非ヒト哺乳動物は、例えば、前述のようにして作製したターゲッティングベクターをマウス胚幹細胞またはマウス卵細胞に導入し、導入によりターゲッティングベクターの本発明の DNA が不活性化された DNA 配列が遺伝子相同組換えにより、マウス胚幹細胞またはマウス卵細胞の染色体上の本発明の DNA と入れ換わる相同組換 30

えをさせることにより、本発明の DNA をロックアウトさせることができる。

本発明の DNA がロックアウトされた細胞は、本発明の DNA 上またはその近傍の DNA 配列をプローブとしたサザンハイブリダイゼーション解析またはターゲッティングベクター上の DNA 配列と、ターゲッティングベクターに使用したマウス由来の本発明の DNA 以外の近傍領域の DNA 配列とをプライマーとした PCR 法による解析で判定することができる。非ヒト哺乳動物胚幹細胞を用いた場合は、遺伝子相同組換えにより、本発明の DNA が不活性化された細胞株をクローニングし、その細胞を適当な時期、例えば、8 細胞期の非ヒト哺乳動物胚または胚盤胞に注入し、作製したキメラ胚を偽妊娠させた該非ヒト哺乳動物の子宮に移植する。作出された動物は正常な本発明の DNA 座をもつ細胞と人為的に変異した本発明の DNA 座をもつ細胞との両者から構成されるキメラ動物である。該 40

キメラ動物の生殖細胞の一部が変異した本発明の DNA 座をもつ場合、このようなキメラ個体と正常個体を交配することにより得られた個体群より、全ての組織が人為的に変異を加えた本発明の DNA 座をもつ細胞で構成された個体を、例えば、コートカラーの判定等により選別することにより得られる。このようにして得られた個体は、通常、本発明のタンパク質のヘテロ発現不全個体であり、本発明のタンパク質のヘテロ発現不全個体同志を交配し、それらの産仔から本発明のタンパク質のホモ発現不全個体を得ることができる。卵細胞を使用する場合は、例えば、卵細胞核内にマイクロインジェクション法で DNA 溶液を注入することによりターゲッティングベクターを染色体内に導入したトランスジェニック非ヒト哺乳動物を得ることができ、これらのトランスジェニック非ヒト哺乳動物に比べて、遺伝子相同組換えにより本発明の DNA 座に変異のあるものを選択することにより 50

得られる。

このようにして本発明のDNAがロックアウトされている個体は、交配により得られた動物個体も該DNAがロックアウトされていることを確認して通常の飼育環境で飼育継代を行なうことができる。

さらに、生殖系列の取得および保持についても常法に従えばよい。すなわち、該不活化DNAの保有する雌雄の動物を交配することにより、該不活化DNAを相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得しうる。得られたホモザイゴート動物は、母親動物に対して、正常個体1，ホモザイゴート複数になるような状態で飼育することにより効率的に得ることができる。ヘテロザイゴート動物の雌雄を交配することにより、該不活化DNAを有するホモザイゴートおよびヘテロザイゴート動物を繁殖継代する。

10

本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞は、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物を作出する上で、非常に有用である。

また、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、本発明のタンパク質により誘導され得る種々の生物活性を欠失するため、本発明のタンパク質の生物活性の不活性化を原因とする疾病のモデルとなり得るので、これらの疾病の原因究明及び治療法の検討に有用である。

【0066】

〔8a〕本発明のDNAの欠損や損傷などに起因する疾病に対して治療・予防効果を有する化合物のスクリーニング方法

本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、本発明のDNAの欠損や損傷などに起因する疾病に対して治療・予防効果を有する化合物のスクリーニングに用いることができる。

20

すなわち、本発明は、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物に試験化合物を投与し、該動物の変化を観察・測定することの特徴とする、本発明のDNAの欠損や損傷などに起因する疾病に対して治療・予防効果を有する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

該スクリーニング方法において用いられる本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物としては、前記と同様のものがあげられる。

試験化合物としては、例えば、ペプチド、タンパク質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液、血漿などがあげられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

30

具体的には、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物を、試験化合物で処理し、無処理の対照動物と比較し、該動物の各器官、組織、疾病の症状などの変化を指標として試験化合物の治療・予防効果を試験することができる。

試験動物を試験化合物で処理する方法としては、例えば、経口投与、静脈注射などが用いられ、試験動物の症状、試験化合物の性質などにあわせて適宜選択することができる。また、試験化合物の投与量は、投与方法、試験化合物の性質などにあわせて適宜選択することができる。

【0067】

例えば、過敏性腸症候群に対して予防・治療効果を有する化合物をスクリーニングする場合、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物に試験化合物を投与し、該動物の拘束ストレスに対する排便量変化を経時的に測定する。

40

該スクリーニング方法を用いて得られる化合物は、上記した試験化合物から選ばれた化合物であり、本発明のタンパク質の欠損や損傷などによって引き起こされる疾患に対して予防・治療効果を有するので、該疾患に対する安全で低毒性な予防・治療剤などの医薬として使用することができる。さらに、上記スクリーニングで得られた化合物から誘導される化合物も同様に用いることができる。

【0068】

該スクリーニング方法で得られた化合物は塩を形成していてもよく、該化合物の塩としては、生理学的に許容される酸（例、無機酸、有機酸など）や塩基（例、アルカリ金属など）などとの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。この様な

50

塩としては、例えば、無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸など）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸など）との塩などが用いられる。

該スクリーニング方法で得られた化合物またはその塩を含有する医薬は、前記した本発明のタンパク質を含有する医薬と同様にして製造することができる。

このようにして得られる製剤は、安全で低毒性であるので、例えば、ヒトまたはその他の哺乳動物（例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

該化合物またはその塩の投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、該化合物を経口投与する場合、一般的に成人（体重60kgとして）の過敏性腸症候群の患者においては、一日につき該化合物を約0.1～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mg投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、該化合物を注射剤の形で通常成人（体重60kgとして）の過敏性腸症候群の患者に投与する場合、一日につき該化合物を約0.01～30mg、好ましくは約0.1～20mg、より好ましくは約0.1～10mgを静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、体重60kg当たり換算した量を投与することができる。

【0069】

〔8b〕本発明のDNAに対するプロモーターの活性を促進または阻害する化合物のスクリーニング方法

本発明は、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物に、試験化合物を投与し、レポーター遺伝子の発現を検出することを特徴とする本発明のDNAに対するプロモーターの活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

上記スクリーニング方法において、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物としては、前記した本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物の中でも、本発明のDNAがレポーター遺伝子を導入することにより不活性化され、該レポーター遺伝子が本発明のDNAに対するプロモーターの制御下で発現しうるものが用いられる。

試験化合物としては、前記と同様のものがあげられる。

レポーター遺伝子としては、前記と同様のものが用いられ、 β -ガラクトシダーゼ遺伝子（lacZ）、可溶性アルカリフォスファターゼ遺伝子またはルシフェラーゼ遺伝子などが好適である。

【0070】

本発明のDNAをレポーター遺伝子で置換された本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物では、レポーター遺伝子が本発明のDNAに対するプロモーターの支配下に存在するので、レポーター遺伝子がコードする物質の発現をトレースすることにより、プロモーターの活性を検出することができる。

例えば、本発明のタンパク質をコードするDNA領域の一部を大腸菌由来の β -ガラクトシダーゼ遺伝子（lacZ）で置換している場合、本来、本発明のタンパク質の発現する組織で、本発明のタンパク質の代わりに β -ガラクトシダーゼが発現する。従って、例えば、5-プロモ-4-クロロ-3-インドリル- β -ガラクトピラノシド（X-gal）のような β -ガラクトシダーゼの基質となる試薬を用いて染色することにより、簡便に本発明のタンパク質の動物生体内における発現状態を観察することができる。具体的には、本発明のタンパク質欠損マウスまたはその組織切片をグルタルアルデヒドなどで固定し、リン酸緩衝生理食塩液（PBS）で洗浄後、X-galを含む染色液で、室温または37℃付近で、約30分ないし1時間反応させた後、組織標本を1mM EDTA/PBS溶液で洗浄することによって、 β -ガラクトシダーゼ反応を停止させ、呈色を観察すればよい。また、常法に従い、lacZをコードするmRNAを検出してもよい。

上記スクリーニング方法を用いて得られる化合物またはその塩は、上記した試験化合物から選ばれた化合物であり、本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進または阻害す

10

20

30

40

50

る化合物である。

【0071】

該スクリーニング方法で得られた化合物は塩を形成していてもよく、該化合物の塩としては、生理学的に許容される酸（例、無機酸など）や塩基（例、有機酸など）などとの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。この様な塩としては、例えば、無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸など）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸など）との塩などが用いられる。

本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進する化合物またはその塩は、本発明のタンパク質の発現を促進し、該タンパク質の機能を促進することができるので、例えば、消化器疾患（例、過敏性腸症候群、潰瘍性大腸炎、クローン病、虚血性大腸炎、胃炎、消化性潰瘍、直腸炎、下痢、逆流性食道炎、十二指腸炎など）、生殖器疾患（例、前立腺肥大症、前立腺炎、精巣神経症、卵巣嚢腫など）、呼吸器疾患（例、慢性閉塞性肺疾患、喘息など）、中枢神経系疾患（例、アルツハイマー病、パーキンソン症候群、精神分裂病（統合失調症）、脳血管性痴呆、脳虚血、てんかんなど）、糖尿病、高血圧症、循環器疾患（例、心不全、不整脈、QT延長症候群、動脈硬化、狭心症など）、膵臓疾患（例、膵炎、膵嚢胞性線維症などの膵機能不全など）、肝臓疾患（例、肝硬変など）、腎疾患（例、腎不全、尿毒症など）、癌（例、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、非小細胞肺癌、卵巣癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、乳癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌、膵臓癌、胸腺腫、精巣腫瘍、食道癌、筋肉腫など）などの予防・治療剤などの医薬として有用である。

【0072】

また、本発明のDNAに対するプロモーター活性を阻害する化合物またはその塩は、本発明のタンパク質の発現を阻害し、該タンパク質の機能を阻害することができるので、例えば、消化器疾患（例、過敏性腸症候群、潰瘍性大腸炎、クローン病、虚血性大腸炎、胃炎、消化性潰瘍、直腸炎、下痢、逆流性食道炎、十二指腸炎など）、生殖器疾患（例、前立腺肥大症、前立腺炎、精巣神経症、卵巣嚢腫など）、呼吸器疾患（例、慢性閉塞性肺疾患、喘息など）、中枢神経系疾患（例、アルツハイマー病、パーキンソン症候群、精神分裂病（統合失調症）、脳血管性痴呆、脳虚血、てんかんなど）、糖尿病、高血圧症、循環器疾患（例、心不全、不整脈、QT延長症候群、動脈硬化、狭心症など）、膵臓疾患（例、膵炎、膵嚢胞性線維症などの膵機能不全など）、肝臓疾患（例、肝硬変など）、腎疾患（例、腎不全、尿毒症など）、癌（例、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、非小細胞肺癌、卵巣癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、乳癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌、膵臓癌、胸腺腫、精巣腫瘍、食道癌、筋肉腫など）などの予防・治療剤などの医薬として有用である。

さらに、上記スクリーニングで得られた化合物から誘導される化合物も同様に用いることができる。

該スクリーニング方法で得られた化合物またはその塩を含有する医薬は、前記した本発明のタンパク質またはその塩を含有する医薬と同様にして製造することができる。

このようにして得られる製剤は、安全で低毒性であるので、例えば、ヒトまたはその他の哺乳動物（例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

該化合物またはその塩の投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進する化合物を経口投与する場合、一般的に成人（体重60kgとして）の過敏性腸症候群患者においては、一日につき該化合物を約0.1~100mg、好ましくは約1.0~50mg、より好ましくは約1.0~20mg投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進する化合物を注射剤の形で通常成人（体重60kgとして）の過敏性腸症候群患者に投与する場合、一日につき該化合物を約0.01~30mg、好ましくは約0.1~20mg、より好ましくは約0.1~10mgを静脈注射により投与するのが好都合で

ある。他の動物の場合も、体重60kgあたりに換算した量を投与することができる。

【0073】

一方、例えば、本発明のDNAに対するプロモーター活性を阻害する化合物を経口投与する場合、一般的に成人(体重60kgとして)の過敏性腸症候群患者においては、一日につき該化合物を約0.1~100mg、好ましくは約1.0~50mg、より好ましくは約1.0~20mg投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、本発明のDNAに対するプロモーター活性を阻害する化合物を注射剤の形で通常成人(体重60kgとして)の過敏性腸症候群患者に投与する場合、一日につき該化合物を約0.01~30mg、好ましくは約0.1~20mg、より好ましくは約0.1~10mgを静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kgあたりに換算した量を投与することができる。

このように、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、本発明のDNAに対するプロモーターの活性を促進または阻害する化合物またはその塩をスクリーニングする上で極めて有用であり、本発明のDNA発現不全に起因する各種疾患の原因究明または予防・治療薬の開発に大きく貢献することができる。

また、本発明のタンパク質のプロモーター領域を含有するDNAを使って、その下流に種々のタンパクをコードする遺伝子を連結し、これを動物の卵細胞に注入していわゆるトランスジェニック動物(遺伝子導入動物)を作出すれば、特異的にそのポリペプチドを合成させ、その生体での作用を検討することも可能となる。さらに上記プロモーター部分に適当なレポーター遺伝子を結合させ、これが発現するような細胞株を樹立すれば、本発明のタンパク質そのものの体内での産生能力を特異的に促進もしくは抑制する作用を持つ低分子化合物の探索系として使用できる。

【0074】

本明細書および図面において、塩基やアミノ酸などを略号で表示する場合、IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature による略号あるいは当該分野における慣用略号に基づくものであり、その例を下記する。またアミノ酸に関し光学異性体があり得る場合は、特に明示しなければL体を示すものとする。

DNA	: デオキシリボ核酸	
cdNA	: 相補的デオキシリボ核酸	30
A	: アデニン	
T	: チミン	
G	: グアニン	
C	: シトシン	
RNA	: リボ核酸	
mRNA	: メッセンジャーリボ核酸	
dATP	: デオキシアデノシン三リン酸	
dTTP	: デオキシチミジン三リン酸	
dGTP	: デオキシグアノシン三リン酸	
dCTP	: デオキシシチジン三リン酸	40
ATP	: アデノシン三リン酸	
EDTA	: エチレンジアミン四酢酸	
SDS	: ドデシル硫酸ナトリウム	
Gly	: グリシン	
Ala	: アラニン	
Val	: バリン	
Leu	: ロイシン	
Ile	: イソロイシン	
Ser	: セリン	
Thr	: スレオニン	50

C y s : システイン
 M e t : メチオニン
 G l u : グルタミン酸
 A s p : アスパラギン酸
 L y s : リジン
 A r g : アルギニン
 H i s : ヒスチジン
 P h e : フェニルアラニン
 T y r : チロシン
 T r p : トリプトファン
 P r o : プロリン
 A s n : アスパラギン
 G l n : グルタミン
 p G l u : ピログルタミン酸

【0075】

また、本明細書中で参照される置換基、保護基および試薬を下記の記号で表記する。

M e : メチル基
 E t : エチル基
 B u : ブチル基
 P h : フェニル基
 T C : チアゾリジン - 4 (R) - カルボキサミド基
 T o s : p - トルエンсульフォニル
 C H O : ホルミル
 B z l : ベンジル
 C l ₂ - B z l : 2 , 6 - ジクロロベンジル
 B o m : ベンジルオキシメチル
 Z : ベンジルオキシカルボニル
 C l - Z : 2 - クロロベンジルオキシカルボニル
 B r - Z : 2 - ブロモベンジルオキシカルボニル
 B o c : t - ブトキシカルボニル
 D N P : ジニトロフェニル
 T r t : トリチル
 B u m : t - ブトキシメチル
 F m o c : N - 9 - フルオレニルメトキシカルボニル
 H O B t : 1 - ヒドロキシベンズトリアゾール
 H O O B t : 3 , 4 - ジヒドロ - 3 - ヒドロキシ - 4 - オキソ - 1 , 2 , 3 - ベン
 ゴトリアジン
 H O N B : 1 - ヒドロキシ - 5 - ノルボルネン - 2 , 3 - ジカルボキシイミド
 D C C : N , N ' - ジシクロヘキシルカルボジイミド

【0076】

本願明細書の配列表の配列番号は、以下の配列を示す。

〔配列番号：1〕

実施例1で取得したヒトTCH204バリエーション1タンパク質のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：2〕

配列番号：1で表されるアミノ酸配列を有するヒトTCH204バリエーション1タンパク質をコードするDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：3〕

実施例1および実施例2で用いられた合成DNAプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：4〕

実施例1および実施例2で用いられた合成DNAプライマーの塩基配列を示す。

10

20

30

40

50

〔配列番号：5〕

実施例1、実施例2および実施例4で用いられた合成DNAプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：6〕

実施例1、実施例2および実施例4で用いられた合成DNAプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：7〕

実施例1で取得したプラスミドに挿入されているヒトTCH204バリエーション1をコードするDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：8〕

実施例2で取得したヒトTCH204バリエーション2タンパク質のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：9〕

配列番号：8で表されるアミノ酸配列を有するヒトTCH204バリエーション2タンパク質をコードするDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：10〕

実施例2で取得したプラスミドに挿入されているヒトTCH204バリエーション2をコードするDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：11〕

実施例3で取得したヒトTCH204バリエーション3タンパク質のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：12〕

配列番号：11で表されるアミノ酸配列を有するヒトTCH204バリエーション3タンパク質をコードするDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：13〕

実施例3で取得したプラスミドに挿入されているヒトTCH204バリエーション3の塩基配列を示す。

〔配列番号：14〕

実施例4で用いられた合成DNAプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：15〕

実施例4で取得したヒトTCH204バリエーション4タンパク質のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：16〕

配列番号：15で表されるアミノ酸配列を有するヒトTCH204バリエーション4タンパク質をコードするDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：17〕

実施例4で取得したプラスミドに挿入されているヒトTCH204バリエーション4の塩基配列を示す。

〔配列番号：18〕

実施例5で取得したマウスTCH204バリエーション6タンパク質のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：19〕

配列番号：18で表されるアミノ酸配列を有するマウスTCH204バリエーション6タンパク質をコードするDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：20〕

実施例5で用いられたプライマーF02の塩基配列を示す。

〔配列番号：21〕

実施例5で用いられたプライマーR02の塩基配列を示す。

〔配列番号：22〕

実施例5で取得したプラスミドに挿入されているマウスTCH204バリエーション6の塩基配列を示す。

〔配列番号：23〕

実施例6で取得したマウスTCH204バリエーション5タンパク質のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：24〕

10

20

30

40

50

配列番号：23で表されるアミノ酸配列を有するマウスTCH204バリエーション5タンパク質をコードするDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：25〕

実施例6で取得したプラスミドに挿入されているマウスTCH204バリエーション5の塩基配列を示す。

〔配列番号：26〕

実施例7で取得したマウスTCH204バリエーション2タンパク質のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：27〕

配列番号：26で表されるアミノ酸配列を有するマウスTCH204バリエーション2タンパク質をコードするDNAの塩基配列を示す。

10

〔配列番号：28〕

実施例7で取得したプラスミドに挿入されているマウスTCH204バリエーション2の塩基配列を示す。

〔配列番号：29〕

実施例8で用いられた合成DNAプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：30〕

実施例8で用いられた合成DNAプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：31〕

実施例8で用いられたTaqMan PCR用合成DNAプローブの塩基配列を示す。

〔配列番号：32〕

20

実施例8で用いられた合成DNAプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：33〕

実施例8で用いられたTaqMan PCR用合成DNAプローブの塩基配列を示す。

〔配列番号：34〕

実施例8で用いられた合成DNAプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：35〕

実施例8で用いられたTaqMan PCR用合成DNAプローブの塩基配列を示す。

〔配列番号：36〕

実施例8で用いられた合成DNAプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：37〕

30

実施例8で用いられた合成DNAプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：38〕

実施例8で用いられたTaqMan PCR用合成DNAプローブの塩基配列を示す。

〔配列番号：39〕

実施例8で用いられた合成DNAプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：40〕

実施例8で用いられた合成DNAプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：41〕

実施例8で用いられたTaqMan PCR用合成DNAプローブの塩基配列を示す。

〔配列番号：42〕

40

実施例8で用いられた合成DNAプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：43〕

実施例8で用いられた合成DNAプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：44〕

実施例8で用いられたTaqMan PCR用合成DNAプローブの塩基配列を示す。

【0077】

後述の実施例1で得られた形質転換体*Escherichia coli* TOP010 / pCRII-TCH204V1は、*Escherichia coli* TOP10 / pCRII-TCH204V1として、2002年5月27日から日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6（郵便番号305-8566）の独立行政法人産業技術総合

50

研究所 特許生物寄託センターに受託番号 F E R M B P - 8 0 5 3 として、2 0 0 2 年 5 月 1 4 日から日本国大阪府大阪市淀川区十三本町 2 丁目 1 7 番 8 5 号の財団法人 発酵研究所 (I F O) に受託番号 I F O 1 6 7 9 4 として寄託されている。

後述の実施例 2 で得られた形質転換体 *E s c h e r i c h i a c o l i* T O P O 1 0 / p C R I I - T C H 2 0 4 V 2 は、*E s c h e r i c h i a c o l i* T O P 1 0 / p C R I I - T C H 2 0 4 V 2 として、2 0 0 2 年 5 月 2 7 日から日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番地 1 中央第 6 (郵便番号 3 0 5 - 8 5 6 6) の独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに受託番号 F E R M B P - 8 0 5 4 として、2 0 0 2 年 5 月 1 4 日から日本国大阪府大阪市淀川区十三本町 2 丁目 1 7 番 8 5 号の財団法人 発酵研究所 (I F O) に受託番号 I F O 1 6 7 9 5 として寄託されている。

10

後述の実施例 5 で得られた形質転換体 *E s c h e r i c h i a c o l i* T O P O 1 0 / p C R I I - m T C H 2 0 4 V 6 は、*E s c h e r i c h i a c o l i* T O P 1 0 / p C R I I - m T C H 2 0 4 V 6 として、2 0 0 2 年 7 月 1 6 日から日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番地 1 中央第 6 (郵便番号 3 0 5 - 8 5 6 6) の独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに受託番号 F E R M B P - 8 1 1 9 として寄託されている。

【実施例】

以下に実施例を示して、本発明をより詳細に説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。なお、大腸菌を用いての遺伝子操作法は、モレキュラー・クローニング (M o l e c u l a r c l o n i n g) に記載されている方法に従った。

20

【0078】

実施例 1

ヒト T C H 2 0 4 バリエーション 1 遺伝子 c D N A のクローニング

以下の合成 DNA プライマーを用い、ヒト肺由来の c D N A を鋳型として P C R 法による増幅を行った。反応液の組成は、ヒト肺 M a r a t h o n - R e a d y c D N A (クロニテック社製) 2 . 0 μ l 、 2 種の合成 DNA プライマー (配列番号 : 3 および配列番号 : 4) 各 2 μ M 、 0 . 2 m M d N T P s 、 P y r o b e s t D N A p o l y m e r a s e (宝酒造社製) 0 . 1 2 5 μ l および酵素に付属の P y r o b e s t バッファーで、総液量は 2 0 μ l とした。増幅のためのサイクルはサーマルサイクラー (P E B i o s y s t e m s) を用い、9 4 . 5 分間の加熱の後、9 4 . 2 0 秒、7 2 . 5 分間のサイクルを 5 回、次いで 9 4 . 2 0 秒、7 0 . 5 分間のサイクルを 5 回、さらに 9 4 . 2 0 秒、6 8 . 5 分間のサイクルを 3 0 回繰り返し、最後に 7 2 で 5 分間保温した。次に D N a s e 、 R N a s e F r e e の蒸留水で 5 0 倍希釈した P C R 反応液 5 μ l 、合成 DNA プライマー (配列番号 : 5 および配列番号 : 6) 各 2 μ M 、 0 . 2 m M d N T P s 、 P y r o b e s t D N A p o l y m e r a s e (宝酒造社製) 0 . 3 1 3 μ l および酵素に付属の P y r o b e s t バッファーで、総液量は 5 0 μ l とし、サーマルサイクラー (P E B i o s y s t e m s) を用い、9 4 . 5 分間の加熱の後、9 4 . 2 0 秒、7 2 . 5 分間のサイクルを 5 回、次いで 9 4 . 2 0 秒、7 0 . 5 分間のサイクルを 5 回、さらに 9 4 . 2 0 秒、6 8 . 5 分間のサイクルを 3 0 回繰り返し、最後に 7 2 で 5 分間保温した。増幅した DNA を 1 . 5 % のアガロースゲル電気泳動により分離した後、約 3 . 5 k b のバンドの部分のカミソリで切出し、DNA を Q I A q u i c k G e l E x t r a c t i o n K i t (キアゲン社製) を用いて回収した。この DNA を、T O P O T A C l o n i n g k i t D u a l P r o m o t e r (インビトロジェン社製) のプロトコールに従って p C R I I - T O P O ベクターへ、クローニングした。これを大腸菌 (*E s c h e r i c h i a c o l i*) T O P 1 0 c o m p e t e n t c e l l (インビトロジェン社製) に導入して形質転換した後、c D N A 挿入断片を持つクローンをカナマイシンおよび X - g a l を含む L B 寒天に塗布し、白色を呈するクローンのみを滅菌した爪楊枝を用いて分離して形質転換体を得た。個々のクローンをカナマイシンを含む L B 培地で一晚培養し、Q I A p r e p M i n i p r e p (キアゲン社製) を用いてプラスミド DNA を調製した。塩基配列決定のための反応

30

40

50

は、BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (アプライドバイオシステムズ社製)を用いて行い、挿入されているcDNA断片の塩基配列をDNAシーケンサーABI PPISM 3100アナライザ(アプライドバイオシステムズ社製)を用いて解読した。

取得したプラスミドには3,517個の塩基配列が挿入されており(配列番号:7)、このcDNA断片には1,118個のアミノ酸配列(配列番号:1)をコードするORFが存在した(配列番号:2)。配列番号:1で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質を、ヒトTCH204バリエーション1タンパク質と命名した。上記cDNA断片(配列番号:7)を含むプラスミドを有する形質転換体を、エシェリヒア・コリ(*Escherichia coli*)TOP010/pCRII-TCH204V1と命名した。

配列番号:2で表される塩基配列の2916番目はAであるが、後述の実施例2、3および4で取得されたヒトTCH204の別種バリエーションの対応する部位の塩基はGであった。この塩基置換はSNPによって生じたものであると考えられる。なお、この塩基は、配列番号:1で表されるアミノ酸配列の972番目のGlnをコードするが、AからGへの置換はアミノ酸置換を伴わない。

Blast P [ヌクレック アシッド リサーチ (Nucleic Acids Res.) 第25巻、3389頁、1997年]を用いてOWLに対してホモロジー検索を行ったところ、ヒトTCH204バリエーション1タンパク質は、ニワトリのカルシウム依存性カリウムチャンネルcSlack (Genbank Accession#: AAM18770)と74.2%、ラットのカルシウム依存性カリウムチャンネルSlack (Nature Neuroscience、第1巻、462頁、1998年、Genbank Accession#: AAC83350)と65.7%、ヒトのカリウムチャンネルサブユニットタンパクKIAA1422 (Genbank Accession#: CAD13242)と63.2%の相同性をそれぞれ示した。

また、疎水性解析ソフトによる解析およびSlack、KIAA1422とのアミノ酸配列の比較(図1~図3)から、ヒトTCH204バリエーション1タンパク質は、6回膜貫通型で第5、第6膜貫通領域間にポア領域をもつ構造を有すると推定される。

以上から、ヒトTCH204バリエーション1タンパク質をコードするcDNAはカルシウム依存性カリウムチャンネルに属する新規遺伝子であると考えられる。カルシウム依存性カリウムチャンネルはチャンネルコンダクタンスによってBig-K(コンダクタンス:100-220pS)、Intermediate-K(コンダクタンス:20-85pS)、およびSmall-K(コンダクタンス:2-20pS)の3種に分類されている。ヒトTCH204バリエーション1タンパク質は各ファミリーの代表的な分子との相同性を、[表1]に示す。表1において、BKはBig-Kを、IKはIntermediate-Kを、SKはSmall-Kをそれぞれ示す。

[表1]

分類	分子	Accession No.	報告	相同性
BK	hSlo	AAA85104	Molecular Brain Res., 第27巻、189頁、1994年	14%
IK	hIK1	AAC23541	Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94巻、11651頁、1997年	11%
SK	hSK1	AAB09562	Science, 第273巻、1709頁、1996年	11%

