

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2005-160480

(P2005-160480A)

(43) 公開日 平成17年6月23日(2005.6.23)

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	Z N A A 2 G O 4 5
C O 7 K 14/705	C O 7 K 14/705	4 B O 2 4
C O 7 K 16/28	C O 7 K 16/28	4 B O 6 3
C 1 2 N 1/15	C 1 2 N 1/15	4 B O 6 4
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/19	4 B O 6 5
審査請求 有 請求項の数 17 O L (全 82 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2004-340504 (P2004-340504)	(71) 出願人	500019948
(22) 出願日	平成16年11月25日 (2004.11.25)		シビア・ニューロサイエンス・インコーポレイテッド
(62) 分割の表示	特願2003-362046 (P2003-362046) の分割		アメリカ合衆国92037-4641カリフォルニア州ラ・ホラ、コースト・ブールバード・サウス505番、スウィート300
原出願日	平成6年6月3日 (1994.6.3)	(74) 代理人	100066692
(31) 優先権主張番号	08/072,574		弁理士 浅村 皓
(32) 優先日	平成5年6月4日 (1993.6.4)	(74) 代理人	100072040
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 浅村 肇
		(74) 代理人	100088926
			弁理士 長沼 暉夫
		(74) 代理人	100102897
			弁理士 池田 幸弘
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 ヒトメタボトロピックグルタミン酸受容体、これをコードする核酸およびその用途

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】ヒトメタボトロピックグルタミン酸受容体蛋白サブタイプ2および5をコードする核酸、およびこれにコードされる蛋白の提供。

【解決手段】ヒトメタボトロピックグルタミン酸受容体のm G l u R 2およびm G l u R 5のサブタイプをコードする。これらの核酸はメタボトロピックグルタミン酸受容体サブタイプの産生に有用である以外に、プローブとしても有用であり、従って当業者は不要な実験をすることなく、関連する受容体サブユニットを同定し単離することが可能である。また、新規のメタボトロピックグルタミン酸受容体蛋白サブタイプを開示する以外に、このような受容体の機能に影響を与える化合物（例えば、グルタミン酸受容体機能のアゴニスト、アンタゴニスト、およびモジュレーター（活性調節因子））を同定し性状解析するための、このような受容体サブタイプの使用。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下の (a) または (b) から選択されることを特徴とする単離された DNA :

(a) 配列番号 3 に記載の全コード領域を有する DNA、

(b) 配列番号 3 に記載の全コード領域を有する DNA と相補的な塩基配列からなる DNA と、高緊縮性条件下でハイブリダイズし、かつヒトメタボトロピックグルタミン酸受容体サブタイプ 2 (ヒト m G l u R 2) としての活性を有する蛋白をコードする DNA。

【請求項 2】

以下の (a) または (b) の蛋白をコードすることを特徴とする単離された DNA :

(a) 配列番号 4 に記載のアミノ酸配列を有する蛋白、

(b) 配列番号 4 に記載のアミノ酸配列において、1 または数個のアミノ酸を欠失、置換および/または付加して (a) の蛋白から得られ、ヒトメタボトロピックグルタミン酸受容体サブタイプ 2 (ヒト m G l u R 2) としての活性を有する蛋白。

10

【請求項 3】

以下の (a) または (b) から選択されることを特徴とする単離された DNA :

(a) 配列番号 7 に記載の全コード領域を有する DNA

(b) 配列番号 7 に記載の全コード領域を有する DNA と相補的な塩基配列からなる DNA と、高緊縮性条件下でハイブリダイズし、かつヒトメタボトロピックグルタミン酸受容体サブタイプ 5 (ヒト m G l u R 5) としての活性を有する蛋白をコードする DNA。

【請求項 4】

以下の (a) または (b) の蛋白をコードすることを特徴とする単離された DNA :

(a) 配列番号 8 に記載のアミノ酸配列からなる蛋白

(b) 配列番号 8 に記載のアミノ酸配列において、1 または数個のアミノ酸を欠失、置換および/または付加して (a) の蛋白から得られ、ヒトメタボトロピックグルタミン酸受容体サブタイプ 5 (ヒト m G l u R 5) としての活性を有する蛋白。

20

【請求項 5】

請求項 1 から 4 のいずれか 1 項に記載の DNA によりコードされる単離された蛋白。

【請求項 6】

請求項 1 から 4 のいずれか 1 項に記載の DNA のうち、少なくとも 14 の連続する塩基、またはその相補的な塩基よりなる、核酸プローブ。

30

【請求項 7】

請求項 1 から 4 のいずれか 1 項に記載の DNA に相補的な単離された mRNA。

【請求項 8】

請求項 1 から 4 のいずれか 1 項に記載の DNA を含有する真核細胞。

【請求項 9】

請求項 1 から 4 のいずれか 1 項に記載の DNA を発現する真核細胞。

【請求項 10】

請求項 7 に記載の mRNA を発現する両生類卵母細胞。

【請求項 11】

ヒトメタボトロピックグルタミン酸受容体サブタイプ 2 (ヒト m G l u R 2) 又はヒトメタボトロピックグルタミン酸受容体サブタイプ 5 (ヒト m G l u R 5) をコードする DNA の同定方法であって、

40

請求項 6 に記載の核酸プローブと、ヒト DNA を、該核酸プローブがポリ核酸断片の時は低緊縮性ハイブリダイゼーション条件から中緊縮性ハイブリダイゼーション条件下で、該核酸プローブがオリゴヌクレオチドの時は高緊縮性ハイブリダイゼーション条件下で、接触させて、該プローブにハイブリダイズする DNA を同定することを特徴とする DNA の同定方法。

【請求項 12】

競合的結合測定法において、請求項 5 に記載の蛋白を用いることを特徴とする、ヒトメタボトロピックグルタミン酸受容体サブタイプ 2 (ヒト m G l u R 2) 又はヒトメタボ

50

ロピックグルタミン酸受容体サブタイプ 5 (ヒト mGluR 5) に結合する化合物の同定方法。

【請求項 13】

ヒトメタボトロピックグルタミン酸受容体サブタイプ 2 (ヒト mGluR 2) 又はヒトメタボトロピックグルタミン酸受容体サブタイプ 5 (ヒト mGluR 5) の活性を調節する化合物を同定するための生物学的測定法であって、

(a) 請求項 9 に記載の真核細胞を、受容体サブタイプの第二メッセンジャー活性の調節能力を測定すべき少なくとも 1 つの化合物に暴露させ、

(b) その後、該第二メッセンジャー活性の変化について該真核細胞を追跡することを特徴とする生物学的測定法。

10

【請求項 14】

ヒトメタボトロピックグルタミン酸受容体を、請求の範囲第 13 項に記載の生物測定法により同定される少なくとも 1 つの化合物に、該化合物が有効量存在する状態で接触させることを特徴とする、ヒトメタボトロピックグルタミン酸受容体サブタイプの第二メッセンジャー活性の調節方法。