10

20

30

40

50

【0079】

実施例 2

ヒトTCH204バリエント2遺伝子cDNAのクローニング

以下の合成DNAプライマーを用い、ヒト精巢由来のcDNAを鋳型としてPCR法による増幅を行った。反応液の組成は、ヒト精巢Marathon-Ready cDNA (クロンテック社製) 2.0 μl、2種の合成DNAプライマー (配列番号: 3および配列番号: 4) 各2 μM、0.2 mM dNTPs、Pyrobest DNA polymerase (宝酒造社製) 0.125 μlおよび酵素に付属のPyrobestバッファーで、総液量は20 μlとした。増幅のためのサイクルはサーマルサイクラー (PE Biosystems) を用い、94・5分間の加熱の後、94・20秒、67・30秒、72・5分間のサイクルを35回繰り返す、最後に72で5分間保温した。次にDNase、RNase Freeの蒸留水で50倍希釈したPCR反応液2 μl、合成DNAプライマー (配列番号: 5および配列番号: 6) 各2 μM、0.2 mM dNTPs、Pyrobest DNA polymerase (宝酒造社製) 0.125 μlおよび酵素に付属のPyrobestバッファーで、総液量は20 μlとし、サーマルサイクラー (PE Biosystems) を用い、94・5分間の加熱の後、94・20秒、68・30秒、72・5分間のサイクルを35回繰り返す、最後に72で5分間保温した。増幅したDNAを1.5%のアガロースゲル電気泳動により分離した後、約3.5 kbのバンドの部分のカミソリで切出し、DNAをQIAquick Gel Extraction Kit (キアゲン社製) を用いて回収した。このDNAを、TOPOTA Cloning kit Dual Promoter (インビトロジェン社製) のプロトコールに従ってpCRII-TOPOベクターへクローニングした。これを大腸菌 (Escherichia coli) TOP10 competent cell (インビトロジェン社製) に導入して形質転換した後、cDNA挿入断片を持つクローンをカナマイシンおよびX-galを含むLB寒天に塗布し、白色を呈するクローンのみを滅菌した爪楊枝を用いて分離して形質転換体を得た。個々のクローンをカナマイシンを含むLB培地で一晚培養し、QIAprep Miniprep (キアゲン社製) を用いてプラスミドDNAを調製した。塩基配列決定のための反応は、BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (アプライドバイオシステムズ社製) を用いて行い、挿入されているcDNA断片の塩基配列をDNAシーケンサーABI PPISM 3100アナライザ (アプライドバイオシステムズ社製) を用いて解読した。

取得したプラスミドには3,496個の塩基配列が挿入されており (配列番号: 10)、このcDNA断片には1,111個のアミノ酸配列 (配列番号: 8) をコードするORFが存在した (配列番号: 9)。配列番号: 8で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質を、ヒトTCH204バリエント2タンパク質と命名した。上記cDNA断片 (配列番号: 10) を含むプラスミドを有する形質転換体を、エシェリヒア・コリ (Escherichia coli) TOP10/pCRII-TCH204V2と命名した。

【0080】

実施例 3

ヒトTCH204バリエント3遺伝子cDNAのクローニング

実施例2のヒトTCH204バリエント2遺伝子を取得するために使用したPCR産物と同じDNAで形質転換した大腸菌クローンのなかの一部に本バリエントを保持するものが存在した。

取得したプラスミドは3,346個の塩基配列が挿入されており (配列番号: 13)、このcDNA断片には1,061個のアミノ酸配列 (配列番号: 11) をコードするORFが存在した (配列番号: 12)。配列番号: 11で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質を、ヒトTCH204バリエント3タンパク質と命名した。上記cDNA断片 (配列番号: 13) を含むプラスミドを有する形質転換体を、エシェリヒア・コリ (Escherichia coli) TOP10/pCRII-TCH204V3と命名した。

【0081】

実施例 4

ヒトTCH204バリエント4遺伝子cDNAのクローニング

以下の合成DNAプライマーを用い、ヒト精巢由来のcDNAを鋳型としてPCR法による増幅を行った。反応液の組成は、ヒト精巢Marathon-Ready cDNA (クロンテック社製) 2.0 μ l、2種の合成DNAプライマー(配列番号: 5および配列番号: 6)各2 μ M、0.2 mM dNTPs、Pyrobest DNA polymerase (宝酒造社製) 0.125 μ lおよび酵素に付属のPyrobestバッファーで、総液量は20 μ lとした。増幅のためのサイクルはサーマルサイクラー (PE Biosystems) を用い、94 \cdot 5分間の加熱の後、94 \cdot 10秒、72 \cdot 7分間のサイクルを5回、次いで94 \cdot 10秒、70 \cdot 7分間のサイクルを5回、さらに94 \cdot 10秒、68 \cdot 7分間のサイクルを25回繰り返し、最後に68 \cdot 10分間保温した。次にDNase、RNase Freeの蒸留水で50倍希釈したPCR反応液2 μ l、合成DNAプライマー(配列番号: 14および配列番号: 6)各2 μ M、0.2 mM dNTPs、Pyrobest DNA polymerase (宝酒造社製) 0.125 μ lおよび酵素に付属のPyrobestバッファーで、総液量は20 μ lとし、サーマルサイクラー (PE Biosystems) を用い、94 \cdot 5分間の加熱の後、94 \cdot 10秒、72 \cdot 7分間のサイクルを5回、次いで94 \cdot 10秒、70 \cdot 7分間のサイクルを5回、さらに94 \cdot 10秒、68 \cdot 7分間のサイクルを25回繰り返し、最後に72 \cdot 5分間保温した。増幅したDNAを1.5%のアガロースゲル電気泳動により分離した後、約2.5 kbのバンドの部分のカミソリで切出し、DNAをQIAquick Gel Extraction Kit (キアゲン社製) を用いて回収した。このDNAを、TOPO TA Cloning kit Dual Promoter (インビトロジェン社製) のプロトコールに従ってpCRII-TOPOベクターへ、クローニングした。これを大腸菌 (*Escherichia coli*) TOP10 competent cell (インビトロジェン社製) に導入して形質転換した後、cDNA挿入断片を持つクローンをカナマイシンおよびX-galを含むLB寒天に塗布し、白色を呈するクローンのみを滅菌した爪楊枝を用いて分離して形質転換体を得た。個々のクローンをカナマイシンを含むLB培地で一晚培養し、QIAprep Miniprep (キアゲン社製) を用いてプラスミドDNAを調製した。塩基配列決定のための反応は、BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (アプライドバイオシステムズ社製) を用いて行い、挿入されているcDNA断片の塩基配列をDNAシーケンサーABI PRISM 3100アナライザ (アプライドバイオシステムズ社製) を用いて解読した。

取得したプラスミドには2,576個の塩基配列が挿入されており(配列番号: 17)、このcDNA断片には759個のアミノ酸配列(配列番号: 15)をコードするORFが存在した(配列番号: 16)。配列番号: 15で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質を、ヒトTCH204バリエント4タンパク質と命名した。上記cDNA断片(配列番号: 17)を含むプラスミドを有する形質転換体を、エシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) TOP10/pCRII-TCH204V4と命名した。

ヒトTCH204バリエント1タンパク質、ヒトTCH204バリエント2タンパク質、ヒトTCH204バリエント3タンパク質およびヒトTCH204バリエント4タンパク質の各アミノ酸配列を図4~図6に示す。

【0082】

実施例 5

マウスTCH204バリエント6遺伝子cDNAのクローニング

以下の合成DNAプライマーを用い、マウス脳由来のcDNAを鋳型としてPCR法による増幅を行った。反応液の組成は、マウス脳Marathon-Ready cDNA (クロンテック社製) 2.0 μ l、合成DNAプライマー(配列番号: 20および配列番号: 21)各2 μ M、0.2 mM dNTPs、Pyrobest DNA polymerase

rase (宝酒造社製) 0.125 μ l および酵素に付属の Pyrobest バッファーで、総液量は 20 μ l とした。増幅のためのサイクルはサーマルサイクラー (PE Biosystems) を使い、94 \cdot 5 分間の加熱の後、94 \cdot 20 秒、68 \cdot 30 秒、72 \cdot 5 分間のサイクルを 40 回繰り返し、最後に 72 で 10 分間保温した。増幅した DNA を 1.5% のアガロースゲル電気泳動により分離した後、約 3.5 kb のバンドの部分のカミソリで切出し、DNA を QIAquick Gel Extraction Kit (キアゲン社製) を用いて回収した。この DNA を、TOPO TA Cloning kit Dual Promoter (インビトロジェン社製) のプロトコールに従って pCRII-TOPO ベクターへクローニングした。これを大腸菌 (*Escherichia coli*) TOPO10 competent cell (インビトロジェン社製) に導入して形質転換した後、cDNA 挿入断片を持つクローンをカナマイシンおよび X-gal を含む LB 寒天に塗布し、白色を呈するクローンのみを滅菌した爪楊枝を用いて分離して形質転換体を得た。個々のクローンをカナマイシンを含む LB 培地で一晚培養し、QIAprep Miniprep (キアゲン社製) を用いてプラスミド DNA を調製した。塩基配列決定のための反応は、BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (アプライドバイオシステムズ社製) を用いて行い、挿入されている cDNA 断片の塩基配列を DNA シークエンサー ABI PRISM 3100 アナライザ (アプライドバイオシステムズ社製) を用いて解読した。取得したプラスミドには 3, 498 個の塩基配列が挿入されており (配列番号: 22)、該 cDNA 断片には 1, 135 個のアミノ酸配列 (配列番号: 18) をコードする ORF が存在した (配列番号: 19)。該アミノ酸配列を含有するタンパク質を、マウス TCH204 バリエーション 6 タンパク質と命名し、また、該 cDNA 断片を含むプラスミドを有する形質転換体を、*Escherichia coli* TOPO10/pCRII-mTCH204V6 と命名した。

Blast P [ヌクレック アシッド リサーチ (Nucleic Acids Res.) 第 25 巻、3389 頁、1997 年] を用いて OWL に対してホモロジー検索を行ったところ、マウス TCH204 バリエーション 6 タンパク質はヒト TCH204 バリエーション 1 とは 96.4% の相同性を、ヒトのカルシウム依存性カリウムチャネル Slc4 (WO 02/40649 号公報記載) とは 97.5% の相同性を示した。また疎水性解析ソフトによる解析およびヒト TCH204、Slc4 とのアミノ酸配列の比較から、該タンパク質は 6 回膜貫通型で、第 5、第 6 膜貫通領域間に膜挿入領域をもつ構造を有すると推定された (図 7~9)。

以上から、マウス TCH204 バリエーション 6 タンパク質をコードする cDNA はカルシウム依存性カリウムチャネルに属する新規遺伝子であると考えられた。

カルシウム依存性カリウムチャネルはチャンネルコンダクタンスによって Big-K (コンダクタンス: 100 - 220 pS)、Intermediate-K (コンダクタンス: 20 - 85 pS)、Small-K (コンダクタンス: 2 - 20 pS) の 3 種に分類されているが、マウス TCH204 バリエーション 6 タンパク質とマウスの各ファミリーの代表的な分子との相同性を [表 2] に示す。表 2 において、BK は Big-K を、IK は Intermediate-K を、SK は Small-K をそれぞれ示す。

〔表2〕

分類	分子	Accession No.	報告	相同性
BK	mSlc	NP_034740	Science 第261巻、221頁、 1993年	14%
IK	mIK1	AAC32829		13%
SK	mSK1	Q9EQR3	Biochim. Biophys. Acta 1518巻、36頁、2001年	12%

10

【0083】

実施例6

マウスTCH204バリエーション5遺伝子cDNAのクローニング

実施例5で取得したPCR産物で形質転換した大腸菌クローンのなかの一部に、本バリエーションを保持するものが存在した。取得したプラスミドは3,523個の塩基配列が挿入されており(配列番号:25)、該cDNA断片には1,142個のアミノ酸配列(配列番号:23)をコードするORFが存在した(配列番号:24)。該アミノ酸配列を含有するタンパク質を、マウスTCH204バリエーション5タンパク質と命名し、また、該cDNA断片を含むプラスミドを有する形質転換体を、エシェリヒア・コリ(*Escherichia coli*)TOP10/pCRII-mTCH204V5と命名した。

20

【0084】

実施例7

マウスTCH204バリエーション2遺伝子cDNAのクローニング

実施例5で取得したPCR産物で形質転換した大腸菌クローンのなかの一部に、本バリエーションを保持するものが存在した。取得したプラスミドは3,430個の塩基配列が挿入されており(配列番号:28)、該cDNA断片には1,111個のアミノ酸配列(配列番号:26)をコードするORFが存在した(配列番号:27)。該アミノ酸配列を含有するタンパク質を、マウスTCH204バリエーション2タンパク質と命名し、また、該cDNA断片を含むプラスミドを有する形質転換体を、エシェリヒア・コリ(*Escherichia coli*)TOP10/pCRII-mTCH204V2と命名した。

30

配列番号:27で表される塩基配列の2,548番目はC、2,745番目はA、2,943番目はAであるが、前述の実施例5、6で取得されたマウスTCH204の別種バリエーションの対応する部位の塩基は各々T、G、Gであった。この塩基置換はSNPによって生じたものであると考えられる。なお、これらの塩基置換はいずれもアミノ酸置換を伴わない。

40

【0085】

実施例8

ヒトTCH204各バリエーション遺伝子産物の組織分布の解析

ヒトTCH204各バリエーション遺伝子配列から、各バリエーション遺伝子の発現量を分別定量できるようにプライマーおよびプローブ配列を以下のように設計した。

ヒトTCH204バリエーション1に対しては配列番号:29および配列番号:30の合成DNAプライマーと、配列番号:31のTaqMan PCR用合成DNAプローブを、ヒトTCH204バリエーション2に対しては配列番号:32および配列番号:30の合成DNAプライマーと、配列番号:33のTaqMan PCR用合成DNAプローブを、ヒトTCH204バリエーション3に対しては配列番号:32および配列番号:34の合成DNA

50

プライマーと、配列番号：35のTaqMan PCR用合成DNAプローブを、ヒトTCH204バリエーション4に対しては配列番号：36および配列番号：37の合成DNAプライマーと、配列番号：38のTaqMan PCR用合成DNAプローブを、ヒトTCH204バリエーション5に対しては配列番号：39および配列番号：40の合成DNAプライマーと、配列番号：41のTaqMan PCR用合成DNAプローブを、ヒトTCH204バリエーション6に対しては配列番号：42および配列番号：43の合成DNAプライマーと、配列番号：44のTaqMan PCR用合成DNAプローブをそれぞれ設計した。

なお、ヒトTCH204バリエーション5は、WO 02/055701号公報でPotassium Channel 54414として開示されている配列を示し、また、ヒトTCH204バリエーション6は、WO 02/40469号公報でヒトSlc4として開示されている配列を示す。これらの配列は、ヒトTCH204バリエーション1、バリエーション2、バリエーション3、バリエーション4のいずれとも95%以上の相同性を示すが配列は一致しなかった。

各ヒトTCH204バリエーションの全長アミノ酸配列をコードする塩基配列を含むプラスミドDNAを標準DNAとして、特定のバリエーションを定量するために設計したプライマーおよびプローブで目的としたバリエーションのみを定量できるか調べたところ、ヒトTCH204バリエーション1、ヒトTCH204バリエーション3、ヒトTCH204バリエーション4、ヒトTCH204バリエーション5およびヒトTCH204バリエーション6のプライマーおよびプローブでは、目的としたバリエーションのみが定量されたが、ヒトTCH204バリエーション2のプライマーおよびプローブでは、ヒトTCH204バリエーション2以外に、ヒトTCH204バリエーション1、ヒトTCH204バリエーション4、ヒトTCH204バリエーション5およびヒトTCH204バリエーション6が定量されてしまうことがわかった。しかしながら、ヒトTCH204バリエーション2と他のヒトTCH204バリエーションの遺伝子配列の関係上、ヒトTCH204バリエーション1、ヒトTCH204バリエーション4、ヒトTCH204バリエーション5およびヒトTCH204バリエーション6の混同は避けられなかった。このため、ヒトTCH204バリエーション2は、ヒトTCH204バリエーション1、ヒトTCH204バリエーション4、ヒトTCH204バリエーション5およびヒトTCH204バリエーション6の発現量を含めて定量を行い、その定量結果から、ヒトTCH204バリエーション1、ヒトTCH204バリエーション4、ヒトTCH204バリエーション5およびヒトTCH204バリエーション6のそれぞれの定量結果を差し引くことで、ヒトTCH204バリエーション2の発現量を推定することにした。

TaqMan PCR Systemによる定量反応のための組成は、ヒト各種組織由来cDNA（クロンテック社製、Human MTC panel I, II）0.8 μl、TaqMan Universal PCR Master Mix（アプライドバイオシステムズ社製）10 μl、各ヒトTCH204バリエーション定量用に設計した合成DNAプライマー各0.2 μMおよび各ヒトTCH204バリエーション定量用に設計したTaqMan PCR用合成DNAプローブ0.2 μMで、総液量を20 μlとした。各cDNAでのグリセルアルデヒドリン酸デヒドロゲナーゼ（GAPDH）定量のための組成は、ヒト各種組織由来cDNA（クロンテック社製、Human MTC panel I, II）0.8 μl、TaqMan Universal PCR Master Mix（アプライドバイオシステムズ社製）10 μl、GAPDH Control Reagents 402869（アプライドバイオシステムズ社製）付属の合成DNAプライマー各0.2 μMおよび同キット付属のTaqMan PCR用合成DNAプローブ0.1 μMで、総液量は20 μlとした。反応は、ABI PRISM 7900 Sequence Detection System（アプライドバイオシステムズ社製）を用い、50・2分間、95・10分間の保温の後、95・15秒、60・1分間のサイクルを40回繰り返し、反応と同時に定量を行った。測定に使用したヒト各種組織由来cDNAを〔表3〕に示す。

10

20

30

40

〔表3〕

試料の名称	試料に含まれるヒト組織
Human MTC Panel I	心臓・脳・胎盤・肺・肝臓・骨格筋・腎臓 ・膵臓
Human MTC Panel II	脾臓・胸腺・前立腺・精巣・卵巣・小腸・ 結腸・末梢血白血球

10

結果を図13～18に示す。

結果は、各cDNA試料中での各ヒトTCH204バリエーション遺伝子のGADPH遺伝子発現量に対する相対的発現量、すなわち単位cDNA液量あたりの各ヒトTCH204バリエーション遺伝子の発現量(コピー数/μl)を同単位液量あたりのGADPH遺伝子の発現量(コピー数/μl)で除した値として表した。

ヒトTCH204バリエーション1は、卵巣、精巣にわずかに発現していた。

ヒトTCH204バリエーション2定量系では、肺、小腸、卵巣、精巣、前立腺で発現が検出された。先述したようにヒトTCH204バリエーション2はヒトTCH204バリエーション1、ヒトTCH204バリエーション4、ヒトTCH204バリエーション5およびヒトTCH204バリエーション6の発現量を含めて定量されるので、これらバリエーションの発現量を差し引いてヒトTCH204バリエーション2の発現量を推定しなければならない。この処理を行うと、肺、卵巣、精巣で検出された発現の大部分はヒトTCH204バリエーション2に由来すると推定された。

20

ヒトTCH204バリエーション3は、精巣以外の組織では発現が検出されず、精巣での発現もわずかであった。

ヒトTCH204バリエーション4は、ヒトTCH204バリエーション3と同様、精巣以外の組織では発現が検出されず精巣での発現もわずかであった。

ヒトTCH204バリエーション5は、小腸、脾臓、卵巣、前立腺で発現が検出された。

30

ヒトTCH204バリエーション6は、小腸・卵巣にわずかに発現が検出された。

【0086】

実施例9

ヒトTCH204バリエーション2遺伝子産物の電気生理学的特性

ヒトTCH204バリエーション2がイオンチャネルを形成するか否かを決定するために、パッチクランプ法を用いて膜電位固定によるホールセル記録を実施した。

Nucleofector (AMAXA社)を用いて、ベクターpcDNA3.1(+)(Invitrogen社製)に組み込んだヒトTCH204バリエーション2をCHO-K1細胞に一過性発現(7例)させ、24ないし48時間後に測定実験を実施した。対照にはベクターのみを導入した細胞(5例)を用いた。パッチ用電極には、ガラス管(GC150-10、ハーバード・クラーク社)を用いチップ抵抗が5-10メガオームになるよう加工した。充填液、細胞外液の組成は、文献(Nature Neurosci., 1巻、462-469頁、1998年)記載に従い、充填液は、KCl 32.5mM、K・gluconate 97.5mM、CaCl₂ 0.1mM、HEPES 10mM(KOHでpH7.2に調製)、細胞外液は、NaCl 140mM、KCl 3.0mM、CaCl₂・2H₂O 1.0mM、D-glucose 29mM、HEPES 25mM、tetrodotoxin 1μM(NaOHでpH7.4に調製)とした。ホールセル記録は、パッチ用増幅器Axopatch 200B(Axon Instruments社)を用いて保持膜電位を-80mVに固定し、2kHzのフィルタをかけてA/D変換器(Digidata1320A、Axon Instruments

40

50

社)を介して5kHzでサンプリングした。これらの記録およびデータ処理はすべてpCLAMP 8ソフトウェア(Axon Instruments社)上で行った。安定的に記録されたヒトTCH204バリエーション2導入細胞に、20mV毎のステップパルスを300ミリ秒間-100mVから+100mVまで2秒間隔で与えたところ、対照細胞に比べて外向き整流成分をもつ電位依存的な電流の発生が認められた。結果を図19に示す。この電流の平衡電位は細胞外液のK⁺イオン濃度に対して依存性を示した。これらの成績から、ヒトTCH204バリエーション2タンパク質は、イオンチャネル、おそらくはK⁺イオンに選択的な電位依存性イオンチャネルを形成することが示された。

【0087】

【発明の効果】

本発明のタンパク質、ポリヌクレオチドおよび抗体などは、例えば、消化器疾患(例、過敏性腸症候群、潰瘍性大腸炎、クローン病、虚血性大腸炎、胃炎、消化性潰瘍、直腸炎、下痢、逆流性食道炎、十二指腸炎など)、生殖器疾患(例、前立腺肥大症、前立腺炎、精巣神経症、卵巣嚢腫など)、呼吸器疾患(例、慢性閉塞性肺疾患、喘息など)、中枢神経系疾患(例、アルツハイマー病、パーキンソン症候群、精神分裂病(統合失調症)、脳血管性痴呆、脳虚血、てんかんなど)、糖尿病、高血圧症、循環器疾患(例、心不全、不整脈、QT延長症候群、動脈硬化、狭心症など)、膵臓疾患(例、膵炎、膵嚢胞性線維症などの膵機能不全など)、肝臓疾患(例、肝硬変など)、腎疾患(例、腎不全、尿毒症など)、癌(例、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、非小細胞肺癌、卵巣癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、乳癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌、膵臓癌、胸腺腫、精巣腫瘍、食道癌、筋肉腫など)などの診断マーカー等として有用である。該タンパク質、ポリヌクレオチドまたは抗体などを用いるスクリーニング法により得られる該タンパク質の活性を促進または阻害する化合物は、該タンパク質遺伝子の発現を促進または阻害する化合物、該タンパク質の発現を促進または阻害する化合物などは、例えば、消化器疾患(例、過敏性腸症候群、潰瘍性大腸炎、クローン病、虚血性大腸炎、胃炎、消化性潰瘍、直腸炎、下痢、逆流性食道炎、十二指腸炎など)、生殖器疾患(例、前立腺肥大症、前立腺炎、精巣神経症、卵巣嚢腫など)、呼吸器疾患(例、慢性閉塞性肺疾患、喘息など)、中枢神経系疾患(例、アルツハイマー病、パーキンソン症候群、精神分裂病(統合失調症)、脳血管性痴呆、脳虚血、てんかんなど)、糖尿病、高血圧症、循環器疾患(例、心不全、不整脈、QT延長症候群、動脈硬化、狭心症など)、膵臓疾患(例、膵炎、膵嚢胞性線維症などの膵機能不全など)、肝臓疾患(例、肝硬変など)、腎疾患(例、腎不全、尿毒症など)、癌(例、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、非小細胞肺癌、卵巣癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、乳癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌、膵臓癌、胸腺腫、精巣腫瘍、食道癌、筋肉腫など)などの予防・治療剤などとして使用することができる。好ましくは、消化器疾患、生殖器疾患、呼吸器疾患などの予防・治療剤である。

【0088】

【配列表】

10

20

30

SEQUENCE LISTING

<110> Takeda Chemical Industries, Ltd.

<120> Novel Protein and its DNA

<130> B03112

<150> JP 2002-139184

<151> 2002-5-14

10

<150> JP 2002-157669

<151> 2002-5-30

<150> JP 2002-218324

<151> 2002-7-26

<160> 44

20

<210> 1

<211> 1118

<212> PRT

<213> Human

<400> 1

Met Val Asp Leu Glu Ser Glu Val Pro Pro Leu Pro Pro Arg Tyr Arg

5

10

15

30

Phe Arg Asp Leu Leu Leu Gly Asp Gln Gly Trp Gln Asn Asp Asp Arg

20

25

30

Val Gln Val Glu Phe Tyr Met Asn Glu Asn Thr Phe Lys Glu Arg Leu

35

40

45

Lys Leu Phe Phe Ile Lys Asn Gln Arg Ser Ser Leu Arg Ile Arg Leu

50

55

60

Phe Asn Phe Ser Leu Lys Leu Leu Ser Cys Leu Leu Tyr Ile Ile Arg

40

65

70

75

80

Val	Leu	Leu	Glu	Asn	Pro	Ser	Gln	Gly	Asn	Glu	Trp	Ser	His	Ile	Phe	
				85					90					95		
Trp	Val	Asn	Arg	Ser	Leu	Pro	Leu	Trp	Gly	Leu	Gln	Val	Ser	Val	Ala	
				100					105					110		
Leu	Ile	Ser	Leu	Phe	Glu	Thr	Ile	Leu	Leu	Gly	Tyr	Leu	Ser	Tyr	Lys	
				115					120					125		
Gly	Asn	Ile	Trp	Glu	Gln	Ile	Leu	Arg	Ile	Pro	Phe	Ile	Leu	Glu	Ile	10
				130					135					140		
Ile	Asn	Ala	Val	Pro	Phe	Ile	Ile	Ser	Ile	Phe	Trp	Pro	Ser	Leu	Arg	
145					150						155				160	
Asn	Leu	Phe	Val	Pro	Val	Phe	Leu	Asn	Cys	Trp	Leu	Ala	Lys	His	Ala	
					165					170					175	
Leu	Glu	Asn	Met	Ile	Asn	Asp	Leu	His	Arg	Ala	Ile	Gln	Arg	Thr	Gln	
				180						185					190	20
Ser	Ala	Met	Phe	Asn	Gln	Val	Leu	Ile	Leu	Ile	Ser	Thr	Leu	Leu	Cys	
				195						200					205	
Leu	Ile	Phe	Thr	Cys	Ile	Cys	Gly	Ile	Gln	His	Leu	Glu	Arg	Ile	Gly	
				210						215					220	
Lys	Lys	Leu	Asn	Leu	Phe	Asp	Ser	Leu	Tyr	Phe	Cys	Ile	Val	Thr	Phe	
225					230						235				240	
Ser	Thr	Val	Gly	Phe	Gly	Asp	Val	Thr	Pro	Glu	Thr	Trp	Ser	Ser	Lys	30
				245							250				255	
Leu	Phe	Val	Val	Ala	Met	Ile	Cys	Val	Ala	Leu	Val	Val	Leu	Pro	Ile	
				260						265					270	
Gln	Phe	Glu	Gln	Leu	Ala	Tyr	Leu	Trp	Met	Glu	Arg	Gln	Lys	Ser	Gly	
				275						280					285	
Gly	Asn	Tyr	Ser	Arg	His	Arg	Ala	Gln	Thr	Glu	Lys	His	Val	Val	Leu	40
				290							300					
Cys	Val	Ser	Ser	Leu	Lys	Ile	Asp	Leu	Leu	Met	Asp	Phe	Leu	Asn	Glu	