【請求項 15】

請求項 5 に記載の蛋白またはその免疫原性を発現する部位に対する抗体。

【請求項 16】

該抗体はモノクローナル抗体である、請求項 15 に記載の抗体。

【請求項 17】

ヒトメタボトロピックグルタミン酸受容体を、請求項 16 項に記載のモノクローナル抗体に、該抗体が有効量存在する状態で接触させることよりなる、ヒトメタボトロピックグルタミン酸受容体サブタイプの第二メッセンジャー活性の調節方法。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、核酸とこれによりコードされる受容体蛋白に関する。本発明の核酸は、新規のヒトメタボトロピック (metabotropic) グルタミン酸受容体サブタイプをコードする核酸に関する。本発明はまたこのような受容体サブタイプの作成方法、およびこのような受容体の機能に影響を与える化合物 (例えば、アゴニスト、アンタゴニスト、およびヒトメタボトロピックグルタミン酸受容体のアロステリックモジュレーター) の同定および性状解析のための受容体蛋白の使用方法に関する。

30

【背景技術】

【0002】

アミノ酸の L - グルタミン酸は、哺乳動物の中樞神経系の主要な興奮性神経伝達物質である。解剖学的、生化学的および電気生理学的分析は、グルタミン酸産生系が広範囲のニューロン作用過程 (例えば、急速な興奮性シナプス伝達、神経伝達物質放出の制御、長期増強、学習および記憶、成長性シナプス可塑性、低酸素性虚血傷害およびニューロン細胞の死、てんかん様発作、およびいくつかの神経変性障害の病変性) に関与していることを示唆している。一般的には、モナガン (Monaghan) ら、Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. , 29 : 365 - 402 (1980) を参照。この広範囲の機能 (特に学習、神経毒性および神経病理に関する機能) のために、近年グルタミン酸の作用機構を説明し規定しようという研究が始まった。

40

【0003】

現在グルタミン酸受容体の分類の概要は、薬理学的基準に基づいている。グルタミン酸は、2 つの主要な受容体 (イオノトロピック (ionotropic) 受容体とメタボトロピック (metabotropic) 受容体) に分類されている受容体を介してその作用を媒介することが認められている。イオノトロピックグルタミン酸受容体は、完全な陽イオン特異的、リガンドゲート (ligand-gated) のイオンチャネルを含有し、メタボトロピックグルタミン酸受容体は、細胞内第二メッセンジャー系の活性化を介して細胞外シグナルを変換する G 蛋白結

50

合受容体である。イオノトロピック受容体は、受容体の薬理学的および機能的性質に基づきさらに少なくとも2つの範疇に分類されている。その2つの主要な型のイオノトロピック受容体は、NMDA (N-メチル-D-アスパラギン酸) 受容体とカイニン酸 (KA) / AMPA (α -アミノ-3-ヒドロキシ-5-メチル-4-イソキサゾールプロピオン酸) (以前はキスカル酸、すなわちQUISと呼ばれていた) 受容体である。メタボトロピック受容体はイオノトロピックグルタミン酸受容体が結合するリガンドと同じリガンドのいくつかに結合するが、メタボトロピック受容体はGTP-結合蛋白および第二メッセンジャー (例えば、サイクリックAMP、サイクリックGMP、ジアシルグリセロール、イノシトール1, 4, 5-三リン酸およびカルシウム) を介してシナプスの生理機能を変更させる [例えば、グンデルセン (Gundersen) ら、Proc. R. Soc. London Ser. 221 : 127 (1984) ; スラデツェック (Sladeczek) ら、Nature 317 : 717 (1985) ; ニコレッティ (Nicoletti) ら、J. Neurosci. 6 : 1905 (1986) ; スギヤマ (Sugiyama) ら、Nature 325 : 531 (1987)]。

10

20

30

40

50

【0004】

メタボトロピックグルタミン酸受容体の電気生理学および薬理学的性質は、受容体供給源として動物組織や細胞株、および非ヒト組換え受容体を用いて研究されている。ヒトの治療薬開発へのそのような研究の意義は、ヒトでない受容体サブユニットのみしか入手できないことにより限定されている。さらに、メタボトロピックグルタミン酸受容体の特性や構造が分子レベルで研究され出したのはつい最近である。しかしこのような研究は、ヒト以外の種でのみ行われている。メタボトロピックグルタミン酸受容体の生理学および病理学的重要性の可能性により、グルタミン酸受容体の種々のクラスの代表的メンバーをコードするヒトの配列 (すなわち、DNA、RNA、蛋白) が利用 (例えば、薬剤スクリーニング測定法のために) できることが必要である。そのようなヒトの配列が入手できれば、ヒトでの受容体の分布の研究、特定の受容体の修飾と種々の疾患の発生の関係の研究も可能になるであろう。

【非特許文献1】グンデルセン (Gundersen) ら、Proc. R. Soc. London Ser. 221 : 127 (1984)

【非特許文献2】スラデツェック (Sladeczek) ら、Nature 317 : 717 (1985)

【非特許文献3】ニコレッティ (Nicoletti) ら、J. Neurosci. 6 : 1905 (1986)

【非特許文献4】スギヤマ (Sugiyama) ら、Nature 325 : 531 (1987)

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0005】

(本発明の概要)

本発明は、ヒトメタボトロピックグルタミン酸受容体蛋白サブタイプをコードする新規の核酸、およびこれにコードされる蛋白を開示する。具体的な実施態様において、新規の核酸は、ヒトメタボトロピックグルタミン酸受容体の全長mGluR1、mGluR2、mGluR3およびmGluR5サブタイプまたはその一部をコードする。これらの核酸はメタボトロピックグルタミン酸受容体サブタイプ蛋白の産生に有用である以外に、プローブとしても有用であり、従って当業者は不要な実験をすることなく、関連する受容体サブタイプをコードする核酸を同定し単離することが可能である。

【0006】

本発明は、新規のメタボトロピックグルタミン酸受容体蛋白サブタイプを開示する以外に、このような受容体に影響を与える化合物 (例えば、グルタミン酸受容体機能のアゴニスト、アンタゴニスト、およびモジュレーター (活性調節因子)) を同定し性状解析するための、このような受容体サブタイプの使用方法を包含する。また本発明は、未知の蛋白がメタボトロピックグルタミン酸受容体サブタイプとして機能するか否かを測定する方法を包含する。

【 0 0 0 7 】

(本発明の詳細な説明)

本発明において、ヒトメタボトロピックグルタミン酸受容体サブタイプをコードする単離された核酸が提供される。本発明の1つの面において、m G l u R 1サブタイプのヒトメタボトロピックグルタミン酸受容体サブタイプをコードする核酸が提供される。別の面において、m G l u R 2サブタイプのメタボトロピックグルタミン酸受容体の少なくとも1部分をコードする核酸が提供される。さらに別の面において、m G l u R 3サブタイプのメタボトロピックグルタミン酸受容体をコードする核酸が提供される。さらなる面において、m G l u R 5サブタイプのメタボトロピックグルタミン酸受容体をコードする核酸が提供される。さらに別の面において、そのような核酸を含有する真核細胞、およびそのような核酸を発現する真核細胞が提供される。

10

【 0 0 0 8 】

また前述の核酸によりコードされる蛋白、および該蛋白に対して産生される抗体が提供される。本発明の別の面において、上記核酸のメタボトロピックグルタミン酸受容体サブタイプ - 選択性部分よりなる核酸プローブが提供される。

【 0 0 0 9 】

本明細書において、「ヒトメタボトロピックグルタミン酸受容体サブタイプ」とは、グルタミン酸産生リガンドに対する細胞のG - 蛋白結合応答に参加する、単離されたおよび/または精製された蛋白を意味する。このような受容体サブタイプは、他のメタボトロピックグルタミン酸受容体サブタイプをコードしない別々の遺伝子により個々にコードされる(すなわち、各サブタイプはユニークな遺伝子によりコードされる)。このような受容体サブタイプの典型的な特徴は、7つの推定されるトランスメンブレンドメインと、その前に大きな推定される細胞外アミノ末端ドメインと、その後大きな推定される細胞内カルボキシ末端ドメインを有することである。メタボトロピックグルタミン酸受容体は、基本的にメタボトロピックグルタミン酸受容体でない他のG蛋白結合受容体と全くアミノ酸配列相同性を有さない。

20

【 0 0 1 0 】

メタボトロピックグルタミン酸受容体サブタイプの各々の間の関係に関して、m G l u R 1受容体サブタイプのアミノ酸配列は一般に、他のヒトメタボトロピックグルタミン酸受容体サブタイプのアミノ酸配列との同一性は約70%未満であり、典型的に観察される同一性は45%未満である。m G l u R 2受容体サブタイプのアミノ酸配列は一般に、他のヒトメタボトロピックグルタミン酸受容体サブタイプのアミノ酸配列との同一性は約60%未満であり、典型的に観察される同一性は45%未満である。m G l u R 3受容体サブタイプのアミノ酸配列は一般に、他のヒトメタボトロピックグルタミン酸受容体サブタイプのアミノ酸配列との同一性は約60%未満であり、典型的に観察される同一性は45%未満である。m G l u R 5受容体サブタイプのアミノ酸配列は一般に、他のヒトメタボトロピックグルタミン酸受容体サブタイプのアミノ酸配列との同一性は約70%未満であり、典型的に観察される同一性は45%未満である。

30

【 0 0 1 1 】

上記定義に含まれるものは、一次転写体の別のスプライシングにより産生されるm R N Aによりコードされる変種、および上記の生理学および/または物理的性質の1つまたはそれ以上を有するその断片である。

40

【 0 0 1 2 】

本明細書および請求の範囲において、DNA、RNA、ポリペプチドまたは蛋白の修飾物質としての「単離される」、「純粋な」という用語は、このように呼ばれるDNA、RNA、ポリペプチドまたは蛋白はヒトの手によりそのような形で産生され、従ってその本来のインビボの細胞環境からは分離されていることを示す。このヒトの介入による結果、本発明の組換えDNA、RNA、ポリペプチドおよび蛋白は、天然に存在するDNA、RNA、ポリペプチドまたは蛋白では役に立たないような方法(例えば、選択的薬剤または化合物の同定)において有用である。

50

【 0 0 1 3 】

本発明の受容体蛋白の修飾物質として使用される時、「機能性」とは、グルタミン酸産生関連リガンド（例えば A C P D または A C P D 様リガンド、Q U I S、A P 4 など）に受容体蛋白に結合すると、G 蛋白との受容体の相互作用を修飾し、これは細胞内第 2 メッセンジャーのレベルに影響を与え、種々の生理学的作用を引き起こす。言い換えると「機能性」とは、受容体蛋白のアゴニスト活性化の結果として応答が産生されることを意味する。

【 0 0 1 4 】

本明細書においてスプライス変種とは、ゲノム D N A の一次転写体の差別的処理により産生され、その結果 2 つ以上の型の m R N A の産生に至る、変種メタボトロピックグルタミン酸受容体サブタイプをコードする核酸を意味する。差別的に処理された一次転写体から得られる c D N A は、アミノ酸が完全に同一の領域と、異なるアミノ酸配列を有する領域を有する、メタボトロピックグルタミン酸受容体サブタイプをコードするであろう。すなわち同じゲノム配列から、多数の関連する m R N A や蛋白が得られる。得られる m R N A や蛋白はいずれも本明細書では「スプライス変種」と呼ぶ。

10

【 0 0 1 5 】

従って、前記で定義したメタボトロピックグルタミン酸受容体サブタイプをコードするが、遺伝コードの縮重のため特定のハイブリダイゼーション条件下で開示された核酸に必ずしもハイブリダイズしない核酸も、本発明の範囲内にあると考えられる。本明細書に記載の方法または当業者に公知の方法により評価すると、そのようなサブタイプもまた、機能性受容体を形成する。典型的には、メタボトロピックグルタミン酸受容体サブタイプが代替スプライシングにより得られる R N A にコードされない（すなわち、スプライス変種）なら、メタボトロピックグルタミン酸受容体サブタイプをコードする核酸とこれによりコードされるメタボトロピックグルタミン酸受容体蛋白は、本明細書に記載の少なくとも 1 つのメタボトロピックグルタミン酸受容体サブタイプ核酸（およびこれによりコードされる蛋白）と実質的な配列相同性を有する。スプライス変種をコードする D N A または R N A は、本明細書で提供される D N A または R N A との配列全体の相同性は 9 0 % 未満であるが、本明細書中の D N A 断片とほとんど 1 0 0 % の相同性を有する領域を含有し、開始コドンおよび停止コドンを含むオープンリーディングフレームをコードし、機能性メタボトロピックグルタミン酸受容体サブタイプをコードすることを理解すべきである。

20

30

【 0 0 1 6 】

ヒト m G l u R 1 サブタイプをコードする D N A 配列の例は、配列番号 2 に記載されるものと実質的に同じアミノ酸配列をコードするヌクレオチドにより示される。現在好適な配列は、配列番号 2 に示されるアミノ酸配列をコードする。

【 0 0 1 7 】

別の D N A の例は、ヒト m G l u R 1 サブタイプをコードし、高緊縮性条件下で配列番号 1 の実質的に配列全体、またはその大部分（すなわち、典型的には少なくともその 2 5 - 3 0 個の隣接ヌクレオチド）にハイブリダイズするヌクレオチドであることが特徴である。

40

【 0 0 1 8 】

本明細書において、ハイブリダイゼーションの緊縮性とは、ポリ核酸ハイブリッドが安定である条件を意味する。当業者に公知なように、ハイブリッドの安定性はハイブリッドの融点（ T_m ）に反映される。

【 0 0 1 9 】

T_m は、

$$\text{式： } 81.5 - 16.6 (\log_{10} [Na^+]) + 0.41 (\% G + C) - 600 / l$$

（式中、 l はヌクレオチド中のハイブリッドの長さである）により近似的に表される。

【 0 0 2 0 】

配列の相同性が 1 % 減少する毎に、 T_m は約 1 - 1.5 低下する。一般にハイブリッドの安定性は、ナトリウムイオン濃度と温度の関数である。典型的には、ハイブリダイゼ

50

ーション反応を低緊縮性条件下で行い、次に種々の（ただし、より高い緊縮性の）条件下で洗浄する。ハイブリダイゼーション緊縮性は、このような洗浄条件に関する。

【0021】

すなわち、本明細書において、

（１）断片のハイブリダイゼーションに関して、高緊縮性条件とは、65 で0.018 MのNaCl中で安定なハイブリッドを形成する核酸配列のみのハイブリダイゼーションを可能にする条件を意味する（すなわち、本明細書で企図されるように、もしハイブリッドが65 で0.018 MのNaCl中で安定でない場合、高緊縮性条件下で安定ではないであろう）。高緊縮性条件は、例えば50%ホルムアミド、5×デンハルト（Denhart's）溶液、5×SSPE、0.2%SDS中で42 でハイブリダイゼーションし、次に65 で0.1×SSPE、そして0.1%SDSによる洗浄により提供される。