305		310		315		320	
Phe Tyr Ala His Pro Arg Leu Gln Asp Tyr Tyr Val Val Ile Leu Cys							
		325		330		335	
Pro Thr Glu Met Asp Val Gln Val Arg Arg Val Leu Gln Ile Pro Met							
		340		345		350	
Trp Ser Gln Arg Val Ile Tyr Leu Gln Gly Ser Ala Leu Lys Asp Gln							
		355		360		365	10
Asp Leu Leu Arg Ala Lys Met Asp Asp Ala Glu Ala Cys Phe Ile Leu							
		370		375		380	
Ser Ser Arg Cys Glu Val Asp Arg Thr Ser Ser Asp His Gln Thr Ile							
385		390		395		400	
Leu Arg Ala Trp Ala Val Lys Asp Phe Ala Pro Asn Cys Pro Leu Tyr							
		405		410		415	
Val Gln Ile Leu Lys Pro Glu Asn Lys Phe His Ile Lys Phe Ala Asp							20
		420		425		430	
His Val Val Cys Glu Glu Glu Phe Lys Tyr Ala Met Leu Ala Leu Asn							
		435		440		445	
Cys Ile Cys Pro Ala Thr Ser Thr Leu Ile Thr Leu Leu Val His Thr							
		450		455		460	
Ser Arg Gly Gln Cys Val Cys Leu Cys Cys Arg Glu Gly Gln Gln Ser							
465		470		475		480	30
Pro Glu Gln Trp Gln Lys Met Tyr Gly Arg Cys Ser Gly Asn Glu Val							
		485		490		495	
Tyr His Ile Val Leu Glu Glu Ser Thr Phe Phe Ala Glu Tyr Glu Gly							
		500		505		510	
Lys Ser Phe Thr Tyr Ala Ser Phe His Ala His Lys Lys Phe Gly Val							
		515		520		525	
Cys Leu Ile Gly Val Arg Arg Glu Asp Asn Lys Asn Ile Leu Leu Asn							40
		530		535		540	

Pro Gly Pro Arg Tyr Ile Met Asn Ser Thr Asp Ile Cys Phe Tyr Ile	
545	550 555 560
Asn Ile Thr Lys Glu Glu Asn Ser Ala Phe Lys Asn Gln Asp Gln Gln	
	565 570 575
Arg Lys Ser Asn Val Ser Arg Ser Phe Tyr His Gly Pro Ser Arg Leu	
	580 585 590
Pro Val His Ser Ile Ile Ala Ser Met Gly Thr Val Ala Ile Asp Leu	10
	595 600 605
Gln Asp Thr Ser Cys Arg Ser Ala Ser Gly Pro Thr Leu Ser Leu Pro	
	610 615 620
Thr Glu Gly Ser Lys Glu Ile Arg Arg Pro Ser Ile Ala Pro Val Leu	
	625 630 635 640
Glu Val Ala Asp Thr Ser Ser Ile Gln Thr Cys Asp Leu Leu Ser Asp	
	645 650 655
	20
Gln Ser Glu Asp Glu Thr Thr Pro Asp Glu Glu Met Ser Ser Asn Leu	
	660 665 670
Glu Tyr Ala Lys Gly Tyr Pro Pro Tyr Ser Pro Tyr Ile Gly Ser Ser	
	675 680 685
Pro Thr Phe Cys His Leu Leu His Glu Lys Val Pro Phe Cys Cys Leu	
	690 695 700
Arg Leu Asp Lys Ser Cys Gln His Asn Tyr Tyr Glu Asp Ala Lys Ala	30
	705 710 715 720
Tyr Gly Phe Lys Asn Lys Leu Ile Ile Val Ala Ala Glu Thr Ala Gly	
	725 730 735
Asn Gly Leu Tyr Asn Phe Ile Val Pro Leu Arg Ala Tyr Tyr Arg Pro	
	740 745 750
Lys Lys Glu Leu Asn Pro Ile Val Leu Leu Leu Asp Asn Pro Leu Asp	
	755 760 765
	40
Asp Leu Leu Arg Cys Gly Val Thr Phe Ala Ala Asn Met Val Val Val	

770	775	780	
Asp Lys Glu Ser Thr Met Ser Ala Glu Glu Asp Tyr Met Ala Asp Ala			
785	790	795	800
Lys Thr Ile Val Asn Val Gln Thr Leu Phe Arg Leu Phe Ser Ser Leu			
805	810	815	
Ser Ile Ile Thr Glu Leu Thr His Pro Ala Asn Met Arg Phe Met Gln			
820	825	830	10
Phe Arg Ala Lys Asp Cys Tyr Ser Leu Ala Leu Ser Lys Leu Glu Lys			
835	840	845	
Lys Glu Arg Glu Arg Gly Ser Asn Leu Ala Phe Met Phe Arg Leu Pro			
850	855	860	
Phe Ala Ala Gly Arg Val Phe Ser Ile Ser Met Leu Asp Thr Leu Leu			
865	870	875	20
Tyr Gln Ser Phe Val Lys Asp Tyr Met Ile Ser Ile Thr Arg Leu Leu			
885	890	895	
Leu Gly Leu Asp Thr Thr Pro Gly Ser Gly Phe Leu Cys Ser Met Lys			
900	905	910	
Ile Thr Ala Asp Asp Leu Trp Ile Arg Thr Tyr Ala Arg Leu Tyr Gln			
915	920	925	
Lys Leu Cys Ser Ser Thr Gly Asp Val Pro Ile Gly Ile Tyr Arg Thr			
930	935	940	30
Glu Ser Gln Lys Leu Thr Thr Ser Glu Ser Gln Ile Ser Ile Ser Val			
945	950	955	60
Glu Glu Trp Glu Asp Thr Lys Asp Ser Lys Glu Gln Gly His His Arg			
965	970	975	
Ser Asn His Arg Asn Ser Thr Ser Ser Asp Gln Ser Asp His Pro Leu			
980	985	990	
Leu Arg Arg Lys Ser Met Gln Trp Ala Arg Arg Leu Ser Arg Lys Gly			
995	1000	1005	40

Pro Lys His Ser Gly Lys Thr Ala Glu Lys Ile Thr Gln Gln Arg Leu
 1010 1015 1020
 Asn Leu Tyr Arg Arg Ser Glu Arg Gln Glu Leu Ala Glu Leu Val Lys
 1025 1030 1035 1040
 Asn Arg Met Lys His Leu Gly Leu Ser Thr Val Gly Tyr Asp Glu Met
 1045 1050 1055
 Asn Asp His Gln Ser Thr Leu Ser Tyr Ile Leu Ile Asn Pro Ser Pro
 1060 1065 1070
 Asp Thr Arg Ile Glu Leu Asn Asp Val Val Tyr Leu Ile Arg Pro Asp
 1075 1080 1085
 Pro Leu Ala Tyr Leu Pro Asn Ser Glu Pro Ser Arg Arg Asn Ser Ile
 1090 1095 1100
 Cys Asn Val Thr Gly Gln Asp Ser Arg Glu Glu Thr Gln Leu
 1105 1110 1115

10

20

<210> 2

<211> 3354

<212> DNA

<213> Human

<400> 2

atgggtgatt tggagagcga agtgccccct ctgcctccca ggtacagggtt tcgagatttg 60
 ctgctagggg accaaggatg gcaaaacgac gacagggtac aagtigaatt ctatatgaat 120
 gaaaatacat ttaaagaaag actaaaatta tttttcataa aaaaccagag atcaagtcta 180
 aggatacgcg tgttcaattt ttctctcaaa ttactaagct gcttattata cataatccga 240
 gtactactag aaaacccttc acaaggaaat gaatggcttc atatcttttg ggtgaacaga 300
 agtctacctt tgtggggcct acaggtttca gtggcattga taagtctgtt tgaacaata 360
 ttacttgggtt atcttagtta taagggaac atctgggaac agatitttac aatacccttc 420
 atcttggaaa taattaatgc agttcccttc attatctcaa tattctggcc ttccttaagg 480
 aatctatttg tcccagtctt tctgaactgt tggcttgcca aacatgcctt ggaaaatatg 540

30

40

attaatgac tacacagagc caticagcgt acacagctcg caatgtttaa tcaagttttg	600	
attttaatat ctacattact atgccttate ttcacctgca tttgtgggat ccaacatctg	660	
gaacgaatag gaaagaagct gaatctcttt gactcccttt atttctgcat tgtgacgttt	720	
tctactgtgg gcttcgggga tgtcactcct gaaacatggc cctccaagct ttttgtagtt	780	
gctatgattt gtgttgctct tgtggttcta cccatacagt ttgaacagct ggcttatttg	840	
tggatggaga gacaaaagtc aggaggaaac tatagtcgac atagagctca aactgaaaag	900	
caigtctgcc tgtgtctcag ctactgaag attgatttac ttatggattt tttaaatgaa	960	10
ttctatgctc atcctaggct ccaggattat tatgtggatga ttttgtgtcc tactgaaatg	1020	
gaigtacagg ttcgaagggt actgcagatt ccaatgtggc cccaacgagt tatctacctt	1080	
caaggttcag cccitaaaga tcaagacctt ttgagagcaa agatggatga cgctgaggcc	1140	
igtittattc tcagtagccg ttgtgaagtg gataggacat catctgatca ccaacaattt	1200	
ttgagagcat gggctgtgaa agattttgct ccaaattgtc ctttgtatgt ccagatatta	1260	
aagccigaaa ataaattca catcaaattt gctgatcatg ttgtttgtga agaagagttt	1320	
aaatacgcca tgttagcttt aaactgtata tgcccagcaa catctacact tattacacta	1380	20
ciggttcata cctctagagg gcagtggtg tgccgtgtgt gcagagaagg ccagcaatcg	1440	
ccagaacaat ggcagaagat gtacggtaga tgctccggga atgaagtcta ccacattgtt	1500	
tiggaagaaa gtacattttt tgctgaatat gaaggaaaga gttttacata tgcccttttc	1560	
catgcacaca aaaagtttgg cgtctgcttg attgggtgta ggaggaggga taataaaaac	1620	
atttgciga atccaggctc tcgatacatt atgaattcta cagacatag cttttatatt	1680	
aatattacca aagaagagaa ttcagcattt aaaaaccaag accagcagag aaaaagcaat	1740	
gigtccaggi cgtttatca tggaccttc agattacctg tacatagcat aattgccagc	1800	30
atgggtactg tggctataga cttgcaagat acaagctgta gatcagcaag tggccctacc	1860	
cigtctcttc ctacagaggg aagcaaagaa ataagaagac ctagcattgc tctgttttta	1920	
gaggttgcag atacatcacc gattcaaca tgtgatcttc taagtacca atcagaagat	1980	
gaaactacac cagatgaaga aatgtcttca aacttagagt atgctaaagg ttaccacctt	2040	
tattctccat atataggaag ttaccacct ttttgtcacc tcttcatga aaaagtacca	2100	
tttgtctgct taagattaga caagagttgc caacataact actatgagga tgcaaaagcc	2160	
tatggattca aaaataaact aattatagtt gcagctgaaa cagctggaaa tggattatat	2220	40
aactttattg ttctctcag ggcatattat agaccaagaa aagaacttaa tcccatagta	2280	

ctgctatigg ataacccccct agatgactta ctcaggigtg gagtgacttt tgctgctaatt 2340
 atggtaggttg tggataaaga gagcaccaatg agtgccgagg aagactacat ggcagatgcc 2400
 aaaaccattg tgaacgtgca gacactcttc aggttgtttt ccagtcctcag tattatcaca 2460
 gagctaacte accccgceaa catgagattc atgcaattca gagccaaaga ctgttactct 2520
 ctgctcttt caaaactgga aaagaaagaa cgggagagag gctctiaactt ggcttttatg 2580
 tttcgactgc cttttgctgc tgggaggggtg tttagcatca gtatgttggg cactctgctg 2640
 tatcagtcat ttgigaagga ttatatgatt tctatcacga gacttctgtt gggactggac 2700
 actacaccag gatctgggtt tctttgttct atgaaaatca ctgcagatga cttatggate 2760
 agaacttatg ccagacttta tcagaagttg tgttcttcta ctggagatgt tcccatigga 2820
 atctacagga ctgagctca gaaacttact acatctgagt ctcaaatac tatcagtgta 2880
 gaagagiggg aagacaccaa agactccaaa gaacaggggc accaccgcag caaccaccgc 2940
 aactcaacat ccagtgacca gtcggaccat ccttctctgc ggagaaaaag catgcagtgg 3000
 gcccgaagac tgagcagaaa aggcccaaaa cactctggta aacagctga aaaaataacc 3060
 cagcagcgac tgaacctcta caggaggtea gaaagacaag agcttctga acttgtgaaa 3120
 aatagaatga aacacttggg tctttctaca gtgggatatg atgaaatgaa tgatcatcaa 3180
 agtacctct cctacatctt gattaacceca tctccagata ccagaataga gctgaatgat 3240
 gtigtatact taattcgacc agatccactg gcctaccttc caaacagtga gcccagtcga 3300
 agaaacagca tctgcaatgt cactggctca gattctcggg aggaaactca actt 3354

10

20

<210> 3

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 3

cttccccctt ctcccattcc tctc

24

<210> 4

40

<211> 26		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Primer		
<400> 4		
ttccatctag tttctttcgt gccagc	26	10
<210> 5		
<211> 26		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Primer		20
<400> 5		
ctcggccaca gcgtcttggt agtcct	26	
<210> 6		
<211> 26		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		30
<220>		
<223> Primer		
<400> 6		
gtggttcaa gcaaggtcct tgtagg	26	
<210> 7		
<211> 3517		40
<212> DNA		

<213> Human

<400> 7

ctcggccaca gcgctctgtt agtccctccc ctgtactccg caatattttc tttctttctc	60	
cctcctctcc tccatttgtt gtttgatgtt tcccactctt tgaggaagga tggttgattt	120	
ggagagcgaa gtgccccctc tgcctcccag gtacagggtt cgagatttgc tgcctagggga	180	
ccaaggatgg caaaacgacg acagggtaca agttgaattc tataatgaatg aaaatacatt	240	
taaagaaaga ctaaaattat tttcataaa aaaccagaga tcaagcttaa ggatacgcct	300	10
gttcaatfff tctctcaaat tactaagctg cttattatac ataatccgag tactactaga	360	
aaaccttca caaggaaatg aatggctca tatcttttgg gtgaacagaa gtctacctt	420	
gtggggctta caggtttcag tggcattgat aagtctgttt gaacaatat tacttgggta	480	
icttagttat aagggaaca tctgggaaca gattttacga ataccttca tcttggaaat	540	
aattaatgca gtaccttca ttatctcaat attctggcct tcccttaagga atctatttgt	600	
cccagcttct ctgaactgtt ggcttgccaa acatgccttg gaaaatatga ttaatgatct	660	
acacagagcc attcagcgtc cacagctctg aatgtttaat caagttttga ttttaatact	720	20
taattacta tgccttatct taccctgat ttgtgggact caacatctgg aacgaatagg	780	
aaagaagctg aatctctttg actcccttca tttctgcatt gtgacgtttt ctactgtggg	840	
cttccgggat gtcactcctg aaacatggc ctccaagctt ttgttagttg ctatgatttg	900	
igtgtctctt gtggttctac ccatacagtt tgaacagctg gcttatttgt ggatggagag	960	
acaaaagica ggaggaaact atagctgaca tagagctcaa actgaaaagc atgtcgtcct	1020	
gtgtgtcagc tcaactgaaga ttgatttact tatggatttt ttaaataaat tctatgtctca	1080	
tcctaggctc caggattatt atgtggtgat ttgtgtcct actgaaatgg atgtacaggt	1140	30
tcgaaggta ctgcagattc caatgtggc ccaacgagtt atctacctc aaggttcagc	1200	
ccctaaagat caagacctat tgagagcaaa gatggatgac gctgaggcct gttttattct	1260	
cagtagccgt tgtgaagtgg ataggacatc atctgatcac caacaattt tgagagcatg	1320	
ggctgtgaaa gattttgctc caaattgtc ttgtatgtc cagatattaa agcctgaaaa	1380	
taaatttcac atcaaatttg ctgatcatgt tgtttgtgaa gaagagtta aatagccat	1440	
gttagcttta aactgtatat gccagcaac atctacactt attacactac tggttcatac	1500	
ctctagaggg cagtgtgtgt gctgtgtgtg cagagaaggc cagcaatcgc cagaacaatg	1560	40
gcagaagatg tacggtagat gctccgggaa tgaagtctac cacattgttt tggagaag	1620	

tacattttt	gctgaatatg	aaggaaagag	ttttacatat	gcctctttcc	atgcacacaa	1680	
aaagtttggc	gtctgcttga	ttggtgttag	gagggaggat	aataaaaaca	ttttgctgaa	1740	
iccaggctct	cgatacatta	tgaattctac	agacatatgc	ttttatatta	atattaccaa	1800	
agaagagaat	tcagcattta	aaaaccaaga	ccagcagaga	aaaagcaatg	tgtccaggtc	1860	
gtttatcat	ggaccitcca	gattacctgt	acatagcata	atigccagca	tgggtactgt	1920	
ggctatagac	ttgcaagata	caagctgtag	atcagcaagt	ggccctacce	tgtctcttcc	1980	
tacagagga	agcaaagaaa	taagaagacc	tagcatigct	ccigtitttag	aggttgcaga	2040	10
tacatcatcg	attcaaacat	gtgatcttct	aagtaccaa	tcagaagatg	aaactacacc	2100	
agaigaagaa	atgcttcaa	acttagagta	tgctaaaggt	taccacctt	attctccata	2160	
tataggaagt	tcaccacctt	tttgtcatct	cttctatgaa	aaagtacctt	tttgtctgtt	2220	
aagattagac	aagagttgcc	aacataacta	ctatgaggat	gcaaaagcct	atggattcaa	2280	
aaataaacta	attatagttg	cagctgaaac	agctggaaat	ggattatata	actttattgt	2340	
tcctctcagg	gcatattata	gaccaaagaa	agaacttaat	cccatagtac	tgctattgga	2400	
taacccctta	gatgacttac	tcagggtgtg	agtgactttt	gctgctaata	tgggtggttgt	2460	20
ggataaagag	agcaccatga	gtgccgagga	agactacatg	gcagatgcca	aaaccattgt	2520	
gaacgtgcag	acactcttca	ggttgttttc	cagtctcagt	attatcacag	agctaactca	2580	
ccccccaac	atgagattca	tgcaattcag	agccaaagac	tgttactctc	ttgtcttttc	2640	
aaaactggaa	aagaaagaac	gggagagagg	ctctaacttg	gcctttatgt	ttcgactgcc	2700	
ttttgctgct	gggaggtgtt	ttagcatcag	tatgttggac	actctgctgt	atcagtcatt	2760	
tgtaaggat	tatatgattt	ctatcacgag	actctgtttg	ggactggaca	ctacaccagg	2820	
atctgggttt	ctttgttcta	tgaaaatcac	tgcagatgac	ttatggatca	gaacttatgc	2880	30
cagactttat	cagaagttgt	gttcttctac	tggagatgtt	cccatggaa	tctacaggac	2940	
tgagtctcag	aaacttacta	catctgagtc	tcaaatatct	atcagtgtag	aagagtggga	3000	
agacaccaa	gactccaaag	aacaggggca	ccaccgcagc	aaccaccgca	actcaacatc	3060	
cagtgaccag	tggaccatc	ctttgctgcg	gagaaaaagc	atgcagtggg	cccgaagact	3120	
gagcagaaaa	ggcccaaac	actctggtaa	aacagctgaa	aaaataacc	agcagcgact	3180	
gaacctctac	aggaggtcag	aaagacaaga	gcttgctgaa	cttctgaaaa	atagaatgaa	3240	
acacttgggt	ctttctacag	tgggatatga	tgaaatgaat	gatcatcaaa	gtaccctctc	3300	40
ctacatcctg	attaacccat	ctccagatac	cagaatagag	ctgaatgatg	ttgtatactt	3360	

aaticgacca gatccactgg cctaccttcc aaacagtgag cccagtcgaa gaaacagcat 3420
 ctgcaatgtc actggteaag attctcggga ggaaactcaa ctttgataaa aataaaatga 3480
 gaaactitit tctataaaag accttgcttg aaaccac 3517

<210> 8

<211> 1111

<212> PRT

<213> Human

<400> 8

Met Val Asp Leu Glu Ser Glu Val Pro Pro Leu Pro Pro Arg Tyr Arg
 5 10 15

Phe Arg Asp Leu Leu Leu Gly Asp Gln Gly Trp Gln Asn Asp Asp Arg
 20 25 30

Val Gln Val Glu Phe Tyr Met Asn Glu Asn Thr Phe Lys Glu Arg Leu
 35 40 45

Lys Leu Phe Phe Ile Lys Asn Gln Arg Ser Ser Leu Arg Ile Arg Leu
 50 55 60

Phe Asn Phe Ser Leu Lys Leu Leu Ser Cys Leu Leu Tyr Ile Ile Arg
 65 70 75 80

Val Leu Leu Glu Asn Pro Ser Gln Gly Asn Glu Trp Ser His Ile Phe
 85 90 95

Trp Val Asn Arg Ser Leu Pro Leu Trp Gly Leu Gln Val Ser Val Ala
 100 105 110

Leu Ile Ser Leu Phe Glu Thr Ile Leu Leu Gly Tyr Leu Ser Tyr Lys
 115 120 125

Gly Asn Ile Trp Glu Gln Ile Leu Arg Ile Pro Phe Ile Leu Glu Ile
 130 135 140

Ile Asn Ala Val Pro Phe Ile Ile Ser Ile Phe Trp Pro Ser Leu Arg
 145 150 155 160

10

20

30

40

Asn Leu Phe Val Pro Val Phe Leu Asn Cys Trp Leu Ala Lys His Ala	
165	170
Leu Glu Asn Met Ile Asn Asp Leu His Arg Ala Ile Gln Arg Thr Gln	
180	185
Ser Ala Met Phe Asn Gln Val Leu Ile Leu Ile Ser Thr Leu Leu Cys	
195	200
Leu Ile Phe Thr Cys Ile Cys Gly Ile Gln His Leu Glu Arg Ile Gly	10
210	215
Lys Lys Leu Asn Leu Phe Asp Ser Leu Tyr Phe Cys Ile Val Thr Phe	
225	230
Ser Thr Val Gly Phe Gly Asp Val Thr Pro Glu Thr Trp Ser Ser Lys	
245	250
Leu Phe Val Val Ala Met Ile Cys Val Ala Leu Val Val Leu Pro Ile	20
260	265
Gln Phe Glu Gln Leu Ala Tyr Leu Trp Met Glu Arg Gln Lys Ser Gly	
275	280
Gly Asn Tyr Ser Arg His Arg Ala Gln Thr Glu Lys His Val Val Leu	
290	295
Cys Val Ser Ser Leu Lys Ile Asp Leu Leu Met Asp Phe Leu Asn Glu	
305	310
Phe Tyr Ala His Pro Arg Leu Gln Asp Tyr Tyr Val Val Ile Leu Cys	30
325	330
Pro Thr Glu Met Asp Val Gln Val Arg Arg Val Leu Gln Ile Pro Met	
340	345
Trp Ser Gln Arg Val Ile Tyr Leu Gln Gly Ser Ala Leu Lys Asp Gln	
355	360
Asp Leu Leu Arg Ala Lys Met Asp Asp Ala Glu Ala Cys Phe Ile Leu	40
370	375
Ser Ser Arg Cys Glu Val Asp Arg Thr Ser Ser Asp His Gln Thr Ile	

Arg Arg Pro Ser Ile Ala Pro Val Leu Glu Val Ala Asp Thr Ser Ser	
625	630
Ile Gln Thr Cys Asp Leu Leu Ser Asp Gln Ser Glu Asp Glu Thr Thr	
	645
	650
	655
Pro Asp Glu Glu Met Ser Ser Asn Leu Glu Tyr Ala Lys Gly Tyr Pro	
	660
	665
	670
Pro Tyr Ser Pro Tyr Ile Gly Ser Ser Pro Thr Phe Cys His Leu Leu	10
	675
	680
	685
His Glu Lys Val Pro Phe Cys Cys Leu Arg Leu Asp Lys Ser Cys Gln	
	690
	695
	700
His Asn Tyr Tyr Glu Asp Ala Lys Ala Tyr Gly Phe Lys Asn Lys Leu	
	705
	710
	715
	720
Ile Ile Val Ala Ala Glu Thr Ala Gly Asn Gly Leu Tyr Asn Phe Ile	
	725
	730
	735
Val Pro Leu Arg Ala Tyr Tyr Arg Pro Lys Lys Glu Leu Asn Pro Ile	20
	740
	745
	750
Val Leu Leu Leu Asp Asn Pro Leu Asp Asp Leu Leu Arg Cys Gly Val	
	755
	760
	765
Thr Phe Ala Ala Asn Met Val Val Val Asp Lys Glu Ser Thr Met Ser	
	770
	775
	780
Ala Glu Glu Asp Tyr Met Ala Asp Ala Lys Thr Ile Val Asn Val Gln	30
	785
	790
	795
	800
Thr Leu Phe Arg Leu Phe Ser Ser Leu Ser Ile Ile Thr Glu Leu Thr	
	805
	810
	815
His Pro Ala Asn Met Arg Phe Met Gln Phe Arg Ala Lys Asp Cys Tyr	
	820
	825
	830
Ser Leu Ala Leu Ser Lys Leu Glu Lys Lys Glu Arg Glu Arg Gly Ser	
	835
	840
	845
Asn Leu Ala Phe Met Phe Arg Leu Pro Phe Ala Ala Gly Arg Val Phe	40

850	855	860		
Ser Ile Ser Met Leu Asp Thr Leu Leu Tyr Gln Ser Phe Val Lys Asp				
865	870	875	880	
Tyr Met Ile Ser Ile Thr Arg Leu Leu Leu Gly Leu Asp Thr Thr Pro				
	885	890	895	
Gly Ser Gly Phe Leu Cys Ser Met Lys Ile Thr Ala Asp Asp Leu Trp				
	900	905	910	10
Ile Arg Thr Tyr Ala Arg Leu Tyr Gln Lys Leu Cys Ser Ser Thr Gly				
	915	920	925	
Asp Val Pro Ile Gly Ile Tyr Arg Thr Glu Ser Gln Lys Leu Thr Thr				
	930	935	940	
Ser Glu Ser Gln Ile Ser Ile Ser Val Glu Glu Trp Glu Asp Thr Lys				
945	950	955	960	
Asp Ser Lys Glu Gln Gly His His Arg Ser Asn His Arg Asn Ser Thr				20
	965	970	975	
Ser Ser Asp Gln Ser Asp His Pro Leu Leu Arg Arg Lys Ser Met Gln				
	980	985	990	
Trp Ala Arg Arg Leu Ser Arg Lys Gly Pro Lys His Ser Gly Lys Thr				
	995	1000	1005	
Ala Glu Lys Ile Thr Gln Gln Arg Leu Asn Leu Tyr Arg Arg Ser Glu				30
	1010	1015	1020	
Arg Gln Glu Leu Ala Glu Leu Val Lys Asn Arg Met Lys His Leu Gly				
1025	1030	1035	1040	
Leu Ser Thr Val Gly Tyr Asp Glu Met Asn Asp His Gln Ser Thr Leu				
	1045	1050	1055	
Ser Tyr Ile Leu Ile Asn Pro Ser Pro Asp Thr Arg Ile Glu Leu Asn				
	1060	1065	1070	
Asp Val Val Tyr Leu Ile Arg Pro Asp Pro Leu Ala Tyr Leu Pro Asn				40
	1075	1080	1085	

Ser Glu Pro Ser Arg Arg Asn Ser Ile Cys Asn Val Thr Gly Gln Asp

1090

1095

1100

Ser Arg Glu Glu Thr Gln Leu

1105

1110

<210> 9

<211> 3333

<212> DNA

<213> Human

<400> 9

aiggttgatt	iggagagcga	agtgccccct	ctgcctccca	ggtacagggt	tcgagatttg	60
ctgctagggg	accaaggatg	gcaaaacgac	gacagggtac	aagtigaatt	ctatatgaat	120
gaaaatacat	ttaaagaaag	actaaaatta	ttttcataa	aaaaccagag	atcaagtcta	180
aggatacgc	tgttcaattt	tctctcaaa	ttactaagct	gcttattata	cataatccga	240
gtactactag	aaaacccttc	acaaggaaat	gaatggcttc	atatcttttg	ggtgaacaga	300
agtctacctt	tgtggggctt	acaggtttca	gtggcattga	taagtctgtt	tgaacaata	360
ttactigggt	atcttagtta	taagggaac	atctgggaac	agattttacg	aatacccttc	420
atcttggaaa	taattaatgc	agttcccttc	attatctcaa	tattctggcc	ttccttaagg	480
aatctatttg	tcccagcttt	tctgaactgt	tggcttgcca	aacatgcctt	ggaaaatag	540
attaatgata	tacacagagc	cattcagcgt	acacagctcg	caatgtttaa	tcaagttttg	600
attttaatat	ctacattact	atgccttata	ttcaccctga	tttgtgggat	ccaacatctg	660
gaacgaatag	gaaagaagct	gaatctcttt	gactcccttt	atttctgcat	tgtgacgttt	720
tctactgigg	gcttcgggga	tgtcactcct	gaaacatggt	ctccaagct	ttttgtagtt	780
gctatgatti	gtgttgctct	tgtggttcta	cccatacagt	ttgaacagct	ggcttatttg	840
iggatggaga	gacaaaagtc	aggaggaaac	tatagtcgac	atagagctca	aactgaaaag	900
catgtcgtcc	tgtgtgtcag	ctcactgaag	attgatttac	ttatggattt	tttaaatgaa	960
ttctatgctc	atcctaggct	ccaggattat	tatgtggtga	ttttgtgtcc	tactgaaatg	1020
gatgtacagg	ttcgaagggt	actgcagatt	ccaatgtggt	cccaacgagt	tatctacctt	1080
caaggttcag	cccttaaaga	tcaagacctt	ttgagagcaa	agatggatga	cgctgaggcc	1140