10

（２）断片のハイブリダイゼーションに関して、中緊縮性条件とは、42 で50%ホルムアミド、5×デンハルト溶液、5×SSPE、0.2%SDS中でハイブリダイゼーションし、次に65 で0.2×SSPE、そして0.2%SDSによる洗浄と同等の条件を意味する。

（３）断片のハイブリダイゼーションに関して、低緊縮性条件とは、42 で10%ホルムアミド、5×デンハルト溶液、6×SSPE、0.2%SDS中でハイブリダイゼーションし、次に50 で1×SSPE、そして0.2%SDSによる洗浄と同等の条件を意味する。そして、

（４）オリゴヌクレオチド（すなわち、長さが約30ヌクレオチド以下の合成DNA）に関して、高緊縮性条件とは、42 で10%ホルムアミド、5×デンハルト溶液、6×SSPE、0.2%SDS中でハイブリダイゼーションし、次に50 で1×SSPE、そして0.2%SDSによる洗浄に等しい条件を意味する。

20

【0022】

種々の緩衝液や温度を用いてこれらの条件を再現することができ、これらは必ずしも正確である必要はないことを理解すべきである。

【0023】

デンハルト溶液およびSSPE（例えば、サムブルーク、フリッチ、およびマニアチス（Sambrook, Fritsch, and Maniatis）、モレキュラークロニング、実験室マニュアル（Molecular Cloning, A Laboratory Manual）、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー・プレス（Cold Spring Harbor Laboratory Press）、1989）は、他の適当なハイブリダイゼーション緩衝液と同様に、当業者に公知である。例えば、SSPEはpH 7.4のリン酸緩衝化された0.18 MのNaClである。SSPEは例えば、175.3 gのNaCl、27.6 gのNaH₂PO₄および7.4 gのEDTAを800 mlの水に溶解しpHを7.4に調整して、次に1リットルになるように水を加えて20×保存溶液として調製することができる。デンハルト溶液（デンハルト（Denhart）（1966）Biochem. Biophys. Res. Commun. 23: 641を参照）は、例えば5 gのFicoll（タイプ400、ファルマシアLKBバイオテクノロジー社（Pharmacia LKB Biotechnology, INC.）、ピスカタウェイ（Piscataway）、ニュージャージー州）、5 gのポリビニルピロリドン、5 gのウシ血清アルブミン（第5画分；シグマ（Sigma）、セントルイス、ミズーリ州）、そして水を500 mlになるように加え、濾過して粒状物質を除去することにより、50×保存溶液として調製することができる。

30

40

【0024】

ヒトmGluR1サブタイプをコードする特に好適な配列は、配列番号1と実質的に同じヌクレオチド配列を有するものであり、配列番号1のコーディング配列と実質的に同じ配列を有するポリ核酸が特に好ましい。

【0025】

本明細書において、「実質的な配列相同性」とは、少なくとも約90%の相同性を有するヌクレオチド配列、そして典型的には95%以上のアミノ酸の同一性を有するヌクレオチド配列を意味する。しかし、スプライス変種であること、または保存的アミノ酸置換（

50

または縮重コドンの置換)により修飾されているため、前記レベルより低い相同性を有する蛋白(およびこのような蛋白をコードするDNAまたはmRNA)は、本発明の範囲内にあることを理解すべきである。

【0026】

本明細書において、「実質的に同じ」とは、本明細書に記載の実際の配列とはわずかに異なるかまたは重大でない配列の変化を有する、DNAのヌクレオチド配列、RNAのリボヌクレオチド配列、または蛋白のアミノ酸配列を意味する。実質的に同じ分子種は、開示された配列と同等であると考えられ、従って本発明の請求の範囲に包含されと考えられる。この点で「わずかに異なるかまたは重大でない配列の変化」は、開示され、特許請求のされているDNA、RNA、または蛋白と実質的に同じ配列が、開示され特許請求のされているヒト由来の配列と機能的に同等であることを意味する。機能的に同等の配列は、実質的に同じ方法で機能して、ヒト由来の核酸および本明細書に開示され特許請求されているアミノ酸組成物と実質的に同じ組成物を産生する。特に機能的に同じDNAは、本明細書に開示されたものと同じであるか、または保存性のアミノ酸変化(例えば非極性残基を別の非極性残基で置換、または荷電残基を類似の荷電残基で置換)を有するものと実質的に同じヒト由来の蛋白をコードする。これらの変化には、当業者に認識される、蛋白の3次元構造を実質的に変化させないものが含まれる。

10

【0027】

ヒトmGluR2受容体サブタイプの一部をコードするDNA配列の例は、配列番号4に記載のものと実質的に同じアミノ酸配列をコードするヌクレオチド(随時、配列番号13に記載の3'非翻訳配列の343ヌクレオチドの一部またはすべてを含む)、またはクローンMETAB40(1993年5月4日に整理番号75465でアメリカンタイプカルチャーコレクション(ATCC)に寄託された)のヒトmGluR2をコードする部分によりコードされるものと実質的に同じアミノ酸配列をコードするヌクレオチドにより示される。

20

【0028】

寄託されたクローンは、1993年5月4日に「特許手続上の微生物の寄託の国際的承認に関するブダペスト条約」(the Budapest Treaty on the International Recognition of Deposits of Microorganisms for Purposes of Patent Procedure)の条件と、この条約の名のもとに公布された規則に従い、アメリカンタイプカルチャーコレクション(ATCC)(12301パークローンドライブ(Parklawn Drive)、ロックヴィル(Rockville)、メリーランド州、アメリカ合衆国20852)に寄託されている。この条約と規則の条件下で、およびさもなくばアメリカ合衆国の特許法や規則に従い受領する法的資格のある工業所有権事務所および他の個人、または本出願または本出願の優先権を主張する出願が提出されたかまたはこのような出願に対して何らかの特許権が与えられた国または国際組織は、寄託された物質の試料を入手することができる。特にこれに基づきまたはこの優先権を主張する出願またはこれに関する出願を取り込んでいる出願に基づき米国特許の与えられた時点で、本寄託物質の入手に関するすべての規制は永久に取り消されるであろう。

30

【0029】

ヒトmGluR2受容体サブタイプの一部をコードする好適なポリ核酸配列は、配列番号4に記載のものと実質的に同じアミノ酸配列、またはクローンMETAB40(1993年5月4日に整理番号75465でアメリカンタイプカルチャーコレクション(ATCC)に寄託された)のヒトmGluR2をコードする部分によりコードされるものと実質的に同じアミノ酸配列をコードするものである。

40

【0030】

あるいはDNAの例は、ヒトmGluR2受容体サブタイプをコードするヌクレオチド配列であり、高緊縮性条件下で配列番号3またはその大部分(すなわち、典型的にはその少なくとも25-30個の隣接ヌクレオチド)、またはクローンMETAB40(ATCC整理番号75465)のヒトmGluR2をコードする部分とまたはその大部分とハイ

50

ブリダイズするヌクレオチド配列として特徴付けられる。ヒトmG1uR2受容体サブタイプの部分をコードする特に好適な配列は、配列番号3のコーディング配列と同じヌクレオチド配列、またはクローンMETAB40のヒトmG1uR2コーディング部分中のコーディング配列のヌクレオチド配列を有するポリ核酸により示される。