10

20

30

40

igtittatc	tcagtagccg	tigtgaagtg	gataggacat	catctgatca	ccaacaatt	1200	
ttagagcat	gggctgtgaa	agattttgct	ccaattgtc	ctttgtatgt	ccagatatta	1260	
aagccigaaa	ataaaittca	catcaaaitt	gctgatcatg	ttgtttgtga	agaagagttt	1320	
aaatacgeca	tgtagcttt	aaactgtata	tgcccagcaa	catctacact	tattacacta	1380	
ctggtcata	ccctagagg	gcaagaaggc	cagcaatcgc	cagaacaatg	gcagaagatg	1440	
tacggtagat	gctccgggaa	tgaagtctac	cacattgttt	tggaagaaag	tacatttttt	1500	
gcigaataig	aaggaaagag	tittacatat	gcctctttcc	atgcacacaa	aaagtttggc	1560	10
gtctgcttga	ttgggtttag	gagggaggat	aataaaaaca	ttttgctgaa	tccaggctct	1620	
cgatacatta	tgaattctac	agacatatgc	ttttatatta	atattacca	agaagagaat	1680	
tcagcattta	aaaaccaaga	ccagcagaga	aaaagcaatg	tgtccaggtc	gttttatcat	1740	
ggaccttcca	gattacctgt	acatagcata	attgccagca	tgggtactgt	ggctatagac	1800	
ttgcaagata	caagctgtag	atcagcaagt	ggccctacce	tgtctcttcc	tacagagggga	1860	
agcaaagaaa	taagaagacc	tagcattgct	ccgtttttag	aggttgcaga	tacatcatcg	1920	
attcaaacat	gtgatcttct	aagtgaccaa	tcagaagatg	aaactacacc	agatgaagaa	1980	20
atgtcttcaa	acttagagta	tgctaaaggt	taccacctt	attctccata	tataggaagt	2040	
tcacccttct	tttgcctct	cttctatgaa	aaagtacct	tttgcctgct	aagattagac	2100	
aagagttgcc	aacataacta	ctatgaggat	gcaaaagcct	atggattcaa	aaataaacta	2160	
attatagttg	cagctgaaac	agctggaaat	ggattatata	actttattgt	tcctctcagg	2220	
gcatattata	gaccaaagaa	agaacttaat	cccatagtac	tgctattgga	taacccccta	2280	
gatgacttac	tcagggtgtg	agtgactttt	gctgctaata	tgggtggtgt	ggataaagag	2340	
agcaccaatga	gtgccgagga	agactacatg	gcagatgcca	aaaccattgt	gaacgtgcag	2400	30
acactcttca	ggttgttttc	cagctcagct	attatcacag	agctaactca	ccccgccaac	2460	
atgagattca	tgcaattcag	agccaaagac	tgttactctc	ttgctctttc	aaaactggaa	2520	
aagaaagaac	gggagagagg	ctctaacttg	gcctttatgt	ttcgactgcc	ttttgctgct	2580	
gggaggggtg	ttagcatcag	tatgttggac	actctgctgt	atcagtcatt	tgtgaaggat	2640	
tatatgattt	ctatcacgag	actctgtttg	ggactggaca	ctacaccagg	atctgggttt	2700	
ctttgttcta	tgaaaatcac	tgcagatgac	ttatggatca	gaacttatgc	cagactttat	2760	
cagaagtgtg	gttcttctac	tggagatgtt	cccatggaa	tctacaggac	tgagctctcag	2820	40
aaacttacta	catctgagtc	tcaaatactt	atcagtttag	aagagtggga	agacacccaaa	2880	

gac1ccaaag aacaaggga ccaccgcagc aaccaccgca actcaacatc cagtgaccag	2940	
tcggaccate ccttgcctgc gagaaaaagc atgcagtggg cccgaagact gagcagaaaa	3000	
ggcccaaac actctggtaa aacagctgaa aaaataacce agcagcgcact gaacctctac	3060	
aggaggtcag aaagacaaga gcttgcctgaa cttgtgaaaa atagaatgaa acacttgggt	3120	
cttctacag tgggatatga tgaatgaat gatcatcaa gtacctctc ctacatcctg	3180	
attaacccat ctccagatac cagaatagag ctgaatgatg ttgtatactt aattcgacca	3240	
gatccacigg cctacctcc aacagtgag cccagtcgaa gaaacagcat ctgcaatgic	3300	10
actggctcaag attctcggga ggaaactcaa ctt	3333	

<210> 10

<211> 3496

<212> DNA

<213> Human

<400> 10

ctcggccaca gcgcttgtt agtctctcc ctgtactccg caatatttc tttcttctc	60	
ccctctctcc tccatttgtt gtttgatgtt tcccactctt tgaggaagga tggttgattt	120	
ggagagcgaa gtgccccctc tgcctcccag gtacagggtt cgagatttgc tgcctagggga	180	
ccaaggatgg caaacgcagc acagggtaca agttgaattc tataatgaatg aaaatacatt	240	
taaagaaaga ctaaaattat tttcataaa aaaccagaga tcaagctctaa ggatacgctt	300	
gttcaatitc tctctcaaat tactaagctg cttattatac ataatccgag tactactaga	360	
aaaccttca caaggaaatg aatggctctc tatcttttgg gtgaacagaa gtctacctt	420	30
gtgggctta caggtttcag tggcattgat aagctctgtt gaaacaatat tacttgggta	480	
tcttagttat aagggaaca tctgggaaca gattttacga ataccttca tcttggaaat	540	
aattaatgca gtctccctca ttatctcaat attctggcct tctttaagga atctatttgt	600	
cccagcttct ctgaactgtt ggcttgccaa acatgccttg gaaaatatga ttaatgatct	660	
acacagagcc attcagcgtc cacagctctc aatgtttaat caagttttga ttttaatatc	720	
tacattacta tgccttatct tcacctgcat ttgtgggatc caacatctgg aacgaatagg	780	
aaagaagctg aatctctttg actcccttca tttctgcatt gtgacgtttt ctactgtggg	840	40
cttcgggat gtcactctg aaacatggct ctccaagctt ttgtagtgtg ctatgatttg	900	

igtgctctt	gtggttctac	ccatacagtt	tgaacagctg	gcttatttgt	ggatggagag	960	
acaaaagtca	ggaggaaact	atagtcgaca	tagagctcaa	actgaaaagc	atgtcgtcct	1020	
gtgtgtcagc	tcactgaaga	tigatttact	tatggatttt	ttaaataaat	tctatgctca	1080	
tcctaggctc	caggattatt	atgtggatg	tttgtgtcct	actgaaatgg	atgtacaggt	1140	
tcgaagggtg	ctgcagattc	caatgtggc	ccaacagatt	atctaccctc	aaggttcagc	1200	
ccttaaagat	caagacctat	tgagagcaaa	gatggatgac	gctgaggcct	gttttattct	1260	
cagtagccgt	tggaagtgg	ataggacatc	atctgatcac	caaacaattt	tgagagcatg	1320	10
ggctgtgaaa	gattttgctc	caaattgtcc	tttgtatgct	cagatattaa	agcctgaaaa	1380	
taaatttcac	atcaaatttg	ctgatcatgt	tgtttgtgaa	gaagagtta	aatagccat	1440	
gttagcttta	aactgtatat	gcccagcaac	atctacactt	attacactac	tggttcatac	1500	
ctctagaggg	caagaaggcc	agcaatcgcc	agaacaatgg	cagaagatgt	acggtagatg	1560	
ctccgggaat	gaagcttacc	acattgtttt	ggaagaaagt	acattttttg	ctgaatatga	1620	
aggaaagagt	ttacatatg	cctctttcca	tgcacacaaa	aagtittggcg	tctgcttgat	1680	
tggtgttagg	aggaggata	ataaaaacat	tttgcitgaa	ccaggctctc	gatacattat	1740	20
gaattctaca	gacatatgct	tttatattaa	tattaccaa	gaagagaatt	cagcatttaa	1800	
aaaccaagac	cagcagagaa	aaagcaatgt	gtccaggctg	ttttatcatg	gaccttccag	1860	
attacctgta	catagcataa	tigccagcat	gggtactgtg	gctatagact	tgcaagatac	1920	
aagctgtaga	tcagcaagtg	gccctacct	gtctcttctc	acagagggaa	gcaaagaaat	1980	
aagaagacct	agcatgtctc	ctgttttaga	ggttgcagat	acatcatcga	ttcaaacatg	2040	
tgatcttcta	agtgaccaat	cagaagatga	aactacacca	gatgaagaaa	tgtcttcaaa	2100	
cttagaglat	gctaaaggtt	accacctta	ttctccatat	ataggaagtt	caccaccttt	2160	30
ttgtcatctc	cttcatgaaa	aagtaccatt	ttgctgctta	agattagaca	agagttgccca	2220	
acataactac	tatgaggatg	caaaagccta	tggattcaaa	aataaactaa	ttatagttgc	2280	
agctgaaaca	gctggaaatg	gattatataa	ctttattgtt	cctctcaggg	catattatag	2340	
accaaagaaa	gaacttaatc	ccatagtact	gctattggat	aaccccttag	atgacttact	2400	
caggtgtgga	gtgacttttg	ctgctaatat	ggtggttgtg	gataaagaga	gcaccatgag	2460	
igccgaggaa	gactacatgg	cagatgcaa	aaccattgtg	aacgtgcaga	cactcttcag	2520	
gttgttttcc	agctctagta	ttatcacaga	gctaactcac	cccgccaaca	tgagattcat	2580	40
gcaattcaga	gccaaagact	gttactctct	tgctctttca	aaactggaaa	agaaagaacg	2640	

ggagagaggc tctaacttgg cctttatgtt tcgactgcct ttigctgctg ggaggggtgtt	2700	
tagcatcagt atgttggaca ctctgctgta tcagtcattt gtgaaggatt atatgatttc	2760	
tatcacgaga ctctgttgg gactggacac tacaccagga tctgggttcc tttgttctat	2820	
gaaaatcact gcagatgact tatggatcag aacttatgcc agactttatc agaagtgtgtg	2880	
ttcttctact ggagatgttc ccatttgaat ctacaggact gagtctcaga aacttactac	2940	
atctgagctc caaatatcta tcagtgtaga agagtgggaa gacaccaaag actccaaaga	3000	
acaagggcac caccgcagca accaccgcaa ctcaacatcc agtgaccagt cggaccatcc	3060	10
cttgcctcgg agaaaaagca tgcagtgggc ccgaagactg agcagaaaag gcccaaaaca	3120	
ctctggtaaa acagctgaaa aaataacca gcagcgcactg aacctctaca ggaggtcaga	3180	
aagacaagag ctctctgaac ttgtgaaaa tagaatgaaa cacttgggtc tttctacagt	3240	
gggataigat gaaatgaatg atcatcaaag taccctctcc tacatctga ttaaccctc	3300	
tccagatacc agaatagagc tgaatgatgt tgtatactta attcgaccag atccactggc	3360	
ctacctcca aacagtgagc ccagtcgaag aaacagcatc tgcaatgtca ctggctcaaga	3420	
ttctcgggag gaaactcaac tttgataaaa ataaaatgag aaactttttt cctacaaaga	3480	20
cttgcctiga aaccac	3496	

<210> 11

<211> 1061

<212> PRT

<213> Human

<400> 11

30

Met Val Asp Leu Glu Ser Glu Val Pro Pro Leu Pro Pro Arg Tyr Arg

5

10

15

Phe Arg Asp Leu Leu Leu Gly Asp Gln Gly Trp Gln Asn Asp Asp Arg

20

25

30

Val Gln Val Glu Phe Tyr Met Asn Glu Asn Thr Phe Lys Glu Arg Leu

35

40

45

Lys Leu Phe Phe Ile Lys Asn Gln Arg Ser Ser Leu Arg Ile Arg Leu

50

55

60

40

Phe	Asn	Phe	Ser	Leu	Lys	Leu	Leu	Ser	Cys	Leu	Leu	Tyr	Ile	Ile	Arg	
65					70				75						80	
Val	Leu	Leu	Glu	Asn	Pro	Ser	Gln	Gly	Asn	Glu	Trp	Ser	His	Ile	Phe	
				85					90						95	
Trp	Val	Asn	Arg	Ser	Leu	Pro	Leu	Trp	Gly	Leu	Gln	Val	Ser	Val	Ala	
			100						105						110	
Leu	Ile	Ser	Leu	Phe	Glu	Thr	Ile	Leu	Leu	Gly	Tyr	Leu	Ser	Tyr	Lys	10
			115						120						125	
Gly	Asn	Ile	Trp	Glu	Gln	Ile	Leu	Arg	Ile	Pro	Phe	Ile	Leu	Glu	Ile	
			130						135						140	
Ile	Asn	Ala	Val	Pro	Phe	Ile	Ile	Ser	Ile	Phe	Trp	Pro	Ser	Leu	Arg	
145					150					155					160	
Asn	Leu	Phe	Val	Pro	Val	Phe	Leu	Asn	Cys	Trp	Leu	Ala	Lys	His	Ala	
			165						170						175	20
Leu	Glu	Asn	Met	Ile	Asn	Asp	Leu	His	Arg	Ala	Ile	Gln	Arg	Thr	Gln	
			180						185						190	
Ser	Ala	Met	Phe	Asn	Gln	Val	Leu	Ile	Leu	Ile	Ser	Thr	Leu	Leu	Cys	
			195						200						205	
Leu	Ile	Phe	Thr	Cys	Ile	Cys	Gly	Ile	Gln	His	Leu	Glu	Arg	Ile	Gly	
			210						215						220	
Lys	Lys	Leu	Asn	Leu	Phe	Asp	Ser	Leu	Tyr	Phe	Cys	Ile	Val	Thr	Phe	30
225					230						235				240	
Ser	Thr	Val	Gly	Phe	Gly	Asp	Val	Thr	Pro	Glu	Thr	Trp	Ser	Ser	Lys	
			245						250						255	
Leu	Phe	Val	Val	Ala	Met	Ile	Cys	Val	Ala	Leu	Val	Val	Leu	Pro	Ile	
			260						265						270	
Gln	Phe	Glu	Gln	Leu	Ala	Tyr	Leu	Trp	Met	Glu	Arg	Gln	Lys	Ser	Gly	
			275						280						285	40
Gly	Asn	Tyr	Ser	Arg	His	Arg	Ala	Gln	Thr	Glu	Lys	His	Val	Val	Leu	

290	295	300	
Cys Val Ser Ser Leu Lys Ile Asp Leu Leu Met Asp Phe Leu Asn Glu			
305	310	315	320
Phe Tyr Ala His Pro Arg Leu Gln Asp Tyr Tyr Val Val Ile Leu Cys			
	325	330	335
Pro Thr Glu Met Asp Val Gln Val Arg Arg Val Leu Gln Ile Pro Met			
	340	345	350
Trp Ser Gln Arg Val Ile Tyr Leu Gln Gly Ser Ala Leu Lys Asp Gln			10
	355	360	365
Asp Leu Leu Arg Ala Lys Met Asp Asp Ala Glu Ala Cys Phe Ile Leu			
	370	375	380
Ser Ser Arg Cys Glu Val Asp Arg Thr Ser Ser Asp His Gln Thr Ile			
385	390	395	400
Leu Arg Ala Trp Ala Val Lys Asp Phe Ala Pro Asn Cys Pro Leu Tyr			20
	405	410	415
Val Gln Ile Leu Lys Pro Glu Asn Lys Phe His Ile Lys Phe Ala Asp			
	420	425	430
His Val Val Cys Glu Glu Glu Phe Lys Tyr Ala Met Leu Ala Leu Asn			
	435	440	445
Cys Ile Cys Pro Ala Thr Ser Thr Leu Ile Thr Leu Leu Val His Thr			
450	455	460	30
Ser Arg Gly Gln Phe Gly Val Cys Leu Ile Gly Val Arg Arg Glu Asp			
465	470	475	480
Asn Lys Asn Ile Leu Leu Asn Pro Gly Pro Arg Tyr Ile Met Asn Ser			
	485	490	495
Thr Asp Ile Cys Phe Tyr Ile Asn Ile Thr Lys Glu Glu Asn Ser Ala			
	500	505	510
Phe Lys Asn Gln Asp Gln Gln Arg Lys Ser Asn Val Ser Arg Ser Phe			40
	515	520	525

Tyr His Gly Pro Ser Arg Leu Pro Val His Ser Ile Ile Ala Ser Met	
530	535
Gly Thr Val Ala Ile Asp Leu Gln Asp Thr Ser Cys Arg Ser Ala Ser	
545	550
Gly Pro Thr Leu Ser Leu Pro Thr Glu Gly Ser Lys Glu Ile Arg Arg	
565	570
Pro Ser Ile Ala Pro Val Leu Glu Val Ala Asp Thr Ser Ser Ile Gln	10
580	585
Thr Cys Asp Leu Leu Ser Asp Gln Ser Glu Asp Glu Thr Thr Pro Asp	
595	600
Glu Glu Met Ser Ser Asn Leu Glu Tyr Ala Lys Gly Tyr Pro Pro Tyr	
610	615
Ser Pro Tyr Ile Gly Ser Ser Pro Thr Phe Cys His Leu Leu His Glu	
625	630
Lys Val Pro Phe Cys Cys Leu Arg Leu Asp Lys Ser Cys Gln His Asn	
645	650
Tyr Tyr Glu Asp Ala Lys Ala Tyr Gly Phe Lys Asn Lys Leu Ile Ile	
660	665
Val Ala Ala Glu Thr Ala Gly Asn Gly Leu Tyr Asn Phe Ile Val Pro	
675	680
Leu Arg Ala Tyr Tyr Arg Pro Lys Lys Glu Leu Asn Pro Ile Val Leu	30
690	695
Leu Leu Asp Asn Pro Leu Asp Asp Leu Leu Arg Cys Gly Val Thr Phe	
705	710
Ala Ala Asn Met Val Val Val Asp Lys Glu Ser Thr Met Ser Ala Glu	
725	730
Glu Asp Tyr Met Ala Asp Ala Lys Thr Ile Val Asn Val Gln Thr Leu	
740	745
Phe Arg Leu Phe Ser Ser Leu Ser Ile Ile Thr Glu Leu Thr His Pro	40

755	760	765	
Ala Asn Met Arg Phe Met Gln Phe Arg Ala Lys Asp Cys Tyr Ser Leu			
770	775	780	
Ala Leu Ser Lys Leu Glu Lys Lys Glu Arg Glu Arg Gly Ser Asn Leu			
785	790	795	800
Ala Phe Met Phe Arg Leu Pro Phe Ala Ala Gly Arg Val Phe Ser Ile			
	805	810	815
Ser Met Leu Asp Thr Leu Leu Tyr Gln Ser Phe Val Lys Asp Tyr Met			10
	820	825	830
Ile Ser Ile Thr Arg Leu Leu Leu Gly Leu Asp Thr Thr Pro Gly Ser			
	835	840	845
Gly Phe Leu Cys Ser Met Lys Ile Thr Ala Asp Asp Leu Trp Ile Arg			
	850	855	860
Thr Tyr Ala Arg Leu Tyr Gln Lys Leu Cys Ser Ser Thr Gly Asp Val			20
865	870	875	880
Pro Ile Gly Ile Tyr Arg Thr Glu Ser Gln Lys Leu Thr Thr Ser Glu			
	885	890	895
Ser Gln Ile Ser Ile Ser Val Glu Glu Trp Glu Asp Thr Lys Asp Ser			
	900	905	910
Lys Glu Gln Gly His His Arg Ser Asn His Arg Asn Ser Thr Ser Ser			30
	915	920	925
Asp Gln Ser Asp His Pro Leu Leu Arg Arg Lys Ser Met Gln Trp Ala			
	930	935	940
Arg Arg Leu Ser Arg Lys Gly Pro Lys His Ser Gly Lys Thr Ala Glu			
945	950	955	960
Lys Ile Thr Gln Gln Arg Leu Asn Leu Tyr Arg Arg Ser Glu Arg Gln			
	965	970	975
Glu Leu Ala Glu Leu Val Lys Asn Arg Met Lys His Leu Gly Leu Ser			40
	980	985	990

Thr Val Gly Tyr Asp Glu Met Asn Asp His Gln Ser Thr Leu Ser Tyr
 995 1000 1005
 Ile Leu Ile Asn Pro Ser Pro Asp Thr Arg Ile Glu Leu Asn Asp Val
 1010 1015 1020
 Val Tyr Leu Ile Arg Pro Asp Pro Leu Ala Tyr Leu Pro Asn Ser Glu
 1025 1030 1035 1040
 Pro Ser Arg Arg Asn Ser Ile Cys Asn Val Thr Gly Gln Asp Ser Arg
 1045 1050 1055
 Glu Glu Thr Gln Leu
 1060

10

<210> 12

<211> 3183

<212> DNA

<213> Human

<400> 12

atgggtgatt tggagagcga agtgccect ctgcctccca ggtacaggtt tcgagatttg 60
 ctgctagggg accaaggatg gcaaacgac gacagggtac aagtigaatt ctatatgaat 120
 gaaaatacat ttaaagaaag actaaaatta ttttccataa aaaaccagag atcaagtcta 180
 aggatacgcc tgttcaattt ttctctcaaa ttactaagct gcttattata cataatccga 240
 gtactactag aaaacccttc acaaggaaat gaatggcttc atatcttttg ggtgaacaga 300
 agtctacctt tgtgggctt acaggtttca gtggcattga taagtctgtt tgaacaata 360
 ttacttgggtt atcttagtta taagggaac atctgggaac agatitttac aatacccttc 420
 atcttggaaa taattaatgc agttcccttc attatctcaa tattctggcc ttccttaagg 480
 aatctatttg tcccagcttt tctgaactgt tggcttgcca aacatgcctt ggaaaatatg 540
 attaatgata tacacagagc cattcagcgt acacagctctg caatgtttaa tcaagttttg 600
 attttaatai ctacattact atgccttacc ttaccctgca ttigtgggat ccaacatctg 660
 gaacgaatag gaaagaagct gaatctcttt gactcccttt atttctgcat tgtgacgttt 720
 tctactgtgg gcttcgggga tgcactcct gaacatggt cctccaagct ttttgtagtt 780

30

40

gctatgatt	gtgttgcct	tgtggttcta	ccatacagt	tgaacagct	ggcttatttg	840	
iggatggaga	gacaaaagtc	aggaggaaac	tatagtcgac	atagagctca	aactgaaaag	900	
catgctgcc	tggtgtcag	ctcactgaag	attgatttac	ttatggattt	tttaaatgaa	960	
ttctatgctc	atcctagget	ccaggattat	tatgttggtga	ttttgtgtcc	tactgaaatg	1020	
gaigtacagg	ttcgaagggt	actgcagatt	ccaatgtggt	cccaacgagt	tatctacctt	1080	
caaggttcag	cccttaaaga	tcaagaccta	ttgagagcaa	agatggatga	cgctgaggcc	1140	
igtittattc	tcagtagccg	tigtgaagtg	gataggacat	catctgatca	ccaacaattt	1200	10
ttgagagcat	gggctgtgaa	agattttgct	ccaaattgct	ctttgtatgt	ccagatatta	1260	
aagccigaaa	ataaattca	catcaaattt	gctgatcatg	ttgtttgtga	agaagagttt	1320	
aaatacgcca	tgttagcttt	aaactgtata	tgcccagcaa	catctacact	tattacacta	1380	
ciggttcata	cctctagagg	gcagtttggc	gtctgcttga	ttggigttag	gagggaggat	1440	
aataaaaaca	ttttgctgaa	tccaggtect	cgatacatta	tgaattctac	agacatatgc	1500	
ttttatatta	atattacca	agaagagaat	tcagcattta	aaaaccaaga	ccagcagaga	1560	
aaaagcaatg	gtccaggtc	gttttatcat	ggaccttcca	gattacctgt	acatagcata	1620	20
atgccagca	igggtactgt	ggctatagac	ttgcaagata	caagctgtag	atcagcaagt	1680	
ggccctacce	gtctcttcc	tacagagggg	agcaaagaaa	taagaagacc	tagcatttct	1740	
ccigtittag	aggttgcaga	tacatcatcg	attcaaacat	gtgatcttct	aagtgaccaa	1800	
tcagaagaig	aaactacacc	agatgaagaa	atgtcttcaa	acttagagta	tgctaaaggt	1860	
taccacctt	attctccata	tataggaagt	tcaccacctt	tttgtcatct	cttctatgaa	1920	
aaagtaccat	tttgcctgct	aagattagac	aagagttgcc	aacataacta	ctatgaggat	1980	
gcaaaaacct	atggattcaa	aaataaacta	attatagttg	cagctgaaac	agctggaaat	2040	30
ggattatata	actttattgt	tctctcagg	gcatattata	gaccaaagaa	agaacttaat	2100	
cccatagtac	tgctattgga	taacccctta	gatgacttac	tcagggtgtg	agtgactttt	2160	
gctgctaata	tgggtggtgt	ggataaagag	agcaccatga	gtgccgagga	agactacatg	2220	
gcagatgcca	aaaccattgt	gaacgtgcag	acactcttca	ggttgttttc	cagtctcagt	2280	
attatcacag	agctaaccca	ccccgccaac	atgagattca	tgcaattcag	agccaaagac	2340	
igtactctc	ttgctcttcc	aaaactggaa	aagaaagaac	gggagagagg	ctctaacctg	2400	
gcctttatgt	ttcgaactgcc	ttttgctgct	gggaggggtgt	ttagcatcag	tatgttggac	2460	40
actctgctgt	atcagtcatt	tgtgaaggat	tatatgattt	ctatcacgag	acttctgttg	2520	

ggactggaca ctacaccagg atctgggttt cttgttcta tgaaaatcac tgcagatgac 2580
 ttatggatca gaacttatgc cagactttat cagaagtigt gttctttctac tggagatgtt 2640
 cccattggaa tctacaggac tgagtctcag aaacttacta catctgagtc tcaaatactt 2700
 atcagtgtag aagagtggga agacaccaa gactccaaag aacaagggca ccaccgcagc 2760
 aaccaccgca actcaacatc cagtgaccag tggaccatc ccttgctgcg gagaaaaagc 2820
 atgcagtggg cccgaagact gagcagaaaa ggcccaaac actctggtaa aacagctgaa 2880
 aaaataacce agcagcgact gaacctctac aggaggctcag aaagacaaga gcttgctgaa 2940
 cttgtgaaaa atagaatgaa acacttgggt ctttctacag tgggatatga tgaatgaa 3000
 gatcatcaa gtacctctc ctacatctg attaacccat ctccagatac cagaatagag 3060
 ctgaatgatg ttgtatactt aattcgacca gateccactgg cctaccttcc aaacagttag 3120
 cccagtcgaa gaaacagcat ctgcaatgtc actggctcaag attctcggga ggaaactcaa 3180
 ctt 3183

10

<210> 13

20

<211> 3346

<212> DNA

<213> Human

<400> 13

ctctggccaca gcgtcttgtt agtctctctc ctgtactccg caatattttc tttctttctc 60
 cctctctctc tccatttgtt gtttgatgtt tcccactctt tgaggaagga tggttgattt 120
 ggagagcgaa gtgccccctc tgcctcccag gtacagggtt cgagatttgc tgctagggga 180
 ccaaggatgg caaacgcagc acagggtaca agttgaattc tataatgaatg aaaatacatt 240
 taaagaaaga ctaaaattat tttcataaa aaaccagaga tcaagctctaa ggatacgcct 300
 gttcaatfff tctctcaaat tactaagctg cttattatac ataateccgag tactactaga 360
 aaacccttca caaggaaatg aatggctctc tatcttttgg gtgaacagaa gtctaccttt 420
 gtggggctta caggtttcag tggcattgat aagtctgttt gaacaatat tacttgggta 480
 tcttagttat aagggaaaca tctgggaaca gattttacga atacccttca tcttggaaat 540
 aattaatgca gttcccttca ttatctcaat attctggcct tcttaagga atctatttgt 600
 cccagcttct ctgaactgtt ggcttgccaa acatgccttg gaaaatatga ttaatgatct 660