【0031】

ヒトmG1uR3受容体サブタイプをコードするDNA配列の例は、配列番号6に記載のアミノ酸配列と実質的に同じアミノ酸配列をコードするヌクレオチドにより示される。好適なポリ核酸配列は、配列番号6と同じ配列をコードするものである。

【0032】

あるいはDNAの例は、ヒトmG1uR3受容体サブタイプをコードするヌクレオチド配列であり、高緊縮性条件下で配列番号5またはその大部分（すなわち、典型的にはその少なくとも25 - 30個の隣接ヌクレオチド）とハイブリダイズするヌクレオチド配列として特徴付けられる。ヒトmG1uR3サブタイプの部分をコードする特に好適な配列は、配列番号5のコーディング配列と実質的に同じヌクレオチド配列を有するものであり、配列番号5のコーディング配列と同じヌクレオチド配列を有するポリ核酸が最も好ましい。

10

【0033】

DNAの例は、ヒトmG1uR3受容体サブタイプまたはその部分をコードするヌクレオチド配列であり、配列番号8、10または12のアミノ酸配列と実質的に同じアミノ酸配列をコードするヌクレオチドにより示される。好適なポリ核酸配列は、配列番号8、10または12と同じ配列をコードするものである。

20

【0034】

あるいはDNAの例は、ヒトmG1uR5受容体サブタイプをコードするヌクレオチド配列であり、高緊縮性条件下で配列番号7、9または11の実質的に全配列、またはそれらの大部分（すなわち、典型的には少なくとも25 - 30個の隣接ヌクレオチド）にハイブリダイズするヌクレオチドとして特徴付けられる。ヒトmG1uR5サブタイプをコードする特に好適な配列は、配列番号7、9または11のコーディング配列と実質的に同じヌクレオチド配列を有するものであり、配列番号7、9または11のコーディング配列と同じ配列を有するポリ核酸が最も好ましい。

【0035】

ヒトメタボトロピックグルタミン酸受容体サブタイプをコードするDNAは、本明細書に開示したDNA（配列番号1、3、5、7、9または11の任意のものより得られるヌクレオチドを含む）により、適当なハイブリダイゼーション条件下で適当なヒトcDNAまたはヒトゲノムライブラリーをスクリーニングすることにより単離される。適当なライブラリーは、神経組織試料（例えば、海馬や小脳組織、細胞株など）から調製される。例えばライブラリーは、その実質的に全ての受容体サブタイプコーディング配列を含むDNAの一部を用いてスクリーニングされるか、あるいはそのDNAの一部に基づく適当なオリゴヌクレオチドプローブでスクリーニングされる。

30

【0036】

本明細書においてプローブは、配列番号1、3、5、7、9または11に記載の任意のものの25またはそれ以上の隣接する塩基と同じであるか少なくとも約25 - 30個の隣接する塩基（またはその相補物）を含む、ヌクレオチドの配列を有する1本鎖DNAまたはRNAである。プローブを作成するのに好適な領域は、5'および/または3'コーディング配列、トランスメンブレンドメインをコードすると予測される配列、細胞質ループをコードすると予測される配列、シグナル配列、リガンド結合部位などがある。

40

【0037】

全長cDNAクローン、その断片、またはそのDNAの部分に基づくオリゴヌクレオチドはプローブとして使用され、好ましくは容易に検出するために適当な標識物で標識される。断片がプローブとして使用される時、そのプローブのDNA配列は好ましくはDNAのカルボキシ末端をコードする部分由来であり、最も好ましくはDNA配列の予測される

50

トランスメンブレンドメインをコードする部分を含む（ドメインは、例えばカイトとドールトル（Kyte and Doolittle）（1982）、J. Mol. Biol. 第157巻：105の方法を用いて、推定されるアミノ酸配列のハイドロパシー解析に基づき予測される）。これらのプローブは例えば、グルタミン酸受容体ファミリーの追加メンバーの同定と単離のために使用される。

【0038】

本発明の配列の特定の応用として、本発明のヌクレオチド配列をプローブとして使用して遺伝子スクリーニングを実施することができる。すなわち、任意の内因性グルタミン酸受容体に異常が存在するか否かを測定するために、グルタミン酸受容体の任意の1つまたはそれ以上の変化／修飾が関与していることが疑われる神経病理的症候を有する患者の核酸試料を、適当なプローブでスクリーニングすることができる。同様に、グルタミン酸受容体の機能不全に関連する疾患の家族歴がある患者をスクリーニングして、このような疾患に罹りやすい体質であるか否かを決定することができる。

10

【0039】

本発明の別の実施態様において、ヒトメタボトロピックグルタミン酸受容体蛋白サブタイプをコードするDNAの同定方法が提供され、この方法は、ヒトDNAを上記の核酸プローブと接触させ（使用されるプローブがポリ核酸断片の時は低緊縮性または中緊縮性条件下で接触させ、または使用されるプローブがオリゴヌクレオチドの時は高緊縮性条件下で接触させる）、そして該プローブにハイブリダイズするDNAを同定することよりなる。

20

【0040】

ライブラリーのスクリーニング後、ハイブリダイゼーションシグナルを検出して陽性クローンを同定する。同定されたクローンを制限酵素マッピングおよび／またはDNA配列解析により性状解析し、次にこれらが完全なメタボトロピックグルタミン酸受容体サブタイプをコードするDNAを含有するか否か（すなわち、これらが翻訳開始コドンおよび停止コドンを含むか）を確認するために本明細書に記載の配列と比較することにより試験する。選択された配列が不完全な場合はこれらを用いて、同じかまたは異なるライブラリーを再スクリーニングして重複するクローンを得ることができる。もしライブラリーがゲノム性の場合は、重複クローンはエクソンとイントロンを含むもよい。もしライブラリーがcDNAライブラリーの場合は、重複クローンはオープンリーディングフレームを含むであろう。いずれの場合も完全なクローンは、本明細書で提供されるDNAおよび推定されるアミノ酸配列と比較して同定される。

30

【0041】

種々のヒトメタボトロピックグルタミン酸受容体サブタイプ（例えば、mGluR1、mGluR2、mGluR3、mGluR5）をコードする、相補的なDNAクローンを単離されている。各サブタイプは、異なる遺伝子にコードされているようである。本明細書に記載されるDNAクローンは、各サブタイプをコードするゲノムクローンを単離し、異なる神経組織から調製されたライブラリーをスクリーニングすることにより、スプライス変種を単離するために使用できる。当業者に公知の核酸増幅法を使用して、ヒトメタボトロピックグルタミン酸受容体サブタイプのスプライス変種をコードするDNAを見つけることができる。これは、公知のまたは予測される互いに異なる配列を取り囲むDNA配列に基づくオリゴヌクレオチドを、ヒトRNAまたはゲノムDNAを増幅するためのプライマーとして用いることにより達成される。増幅生成物のサイズと配列の測定により、スプライス変種の存在が明らかになる。さらにハイブリダイゼーションによるヒトゲノムDNA配列の単離により、ヒトメタボトロピックグルタミン酸受容体サブタイプをコードする転写体の異なるスプライス変種に対応する、イントロンにより分離された多数のエクソンを含むDNAが得られる。