30

40

acacagagcc	atcagcgt	cacagtctgc	aatgtttaa	caagtttga	ttttaatc	720	
tacattaacta	tgccttatct	tcacctgcat	ttgtgggac	caacatctgg	aacgaatagg	780	
aaagaagctg	aatctctttg	actccctta	tttctgcatt	gtgacgtttt	ctactgtggg	840	
cttcggggat	gtcactcctg	aaacatggc	ctccaagctt	tttgtagtig	ctatgattig	900	
igtgtctctt	gtggttctac	ccatacagtt	tgaacagctg	gcttatttgi	ggatggagag	960	
acaaaagtca	ggaggaact	atagtcgaca	tagagctcaa	actgaaaagc	atgtcgtcct	1020	
gigtgtcagc	tcactgaaga	ttgatttact	tatggatttt	ttaaataaat	tctatgtcca	1080	10
tcctaggctc	caggattatt	atgtggtgat	tttgtgtcct	actgaaatgg	atgtacaggt	1140	
tcgaagggtg	ctgcagattc	caatgtggc	ccaacaggtt	atctaccctc	aaggttcagc	1200	
ccttaaagat	caagacctat	tgagagcaaa	gatggatgac	gctgaggcct	gttttattct	1260	
cagtagccgt	tggaagtgg	ataggacatc	atctgatcac	caaacaattt	tgagagcatg	1320	
ggctgtgaaa	gattttgctc	caaattgtcc	tttgtatgct	cagatattaa	agcctgaaaa	1380	
taaatttcac	atcaaatttg	ctgatcatgt	tgtttgtgaa	gaagagttaa	aatagccat	1440	
gttagcttta	aactgtatat	gcccagcaac	atctacactt	attacactac	tggttcatac	1500	20
ctctagaggg	cagtttggcg	tctgcttgat	tgggtgttagg	agggaggata	ataaaaacat	1560	
tttgcagaat	ccaggctcctc	gatacattat	gaattctaca	gacatatgct	tttatattaa	1620	
tattacaaa	gaagagaatt	cagcatttaa	aaaccaagac	cagcagagaa	aaagcaatgt	1680	
gtccaggctg	ttttatcatg	gacctccag	attacctgta	catagcataa	ttgccagcat	1740	
gggtactgtg	gctatagact	tgcaagatac	aagctgtaga	tcagcaagtg	gccctaccct	1800	
gtctcttctt	acagagggaa	gcaaagaaat	aagaagacct	agcattgctc	ctgtttttaga	1860	
ggttgcagat	acatcatcga	ttcaaacatg	tgatcttcta	agtgaccaat	cagaagatga	1920	30
aactacacca	gatgaagaaa	tgtcttcaaa	cttagagtat	gctaaagggt	accacacctta	1980	
ttctccatat	ataggaagtt	caccaccttt	ttgtcatctc	cttcatgaaa	aagtaccatt	2040	
ttgtctctta	agattagaca	agagttgcca	acataactac	tatgaggatg	caaaagccta	2100	
iggattcaaa	aataaactaa	ttatagttgc	agctgaacaa	gctggaaatg	gattatataa	2160	
ctttattgtt	ctctcaggg	catattatag	accaaagaaa	gaacttaatc	ccatagtact	2220	
gctattggat	aacccttag	atgacttact	caggtgtgga	gtgacttttg	ctgctaatai	2280	
ggtggttgtg	gataaagaga	gcacatgag	tgccgaggaa	gactacatgg	cagatgccaa	2340	40
aaccattgtg	aacgtgcaga	cactcttcag	gttgttttcc	agcttcagta	ttatcacaga	2400	

gctaactcac	cccgccaaca	tgagattcat	gcaattcaga	gccaaagact	gttactctct	2460	
tgctctttca	aaactggaaa	agaaagaacg	ggagagagge	tctaacttgg	cttttatgtt	2520	
tcgactgcct	tttgcigctg	ggaggggtgt	tagcatcagt	atgttggaca	ctctgctgta	2580	
tcagtcattt	gtgaaggatt	atatgatttc	tatcacgaga	cttcigtitg	gactggacac	2640	
tacaccagga	tcigggtttc	ttgtttctat	gaaaatcact	gcagatgact	tatggatcag	2700	
aaattatgcc	agactttatc	agaagttgtg	ttcttctact	ggagatgttc	ccattggaat	2760	
ctacaggact	gagtcicaga	aacttactac	atctgagtct	caaatactta	tcagtgtaga	2820	10
agagtgggaa	gacaccaaag	actccaaaga	acaagggcac	caccgcagca	accaccgcaa	2880	
ctcaacatcc	agtgaccagt	cggaccatcc	cttgcigcgg	agaaaaagca	tgcagtgggc	2940	
ccgaagactg	agcagaaaag	gccccaaaaca	ctctggtaaa	acagctgaaa	aaataaccca	3000	
gcagcgactg	aacctctaca	ggaggtcaga	aagacaagag	cttgcitgaac	ttgtgaaaaa	3060	
tagaatgaaa	cacttgggtc	tttctacagt	gggatatgat	gaaatgaatg	atcatcaaag	3120	
tacccctccc	tacatcctga	ttaaccatc	tccagatacc	agaatagagc	tgaatgatgt	3180	
tgtatactta	attcgaccag	atccactggc	ctaccttcca	aacagtgagc	ccagtcgaag	3240	20
aaacagcatc	tgcaatgta	ctggtaaga	ttctcgggag	gaaactcaac	tttgataaaa	3300	
ataaaatgag	aaactttttt	cttacaaga	cttgccttga	aaccac		3346	

<210> 14

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 14

ctccctcctc	tcctccattt	gttgtt	26
------------	------------	--------	----

<210> 15

<211> 759

<212> PRT

10

20

30

40

<213> Human

<400> 15

Met Val Asp Leu Glu Ser Glu Val Pro Pro Leu Pro Pro Arg Tyr Arg

5 10 15

Phe Arg Asp Leu Leu Leu Gly Asp Gln Gly Trp Gln Asn Asp Asp Arg

20 25 30

Val Gln Val Glu Phe Tyr Met Asn Glu Asn Thr Phe Lys Glu Arg Leu

35 40 45

Lys Leu Phe Phe Ile Lys Asn Gln Arg Ser Ser Leu Arg Ile Arg Leu

50 55 60

Phe Asn Phe Ser Leu Lys Leu Leu Ser Cys Leu Leu Tyr Ile Ile Arg

65 70 75 80

Val Leu Leu Glu Asn Pro Ser Gln Gly Asn Glu Trp Ser His Ile Phe

85 90 95

Trp Val Asn Arg Ser Leu Pro Leu Trp Gly Leu Gln Val Ser Val Ala

100 105 110

Leu Ile Ser Leu Phe Glu Thr Ile Leu Leu Gly Tyr Leu Ser Tyr Lys

115 120 125

Gly Asn Ile Trp Glu Gln Ile Leu Arg Ile Pro Phe Ile Leu Glu Ile

130 135 140

Ile Asn Ala Val Pro Phe Ile Ile Ser Ile Phe Trp Pro Ser Leu Arg

145 150 155 160

Asn Leu Phe Val Pro Val Phe Leu Asn Cys Trp Leu Ala Lys His Ala

165 170 175

Leu Glu Asn Met Ile Asn Asp Leu His Arg Ala Ile Gln Arg Thr Gln

180 185 190

Ser Ala Met Phe Asn Gln Val Leu Ile Leu Ile Ser Thr Leu Leu Cys

195 200 205

Leu Ile Phe Thr Cys Ile Cys Gly Ile Gln His Leu Glu Arg Ile Gly

10

20

30

40

210	215	220	
Lys Lys Leu Asn Leu Phe Asp Ser Leu Tyr Phe Cys Ile Val Thr Phe			
225	230	235	240
Ser Thr Val Gly Phe Gly Asp Val Thr Pro Glu Thr Trp Ser Ser Lys			
	245	250	255
Leu Phe Val Val Ala Met Ile Cys Val Ala Leu Val Val Leu Pro Ile			
	260	265	270
Gln Phe Glu Gln Leu Ala Tyr Leu Trp Met Glu Arg Gln Lys Ser Gly			10
	275	280	285
Gly Asn Tyr Ser Arg His Arg Ala Gln Thr Glu Lys His Val Val Leu			
	290	295	300
Cys Val Ser Ser Leu Lys Ile Asp Leu Leu Met Asp Phe Leu Asn Glu			
305	310	315	320
Phe Tyr Ala His Pro Arg Leu Gln Asp Tyr Tyr Val Val Ile Leu Cys			20
	325	330	335
Pro Thr Glu Met Asp Val Gln Val Arg Arg Val Leu Gln Ile Pro Met			
	340	345	350
Trp Ser Gln Arg Val Ile Tyr Leu Gln Gly Ser Ala Leu Lys Asp Gln			
	355	360	365
Asp Leu Leu Arg Ala Lys Met Asp Asp Ala Glu Ala Cys Phe Ile Leu			
	370	375	380
Ser Ser Arg Cys Glu Val Asp Arg Thr Ser Ser Asp His Gln Thr Ile			30
385	390	395	400
Leu Arg Ala Trp Ala Val Lys Asp Phe Ala Pro Asn Cys Pro Leu Tyr			
	405	410	415
Val Gln Ile Leu Lys Pro Glu Asn Lys Phe His Ile Lys Phe Ala Asp			
	420	425	430
His Val Val Cys Glu Glu Glu Phe Lys Tyr Ala Met Leu Ala Leu Asn			40
	435	440	445

Cys Ile Cys Pro Ala Thr Ser Thr Leu Ile Thr Leu Leu Val His Thr	
450	455 460
Ser Arg Gly Gln Glu Gly Gln Gln Ser Pro Glu Gln Trp Gln Lys Met	
465	470 475 480
Tyr Gly Arg Cys Ser Gly Asn Glu Val Tyr His Ile Val Leu Glu Glu	
	485 490 495
Ser Thr Phe Phe Ala Glu Tyr Glu Gly Lys Ser Phe Thr Tyr Ala Ser	10
	500 505 510
Phe His Ala His Lys Lys Phe Gly Val Cys Leu Ile Gly Val Arg Arg	
	515 520 525
Glu Asp Asn Lys Asn Ile Leu Leu Asn Pro Gly Pro Arg Tyr Ile Met	
	530 535 540
Asn Ser Thr Asp Ile Cys Phe Tyr Ile Asn Ile Thr Lys Glu Glu Asn	
545	550 555 560
Ser Ala Phe Lys Asn Gln Asp Gln Gln Arg Lys Ser Asn Val Ser Arg	
	565 570 575
Ser Phe Tyr His Gly Pro Ser Arg Leu Pro Val His Ser Ile Ile Ala	
	580 585 590
Ser Met Gly Thr Val Ala Ile Asp Leu Gln Asp Thr Ser Cys Arg Ser	
	595 600 605
Ala Ser Gly Pro Thr Leu Ser Leu Pro Thr Glu Gly Ser Lys Glu Ile	30
	610 615 620
Arg Arg Pro Ser Ile Ala Pro Val Leu Glu Val Ala Asp Thr Ser Ser	
625	630 635 640
Ile Gln Thr Cys Asp Leu Leu Ser Asp Gln Ser Glu Asp Glu Thr Thr	
	645 650 655
Pro Asp Glu Glu Met Ser Ser Asn Leu Glu Tyr Ala Lys Gly Tyr Pro	
	660 665 670
Pro Tyr Ser Pro Tyr Ile Gly Ser Ser Pro Thr Phe Cys His Leu Leu	40

	675		680		685										
His	Glu	Lys	Val	Pro	Phe	Cys	Cys	Leu	Arg	Leu	Asp	Lys	Ser	Cys	Gln
	690		695		700										
His	Asn	Tyr	Tyr	Glu	Asp	Ala	Lys	Ala	Tyr	Gly	Phe	Lys	Asn	Lys	Leu
705				710					715					720	
Ile	Ile	Val	Ala	Ala	Glu	Thr	Ala	Gly	Asn	Gly	Leu	Tyr	Asn	Phe	Ile
			725						730					735	
Val	Pro	Leu	Arg	Ala	Tyr	Tyr	Arg	Pro	Lys	Lys	Glu	Leu	Asn	Pro	Ile
			740						745					750	
Val	Leu	Leu	Leu	Asp	Asn	Pro									
	755														

10

<210> 16

<211> 2277

<212> DNA

<213> Human

<400> 16

atggttgatt	ggagagcga	agtgccccct	ctgcctccca	ggtacagggt	tcgagatttg	60
ctgctagggg	accaaggatg	gcaaaacgac	gacagggtac	aagtigaatt	ctatatgaat	120
gaaaatacat	ttaaagaaag	actaaaatta	ttttcataa	aaaaccagag	atcaagtcta	180
aggatacgcc	gttcaattt	tctctcaaa	ttactaagct	gcttattata	cataatccga	240
gtactactag	aaaacccttc	acaaggaaat	gaatggcttc	atatcttttg	ggtgaacaga	300
agtctacctt	tgtggggcct	acaggtttca	gtggcattga	taagtctgtt	tgaacaata	360
ttacttgggt	atcttagtta	taagggaac	atctgggaac	agattttacg	aatacccttc	420
atcttggaaa	taattaatgc	agttcccttc	attatctcaa	tattctggcc	ttccttaagg	480
aatctatttg	tcccagtctt	tctgaactgt	tggcttgcca	aacatgcctt	ggaaaatag	540
attaatgac	tacacagagc	cattcagcgt	acacagtctg	caatgtttaa	tcaagttttg	600
atthtaatat	ctacattact	atgccttacc	ttcacctgca	tttgtgggat	ccaacatctg	660
gaacgaatag	gaaagaagct	gaatctcttt	gactcccttt	atthctgcat	tgtgacgttt	720

30

40

tctactgigg gcttcgggga tgcactcct gaaacatggt cctccaagct tttttagt 780
 gctatgatti gtgttgcet tgtggttcta cccatacagt ttgaacagct ggcttatttg 840
 tggatggaga gacaaaagtc aggaggaaac tatagtcgac atagagctca aactgaaaag 900
 catgtcgtcc tgtgtgtcag ctcactgaag attgatttac ttatggattt tttaaatgaa 960
 ttctatgctc atcctaggct ccaggattat tatgtggatga ttttgtgtcc tactgaaatg 1020
 gatgtacagg ttcgaagggt actgcagatt ccaatgtggt cccaacgagt tatctacctt 1080
 caaggttcag cccitaaaga tcaagacctt ttgagagcaa agatggatga cgctgaggcc 1140
 tgtttatc tcagtagccg ttgtgaagt gataggacat catctgatca ccaaacaatt 1200
 ttgagagcat gggctgtgaa agattttgct ccaaattgct ctttgtatgt ccagatatta 1260
 aagcctgaaa ataaattca catcaaattt gctgatcatg ttgtttgtga agaagagttt 1320
 aatacgcc igttagctt aaactgtata tgcccagcaa catctacact tattacacta 1380
 ctggttcata cctctagagg gcaagaaggc cagcaatcgc cagaacaatg gcagaagatg 1440
 tacggtagat gctccgggaa tgaagtctac cacattgttt tggaagaaag tacatTTTT 1500
 gctgaatatg aaggaaagag ttttacatat gcctctttcc atgcacacaa aaagtttggc 1560
 gtcigtiga ttgggttag gaggaggat aataaaaaca ttttgcigaa tccaggctct 1620
 cgatacatta tgaattctac agacatatgc ttttatatta atattaccaa agaagagaat 1680
 tcagcattta aaaaccaaga ccagcagaga aaaagcaatg tgtccaggtc gttttatcat 1740
 ggacctcca gattacctgt acatagcata attgccagca tgggtactgt ggctatagac 1800
 ttgcaagata caagcigtg atcagcaagt ggccctacc tgtctcttcc tacagagggg 1860
 agcaaagaaa taagaagacc tagcattgct cctgttttag aggttgcaga tacatcatcg 1920
 attcaaacat gtgatcttct aagtaccaa tcagaagatg aaactacacc agatgaagaa 1980
 atgtctcaa acttagagta tgctaaaggt taccacctt attctccata tataggaagt 2040
 tcaccactt ttgtcatct ccttcatgaa aaagtacat ttigtctgtt aagattagac 2100
 aagagttgcc aacataacta ctatgaggat gcaaaagcct atggattcaa aaataaacta 2160
 attatagttg cagctgaaac agctggaaat ggattatata acitiatgt tctctcagg 2220
 gcatattata gaccaaagaa agaacttaat cccatagtac tgctattgga taacca 2277

10

20

30

(210) 17

(211) 2576

40

<212> DNA

<213> Human

<400> 17

ctccctcctc	tectccattt	gttgttgat	gttcccact	ctttgaggaa	ggatggttga	60	
tttggagagc	gaagtgcccc	cctgcctcc	caggtacagg	tttcgagatt	tgctgctagg	120	
ggaccaagga	tggcaaacg	acgacaggg	acaagtigaa	ttctatatga	atgaaaatac	180	
atttaaagaa	agactaaaat	tattttcat	aaaaaccag	agatcaagtc	taaggatacg	240	10
cctgttcaat	ttttctctca	aattactaag	ctgcttatta	tacataatcc	gagtactact	300	
agaaaacctt	tcacaaggaa	atgaatggc	tcatacttt	tgggigaaca	gaagcttacc	360	
tttgtggggc	ttacaggttt	cagtggcatt	gataagctcg	tttgaacaa	tattacttgg	420	
ttatcttagt	tataaggga	acatctggga	acagatttta	cgaatacctt	tcacttggga	480	
aataattaat	gcagttccct	tcattatctc	aatattctgg	ccttccctaa	ggaatctatt	540	
igccccagtc	ttctgaact	gttggcttgc	caaacaigcc	tiggaaaata	tgattaatga	600	
tctacacaga	gccattcagc	gtacacagtc	tgcaatgttt	aatcaagttt	tgattttaat	660	20
atctacatta	ctatgctta	tcttaccctg	catttgtggg	atccaacatc	tggaacgaat	720	
aggaaaagaag	ctgaatctct	ttagctccct	ttatttctgc	attgtgacgt	tttctactgt	780	
gggcttcggg	gatgtcactc	ctgaacaatg	gtctccaag	ctttttgtag	tgtctatgat	840	
ttgtgttgc	cttgtggttc	taccataca	gttgaacag	ctggcttatt	tgtggatgga	900	
gagacaaaag	tcaggaggaa	actatagtcg	acatagagct	caaactgaaa	agcatgtcgt	960	
cctgtgtgtc	agctcactga	agattgattt	acttatggat	tttttaaatg	aattctatgc	1020	
tcactctagg	ctccaggatt	attatgtggt	gattttgtgt	cctactgaaa	tggatgtaca	1080	30
ggttcgaagg	gtactgcaga	ttccaatgtg	gtcccaacga	gttatctacc	ttcaaggttc	1140	
agcccttaaa	gatcaagacc	tattgagagc	aaagatggat	gacgctgagg	cctgttttat	1200	
tctcagttagc	cgttgtgaag	tggataggac	atcatctgat	caccaacaa	ttttgagagc	1260	
atgggctgtg	aaagattttg	ctccaaatg	tcctttgtat	gtccagatat	taaagcctga	1320	
aaataaattt	cacatcaaat	ttgctgatca	tgttgtttgt	gaagaagagt	ttaaatacgc	1380	
catgttagct	ttaaactgta	tatgcccagc	aacatctaca	cttattacac	tactggttca	1440	
tacctctaga	gggcaagaag	gccagcaatc	gccagaacaa	tggcagaaga	tgtacggtag	1500	40
atgctccggg	aatgaagtct	accacattgt	tttggagaag	agtacatttt	ttgctgaata	1560	

tgaaggaaa agttttacat atgcctcttt ccatgcacac aaaaagtttg gcgtctgctt 1620
 gattggigtgtt aggagggagg ataataaaaa cattttgctg aatccaggtc ctcgatacat 1680
 tatgaattcti acagacatat gcttttataat taatattacc aaagaagaga attcagcatt 1740
 taaaaaccaa gaccagcaga gaaaaagcaa tgtgtccagg tcgtttttatc atggaccttc 1800
 cagattaccti gtacatagca taattgccag catgggttact gtggctatag acttgcaaga 1860
 tacaagctgti agatcagcaa gtggccctac cctgtctctt cctacagagg gaagcaaaga 1920
 aataagaaga cctagcattg ctctgttttt agaggttgca gatacatcat cgattcaaac 1980
 atgtgatctt ctaagtgacc aatcagaaga tgaactaca ccagatgaag aaatgtcttc 2040
 aaacttagag tatgctaaag gttaccacc ttattctcca tatataggaa gttcaccacc 2100
 tttttgtcat ctcttctatg aaaaagtacc attttgcctg ttaagattag acaagagtgt 2160
 ccaacataac tactatgagg atgcaaaagc ctatggattc aaaaataaac taattatagt 2220
 tgcagctgaa acagctggaa atggattata taactttatt gttctctctca gggcatatta 2280
 tagaccaaag aaagaactta atcccatagt actgctattg gataacccat gaaatgaatg 2340
 atcatcaaag taccctctcc tacatctga ttaaccctc tccagatacc agaataagagc 2400
 tgaatgaigt tgtatactta attcgaccag atccactggc ctaccttcca aacagtgagc 2460
 ccagtcgaag aaacagctc tgcaatgtca ctggctcaaga ttctcgggag gaaactcaac 2520
 ttigataaaa ataaaatgag aaactttttt cctacaaaga ccttgccttga aaccac 2576

10

20

<210> 18

<211> 1135

<212> PRT

<213> Mouse

<400> 18

Met Val Asp Leu Glu Ser Glu Val Pro Pro Leu Pro Pro Arg Tyr Arg

5

10

15

Phe Arg Asp Leu Leu Leu Gly Asp Gln Gly Trp Gln Asn Asp Asp Arg

20

25

30

Val Gln Val Glu Phe Tyr Met Asn Glu Asn Thr Phe Lys Glu Arg Leu

35

40

45

30

40

Phe His Ala His Lys Lys Phe Gly Val Cys Leu Val Gly Val Arg Arg	
515	520
Glu Asp Asn Lys Asn Ile Leu Leu Asn Pro Gly Pro Arg Tyr Ile Met	
530	535
Asn Ala Ser Asp Ile Cys Phe Tyr Ile Asn Ile Thr Lys Glu Glu Asn	
545	550
Ser Ala Phe Lys Asn Gln Asp Gln Gln Arg Lys Ser Asn Val Ser Arg	10
565	570
Ser Phe Tyr His Gly Pro Ser Arg Leu Pro Val His Ser Ile Ile Ala	
580	585
Ser Met Gly Thr Val Ala Ile Asp Leu Gln Asp Thr Ser Cys Arg Ala	
595	600
Thr Ser Gly Pro Thr Leu Ala Leu Pro Ser Glu Gly Gly Lys Glu Leu	
610	615
Arg Arg Pro Ser Ile Ala Pro Val Leu Glu Val Ala Asp Thr Ser Ser	
625	630
Ile Gln Thr Cys Asp Leu Leu Ser Asp Gln Ser Glu Asp Glu Thr Thr	
645	650
Pro Asp Glu Glu Thr Ser Ser Asn Leu Glu Tyr Ala Lys Gly Tyr Pro	
660	665
Pro Tyr Ser Pro Tyr Ile Gly Ser Ser Pro Thr Phe Cys His Leu Leu	30
675	680
Gln Glu Lys Val Pro Phe Cys Cys Leu Arg Leu Asp Lys Ser Cys Gln	
690	695
His Asn Tyr Tyr Glu Asp Ala Lys Ala Tyr Gly Phe Lys Asn Lys Leu	
705	710
Ile Ile Val Ala Ala Glu Thr Ala Gly Asn Gly Leu Tyr Asn Phe Ile	
725	730
Val Pro Leu Arg Ala Tyr Tyr Arg Pro Lys Lys Glu Leu Asn Pro Ile	40

Val Glu Glu Trp Glu Asp Thr Lys Asp Val Lys Asp Pro Gly His His
 980 985 990
 Arg Ser Leu His Arg Asn Ser Thr Ser Ser Asp Gln Ser Asp His Pro
 995 1000 1005
 Leu Leu Arg Arg Lys Ser Met Gln Trp Ala Arg Arg Leu Ser Arg Lys
 1010 1015 1020
 Gly Pro Lys His Ser Gly Lys Thr Ala Glu Lys Ile Thr Gln Gln Arg
 1025 1030 1035 1040
 Leu Asn Leu Tyr Arg Arg Ser Glu Arg Gln Glu Leu Ala Glu Leu Val
 1045 1050 1055
 Lys Asn Arg Met Lys His Leu Gly Leu Ser Thr Val Gly Tyr Asp Glu
 1060 1065 1070
 Met Asn Asp His Gln Ser Thr Leu Ser Tyr Ile Leu Ile Asn Pro Ser
 1075 1080 1085
 Pro Asp Thr Arg Leu Glu Leu Asn Asp Val Val Tyr Leu Ile Arg Pro
 1090 1095 1100
 Asp Pro Leu Ser Tyr Leu Pro Asn Ser Glu Pro Ser Arg Lys Asn Ser
 1105 1110 1115 1120
 Ile Cys Asn Ala Ala Val Gln Asp Ser Arg Glu Glu Thr Gln Leu
 1125 1130 1135

10

20

30

40

<210> 19

<211> 3405

<212> DNA

<213> Mouse

<400> 19

atggttgatt tggagagcga agtgccccct ctgcctccca ggtacagatt ccgggatttg 60
 ctgctagggg accaaggctg gcaaaatgat gacaggtcc aagtigaatt ctacatgaac 120
 gaaaacacat ttaaagagag attaaaactg tttttcataa aaaaccagcg atcaagtcta 180

agaatccgct	igtcaactt	tccctgaaa	tgttaagct	gcttattata	tattatccgt	240	
gtgttgcttg	agaaaccgtc	acagggaaat	gaatggcttc	acatattttg	ggttaaccga	300	
agcttacctt	taiggggttt	acaggtctca	gtggcattga	taagctatt	igaacaata	360	
ctccttgggt	atctcagtt	taagggaaat	atctgggagc	agatitttacg	aattccattc	420	
atcttggaaa	taatcaatgc	agtcccttc	atcatctcaa	tattctggcc	caccttaaga	480	
aatctatttg	tccagtttt	tctaaattgt	tggcttgcca	aacatgccct	ggaaaatag	540	
attaatgac	tccatagagc	cattcagcgt	acacagctcg	caatgtttaa	tcaagttttg	600	10
atthtgatai	ctactttact	atgccttacc	ttcacttga	tttgtgggat	tcagcatcta	660	
gaacgaattg	gcaagaagct	caatctctt	gactccctt	atthctgcat	tgtgacattt	720	
tctactgtgg	gctttgggga	tgctactcct	gaaacatggt	cttccaagct	ctttgtcgtt	780	
gctaigatci	gcgttgcct	tgtagtactc	cctatacagt	tigaacagtt	ggcctatttg	840	
tggatggaga	gacaaaagtc	aggaggaac	tacagctgac	acagagctca	gacagagaag	900	
caigtgtcc	tgigtgtcag	ctccttgaag	attgacttac	ttatggattt	tctaaatgag	960	
ttctatgcgc	atccaagact	acaggattat	tacgtggatga	ttttgtgtcc	cacggagatg	1020	20
gaigtgcaag	ttcggagagt	actacagatt	ccaatgtggt	cccagagagt	gatctacctt	1080	
caaggctctg	cccttaaaga	ccaggatctc	ctgagagcaa	agatggacaa	tgctgaggcc	1140	
igtthcattt	tgagtagccg	ctgcaagtg	gatagaacct	catctgatca	ccaacaatc	1200	
ttgagagcat	gggctgtgaa	agatthtgc	ccaaattgtc	ctctgtatgt	tcagatatta	1260	
aaaccagaaa	acaaattcca	catcaaattt	gcagatcatg	ttgtttgtga	agaagagttt	1320	
aagtacgcca	tgthagcttt	aaactgtata	tgcccagcaa	catctacact	cattacacta	1380	
ctggthcata	ctctagagg	gcaagaagg	cagcagtcac	ctgaacagtg	gcagaagact	1440	30
tacgggaggt	gctcaggaaa	cgaagcttat	cacatcgttt	tggaaagaaag	tacatthttt	1500	
gctgaatatg	aaggaagag	thttacctat	gctthctttc	atgccacaa	aaagthtgg	1560	
gtctgcttgg	ttgggtgttag	gagggaggat	aataaaaaca	thttgctgaa	tccaggtcct	1620	
cgatacatta	tgaatgcttc	agacatatgt	thttatatta	atathacca	agaagaaaat	1680	
tcagcattta	agaatcaaga	ccaacagaga	aaaagtaatg	tgtcaaggtc	atthttatcat	1740	
ggccttcca	gattgcctgt	ccacagcatc	atthccagca	tgggtactgt	ggctatagac	1800	
ttgcaagaca	caagctgcag	agcaacaagt	ggccccacc	tggctcttcc	ttcagagggga	1860	40
ggcaaagaat	taagaagacc	tagcattgct	cctgthtttag	aggtggcaga	tacatcatca	1920	

attcaaacat gcgatctcct aagtgaccag tccgaagatg aaactacacc agatgaagaa 1980
 acatcttcaa atttagagta tgccaaagge taccacett attceccata cataggaagt 2040
 tcacctacti ttigtacct acttcaagaa aaagtgccat ttigtctgctt aagattagac 2100
 aagagttgcc agcataacta ctatgaggac gcaaaagcct atggattcaa aaataaacta 2160
 attatagttg cagctgaaac agctggaaat ggactatata attttattgt acctctcagg 2220
 gcatattata gaccaaagaa agaattaat cccatagttc tgctattgga taaccgcca 2280
 gataigcatt ttciggatgc aatctgttgg ttccaatgg ttactacat ggtgggctct 2340
 attgacaacc tagatgattt gctcagggtg ggagtacct ttgctgcca catggtgggtg 2400
 gggacaaaag aaagcacat gagtgcagag gaagactaca tggcagatgc caagacgatt 2460
 gtgaatgtgc agactctgtt caggttgttt tcaagtctca gtatcatcac tgagcttacg 2520
 catccagcaa atatgagatt catgcaattc agagccaagg atigtactc tctcgcgctt 2580
 tcaaaactgg aaaagaaaga aagagaacga ggttctaact tggcctttat gtttcgactg 2640
 cctttgctg cgggaagagt gttcagcatc agtatgttag acacccttct ttatcagtca 2700
 ttgtgaaaag attatatgat ttctatcacc agacttcttt tgggactgga caccatacca 2760
 ggatcggggt tctttgttc tatgaaaac actgaagatg acttgtggat cagaacgtat 2820
 gccagactct atcagaagtt gtgttctct actggagatg ttcccatcgg gatctacaga 2880
 acagaatctc agaaactaac gacatctgag tctcaaatat ccattagtgt ggaagagtgg 2940
 gaagacacca aagatgtcaa agaccaggg caccaccgca gccttcaccg caactcaacg 3000
 tctagtgacc agtcggacca tcccttgctg cggaggaaga gcatgcagtg ggcccgaagg 3060
 ctgagcagaa aaggccgaa gcactctggt aaaactgcag aaaaaataac tcaacagcga 3120
 ctgaacctct accggagatc cgaaagacag gagcttgctg aactigtgaa aaacagaatg 3180
 aaacacctgg gcctctcgac ggtgggctac gatgaaatga atgatcatca gagcaccctg 3240
 tctatcatcc tgattaatcc gtctccagac accaggcttg agctgaatga tgttgtatat 3300
 ttgatccgac cagatccact gtctacctt ccaaacagtg aaccagtag gaaaaacagc 3360
 atctgcaatg ccgctgttca agattctcgg gaggaactc aactc 3405