40

【0042】

必ずしもすべてのメタボトロピックグルタミン酸受容体サブタイプ（およびその変種）がすべての神経組織または脳のすべての部分に発現されているのではないことは、わかっ

50

ている。すなわち特定のサブタイプ（またはそのスプライス変種）をコードする cDNA を単離するためには、異なるニューロンまたは神経組織または細胞から調製されるライブラリーをスクリーニングすることが好ましい。各サブユニットをコードする DNA を得るために好適なライブラリーは：ヒト mGluR1 をコードする DNA を単離するための小脳；mGluR2 をコードする DNA を単離するための海馬；mGluR3 をコードする DNA を単離するための海馬と小脳；mGluR5 をコードする DNA を単離するための海馬と小脳などがある。

【0043】

特定の受容体サブタイプをコードする DNA が一旦単離されると、そのようなサブタイプ（またはそのスプライス変種）をコードする mRNA を発現する組織を決定するために、リボヌクレアーゼ（RNase）保護測定法が実施される。この測定法は、全細胞性 RNA の複雑な混合物中の 1 つの RNA 種を検出し定量するための高感度の手段を与える。サブタイプ DNA は標識され、細胞性 RNA とハイブリダイズされる。もし細胞性 RNA 中に相補的な mRNA が存在する場合、DNA-RNA ハイブリッドが得られる。次に RNA 試料を RNase で処理する（これは 1 本鎖 RNA を分解する）。RNA-DNA ハイブリッドは、RNase 分解から保護され、ゲル電気泳動やオートラジオグラフィにより肉眼で見ることができる。特定のメタボトロピックグルタミン酸受容体サブタイプをコードする mRNA を発現する組織を決定するために、in situ ハイブリダイゼーションを使用することができる。こうして、標識されたサブタイプ DNA は異なる脳の領域のスライスとハイブリダイズして、サブタイプ mRNA 発現が肉眼で見えるようになる。

【0044】

いくつかのヒトのメタボトロピックグルタミン酸受容体サブタイプの発現の分布は、この受容体のラットでの分布とは異なる。例えばラットの mGluR5 サブタイプをコードする RNA はラットの海馬に多く存在し、ラットの小脳にはあまり存在しない [例えば、アベ（Abe）ら、J. Biol. Chem. 267: 13361-13368 (1992) を参照] が、ヒトの小脳ライブラリーからは無数のヒト mGluR5 をコードする cDNA が得られている。すなわちヒトとラットではいくつかのメタボトロピックグルタミン酸受容体サブタイプの分布が異なっているようである。

【0045】

前述のヌクレオチド配列はベクターに取り込んでさらに操作することができる。本明細書においてベクター（またはプラスミド）とは、異種 DNA を細胞に取り込んでそれを発現または複製をさせるのに使用される、独立した成分である。このような担体（vehicle）の選択と使用は、当業者には公知である。

【0046】

発現ベクターとは、DNA 断片の発現を制御することができる制御配列（例えばプロモーター領域）に機能的に結合した DNA を発現することができるベクターを含む。すなわち発現ベクターとは、適当な宿主細胞内に取り込まれるとクローン化 DNA を発現する、組換え DNA または RNA 作成体（例えば、プラスミド、ファージ、組換えウイルスまたは他のベクター）を意味する。適当な発現ベクターは当業者に公知であり、真核細胞および/または原核細胞中で複製されるもの、およびエピソームとしてとどまるか宿主細胞ゲノム内に取り込まれるものも含まれる。真核生物の宿主細胞（特に哺乳動物細胞）中での本発明のメタボトロピックグルタミン酸受容体サブタイプの発現のために好適なプラスミドには、例えば、pCMV-T7-2、pCMV-T7-3（図1を参照）、p cDNA 1 などのサイトメガロウイルス（CMV）プロモーター含有ベクター、そして、SV40 プロモーター含有ベクター、および pMMTV T7 (+) または pMMTV T7 (-)（本明細書に記載のように調製された pMAMneo（クロンテク（Clontek）、パロアルト（Palo Alto）、カリフォルニア州）を修飾したもの）などの MMTV LTR プロモーター含有ベクターがある。

【0047】

10

20

30

40

50

本明細書において、プロモーター領域とは、そこに機能的に結合したDNAの転写を調節するDNAのセグメントを意味する。プロモーター領域は、RNAポリメラーゼによる認識、結合および転写の開始に十分な特異的配列を含有する。このプロモーター領域の部分をプロモーターと呼ぶ。さらにこのプロモーター領域は、このRNAポリメラーゼの認識、結合および転写開始を調節する配列を含む。これらの配列はcis作用性であるか、またはtrans活性化因子に対して応答する。制御の性質により、プロモーターは構成性(constitutive)であるかまたは制御されている。本発明の実施において使用されるプロモーターの例には、SV40早期プロモーター、サイトメガロウイルス(CMV)プロモーター、マウス乳癌ウイルス(MMTV)ステロイド誘導性プロモーター、モロニー(Moloney)マウス白血病ウイルス(MMLV)プロモーターなどがある。

10

【0048】

本明細書において、「機能的に結合している」とは、DNAとヌクレオチドの制御配列やエフェクター配列(例えばプロモーター、エンハンサー、転写および翻訳停止部位、および他のシグナル配列)との機能的関係を意味する。例えば、DNAとプロモーターの機能的結合は、DNAの転写はプロモーターを特異的に認識してこれに結合し、DNAを転写するRNAポリメラーゼによりプロモーターから開始されるような、DNAとプロモーターの間の物理的および機能的結合を意味する。発現および/またはインビトロの転写を最適化するために、転写または翻訳のレベルで発現を妨害するかまたは低下させる、不適当な代替翻訳開始コドンまたは他の配列を除去するために、クローンの5'および/または3'非翻訳部分を除去、付加または変更することが必要なこともある。あるいはコンセンサスリボゾーム結合部位(例えば、コザック(Kozak))(1991)J. Biol.Chem. 266:19867-19870)を開始コドンの5'のすぐ近くに挿入して、発現を増強させることもできる。同様に、転写を増強するために、メタボトロピックグルタミン酸受容体サブユニットのコーディング配列の代わりに同じアミノ酸をコードする代替コドンを用いることができる(例えば、宿主細胞のコドンの選択性が採用され、G-Cの豊富なドメインを減少させるなど)。さらに両生類の卵母細胞中のメタボトロピックグルタミン酸受容体サブユニットの発現増強の可能性のために、サブユニットコーディング配列を随時発現作成体中に取り込むことができる(ここではコーディング配列の5'末端と3'末端は、それぞれツメガエル(Xenopus)のβ-グロビン遺伝子の5'と3'の非翻訳配列に隣接している)。例えば、メタボトロピックグルタミン酸受容体サブユニットコーディング配列は、pSP64(プロメガ(Promega)、マジソン、ウィスコンシン州、より入手できる)の修飾型であるベクターpSP64Tに取り組むことができる(クリーグとメルトン(Krieg and Melton)(1984)Nucleic Acids Research 12:7057-7070を参照)。このコーディング配列は、β-グロビン遺伝子の5'末端とSP6プロモーターの下流に位置する3'非翻訳配列の間に挿入される。次に得られるベクターから、インビトロの転写体が作成される。このような修飾の好ましい点(またはニーズ)は実験的に決定されている。

20

30

本明細書において、発現とはポリ核酸がmRNAに転写され、ペプチド、ポリペプチドまたは蛋白に翻訳される過程を意味する。ポリ核酸がゲノムDNAから得られる場合、適当な真核生物宿主細胞または微生物が選択されるなら、発現にはmRNAのスプライシングを含む。

40

【0049】

哺乳動物細胞のトランスフェクションのための、ヒトメタボトロピックグルタミン酸受容体をコードするDNAに結合した制御成分を含有する特に好適な基礎ベクターは、サイトメガロウイルス(CMV)プロモーターをベースにしたベクター(例えば、pCMV-T7-2およびpCMV-T7-3(本明細書に記載)、またはpcDNA1(インビトロゲン(Invitrogen)、サンジエゴ、カリフォルニア州))、およびMMTVプロモーターをベースにしたベクター(例えば、pMMTV-T7(+)またはpMMTV-T7(-)(本明細書中に記載))、およびSV40プロモーターをベースにしたベクター(例えば、pSVβ(クロンテック(Clontech)、パロアルト(Palo Alto)、カリフォルニア州))

50

である。

【 0 0 5 0 】

ヒトメタボトロピックグルタミン酸受容体サブタイプをコードする全長DNAは、ベクターpMMTVT7(+)、pMMTVT7(-)、pCMV-T7-2またはpCMV-T7-3に挿入されている。pCMV-T7-2(およびpCMV-T7-3)は、CMVプロモーター/エンハンサー、プロモーターのすぐ下流に存在するSV40スプライス/ドナー部位、スプライス部位の下流に位置するT7バクテリオファージRNAポリメラーゼプロモーター、その後SV40ポリアデニル化シグナル、そしてT7プロモーターとポリアデニル化シグナルの間にポリリンカーを有する、pUC19をベースにした哺乳動物細胞発現ベクターである。CMVプロモーターとSV40ポリアデニル化シグナルの間にメタボトロピックグルタミン酸受容体サブタイプを配置させると、この作成体によりトランスフェクションされた哺乳動物の宿主細胞中で外来DNAの構成的発現(constitutive expression)が与えられる。

【 0 0 5 1 】

ベクターpMMTVT7(+)とpMMTVT7(-)はベクターpMAMneo(クロンテック(Clontech)、パロアルト(Palo Alto)、カリホルニア州)を修飾することにより調製された。pMAMneoは、デキサメタゾン誘導性マウス乳癌ウイルス(MMTV)-LTRプロモーターに結合した(この後にSV40スプライス部位とポリアデニル化部位が続く)ラウス肉腫ウイルス(RSV)の長い末端反復配列(LTR)を含有する、哺乳動物の発現ベクターである。pMAMneoはまた、大腸菌の増殖のためのβ-ラクタマーゼ遺伝子(アンピシリン耐性を与える蛋白をコードする)と同様に、形質転換体の選択のための大腸菌neo遺伝子を含有する。

【 0 0 5 2 】

ベクターpMMTVT7(+)は、pMAMneoからneo遺伝子を除去し、pBlue-script(ストラタジーン(Stratagene)、ラホイア(La Jolla)、カリホルニア州)からのマルチブルクローニング部位とT7およびT3プロモーターを挿入することにより作成される。従ってpMMTVT7(+)はMMTV-LTRプロモーターに結合したRSV-LTRエンハンサー、MMTV-LTRプロモーターの下流に位置するT7バクテリオファージRNAポリメラーゼプロモーター、T7プロモーターの下流に位置するポリリンカー、T7プロモーターの下流に位置するT3バクテリオファージRNAポリメラーゼプロモーター、そしてT3プロモーターの下流に位置するSV40スプライシング部位とポリアデニル化部位を含有する。pMAMneoからのβ-ラクタマーゼ遺伝子(アンピシリン耐性を与える蛋白をコードする)はpMMTVT7(+)中で保持されるが、pMAMneo中の配向に対して配向は逆転している。

【 0 0 5 3 】

ベクターpMMTVT7(-)はpMMTVT7(+)と同じであるが、T7プロモーターとT3プロモーターの位置が逆転しており、pMMTVT7(-)中のT3プロモーターはpMMTVT7(+)中のT7プロモーターがある場所に位置しており、pMMTVT7(-)中のT7プロモーターはpMMTVT7(+)中のT3プロモーターがある場所に位置している。従ってpMMTVT7(+)とpMMTVT7(-)ベクターは、哺乳動物宿主細胞中で異種DNA(ここで異種DNAはポリリンカーでベクター内に取り込まれている)が発現するのに必要な制御成分のすべてを含有している。さらにT7プロモーターとT3プロモーターはポリリンカーのどちらかの側に位置しているため、これらのプラスミドはポリリンカーでベクター内にサブクローニングされている異種DNAのインビトロ転写体の合成に使用することができる。

【 0 0 5 4 】

哺乳動物細胞中のヒトメタボトロピックグルタミン酸受容体サブタイプをコードするDNAの誘導性発現のために、DNAをpMMTVT7(+)またはpMMTVT7(-)のようなプラスミド中に挿入することができる。これらのプラスミドは、機能的に関連する外来DNAのステロイド誘導性発現のためのマウス乳癌ウイルス(MMTV)LTRプ

ロモーターを含有する。宿主細胞が細胞内への糖質コルチコイド（すなわちMMTVLTRプロモーターの誘導物質）の摂取に必要な内因性糖質コルチコイド受容体を発現しない場合は、糖質コルチコイド受容体をコードするDNA（ATCC整理番号67200）で細胞を追加的にトランスフェクションする必要がある。インビトロ転写体の合成のために、ヒトmGluR1、mGluR3、およびmGluR5をコードする全長ヒトDNAクローンを、pIBI24（インターナショナル・バイオテクノロジー社（International Biotechnologies, Inc.）、ニューヘーブン、コネチカット州）、pCMV-T7-2、pCMV-T7-3（図1参照）、pMMTVT7(+）、pMMTVT7(-）、pBluescript（ストラタジーン（Stratagene）、ラホイア（La Jolla）、カリフォルニア州）またはpGEM7Z（プロメガ（Promega）、マジソン、ウィスコンシン州）などの中にサブクローニングすることもできる。

10

【0055】

本発明の別の実施態様において、前述のポリ核酸（すなわちDNAまたはmRNA）を含有する細胞が提供される。細菌、酵母および哺乳動物のような宿主細胞は、DNAを複製しメタボトロピックグルタミン酸受容体サブタイプを産生するために使用することができる。本発明に記載の発現ベクターの作成、インビトロ転写体の調製、哺乳動物細胞へのDNAのトランスフェクション、卵母細胞の注入の方法、および受容体の発現と機能の評価のための電気生理的および他の分析方法は、PCT出願PCT/US91/05625とPCT/US92/11090、および同時係属出願米国特許出願第07/563,751号と07/812,254号にも記載されている。これらの文献の主題はその全体が