10

20

30

<210> 20

<211> 26

<212> DNA

40

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 20

ccctcccat cccatccatcc ctgtt 26

<210> 21

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 21

gatccctgca aggactacaa tgtctc 26 20

<210> 22

<211> 3498

<212> DNA

<213> Mouse

<400> 22

tcctcatccc tccatccctt gttggatggt gccactcct taaggaagga tggttgatt 60 30
 ggagagcga gtcceccctc tgcctcccag gtacagattc cgggatttgc tgctagggga 120
 ccaaggctgg caaaatgatg acaggtcca agttgaattc tacaigaacg aaaacacatt 180
 taaagagaga ttaaaactgt tttcataaa aaaccagcga tcaagtctaa gaatccgctt 240
 gtccaacttt tccctgaaat tgtaagctg cttattatat attatccgtg tgttgcttga 300
 gaaaccgtca cagggaatg aatggctcga catattttgg gttaccgaa gtctaccttt 360
 atgggttta caggctcag tggcattgat aagtctattt gaaacaatac tcttgggta 420
 tctcagttat aagggaata tctgggagca gattttacga attcattca tcttggaaat 480 40
 aatcaatgca gtcccctca tcatcctaat attctggccc accttaagaa atctatttgt 540

iccagttttt	ctaaattggt	ggcttgccaa	acatgccttg	gaaaatatga	ttaatgatct	600	
ccatagagcc	attcagcgta	cacagctctgc	aatgtttaat	caagttttga	ttttgatatac	660	
facittacta	tgccittatct	tcacttgcatt	ttgtgggatt	cagcatctag	aacgaattgg	720	
caagaagctc	aatctctttg	actcccttta	ttcttgcatt	gtgacatttt	ctactgtggg	780	
ctttggggat	gtcactcctg	aaacatggtc	ctccaagctc	tttgccttg	ctatgatctg	840	
cgttgccctt	gtagtactcc	ctatacagtt	tgaacagttg	gcctatttgt	ggatggagag	900	
acaaaagica	ggaggaaact	acagtcgaca	cagagctcag	acagagaagc	atgttgtcct	960	10
gtgtgtcagc	tccttgaaga	ttgacttact	tatggatttt	ctaaatgagt	tctatgcgca	1020	
iccaagacta	caggattatt	acgtggtgat	tttgtgtccc	acggagatgg	atgtgcaagt	1080	
tcggagagta	ctacagattc	caatgtggtc	ccagagagtg	atctaccttc	aaggctctgc	1140	
ccttaaagac	caggatctcc	tgagagcaaa	gatggacaat	gctgaggcct	gtttcatttt	1200	
gagtagccgc	tgcaagtggt	atagaacctc	atctgatcac	caaacaatct	tgagagcatg	1260	
ggcigtgaaa	gattttgccc	caaattgtcc	tctgtatgtt	cagatattaa	aaccagaaaa	1320	
caaattccac	atcaaatttg	cagatcatgt	tgtttgtgaa	gaagagttaa	agtacgccat	1380	20
glttagcttta	aactgtatat	gccagcaac	atctacactc	attacactac	tggttcatac	1440	
ctctagaggg	caagaagggc	agcagtcacc	tgaacagttg	cagaagactt	acgggaggtg	1500	
ctcaggaaac	gaagctctac	acatcgtttt	ggaagaaagt	acatittttg	ctgaatatga	1560	
agggaaagagt	tttacctatg	cctcttttca	tgcccacaaa	aagtttgggtg	tctgcttgggt	1620	
tggtgttagg	agggaggata	ataaaaacat	tttgcctgaat	ccaggctctc	gatacattat	1680	
gaatgcttca	gacatatgtt	tttatattaa	tattaccaaa	gaagaaaatt	cagcattttaa	1740	
gaatcaagac	caacagagaa	aaagtaatgt	gtcaaggcca	ttttatcatg	ggccttcag	1800	30
attgcctgtc	cacagcatca	ttgccagcat	gggtactgtg	gctatagact	tgcaagacac	1860	
aagctgcaga	gcaacaagtg	gccccacct	ggctcttctt	tcagagggag	gcaaagaatt	1920	
aagaagacct	agcattgctc	ctgtttttaga	gggtggcagat	acatcatcaa	ttcaaacatg	1980	
cgatctccta	agtgaccagt	ccgaagatga	aactacacca	gatgaagaaa	catcttcaaa	2040	
tttagagtat	gcccaggctt	accacctta	ttccccatac	ataggaagtt	cacctacttt	2100	
ttgtcaccta	cttcaagaaa	aagtgcatt	ttgtctgtta	agattagaca	agagttgcca	2160	
gcataactac	tatgaggacg	caaaagccta	tggattcaaa	aataaactaa	ttatagttgc	2220	40
agctgaaaca	gctggaaatg	gactatataa	ttttattgta	cctctcaggg	catattatag	2280	

accaaagaaa gaattaaatc ccatagtctt gctattggat aaccgccag atatgcattt	2340	
tctggatgca atcgttgggt ttccaatggt ttactacatg gtgggctcta ttgacaacct	2400	
agatgatttg ctgagggtg gagtgacctt tgctgccaac atggigtggtg tggacaaaga	2460	
aagcaccatg agtgcagagg aagactacat ggcagatgcc aagacgattg tgaatgtgca	2520	
gactctgttc aggttgtttt caagtctcag tatcatcact gagcttacgc atccagcaaa	2580	
tatgagattc atgcaattca gagccaagga ttgttactct ctgcgccttt caaaactgga	2640	
aaagaaagaa agagaacgag gttctaactt ggcccttatg tticgactgc cttttgctgc	2700	10
gggaagagtg ttcagcatca gtatgttaga cacccttctt tctcagtcct ttgtgaaaga	2760	
ttataatgatt tctatcacca gacttctttt gggactggac accataccag gatcgggggtt	2820	
tctttgttct atgaaaatca ctgaagatga cttgtggatc agaacgtatg ccagactcta	2880	
tcagaagttg tgttcttcta ctggagatgt tcccatcggg atctacagaa cagaatctca	2940	
gaaactaacg acatctgagt ctcaaatatc cattagtgtg gaagagtggg aagacaccaa	3000	
agaigtcaaa gaccagggc accaccgcag ccttcaccgc aactcaactg ctagtacca	3060	
gtcggaccat cctttgctgc ggaggaagag catgcagtgg gcccgaggc tgagcagaaa	3120	20
agggccgaag cactctggta aaactgcaga aaaataact caacagcgac tgaacctcta	3180	
ccggagatcc gaaagacagg agcttgctga acttgtgaaa aacagaatga aacacctggg	3240	
ctctcgcag gtgggctacg atgaaatgaa tgatcatcag agcacctgt cctacatctt	3300	
gattaatccg tctccagaca ccaggcttga gctgaaatgat gttgtatatt tgatccgacc	3360	
agatccactg tcttacctt caaacagtga acccagtagg aaaaacagca tctgcaatgc	3420	
cgctgttcaa gattctcggg aggaaactca actctgatga aaagaaaata agagacattg	3480	
tagtcttgc agggatca	3498	30

<210> 23

<211> 1142

<212> PRT

<213> Mouse

<400> 23

Met Val Asp Leu Glu Ser Glu Val Pro Pro Leu Pro Pro Arg Tyr Arg

5

10

15

40

Phe	Arg	Asp	Leu	Leu	Leu	Gly	Asp	Gln	Gly	Trp	Gln	Asn	Asp	Asp	Arg	
		20						25					30			
Val	Gln	Val	Glu	Phe	Tyr	Met	Asn	Glu	Asn	Thr	Phe	Lys	Glu	Arg	Leu	
		35					40					45				
Lys	Leu	Phe	Phe	Ile	Lys	Asn	Gln	Arg	Ser	Ser	Leu	Arg	Ile	Arg	Leu	
		50				55					60					
Phe	Asn	Phe	Ser	Leu	Lys	Leu	Leu	Ser	Cys	Leu	Leu	Tyr	Ile	Ile	Arg	10
	65				70				75						80	
Val	Leu	Leu	Glu	Lys	Pro	Ser	Gln	Gly	Asn	Glu	Trp	Ser	His	Ile	Phe	
				85					90					95		
Trp	Val	Asn	Arg	Ser	Leu	Pro	Leu	Trp	Gly	Leu	Gln	Val	Ser	Val	Ala	
				100					105					110		
Leu	Ile	Ser	Leu	Phe	Glu	Thr	Ile	Leu	Leu	Gly	Tyr	Leu	Ser	Tyr	Lys	
				115					120					125		20
Gly	Asn	Ile	Trp	Glu	Gln	Ile	Leu	Arg	Ile	Pro	Phe	Ile	Leu	Glu	Ile	
				130					135					140		
Ile	Asn	Ala	Val	Pro	Phe	Ile	Ile	Ser	Ile	Phe	Trp	Pro	Thr	Leu	Arg	
	145				150						155				160	
Asn	Leu	Phe	Val	Pro	Val	Phe	Leu	Asn	Cys	Trp	Leu	Ala	Lys	His	Ala	
				165					170					175		
Leu	Glu	Asn	Met	Ile	Asn	Asp	Leu	His	Arg	Ala	Ile	Gln	Arg	Thr	Gln	30
				180					185					190		
Ser	Ala	Met	Phe	Asn	Gln	Val	Leu	Ile	Leu	Ile	Ser	Thr	Leu	Leu	Cys	
				195					200					205		
Leu	Ile	Phe	Thr	Cys	Ile	Cys	Gly	Ile	Gln	His	Leu	Glu	Arg	Ile	Gly	
				210					215					220		
Lys	Lys	Leu	Asn	Leu	Phe	Asp	Ser	Leu	Tyr	Phe	Cys	Ile	Val	Thr	Phe	
				225					230					235	240	40
Ser	Thr	Val	Gly	Phe	Gly	Asp	Val	Thr	Pro	Glu	Thr	Trp	Ser	Ser	Lys	

	245	250	255	
Leu Phe Val Val	Ala Met Ile Cys	Val Ala Leu Val Val	Leu Pro Ile	
	260	265	270	
Gln Phe Glu Gln	Leu Ala Tyr Leu Trp Met	Glu Arg Gln Lys Ser Gly		
	275	280	285	
Gly Asn Tyr Ser	Arg His Arg Ala Gln Thr	Glu Lys His Val Val Leu		
	290	295	300	10
Cys Val Ser Ser	Leu Lys Ile Asp Leu Leu Met Asp Phe Leu Asn Glu			
305	310	315	320	
Phe Tyr Ala His	Pro Arg Leu Gln Asp Tyr Tyr Val Val Ile Leu Cys			
	325	330	335	
Pro Thr Glu Met	Asp Val Gln Val Arg Arg Val Leu Gln Ile Pro Met			
	340	345	350	
Trp Ser Gln Arg	Val Ile Tyr Leu Gln Gly Ser Ala Leu Lys Asp Gln			20
	355	360	365	
Asp Leu Leu Arg	Ala Lys Met Asp Asn Ala Glu Ala Cys Phe Ile Leu			
	370	375	380	
Ser Ser Arg Cys	Glu Val Asp Arg Thr Ser Ser Asp His Gln Thr Ile			
385	390	395	400	
Leu Arg Ala Trp	Ala Val Lys Asp Phe Ala Pro Asn Cys Pro Leu Tyr			
	405	410	415	30
Val Gln Ile Leu	Lys Pro Glu Asn Lys Phe His Ile Lys Phe Ala Asp			
	420	425	430	
His Val Val Cys	Glu Glu Glu Phe Lys Tyr Ala Met Leu Ala Leu Asn			
	435	440	445	
Cys Ile Cys Pro	Ala Thr Ser Thr Leu Ile Thr Leu Leu Val His Thr			
	450	455	460	
Ser Arg Gly Gln	Glu Gly Gln Gln Ser Pro Glu Gln Trp Gln Lys Thr			40
465	470	475	480	

Tyr Gly Arg Cys Ser Gly Asn Glu Val Tyr His Ile Val Leu Glu Glu	
485	490
Ser Thr Phe Phe Ala Glu Tyr Glu Gly Lys Ser Phe Thr Tyr Ala Ser	
500	505
Phe His Ala His Lys Lys Phe Gly Val Cys Leu Val Gly Val Arg Arg	
515	520
Glu Asp Asn Lys Asn Ile Leu Leu Asn Pro Gly Pro Arg Tyr Ile Met	10
530	535
Asn Ala Ser Asp Ile Cys Phe Tyr Ile Asn Ile Thr Lys Glu Glu Asn	
545	550
Ser Ala Phe Lys Asn Gln Asp Gln Gln Arg Lys Ser Asn Val Ser Arg	
565	570
Ser Phe Tyr His Gly Pro Ser Arg Leu Pro Val His Ser Ile Ile Ala	
580	585
Ser Met Gly Thr Val Ala Ile Asp Leu Gln Asp Thr Ser Cys Arg Ala	20
595	600
Thr Ser Gly Pro Thr Leu Ala Leu Pro Ser Glu Gly Gly Lys Glu Leu	
610	615
Arg Arg Pro Ser Ile Ala Pro Val Leu Glu Val Ala Asp Thr Ser Ser	
625	630
Ile Gln Thr Cys Asp Leu Leu Ser Asp Gln Ser Glu Asp Glu Thr Thr	30
645	650
Pro Asp Glu Glu Thr Ser Ser Asn Leu Glu Tyr Ala Lys Gly Tyr Pro	
660	665
Pro Tyr Ser Pro Tyr Ile Gly Ser Ser Pro Thr Phe Cys His Leu Leu	
675	680
Gln Glu Lys Val Pro Phe Cys Cys Leu Arg Leu Asp Lys Ser Cys Gln	
690	695
His Asn Tyr Tyr Glu Asp Ala Lys Ala Tyr Gly Phe Lys Asn Lys Leu	40

705		710		715		720									
Ile	Ile	Val	Ala	Ala	Glu	Thr	Ala	Gly	Asn	Gly	Leu	Tyr	Asn	Phe	Ile
		725		730		735									
Val	Pro	Leu	Arg	Ala	Tyr	Tyr	Arg	Pro	Lys	Lys	Glu	Leu	Asn	Pro	Ile
		740		745		750									
Val	Leu	Leu	Leu	Asp	Asn	Pro	Pro	Asp	Met	His	Phe	Leu	Asp	Ala	Ile
		755		760		765									
Cys	Trp	Phe	Pro	Met	Val	Tyr	Tyr	Met	Val	Gly	Ser	Ile	Asp	Asn	Leu
		770		775		780									
Asp	Asp	Leu	Leu	Arg	Cys	Gly	Val	Thr	Phe	Ala	Ala	Asn	Met	Val	Val
		785		790		795									
Val	Asp	Lys	Glu	Ser	Thr	Met	Ser	Ala	Glu	Glu	Asp	Tyr	Met	Ala	Asp
		805		810		815									
Ala	Lys	Thr	Ile	Val	Asn	Val	Gln	Thr	Leu	Phe	Arg	Leu	Phe	Ser	Ser
		820		825		830									
Leu	Ser	Ile	Ile	Thr	Glu	Leu	Thr	His	Pro	Ala	Asn	Met	Arg	Phe	Met
		835		840		845									
Gln	Phe	Arg	Ala	Lys	Asp	Cys	Tyr	Ser	Leu	Ala	Leu	Ser	Lys	Leu	Glu
		850		855		860									
Lys	Lys	Glu	Arg	Glu	Arg	Gly	Ser	Asn	Leu	Ala	Phe	Met	Phe	Arg	Leu
		865		870		875									
Pro	Phe	Ala	Ala	Gly	Arg	Val	Phe	Ser	Ile	Ser	Met	Leu	Asp	Thr	Leu
		885		890		895									
Leu	Tyr	Gln	Ser	Phe	Val	Lys	Asp	Tyr	Met	Ile	Ser	Ile	Thr	Arg	Leu
		900		905		910									
Leu	Leu	Gly	Leu	Asp	Thr	Ile	Pro	Gly	Ser	Gly	Phe	Leu	Cys	Ser	Met
		915		920		925									
Lys	Ile	Thr	Glu	Asp	Asp	Leu	Trp	Ile	Arg	Thr	Tyr	Ala	Arg	Leu	Tyr
		930		935		940									

10

20

30

40

Gln Lys Leu Cys Ser Ser Thr Gly Asp Val Pro Ile Gly Ile Tyr Arg
 945 950 955 960
 Thr Glu Ser Gln Lys Leu Thr Thr Ser Glu Ser Arg Glu Ile Gly Ser
 965 970 975
 Gln Ser Gln Ile Ser Ile Ser Val Glu Glu Trp Glu Asp Thr Lys Asp
 980 985 990
 Val Lys Asp Pro Gly His His Arg Ser Leu His Arg Asn Ser Thr Ser
 995 1000 1005
 Ser Asp Gln Ser Asp His Pro Leu Leu Arg Arg Lys Ser Met Gln Trp
 1010 1015 1020
 Ala Arg Arg Leu Ser Arg Lys Gly Pro Lys His Ser Gly Lys Thr Ala
 1025 1030 1035 1040
 Glu Lys Ile Thr Gln Gln Arg Leu Asn Leu Tyr Arg Arg Ser Glu Arg
 1045 1050 1055
 Gln Glu Leu Ala Glu Leu Val Lys Asn Arg Met Lys His Leu Gly Leu
 1060 1065 1070
 Ser Thr Val Gly Tyr Asp Glu Met Asn Asp His Gln Ser Thr Leu Ser
 1075 1080 1085
 Tyr Ile Leu Ile Asn Pro Ser Pro Asp Thr Arg Leu Glu Leu Asn Asp
 1090 1095 1100
 Val Val Tyr Leu Ile Arg Pro Asp Pro Leu Ser Tyr Leu Pro Asn Ser
 1105 1110 1115 1120
 Glu Pro Ser Arg Lys Asn Ser Ile Cys Asn Ala Ala Val Gln Asp Ser
 1125 1130 1135
 Arg Glu Glu Thr Gln Leu
 1140

10

20

30

40

<210> 24

<211> 3426

<212> DNA

<213> Mouse

<400> 24

atggttgatt tggagagcga agtgeccccct ctgcctccca ggtacagatt ccgggatttg	60	
ctgctagggg accaaggctg gcaaaatgat gacaggggcc aagtigaatt ctacatgaac	120	
gaaaacacat ttaaagagag attaaaactg ttttccataa aaaaccagcg atcaagtcta	180	
agaatccgct tgttcaactt ticcctgaaa ttgttaagct gcttattata tattatccgt	240	10
gtgttgcttg agaaaccgtc acagggaaat gaatggcttc acatattttg ggtaaacga	300	
agctacctt tatggggttt acaggtctca gtggcattga taagcttatt tgaacaata	360	
ctccttgggt atctcagtta taagggaaat atctgggagc agatitttacg aattccattc	420	
atcttggaaa taatcaatgc agtccccctc atcatctcaa tattctggcc caccttaaga	480	
aatctatttg ttccagtttt tctaaattgt tggcttgcca aacatgcctt ggaaaatatg	540	
attaatgac tccatagagc cattcagcgt acacagctcg caatgtttaa tcaagttttg	600	
atittgatat ctactttact atgccttacc ttcacttgcg tttgtgggat tcagcatcta	660	20
gaacgaattg gcaagaagct caatctcttt gactccccctt atttctgcat tgtgacattt	720	
tctactgtgg gctttgggga tgtcactcct gaaacatggt cctccaagct ctttgtcgtt	780	
gctatgatct gcgttgcctt tgtagtactc cctatacagt ttgaacagtt ggcttatttg	840	
tggatggaga gacaaaagtc aggaggaaac tacagctcac acagagctca gacagagaag	900	
cagttgctc tgtgtgtcag ctccctgaag attgacttac ttatggattt tctaaatgag	960	
ttctatgcgc atccaagact acaggattat tacgttggtga ttttgtgtcc cacggagatg	1020	
gatttgcaag ttccggagagt actacagatt ccaatgtggt cccagagagt gatctacctt	1080	30
caaggctctg cccctaaaga ccaggatctc ctgagagcaa agatggacaa tgctgaggcc	1140	
gttttcattt tgagttagccg ctgcgaagtg gatagaacct catctgatca ccaacaatc	1200	
ttgagagcat gggctgtgaa agatitttgc ccaaatgtc ctctgtatgt tcagatatta	1260	
aaaccagaaa acaaatcca catcaaattt gcagatcatg ttgtttgtga agaagagttt	1320	
aagtacgcca tgttagcttt aaactgtata tgcccagcaa catctacact cattacacta	1380	
ctggttcata cctctagagg gcaagaaggg cagcagtcac ctgaacagtg gcagaagact	1440	
tacgggaggt gctcaggaaa cgaagtctat cacatcgttt tgggaagaaag tacatttttt	1500	40
gctgaatatg aagggaagag ttttacctat gcttcttttc atgccacaa aaagtttgggt	1560	

gtctgcttgg	tgggtgtag	gagggaggat	aataaaaaca	ttttgctgaa	tccaggctct	1620	
cgatacatta	tgaatgcttc	agacatatgt	ttttatatta	atattaccaa	agaagaaaat	1680	
tcagcattta	agaatcaaga	ccaacagaga	aaaagtaatg	tgtaaggctc	attttatcat	1740	
gggccttcca	gattgectgt	ccacagcatic	attgccagca	tgggtactgt	ggctatagac	1800	
tigcaagaca	caagctgcag	agcaacaagt	ggccccacce	tggctcttcc	ttcagagggga	1860	
ggcaaagaat	taagaagacc	tagcatttgc	cctgttttag	agggtggcaga	tacatcatca	1920	
attcaaacat	gcgatctcct	aagtgaccag	tccgaagatg	aaactacacc	agatgaagaa	1980	10
acatcttcaa	atttagagta	tgccaaaggc	taccacctt	attccccata	cataggaagt	2040	
tcacctacti	ttgtcacct	acttcaagaa	aaagtgccat	tttgcctgct	aagattagac	2100	
aagagttgcc	agcataacta	ctatgaggac	gcaaaagcct	atggattcaa	aaataaacta	2160	
attatagttg	cagctgaaac	agctggaaat	ggactatata	attttatgtt	acctctcagg	2220	
gcatattata	gaccaaagaa	agaattaaat	cccatagttc	tgctattgga	taaccgccea	2280	
gataigcatt	ttctggatgc	aatctgttgg	ttccaatgg	tttactacat	ggtgggctct	2340	
attgacaacc	tagatgattt	gctcagggtg	ggagtgacct	ttgctgccaa	catgggtggg	2400	20
giggacaaaag	aaagcaccat	gagtgcagag	gaagactaca	tggcagatgc	caagacgatt	2460	
gtgaatgtgc	agactctgtt	caggttgttt	tcaagctcca	gtatcatcac	tgagcttacg	2520	
catccagcaa	ataigagatt	catgcaattc	agagccaagg	attgttactc	tctcgcgctt	2580	
tcaaaactgg	aaaagaaaga	aagagaacga	ggttctaact	tggcctttat	gtttcgactg	2640	
ccttttgcig	cgggaagagt	gttcagcatic	agtaigttag	acaccttctt	ttatcagtca	2700	
tttgtgaaaag	attatatgat	ttctatcacc	agacttcttt	tgggactgga	caccatacca	2760	
ggatcggggt	ttctttgttc	tatgaaaatc	actgaagatg	acttgtggat	cagaacgtat	2820	30
gccagactct	atcagaagtt	gtgttcttct	actggagatg	ttcccatcgg	gatctacaga	2880	
acagaatctc	agaaactaac	gacatctgag	tctcgagaaa	taggatctca	atctcaaata	2940	
tccattagtg	tggaaagagt	ggaagacacc	aaagatgtca	aagaccagg	gcaccaccgc	3000	
agccttcacc	gcaactcaac	gtctagtgc	cagctggacc	atcccttgc	gcgaggaag	3060	
agcatgcagt	gggcccgaag	gctgagcaga	aaagggccga	agcactctgg	taaaactgca	3120	
gaaaaaataa	ctcaacagcg	actgaacctc	taccggagat	ccgaaagaca	ggagcttgc	3180	
gaacttgtga	aaaacagaat	gaaacacctg	ggcctctcga	cgggtgggcta	cgatgaaatg	3240	40
aatgatcatic	agagcacctt	gtctacatic	ctgattaatc	cgtctccaga	caccaggctt	3300	

gagctgaatg atgittgata ttgatccga ccagatccac tgcctacct tccaaacagt 3360
 gaacccagta ggaaaaacag catctgcaat gccgctgttc aagattctcg ggaggaaact 3420
 caactc 3426

<210> 25

<211> 3523

<212> DNA

<213> Mouse

<400> 25

tctctctcca tctctccatc ccttgttggg tgttgeccac tctttaagga aggatggttg 60
 attiggagag cgaagtgccc cctctgccc ccaggtacag attccgggat ttgctgctag 120
 gggaccaagg ctggcaaaat gatgacaggg tccaagtga attctacatg aacgaaaaca 180
 cattaaaga gagattaaaa ctgttttca taaaaacca gcgatcaagt ctaagaatcc 240
 gcttgttcaa ctttccctg aaattgttaa gctgcttatt atatattatc cgtgtgttgc 300
 ttgagaaacc gtcacagga aatgaatggt ctacatatt ttgggtaac cgaagtctac 360
 ctttatgggg ttacaggtc tcagtggcat tgataagctt atttgaaca atactccttg 420
 gttatctcag ttataagga aatatctggg agcagatit acgaattcca ttcatcttgg 480
 aaataatcaa tgcagtcccc ttcatcatc caatattctg gcccacctta agaaatctat 540
 ttgtccagt tttctaaat tgttggcttg ccaacatgc ctiggaaaat atgattaatg 600
 atctccatag agccattcag cgtacacagt ctgcaatgtt taatcaagtt ttgattttga 660
 tatctacit actatgcctt atcttcactt gcatttgtgg gattcagcat ctagaacgaa 720
 ttggcaagaa gtcfaatctc ttgactccc tttatttctg cattgtgaca tttctactg 780
 tgggctttgg ggaigtact cctgaaacat ggtcctccaa gctctttgtc gttgctatga 840
 tctgcgttgc cctttagta ctccctatac agtttgaaca gttggcctat ttgtggatgg 900
 agagacaaaa gtcaggagga aactacagtc gacacagagc tcagacagag aagcatgttg 960
 tcttgttgt cagctccttg aagattgact tacttatgga ttttctaaat gaggttctatg 1020
 cgcattcaag actacaggat tattacgtgg tgattttgtg tcccacggag atggatgtgc 1080
 aagttcggag agtactacag attccaatgt ggtcccagag agtgatctac ctccaaggct 1140
 ctgcccttaa agaccaggat ctctgagag caaagatgga caatgctgag gcctgtttca 1200

10

20

30

40

ttttgagtag	ccgctgcgaa	gtggatagaa	cctcatctga	tcaccaaaca	atcttgagag	1260	
catgggctgt	gaaagatit	gccccaaat	gtctctgtta	tgttcagata	ttaaaccag	1320	
aaaacaaat	ccacatcaaa	ttgcagatc	atgttgittg	tgaagaagag	ttaagtacg	1380	
ccatgttagc	tttaaactgt	atatgccag	caacatctac	actcattaca	ctactggttc	1440	
atacccttag	agggcaagaa	gggcagcagt	cacctgaaca	gtggcagaag	acttacggga	1500	
gggtctcagg	aaacgaagtc	tatcacatcg	ttttggaaga	aagtacattt	tttgctgaat	1560	
atgaaggga	gagttitacc	tatgcttctt	tcatgccc	caaaaagttt	gggtctctgt	1620	10
tggttggtgt	taggaggag	gataataaaa	acattttgct	gaatccaggt	cctcgataca	1680	
ttatgaaigc	ttcagacata	tgttttata	ttaatattac	caaagaagaa	aattcagcat	1740	
ttaagaatca	agaccaacag	agaaaaagta	atgtgtcaag	gtcattttat	catgggcctt	1800	
ccagatigcc	igtccacagc	atcattgcca	gcatgggtac	tgiggctata	gacttgcaag	1860	
acacaagctg	cagagcaaca	agtggcccc	ccctggctct	tcttcagag	ggaggcaaa	1920	
aattaagaag	acctagcatt	gtctctgttt	tagagggtgc	agatacatca	tcaattcaaa	1980	
catgcgatct	cctaagtgac	cagtcgaag	atgaaactac	accagatgaa	gaaacatctt	2040	20
caaatttaga	gtaigccaaa	ggctaccac	cttatcccc	atacatagga	agttcaccta	2100	
ctttttgtca	ctacttcaa	gaaaaagtgc	cattttgctg	cttaagatta	gacaagagtt	2160	
gccagcataa	ctactatgag	gacgcaaaag	cctatggatt	caaaaataaa	ctaattatag	2220	
ttgcagctga	aacagctgga	aatggactat	ataattttat	tgtacctctc	agggcataat	2280	
atagacaaa	gaaagaatta	aatcccatag	tctgtctatt	ggataaccg	ccagatatgc	2340	
atcttctgga	tgcaatctgt	tggtttccaa	tggtttacta	catgggtggc	tctattgaca	2400	
acctagaiga	ttgtctcagg	tgtaggtga	ctttgctgc	caacatgggtg	gtgggtggaca	2460	30
aagaaagcac	catgagtgca	gaggaagact	acatggcaga	tgccaagacg	attgtgaatg	2520	
igcagactct	gttcaggttg	tttcaagtc	tcagtatcat	cactgagctt	acgcatccag	2580	
caaatatgag	attcatgcaa	ttcagagcca	aggattgta	ctctctcgcg	ctttcaaac	2640	
iggaaaagaa	agaaagagaa	cgaggttcia	acttggcctt	tatgtttcga	ctgccttttg	2700	
ctgcgggaag	agtgttcagc	atcagtatgt	tagacacct	tctttatcag	tcattttgta	2760	
aagattatai	gatttctatc	accagacttc	ttttgggact	ggacaccata	ccaggatcgg	2820	
ggtttctttg	ttctatgaaa	atcactgaag	atgacttgtg	gatcagaacg	tatgccagac	2880	40
tctatcagaa	gttgtgttct	tctactggag	atgttccat	cgggatctac	agaacagaat	2940	

ctcagaaact aacgacatct gagtctcgag aataggatc tcaatctcaa atatccatta 3000
 gtgtggaaga gtgggaagac accaaagatg tcaaagacc agggcaccac cgcagccttc 3060
 accgcaactc aacgtctagt gaccagtcgg accatccctt gctgcggagg aagagcatgc 3120
 agtgggcccc aaggctgagc agaaaagggc cgaagcactc tggtaaaact gcagaaaaaa 3180
 taactcaaca gcgactgaac cctaccgga gatccgaaag acaggagctt gctgaacttg 3240
 tgaaaaacag aatgaaacac ctgggctctc cgacggctgg ctacgatgaa atgaatgac 3300
 atcagagcac cctgtcctac atcctgatta atccgtctcc agacaccagg cttgagctga 3360
 atgatgttgt atatttgatc cgaccagatc cactgtccta ccttccaaac agtgaaccca 3420
 gtaggaaaaa cagcatctgc aatgccgctg ttcaagattc tcgggaggaa actcaactct 3480
 gatgaaaaga aaataagaga cattgtagtc cttgcaggga tca 3523

10

<210> 26

<211> 1111

<212> PRT

<213> Mouse

<400> 26

Met Val Asp Leu Glu Ser Glu Val Pro Pro Leu Pro Pro Arg Tyr Arg
 5 10 15
 Phe Arg Asp Leu Leu Leu Gly Asp Gln Gly Trp Gln Asn Asp Asp Arg
 20 25 30
 Val Gln Val Glu Phe Tyr Met Asn Glu Asn Thr Phe Lys Glu Arg Leu
 35 40 45
 Lys Leu Phe Phe Ile Lys Asn Gln Arg Ser Ser Leu Arg Ile Arg Leu
 50 55 60
 Phe Asn Phe Ser Leu Lys Leu Leu Ser Cys Leu Leu Tyr Ile Ile Arg
 65 70 75 80
 Val Leu Leu Glu Lys Pro Ser Gln Gly Asn Glu Trp Ser His Ile Phe
 85 90 95
 Trp Val Asn Arg Ser Leu Pro Leu Trp Gly Leu Gln Val Ser Val Ala

20

30

40

Pro Thr Glu Met Asp Val Gln Val Arg Arg Val Leu Gln Ile Pro Met	
340	345 350
Trp Ser Gln Arg Val Ile Tyr Leu Gln Gly Ser Ala Leu Lys Asp Gln	
355	360 365
Asp Leu Leu Arg Ala Lys Met Asp Asn Ala Glu Ala Cys Phe Ile Leu	
370	375 380
Ser Ser Arg Cys Glu Val Asp Arg Thr Ser Ser Asp His Gln Thr Ile	10
385	390 395 400
Leu Arg Ala Trp Ala Val Lys Asp Phe Ala Pro Asn Cys Pro Leu Tyr	
405	410 415
Val Gln Ile Leu Lys Pro Glu Asn Lys Phe His Ile Lys Phe Ala Asp	
420	425 430
His Val Val Cys Glu Glu Glu Phe Lys Tyr Ala Met Leu Ala Leu Asn	
435	440 445
Cys Ile Cys Pro Ala Thr Ser Thr Leu Ile Thr Leu Leu Val His Thr	20
450	455 460
Ser Arg Gly Gln Glu Gly Gln Gln Ser Pro Glu Gln Trp Gln Lys Thr	
465	470 475 480
Tyr Gly Arg Cys Ser Gly Asn Glu Val Tyr His Ile Val Leu Glu Glu	
485	490 495
Ser Thr Phe Phe Ala Glu Tyr Glu Gly Lys Ser Phe Thr Tyr Ala Ser	30
500	505 510
Phe His Ala His Lys Lys Phe Gly Val Cys Leu Val Gly Val Arg Arg	
515	520 525
Glu Asp Asn Lys Asn Ile Leu Leu Asn Pro Gly Pro Arg Tyr Ile Met	
530	535 540
Asn Ala Ser Asp Ile Cys Phe Tyr Ile Asn Ile Thr Lys Glu Glu Asn	
545	550 555 560
Ser Ala Phe Lys Asn Gln Asp Gln Gln Arg Lys Ser Asn Val Ser Arg	40

1025 1030 1035 1040
 Leu Ser Thr Val Gly Tyr Asp Glu Met Asn Asp His Gln Ser Thr Leu
 1045 1050 1055
 Ser Tyr Ile Leu Ile Asn Pro Ser Pro Asp Thr Arg Leu Glu Leu Asn
 1060 1065 1070
 Asp Val Val Tyr Leu Ile Arg Pro Asp Pro Leu Ser Tyr Leu Pro Asn
 1075 1080 1085
 Ser Glu Pro Ser Arg Lys Asn Ser Ile Cys Asn Ala Ala Val Gln Asp
 1090 1095 1100
 Ser Arg Glu Glu Thr Gln Leu
 1105 1110

10

<210> 27

<211> 3333

<212> DNA

<213> Mouse

<400> 27

atggttgatt tggagagcga agtgcceccct ctgcctccca ggtacagatt ccgggatttg 60
 ctgctagggg accaaggctg gcaaaatgat gacagggctc aagtigaatt ctacatgaac 120
 gaaaacacat ttaaagagag attaaaactg ttttcataa aaaaccagcg atcaagtcta 180
 agaatccgct tgttcaactt ttcctgaaa ttgttaagct gcttattata tattatccgt 240
 gtgttgcttg agaaaccgtc acagggaaat gaatggcttc acatattttg ggtaaccga 300
 agctacctt tatggggttt acaggtctca gtggcattga taagtctatt tgaacaata 360
 ctccctgggtt atctcagtta taagggaaat atctgggagc agattttacg aattccattc 420
 atcttggaaa taatcaatgc agtccccttc atcatctcaa tattctggcc caccttaaga 480
 aatctatttg ttccagtttt tctaaattgt tggcttgcca aacatgcctt ggaaaatatg 540
 attaatgac tcctagagc caticagcgt acacagctcg caatgtttaa tcaagttttg 600
 atttgatat ctactttact atgccttacc ttcacttgca ttigtgggat tcagcatcta 660
 gaacgaattg gcaagaagct caatctcttt gactcccttt atttctgcat tgtgacattt 720

30

40

ictactgigg	gctttgggga	tgctactcct	gaaacatggt	cctccaagct	ctttgtcgtt	780	
gctatgatct	gcgttgcctt	tgtagtactc	cctatacagt	ttgaacagtt	ggcctatttg	840	
tggaatggaga	gacaaaagtc	aggaggaaac	tacagtcgac	acagagctca	gacagagaag	900	
catgttgtec	tgtgtgtcag	cctcttgaag	attgacttac	ttatggattt	tctaaatgag	960	
ttctatgcgc	atccaagact	acaggattat	tacgttggtga	ttttgtgtcc	cacggagatg	1020	
gatgtgcaag	ttcggagagt	actacagatt	ccaatgtggt	cccagagagt	gatctacctt	1080	
caaggctctg	cccttaaaga	ccaggatctc	ctgagagcaa	agatggacaa	tgctgaggcc	1140	10
tgtttcattt	tgagtagccg	ctgcgaagtg	gatagaacct	catctgatca	ccaacaatec	1200	
ttgagagcat	gggctgtgaa	agattttgcc	ccaatigtc	ctctgtatgt	tcagatatta	1260	
aaaccagaaa	acaattcca	catcaaattt	gcagatcatg	ttgtttgtga	agaagagttt	1320	
aagtaccca	igttagcttt	aaactgtata	tgcccagcaa	catctacact	cattacacta	1380	
ctggttcata	cctctagagg	gcaagaaggg	cagcagtcac	ctgaacagtg	gcagaagact	1440	
tacgggaggi	gctcaggaaa	cgaagtctat	cacatcgttt	tggaagaaag	tacatTTTTT	1500	
gctgaataatg	aagggaagag	ttttacctat	gcttcttttc	atgcccacaa	aaagtttggg	1560	20
gtctgctigg	ttgggttag	gagggaggat	aataaaaaca	ttttgctgaa	tccaggctct	1620	
cgatacatta	tgaatgcttc	agacatatgt	ttttatatta	atattaccaa	agaagaaaaat	1680	
tcagcattta	agaatcaaga	ccaacagaga	aaaagtaatg	tgtcaaggtc	atTTTatcat	1740	
ggccttcca	gattgcctgt	ccacagcctc	attgccagca	tgggtactgt	ggctatagac	1800	
ttgcaagaca	caagctgcag	agcaacaagt	ggccccacc	tggctcttcc	ttcagagggga	1860	
ggcaaagaat	taagaagacc	tagcattgct	cctgttttag	aggtggcaga	tacatcatca	1920	
attcaaacat	gcgatctcct	aagtgaccag	tccgaagatg	aaactacacc	agatgaagaa	1980	30
acatcttcaa	atttagagta	tgccaaaggc	taccacctt	attccccata	cataggaagt	2040	
tcacctactt	ttgtcactt	acttcaagaa	aaagtgccat	tttgctgctt	aagattagac	2100	
aagagttgcc	agcataacta	ctatgaggac	gcaaaaacct	atggattcaa	aaataaacta	2160	
attatagttg	cagctgaaac	agctggaaat	ggactatata	atTTTattgt	acctctcagg	2220	
gcatattata	gaccaaagaa	agaattaaat	cccatagttc	tgctattgga	taaccccccta	2280	
gatgatttgc	tcaggigtgg	agtgaccttt	gctgccaaca	tgggtggtggt	ggacaaagaa	2340	
agcaccatga	gtgcagagga	agactacatg	gcagatgcca	agacgattgt	gaatgtgcag	2400	40
actctgttca	ggttgitttc	aagctcagtt	atcatcactg	agcttacgca	tccagcaaat	2460	

atgagattca igcaattcag agccaaggat tgttactctc tcgcgcttcc aaaactggaa 2520
 aagaaaagaaa gagaacgagg ttctaacctg gccittatgt ttcgactgcc ttttgctgcg 2580
 ggaagagigi tcagcatcag tatgttagac acccttcttt atcagtcatt tgtgaaagat 2640
 tataatgatt ctatcaccag acttcttttg ggactggaca ccataccagg atcgggggtt 2700
 ctttgttcta igaaaatcac tgaagatgac ttgtggatca gaacatatgc cagactctat 2760
 cagaagtgtt gttctctac tggagatgtt cccatcggga tctacagaac agaattctcag 2820
 aaactaacga catctgagtc tcaaataatcc attagtgtgg aagagtggga agacacccaaa 2880
 gatgtcaaaag acccaggcca ccaccgcagc cttaccgca actcaacgtc tagtgaccag 2940
 icagaccatc ccttgctgcg gaggaagagc atgcagtggg cccgaaggct gagcagaaaa 3000
 gggcccgaagc actctggtaa aactgcagaa aaaataacte aacagcgcact gaacctctac 3060
 cggagatccg aaagacagga gcttgctgaa cttgtgaaaa acagaatgaa acacctgggc 3120
 ctctcgacgg tggctacga tgaatgaat gatcatcaga gcacctgtc ctacatcctg 3180
 attaatccgt ctccagacac caggcttgag ctgaatgatg ttgtatatt gatccgacca 3240
 gatccactgt cctacctcc aacagtgaa cccagtagga aaaacagcat ctgcaatgcc 3300
 gcigtcaag attctcggga ggaaactcaa ctc 3333

10

20

<210> 28

<211> 3430

<212> DNA

<213> Mouse

<400> 28

tctctctcca tccctccatc ccttgttgga tgttgcccac tcttaagga aggatggttg 60
 attggagag cgaagtgccc cctctgccc ccaggtacag attccgggat ttgctgctag 120
 gggaccaagg ctggcaaaat gatgacaggg tccaagtga attctacatg aacgaaaaca 180
 cattaaaga gagattaaaa ctgttttca taaaaacca gcgatcaagt ctaagaatcc 240
 gcttgttcaa ctttccctg aaattgttaa gctgcttatt atatattatc cgtgtgttgc 300
 ttgagaaacc gtcacagga aatgaatggt ctacatatt ttgggttaac cgaagtctac 360
 ctttatgggg ttacaggtc tcagtggcat tgataagtct atttgaaca atactccttg 420
 gttatctcag ttataagga aatatctggg agcagatit acgaattcca ttcatcttgg 480

30

40

aaataatcaa	igcagtc	ttcatcatct	caatattctg	gccacctta	agaaatctat	540	
ttgtccagt	ttttctaaat	tgttggcttg	caaacatgc	cttggaaaat	atgattaatg	600	
atcctcatag	agccattcag	cgtacacagt	ctgcaatgtt	taatcaagti	ttgattttga	660	
tatctacttt	actatgcett	atcttcactt	gcatttgtgg	gattcagcat	ctagaacgaa	720	
ttggcaagaa	gctcaatctc	tttgactccc	tttatttctg	cattgtgaca	ttttctactg	780	
tgggctttgg	ggatgtcact	cctgaaacat	ggctctccaa	gctctttgtc	gttgctatga	840	
tcigcgttgc	cctgttagta	ctccctatac	agtttgaaca	gttggcctat	ttgtggatgg	900	10
agagacaaaa	gtcaggagga	aactacagtc	gacacagagc	tcagacagag	aagcatgttg	960	
tcctgtgigt	cagctccttg	aagattgact	tacttaigga	ttttctaaat	gagttctatg	1020	
cgcatccaag	actacaggat	tattacgtgg	tgattttgtg	tcccacggag	atggatgtgc	1080	
aagttcggag	agtactacag	attccaatgt	ggctccagag	agtgatctac	cttcaaggct	1140	
ctgcccttaa	agaccaggat	ctcctgagag	caaagatgga	caatgctgag	gcctgtttca	1200	
tttigagtag	ccgctgcaa	gtggatagaa	cctcatctga	tcaccaaaaca	atcttgagag	1260	
catgggctgt	gaaagatttt	gccccaaatt	gtctctgtta	tgttcagata	ttaaaaccag	1320	20
aaaacaaatt	ccacatcaaa	tttgcatc	atgttgtttg	tgaagaagag	tttaagtacg	1380	
ccatgttagc	tttaaactgt	atatgccag	caacatctac	atcattaca	ctactggttc	1440	
atacctctag	agggcaagaa	gggcagcagt	cacctgaaca	gtggcagaag	acttacggga	1500	
gggtctcagg	aaacgaagtc	tatcacatcg	ttttggaaga	aagtacattt	tttgcctgaat	1560	
algaaggga	gagttttacc	tatgcttctt	ttcatgccca	caaaaagttt	gggtctctgt	1620	
tggttgggtgt	taggaggag	gataataaaa	acattttgct	gaatccaggt	cctcgataca	1680	
ttatgaatgc	ttcagacata	tgtttttata	ttaatattac	caaagaagaa	aattcagcat	1740	30
ttagaatca	agaccaacag	agaaaaagta	atgtgtcaag	gtcattttat	catgggcctt	1800	
ccagattgcc	tgccacagc	atcattgcca	gcatgggtac	tgttggctata	gacttgcaag	1860	
acacaagctg	cagagcaaca	agtggcecca	ccctggctct	tccttcagag	ggaggcaaaag	1920	
aattaagaag	acctagcatt	gctcctgttt	tagagggtggc	agatacatca	tcaattcaaa	1980	
catgcgatct	cctaagtgc	cagtcgaag	atgaaactac	accagatgaa	gaaacatctt	2040	
caaatttaga	gtatgccaaa	ggctaccac	cttattcccc	atacatagga	agttcaccta	2100	
ctttttgtca	cctacttcaa	gaaaaagtgc	cattttgctg	cttaagatta	gacaagagtt	2160	40
gccagcataa	ctactatgag	gacgcaaaag	cctatggatt	caaaaataaa	ctaattatag	2220	

ttgcagctga aacagctgga aatggactat ataatttat tgtacctctc agggcatatt	2280	
atagacaaa gaaagaatta aatcccatag ttctgttatt ggataacccc ctgatgatt	2340	
tgctcaggig tggagigacc ttgtctgcca acatggigtgt ggiggacaaa gaaagcacca	2400	
tgagtgcaga ggaagactac atggcagatg ccaagacgat tgtgaatgtg cagactctgt	2460	
tcaggttgtt ttcaagtctc agtatcatca ctgagcttac gcatccagca aatatgagat	2520	
tcattgcaatt cagagccaag gattgttact ctctcgcgt ttcaaaactg gaaaagaaag	2580	
aaagagaacg aggttctaac ctggccttta tgtttcgact gccttttgc tgcgggaagag	2640	10
tgttcagcat cagtaigtta gacaccttc tttatcagtc atttgtgaaa gattatatga	2700	
ttctatcac cagacttctt ttgggactgg acaccatacc aggatcgggg tttctttgtt	2760	
ctatgaaaat cactgaagat gacttgtgga tcagaacata tgccagactc tatcagaagt	2820	
tgigtcttc tactggagat gtcccatcg ggatctacag aacagaatct cagaaactaa	2880	
cgacatctga gtctcaaata tccattagtg tggaaagagt ggaagacacc aaagatgtca	2940	
aagaccagg gcaccaccgc agccttcacc gcaactcaac gtctagtac cagtcagacc	3000	
atcccttgc tgcggaggaag agcatgcagt gggcccgaag gctgagcaga aaagggccga	3060	20
agcactcigg taaaactgca gaaaaataa ctcaacagcg actgaacctc taccggagat	3120	
ccgaaagaca ggagcttgc tgaacttgtga aaaacagaat gaaacacctg ggcctctcga	3180	
cggigggcta cgalgaaatg aatgatcctc agagcacctt gtcttacctc ctgattaatc	3240	
cgctccaga caccaggctt gagctgaatg atgttgtata ttgatccga ccagatccac	3300	
igtctacct tccaaacagt gaaccagta ggaaaacag catctgcaat gccgctgttc	3360	
aagattctcg ggaggaaact caactctgat gaaaagaaaa taagagacat tgtagtcctt	3420	
gcaggatca	3430	30

<210> 29

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 29

40

ctgtataigc ccagcaacat ctac	24	
<210> 30		
<211> 22		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		10
<223> Primer		
<400> 30		
cgtacatctt ctgccattgt tc	22	
<210> 31		
<211> 26		
<212> DNA		20
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Probe		
<400> 31		
cagtgigtgt gccigtgtg cagaga	26	
<210> 32		30
<211> 22		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Primer		
<400> 32		
tgcccagcaa catctacact ta	22	40

<210> 33		
<211> 30		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Probe		
<400> 33		10
tacctctaga ggg caagaag gccagcaatc	30	
<210> 34		
<211> 21		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		20
<223> Primer		
<400> 34		
tcctccctcc taacaccaat c	21	
<210> 35		
<211> 30		
<212> DNA		30
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Probe		
<400> 35		
tacctctaga ggg cagtttg gcgtctgctt	30	
<210> 36		40
<211> 20		

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 36

gaggatgcaa aagcctatgg

20

10

<210> 37

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 37

ctigaccagt gacattgcag at

22

20

<210> 38

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Probe

<400> 38

attggataac ccatgaaatg aatgatcatc

30

30

<210> 39

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

40

<220>

<223> Primer

<400> 39

tgagatggt cccattgga

19

<210> 40

<211> 26

10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 40

gtctccac tctctacac tgatag

26

20

<210> 41

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Probe

<400> 41

atctgagtct cgaaaaatag catcacaatc

30

30

<210> 42

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

40

<400> 42

ctggatgcaa tctgttggtt tc

22

<210> 43

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

10

<220>

<223> Primer

<400> 43

gcacgttcac aatggttttg g

21

<210> 44

<211> 29

20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Probe

<400> 44

ttgtggataa agagagcacc atgagtgcc

29

30

【図面の簡単な説明】

【図1】ヒトTCH204バリエント1タンパク質、KIAA1422およびSlackのアミノ酸配列の比較を表す図である。図中、TCH204V1は配列番号：1で表されるアミノ酸配列を示す。S1～S6は膜貫通領域を、Pはポア領域を示す。はTCH204V1に一致するアミノ酸を示す。(図2へ続く)

【図2】ヒトTCH204バリエント1タンパク質、KIAA1422およびSlackのアミノ酸配列の比較を表す図である。図中、TCH204V1は配列番号：1で表されるアミノ酸配列を示す。S1～S6は膜貫通領域を、Pはポア領域を示す。はTCH204V1に一致するアミノ酸を示す。(図1の続き、図3へ続く)

【図3】ヒトTCH204バリエント1タンパク質、KIAA1422およびSlackのアミノ酸配列の比較を表す図である。図中、TCH204V1は配列番号：1で表されるアミノ酸配列を示す。S1～S6は膜貫通領域を、Pはポア領域を示す。はTCH204V1に一致するアミノ酸を示す。(図2の続き)

40

【図4】ヒトTCH204バリエント1、ヒトTCH204バリエント2、ヒトTCH204バリエント3およびヒトTCH204バリエント4のアミノ酸配列の比較を示す図である。図中、TCH204V1は配列番号：1、TCH204V2は配列番号：8、TCH204V3は配列番号：11、およびTCH204V4は配列番号：15で表されるアミノ酸配列をそれぞれ示す。S1～S6は膜貫通領域を、Pはポア領域を示す。はTCH204V1に一致するアミノ酸を示す。(図5へ続く)

【図5】ヒトTCH204バリエント1、ヒトTCH204バリエント2、ヒトTCH2

50

04バリエーション3およびヒトTCH204バリエーション4のアミノ酸配列の比較を示す図である。図中、TCH204V1は配列番号：1、TCH204V2は配列番号：8、TCH204V3は配列番号：11、およびTCH204V4は配列番号：15で表されるアミノ酸配列をそれぞれ示す。S1～S6は膜貫通領域を、Pはポア領域を示す。はTCH204V1に一致するアミノ酸を示す。(図4の続き、図6へ続く)

【図6】ヒトTCH204バリエーション1、ヒトTCH204バリエーション2、ヒトTCH204バリエーション3およびヒトTCH204バリエーション4のアミノ酸配列の比較を示す図である。図中、TCH204V1は配列番号：1、TCH204V2は配列番号：8、TCH204V3は配列番号：11、およびTCH204V4は配列番号：15で表されるアミノ酸配列をそれぞれ示す。S1～S6は膜貫通領域を、Pはポア領域を示す。はTCH204V1に一致するアミノ酸を示す。(図5の続き)

10

【図7】マウスTCH204バリエーション6タンパク質、ヒトTCH204バリエーション1タンパク質およびヒトS104タンパク質のアミノ酸配列の比較を表す図である。図中、mTCH204V6は配列番号：18で表されるアミノ酸配列を、hTCH204V1は配列番号：1で表されるアミノ酸配列を、W00240649.4はS104アミノ酸配列を示す。S1～S6は膜貫通領域を、Pはポア領域を示す。はmTCH204V6に一致するアミノ酸を示す。(図8へ続く)

【図8】マウスTCH204バリエーション6タンパク質、ヒトTCH204バリエーション1タンパク質およびヒトS104タンパク質のアミノ酸配列の比較を表す図である。図中、mTCH204V6は配列番号：18で表されるアミノ酸配列を、hTCH204V1は配列番号：1で表されるアミノ酸配列を、W00240649.4はS104アミノ酸配列を示す。S1～S6は膜貫通領域を、Pはポア領域を示す。はmTCH204V6に一致するアミノ酸を示す。(図7の続き、図9へ続く)

20

【図9】マウスTCH204バリエーション6タンパク質、ヒトTCH204バリエーション1タンパク質およびヒトS104タンパク質のアミノ酸配列の比較を表す図である。図中、mTCH204V6は配列番号：18で表されるアミノ酸配列を、hTCH204V1は配列番号：1で表されるアミノ酸配列を、W00240649.4はS104アミノ酸配列を示す。S1～S6は膜貫通領域を、Pはポア領域を示す。はmTCH204V6に一致するアミノ酸を示す。(図8の続き)

【図10】マウスTCH204バリエーション6、マウスTCH204バリエーション5およびマウスTCH204バリエーション2のアミノ酸配列の比較を示す図である。図中、mTCH204V6は配列番号：18で表されるアミノ酸配列を、mTCH204V5は配列番号：23で表されるアミノ酸配列を、mTCH204V2は配列番号：26で表されるアミノ酸配列を示す。S1～S6は膜貫通領域を、Pはポア領域を示す。はmTCH204V6に一致するアミノ酸を示す。(図11へ続く)

30

【図11】マウスTCH204バリエーション6、マウスTCH204バリエーション5およびマウスTCH204バリエーション2のアミノ酸配列の比較を示す図である。図中、mTCH204V6は配列番号：18で表されるアミノ酸配列を、mTCH204V5は配列番号：23で表されるアミノ酸配列を、mTCH204V2は配列番号：26で表されるアミノ酸配列を示す。S1～S6は膜貫通領域を、Pはポア領域を示す。はmTCH204V6に一致するアミノ酸を示す。(図10の続き、図12へ続く)

40

【図12】マウスTCH204バリエーション6、マウスTCH204バリエーション5およびマウスTCH204バリエーション2のアミノ酸配列の比較を示す図である。図中、mTCH204V6は配列番号：18で表されるアミノ酸配列を、mTCH204V5は配列番号：23で表されるアミノ酸配列を、mTCH204V2は配列番号：26で表されるアミノ酸配列を示す。S1～S6は膜貫通領域を、Pはポア領域を示す。はmTCH204V6に一致するアミノ酸を示す。(図11の続き)

【図13】各種ヒト正常組織由来cDNAにおけるヒトTCH204バリエーション1遺伝子の発現量を表す図である。縦軸の相対的発現量は、各cDNA試料単位液量あたりのヒトTCH204バリエーション1遺伝子発現量(コピー数/μl)を同単位液量あたりのGAD

50

PH 遺伝子発現量 (コピー数 / μl) で除した値を 100 倍した値を示す。

【図 14】各種ヒト正常組織由来 cDNA におけるヒト TCH204 バリエント 2 遺伝子定量系での発現量測定結果を表す図である。縦軸の相対的発現量は、各 cDNA 試料単位液量あたりのヒト TCH204 バリエント 2 遺伝子発現量 (コピー数 / μl) を同単位液量あたりの GAPDH 遺伝子発現量 (コピー数 / μl) で除した値を 100 倍した値を示す。

【図 15】各種ヒト正常組織由来 cDNA におけるヒト TCH204 バリエント 3 遺伝子の発現量を表す図である。縦軸の相対的発現量は、各 cDNA 試料単位液量あたりのヒト TCH204 バリエント 3 遺伝子発現量 (コピー数 / μl) を同単位液量あたりの GAPDH 遺伝子発現量 (コピー数 / μl) で除した値を 100 倍した値を示す。

10

【図 16】各種ヒト正常組織由来 cDNA におけるヒト TCH204 バリエント 4 遺伝子の発現量を表す図である。縦軸の相対的発現量は、各 cDNA 試料単位液量あたりのヒト TCH204 バリエント 4 遺伝子発現量 (コピー数 / μl) を同単位液量あたりの GAPDH 遺伝子発現量 (コピー数 / μl) で除した値を 100 倍した値を示す。

【図 17】各種ヒト正常組織由来 cDNA におけるヒト TCH204 バリエント 5 遺伝子の発現量を表す図である。縦軸の相対的発現量は、各 cDNA 試料単位液量あたりのヒト TCH204 バリエント 5 遺伝子発現量 (コピー数 / μl) を同単位液量あたりの GAPDH 遺伝子発現量 (コピー数 / μl) で除した値を 100 倍した値を示す。

【図 18】各種ヒト正常組織由来 cDNA におけるヒト TCH204 バリエント 6 遺伝子の発現量を表す図である。縦軸の相対的発現量は、各 cDNA 試料単位液量あたりのヒト TCH204 バリエント 6 遺伝子発現量 (コピー数 / μl) を同単位液量あたりの GAPDH 遺伝子発現量 (コピー数 / μl) で除した値を 100 倍した値を示す。

20

【図 19】TCH204 バリエント 2 を CHO-K1 細胞に一過性発現させたときの電流 - 電位曲線を示す図である。保持膜電位は -80 mV に固定した。● はヒト TCH204 バリエント 2 ベクターを導入した細胞 (7 例)、○ はベクターのみを導入した細胞 (5 例) の平均値を示す。

【 5 】

461 800WXYVCRGCMWYH1Y1BESFFPAEYSGKSTFYAFPHAKKXGVCCLIGVRRERENKM TCH204V1
 474 800WXYVCRGCMWYH1Y1BESFFPAEYSGKSTFYAFPHAKKXGVCCLIGVRRERENKM TCH204V1
 469 800WXYVCRGCMWYH1Y1BESFFPAEYSGKSTFYAFPHAKKXGVCCLIGVRRERENKM TCH204V1
 474 800WXYVCRGCMWYH1Y1BESFFPAEYSGKSTFYAFPHAKKXGVCCLIGVRRERENKM TCH204V1
 541 LLLNPGPRVIMNSTDCYINITREEMSAFNKODQKSNVSKSPYHGFRRLLVYHSIIAS TCH204V1
 534 LLLNPGPRVIMNSTDCYINITREEMSAFNKODQKSNVSKSPYHGFRRLLVYHSIIAS TCH204V2
 484 LLLNPGPRVIMNSTDCYINITREEMSAFNKODQKSNVSKSPYHGFRRLLVYHSIIAS TCH204V3
 534 LLLNPGPRVIMNSTDCYINITREEMSAFNKODQKSNVSKSPYHGFRRLLVYHSIIAS TCH204V4
 601 HGTVAIDLDOTGCRSASGPPALSPTGSKERKRPAPVLEVAADTSSIQCDLSDSED TCH204V1
 594 HGTVAIDLDOTGCRSASGPPALSPTGSKERKRPAPVLEVAADTSSIQCDLSDSED TCH204V2
 544 HGTVAIDLDOTGCRSASGPPALSPTGSKERKRPAPVLEVAADTSSIQCDLSDSED TCH204V3
 594 HGTVAIDLDOTGCRSASGPPALSPTGSKERKRPAPVLEVAADTSSIQCDLSDSED TCH204V4
 661 HTPPBEMESNLKYAKGYPYSPYIGSPTFCHLLEKRVPPCLLRDKSCORHMYEBAKA TCH204V1
 654 HTPPBEMESNLKYAKGYPYSPYIGSPTFCHLLEKRVPPCLLRDKSCORHMYEBAKA TCH204V2
 604 HTPPBEMESNLKYAKGYPYSPYIGSPTFCHLLEKRVPPCLLRDKSCORHMYEBAKA TCH204V3
 654 HTPPBEMESNLKYAKGYPYSPYIGSPTFCHLLEKRVPPCLLRDKSCORHMYEBAKA TCH204V4
 721 YGFKKLLIYAATASGLNPLVPLKAYYKKEKLNIVLDDNLDLDRGCVTAAAN TCH204V1
 714 YGFKKLLIYAATASGLNPLVPLKAYYKKEKLNIVLDDNLDLDRGCVTAAAN TCH204V2
 664 YGFKKLLIYAATASGLNPLVPLKAYYKKEKLNIVLDDNLDLDRGCVTAAAN TCH204V3
 714 YGFKKLLIYAATASGLNPLVPLKAYYKKEKLNIVLDDNLDLDRGCVTAAAN TCH204V4
 781 MVVDPKESPMASREEDYMAADAKTIVNVTLPFLPSSLSITRETPPANMRMQFRAKDCYS TCH204V1
 774 MVVDPKESPMASREEDYMAADAKTIVNVTLPFLPSSLSITRETPPANMRMQFRAKDCYS TCH204V2
 724 MVVDPKESPMASREEDYMAADAKTIVNVTLPFLPSSLSITRETPPANMRMQFRAKDCYS TCH204V3
 759 MVVDPKESPMASREEDYMAADAKTIVNVTLPFLPSSLSITRETPPANMRMQFRAKDCYS TCH204V4
 841 LALSLLKREKREKCSLAPRFLPFAAGRVYSISWDLLYOSPVYDYIISILLLGLD TCH204V1
 834 LALSLLKREKREKCSLAPRFLPFAAGRVYSISWDLLYOSPVYDYIISILLLGLD TCH204V2
 784 LALSLLKREKREKCSLAPRFLPFAAGRVYSISWDLLYOSPVYDYIISILLLGLD TCH204V3
 759 LALSLLKREKREKCSLAPRFLPFAAGRVYSISWDLLYOSPVYDYIISILLLGLD TCH204V4
 901 HTPGSGFLCSMKITADLWERTYARLRYKLGCSSTGDDYPIGIVYTESQKLTSSOISISV TCH204V1
 894 HTPGSGFLCSMKITADLWERTYARLRYKLGCSSTGDDYPIGIVYTESQKLTSSOISISV TCH204V2
 844 HTPGSGFLCSMKITADLWERTYARLRYKLGCSSTGDDYPIGIVYTESQKLTSSOISISV TCH204V3
 759 HTPGSGFLCSMKITADLWERTYARLRYKLGCSSTGDDYPIGIVYTESQKLTSSOISISV TCH204V4

【 6 】

961 EREDTDSKQOQHNSMNSSTSDSDHLLRKSMAWALSRCYKSGKAKKXIT TCH204V1
 954 EREDTDSKQOQHNSMNSSTSDSDHLLRKSMAWALSRCYKSGKAKKXIT TCH204V2
 904 EREDTDSKQOQHNSMNSSTSDSDHLLRKSMAWALSRCYKSGKAKKXIT TCH204V3
 759 EREDTDSKQOQHNSMNSSTSDSDHLLRKSMAWALSRCYKSGKAKKXIT TCH204V4
 1021 QBLNLYRRSERQALAVKWRKHLGLSTVYDMMNDQSTLSYIINPDPDTIELLD TCH204V1
 1014 QBLNLYRRSERQALAVKWRKHLGLSTVYDMMNDQSTLSYIINPDPDTIELLD TCH204V2
 964 QBLNLYRRSERQALAVKWRKHLGLSTVYDMMNDQSTLSYIINPDPDTIELLD TCH204V3
 759 QBLNLYRRSERQALAVKWRKHLGLSTVYDMMNDQSTLSYIINPDPDTIELLD TCH204V4
 1081 VVYLIHDDPLIYLPSEPRRNKXICWVGOJRETFOL TCH204V1
 1074 VVYLIHDDPLIYLPSEPRRNKXICWVGOJRETFOL TCH204V2
 1024 VVYLIHDDPLIYLPSEPRRNKXICWVGOJRETFOL TCH204V3
 759 VVYLIHDDPLIYLPSEPRRNKXICWVGOJRETFOL TCH204V4

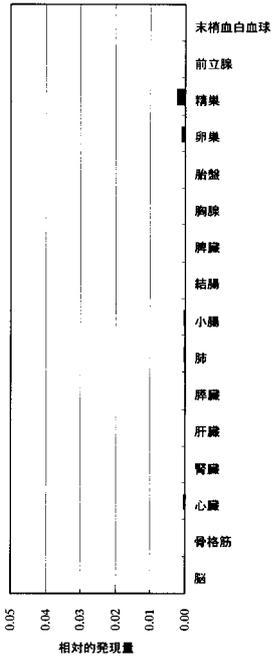
【 7 】

1 MVDLSEVPLPFRYFRDLLLLGQGGQNDORVOVEFYNNRMTFKRLLKFFPKNQRSSL mCH204V6
 1 MVDLSEVPLPFRYFRDLLLLGQGGQNDORVOVEFYNNRMTFKRLLKFFPKNQRSSL mCH204V1
 1 MVDLSEVPLPFRYFRDLLLLGQGGQNDORVOVEFYNNRMTFKRLLKFFPKNQRSSL mCH204V1
 1 MVDLSEVPLPFRYFRDLLLLGQGGQNDORVOVEFYNNRMTFKRLLKFFPKNQRSSL mCH204V1
 61 MRLKWSKLEKLLIYVLEKPPGGNWSHFVWRSPLWGLQEVXALISLFTTI mCH204V6
 61 MRLKWSKLEKLLIYVLEKPPGGNWSHFVWRSPLWGLQEVXALISLFTTI mCH204V1
 61 MRLKWSKLEKLLIYVLEKPPGGNWSHFVWRSPLWGLQEVXALISLFTTI mCH204V1
 61 MRLKWSKLEKLLIYVLEKPPGGNWSHFVWRSPLWGLQEVXALISLFTTI mCH204V1
 121 LLYGYSYKGNIMROIRIPRILIRINAVPFIISLWPKRNFVPPVFLNCLAKKHAENMH mCH204V6
 121 LLYGYSYKGNIMROIRIPRILIRINAVPFIISLWPKRNFVPPVFLNCLAKKHAENMH mCH204V1
 121 LLYGYSYKGNIMROIRIPRILIRINAVPFIISLWPKRNFVPPVFLNCLAKKHAENMH mCH204V1
 121 LLYGYSYKGNIMROIRIPRILIRINAVPFIISLWPKRNFVPPVFLNCLAKKHAENMH mCH204V1
 181 INDLRAIORTSAMFNQVLLISLTLCLIFTCIGIOHLEIRIGKLNLPDSSLYFCVTF mCH204V6
 181 INDLRAIORTSAMFNQVLLISLTLCLIFTCIGIOHLEIRIGKLNLPDSSLYFCVTF mCH204V1
 181 INDLRAIORTSAMFNQVLLISLTLCLIFTCIGIOHLEIRIGKLNLPDSSLYFCVTF mCH204V1
 181 INDLRAIORTSAMFNQVLLISLTLCLIFTCIGIOHLEIRIGKLNLPDSSLYFCVTF mCH204V1
 241 STVGQDVTPEWSSLLFVAMICVAVLVIOPFOLAYLWREKQSGNYSHRBAQTEK mCH204V6
 241 STVGQDVTPEWSSLLFVAMICVAVLVIOPFOLAYLWREKQSGNYSHRBAQTEK mCH204V1
 241 STVGQDVTPEWSSLLFVAMICVAVLVIOPFOLAYLWREKQSGNYSHRBAQTEK mCH204V1
 241 STVGQDVTPEWSSLLFVAMICVAVLVIOPFOLAYLWREKQSGNYSHRBAQTEK mCH204V1
 301 MVLVCSVSKIDLLMPLNREYARPRQDYVVILCPREMDYQVRVLIQIPMNSQRVIYI mCH204V6
 301 MVLVCSVSKIDLLMPLNREYARPRQDYVVILCPREMDYQVRVLIQIPMNSQRVIYI mCH204V1
 301 MVLVCSVSKIDLLMPLNREYARPRQDYVVILCPREMDYQVRVLIQIPMNSQRVIYI mCH204V1
 301 MVLVCSVSKIDLLMPLNREYARPRQDYVVILCPREMDYQVRVLIQIPMNSQRVIYI mCH204V1
 361 QGSAIKDQDLAKKMDAECFLSSCEVBTSSDHOITILAMAKDAPMPLVYQIL mCH204V6
 361 QGSAIKDQDLAKKMDAECFLSSCEVBTSSDHOITILAMAKDAPMPLVYQIL mCH204V1
 361 QGSAIKDQDLAKKMDAECFLSSCEVBTSSDHOITILAMAKDAPMPLVYQIL mCH204V1
 361 QGSAIKDQDLAKKMDAECFLSSCEVBTSSDHOITILAMAKDAPMPLVYQIL mCH204V1
 421 KPEKPHIFAFORVVEEERFYKMLANLNICPATSTLTLVHTSRGQ mCH204V6
 421 KPEKPHIFAFORVVEEERFYKMLANLNICPATSTLTLVHTSRGQ mCH204V1
 421 KPEKPHIFAFORVVEEERFYKMLANLNICPATSTLTLVHTSRGQ mCH204V1
 421 KPEKPHIFAFORVVEEERFYKMLANLNICPATSTLTLVHTSRGQ mCH204V1
 471 HOGWYVRCGSENYRIVLESTTFAEYSGKSTFYAFPHAKKXGVCCLIGVRRERENKM mCH204V6
 471 HOGWYVRCGSENYRIVLESTTFAEYSGKSTFYAFPHAKKXGVCCLIGVRRERENKM mCH204V1
 471 HOGWYVRCGSENYRIVLESTTFAEYSGKSTFYAFPHAKKXGVCCLIGVRRERENKM mCH204V1
 471 HOGWYVRCGSENYRIVLESTTFAEYSGKSTFYAFPHAKKXGVCCLIGVRRERENKM mCH204V1
 474 800WXYVCRGCMWYH1Y1BESFFPAEYSGKSTFYAFPHAKKXGVCCLIGVRRERENKM mCH204V6
 474 800WXYVCRGCMWYH1Y1BESFFPAEYSGKSTFYAFPHAKKXGVCCLIGVRRERENKM mCH204V1
 474 800WXYVCRGCMWYH1Y1BESFFPAEYSGKSTFYAFPHAKKXGVCCLIGVRRERENKM mCH204V1
 474 800WXYVCRGCMWYH1Y1BESFFPAEYSGKSTFYAFPHAKKXGVCCLIGVRRERENKM mCH204V1

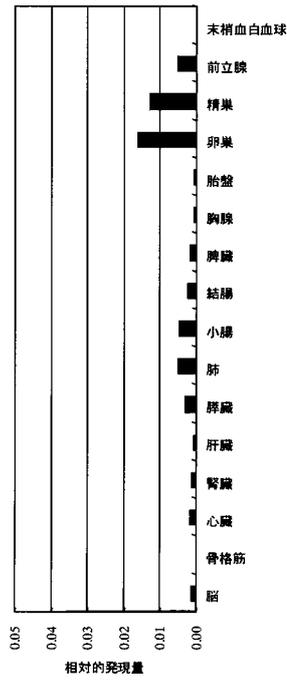
【 8 】

534 ILLNPGPRVIMNSTDCYINITREEMSAFNKODQKSNVSKSPYHGFRRLLVYHSIIAS mCH204V6
 534 ILLNPGPRVIMNSTDCYINITREEMSAFNKODQKSNVSKSPYHGFRRLLVYHSIIAS mCH204V1
 534 ILLNPGPRVIMNSTDCYINITREEMSAFNKODQKSNVSKSPYHGFRRLLVYHSIIAS mCH204V1
 534 ILLNPGPRVIMNSTDCYINITREEMSAFNKODQKSNVSKSPYHGFRRLLVYHSIIAS mCH204V1
 594 MFTVADLDQDTSCHLTPGPTLALPJEKKEILRRPSTAPVLEVAADTSSIQCDLSDSED mCH204V6
 601 MFTVADLDQDTSCHLTPGPTLALPJEKKEILRRPSTAPVLEVAADTSSIQCDLSDSED mCH204V1
 594 MFTVADLDQDTSCHLTPGPTLALPJEKKEILRRPSTAPVLEVAADTSSIQCDLSDSED mCH204V1
 594 MFTVADLDQDTSCHLTPGPTLALPJEKKEILRRPSTAPVLEVAADTSSIQCDLSDSED mCH204V1
 654 EPTPDEWSSLLFVAMICVAVLVIOPFOLAYLWREKQSGNYSHRBAQTEK mCH204V6
 661 EPTPDEWSSLLFVAMICVAVLVIOPFOLAYLWREKQSGNYSHRBAQTEK mCH204V1
 654 EPTPDEWSSLLFVAMICVAVLVIOPFOLAYLWREKQSGNYSHRBAQTEK mCH204V1
 654 EPTPDEWSSLLFVAMICVAVLVIOPFOLAYLWREKQSGNYSHRBAQTEK mCH204V1
 714 YGFKKLLIYAATASGLNPLVPLKAYYKKEKLNIVLDDNLDLDRGCVTAAAN mCH204V6
 721 YGFKKLLIYAATASGLNPLVPLKAYYKKEKLNIVLDDNLDLDRGCVTAAAN mCH204V1
 714 YGFKKLLIYAATASGLNPLVPLKAYYKKEKLNIVLDDNLDLDRGCVTAAAN mCH204V1
 714 YGFKKLLIYAATASGLNPLVPLKAYYKKEKLNIVLDDNLDLDRGCVTAAAN mCH204V1
 774 VVYLIHDDPLIYLPSEPRRNKXICWVGOJRETFOL mCH204V6
 774 VVYLIHDDPLIYLPSEPRRNKXICWVGOJRETFOL mCH204V1
 774 VVYLIHDDPLIYLPSEPRRNKXICWVGOJRETFOL mCH204V1
 774 VVYLIHDDPLIYLPSEPRRNKXICWVGOJRETFOL mCH204V1
 834 SITRETPPANMRMQFRAKDCYSALSKLKKRKSGLAFMFRPFAAGRVYSISML mCH204V6
 817 SITRETPPANMRMQFRAKDCYSALSKLKKRKSGLAFMFRPFAAGRVYSISML mCH204V1
 834 SITRETPPANMRMQFRAKDCYSALSKLKKRKSGLAFMFRPFAAGRVYSISML mCH204V1
 834 SITRETPPANMRMQFRAKDCYSALSKLKKRKSGLAFMFRPFAAGRVYSISML mCH204V1
 894 DDLYOSPVYDYIISILLLGLD mCH204V6
 894 DDLYOSPVYDYIISILLLGLD mCH204V1
 894 DDLYOSPVYDYIISILLLGLD mCH204V1
 894 DDLYOSPVYDYIISILLLGLD mCH204V1
 954 VPIGIVYTESQKLTSSOISISVBEHMDTKVQKHHSLSLHNSMNSSTSDSDHLLRKS mCH204V6
 937 VPIGIVYTESQKLTSSOISISVBEHMDTKVQKHHSLSLHNSMNSSTSDSDHLLRKS mCH204V1
 954 VPIGIVYTESQKLTSSOISISVBEHMDTKVQKHHSLSLHNSMNSSTSDSDHLLRKS mCH204V1
 954 VPIGIVYTESQKLTSSOISISVBEHMDTKVQKHHSLSLHNSMNSSTSDSDHLLRKS mCH204V1
 1044 SOMARRLSKSGKPNRSKXTAKITQORNLNLYRRSERQALAVKWRKHLGLSTVYDMMNDQSTLSYIINPDPDTIELLD mCH204V6
 997 SOMARRLSKSGKPNRSKXTAKITQORNLNLYRRSERQALAVKWRKHLGLSTVYDMMNDQSTLSYIINPDPDTIELLD mCH204V1
 1044 SOMARRLSKSGKPNRSKXTAKITQORNLNLYRRSERQALAVKWRKHLGLSTVYDMMNDQSTLSYIINPDPDTIELLD mCH204V1
 1044 SOMARRLSKSGKPNRSKXTAKITQORNLNLYRRSERQALAVKWRKHLGLSTVYDMMNDQSTLSYIINPDPDTIELLD mCH204V1

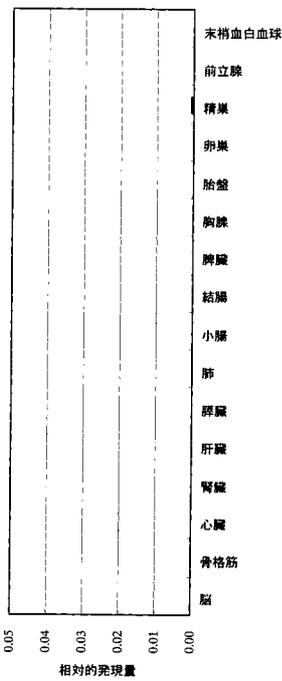
【 図 1 3 】



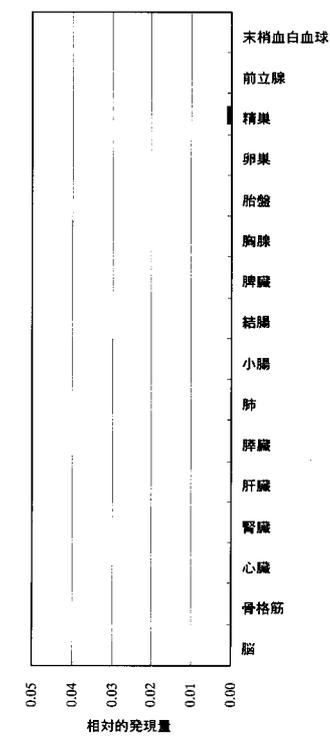
【 図 1 4 】



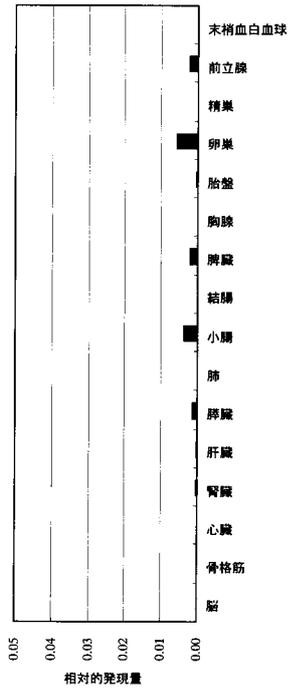
【 図 1 5 】



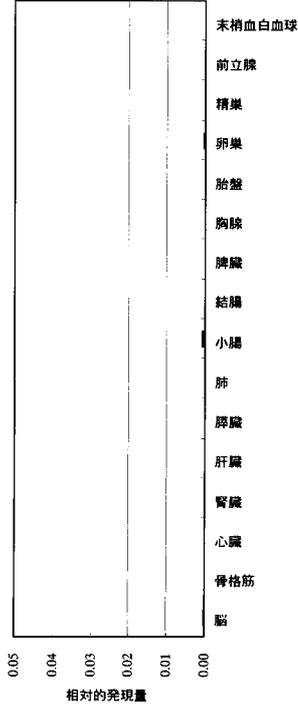
【 図 1 6 】



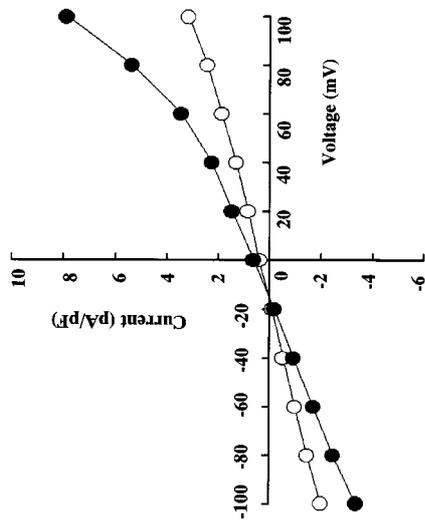
【 图 17 】



【 图 18 】



【 图 19 】



专利名称(译)	新型蛋白质及其DNA		
公开(公告)号	JP2004105167A	公开(公告)日	2004-04-08
申请号	JP2003133857	申请日	2003-05-13
申请(专利权)人(译)	武田化学工业有限公司		
[标]发明人	中西淳 味谷浩之 岩間斗史		
发明人	中西 淳 味谷 浩之 岩間 斗史		
IPC分类号	G01N33/50 A61K38/00 A61K39/395 A61K45/00 A61K48/00 A61K49/00 A61P1/00 A61P11/00 A61P15/00 C07K14/47 C07K16/18 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12P21/02 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/53		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K39/395.D A61K45/00 A61K48/00 A61K49/00.Z A61P1/00 A61P11/00 A61P15/00 C07K14/47 C07K16/18 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02.C C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D C12N5/00.A A61K37/02 A61K38/00 A61K38/02 A61K38/16 A61K49/00 C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A C12N5/00.101 C12N5/10		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/AA40 2G045/BB03 2G045/BB20 2G045/CB01 2G045/CB21 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/DA37 2G045/DA77 2G045/FB02 2G045/FB03 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA80 4B024/CA04 4B024/DA02 4B024/DA06 4B024/DA12 4B024/EA02 4B024/EA04 4B063/QA01 4B063/QA05 4B063/QA11 4B063/QQ08 4B063/QQ53 4B063/QQ79 4B063/QR32 4B063/QR77 4B063/QR80 4B063/QS25 4B063/QS35 4B063/QS36 4B063/QS38 4B063/QX02 4B064/AG01 4B064/CA02 4B064/CA06 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/CE04 4B064/CE07 4B064/CE10 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA26X 4B065/AA80X 4B065/AA90X 4B065/AA91Y 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/BB23 4B065/BB24 4B065/BB27 4B065/BB29 4B065/BC02 4B065/CA24 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA06 4C084/AA07 4C084/AA13 4C084/AA17 4C084/BA01 4C084/BA02 4C084/BA08 4C084/BA22 4C084/BA23 4C084/CA53 4C084/NA14 4C084/ZA592 4C084/ZA662 4C084/ZA812 4C085/AA13 4C085/BB11 4C085/EE01 4C085/HH20 4C085/KA03 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74 4H045/GA21		
代理人(译)	高桥修一 叻关口		
优先权	2002139184 2002-05-14 JP 2002157669 2002-05-30 JP 2002218324 2002-07-26 JP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种具有K⁺离子渗透活性的新型蛋白质，编码该蛋白质的DNA，促进或抑制该蛋白质活性的化合物的筛选方法，通过该筛选方法获得的化合物等。与由特定序列表示的氨基酸序列具有相同或基本相同的氨基酸序列的蛋白质是例如消化系统疾病，与胸腺异常有关的免疫疾病，胰腺疾病，糖尿病，生殖系统疾病，中枢神经系统。用作神经系统疾病，心血管疾病，肌肉疾病，癌症等的诊断标志物并且促进或抑制通过使用该蛋白质的筛选方法获得的蛋白质的活性的化合物包括例如预防上述疾病。·可用作治疗剂等 [选择图]无