20

【0056】

適当な発現ベクターへのクローン化DNAの導入法、1つのプラスミドベクターまたはプラスミドベクターの組合せ（それぞれが1つまたはそれ以上の異なる遺伝子をコードする）または線状DNAによる真核細胞のトランスフェクション、そしてトランスフェクションした細胞の選択法は公知である（例えば、サムブルーク（Sambrook）ら、（1989）分子クローニング：実験室マニュアル（Molecular Cloning: A Laboratory Manual）、第2版、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー・プレス（Cold Spring Harbor Laboratory Press）を参照）。異種DNAは、当業者に公知の任意の方法により宿主細胞に導入される：例えば、CaPO₄沈殿法（例えば、ウィグラー（Wigler）ら、（1979）、Proc. Natl. Acad. Sci. 76: 1373-1376）を用いる、異種DNAをコードするベクターによるトランスフェクション。次に組換え細胞は、DNAによりコードされたサブタイプが発現される条件下で培養することができる。好適な細胞は哺乳動物細胞（例えば、HEK293、CHO、およびLtk⁻細胞）、酵母細胞（例えば、ピキア・パストリス（Pichia Pastoris）のようなメチル親和性（methilotrophic）酵母細胞）、細菌細胞（例えば大腸菌）などがある。

30

【0057】

本明細書で提供されるDNAは任意の真核細胞（例えば、ピキア・パストリス（Pichia Pastoris）（米国特許第4,882,279号、4,837,148号、4,929,555号および4,855,231号を参照）、サッカロミセス・セレビスシェ（Saccharomyces cerevisiae）、カンジダ・トロピカリス（Candida tropicalis）、ハンゼヌラ・ポリモルファ（Hansenula polymorpha）などの酵母細胞）中で発現されるが、本明細書で提供されるヒトメタボトロピックグルタミン酸受容体サブタイプをコードするDNAの発現のためには、G蛋白を発現する（内因性にまたは組換えで）市販の発現系や当業者に公知の他の発現系を含む哺乳動物発現系が好ましい。PI加水分解/Ca⁺⁺シグナル経路に結合したヒトメタボトロピック受容体サブタイプをコードするDNAのインビトロmRNA転写体の発現にはツノガエル（Xenopus）卵母細胞が好適である。卵母細胞中の内因性イノシトール3'末端リン酸第二メッセンジャー介在経路は、これらの細胞におけるヒトメタボトロピック受容体の機能性発現を可能にする。組換えヒトメタボトロピック受容体を発現する卵母細胞は、卵母細胞G蛋白結合IP₃生成経路を介してアゴニストに応答

40

50

し、内部の貯蔵状態から Ca^{++} を放出し、電圧固定記録法により遅延振動電流として検出される塩素チャネルを活性化すると報告されている。

【0058】

ヒトメタボトロピック受容体の機能性組換え発現のための宿主細胞は、好ましくは内因性または組換えグアニンヌクレオチド結合蛋白（すなわち G 蛋白）を発現する。G 蛋白は α 、 β および γ サブユニットよりなる高度に保存された膜関連蛋白のファミリーの 1 つである。 α サブユニットは G D P と G T P に結合し、異なる G 蛋白毎に異なる。結合した対の β および γ サブユニットはユニークであることもそうでないこともあり、異なる α 鎖が同じ β γ 対または異なる対に結合している [リンダーとギルマン (Linder and Gilman)、Sci. Am. 267: 56 - 65 (1992)]。G 蛋白 α 鎖をコードする 30 以上の異なる c D N A がクローン化されている [サイモン (Simon) ら、Science 252: 802 (1991)]。4 つの異なる β ポリペプチドが知られている [サイモン (Simon) ら、Science 252: 802 (1991)]。同定された 5 つの γ c D N A のうち 3 つがクローン化されている [ハーレー (Hurley) ら、PNAS U.S.A. 81: 6948 (1984) : ガウタム (Gautam) ら、Science 244: 971 (1989) : ガウタム (Gautam) ら、PNAS U.S.A. 87: 7973 (1990) :]。4 番目の γ c D N A [クレウス (Kleus) ら、Science 259: 832 (1993)] と 5 番目の γ c D N A [フィッシャーとアロンソン (Fischer and Aronson)、Mol. Cell. Bio. 12: 1585 (1992)] の配列は確立されており、さらに追加の γ サブユニットが存在するかも知れない [タミール (Tamir) ら、Biochemistry 30: 3929 (1991)]。グアニンヌクレオチド交換と G T P 加水分解により、G 蛋白は活性状態と不活性状態の間で変化する。不活性 G 蛋白は、リガンド活性化受容体により刺激されて G D P を G T P に交換する。活性型では、G T P に結合した α サブユニットは β γ 複合体から解離し、次にサブユニットは細胞性エフェクター分子と特異的に相互作用して細胞性応答を引き出す。異なる G 蛋白は異なるエフェクター系（例えば、ホスホリパーゼ C、アデニルサイ클ラーゼ系）や異なる受容体と相互作用することができるため、異なる組換えヒトメタ受容体サブタイプの発現のための異なる宿主細胞を研究することは有用である。あるいは宿主細胞は、異なる G 蛋白の異種発現のために G 蛋白サブユニットをコードする D N A でトランスフェクションすることができる。

10

20

30

【0059】

好適な実施態様において、ヒトメタボトロピックグルタミン酸受容体サブタイプをコードする D N A は、ベクターに結合され、適当な宿主細胞中に導入されて、特異的なヒトメタボトロピックグルタミン酸受容体サブタイプまたはサブタイプの特異的な組合せを発現する、形質転換された細胞株を産生する。得られる細胞株は次に、公知の薬剤または可能性のある薬剤の受容体機能への影響の再現性のある定量的解析のために大量に産生される。他の実施態様においては、各サブタイプをコードする D N A のインビトロ転写により m R N A が産生される。この m R N A（単一のサブタイプクローンからであってもまたはクローンの組合せからであっても）は、ツノガエル (Xenopus) 卵母細胞に注入され、ここで m R N A はヒトメタボトロピックグルタミン酸受容体サブタイプの合成を指令する。あるいは機能性ヒトメタボトロピックグルタミン酸受容体サブタイプの発現のために、サブタイプをコードする D N A は卵母細胞に直接注入される。次にトランスフェクションされた哺乳動物細胞または注入された卵母細胞は、本明細書に記載の薬剤スクリーニング法に使用される。

40

【0060】

D N A または R N A が導入される真核細胞は、このような D N A または R N A によりトランスフェクションされることができる細胞、またはこのような D N A または R N A を注入されて G 蛋白を（内因性にまたは組換えにより）発現することができる細胞である。好適な細胞は、内因性メタボトロピックグルタミン酸受容体を（あったとしても）ほんの少ししか発現せず、かつ一時的または安定にトランスフェクションされ、また本発明の D N A や R N A を発現するものである。最も好適な細胞は、異種 D N A によりコードされる 1

50

つまたはそれ以上のサブタイプよりなる組換えまたは異種ヒトメタボトロピックグルタミン酸受容体を形成することができるものである。このような細胞は経験的に同定されるか、または容易にトランスフェクションまたは注入されることが知られているものの中から選択される。

【0061】

DNAを導入するための細胞の例は、哺乳動物起源の細胞（例えば、COS細胞、マウスL細胞、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、ヒト胎児性腎（HEK）細胞、アフリカミドリザル（African green monkey）細胞および当業者に公知の他の細胞）、両生類の細胞（例えば、ゼノプス・ラエビス（*Xenopus laevis*）卵母細胞）、酵母細胞（例えば、サッカロミセス・セレビツシェ（*Saccharomyces cerevisiae*）、ピキア・パストリス（*Pichia Pastoris*））などがある。注入されたRNA転写体を発現するための細胞の例は、ゼノプス・ラエビス（*Xenopus laevis*）卵母細胞がある。DNAのトランスフェクションに好適な細胞は、当業者に公知であるかまたは経験的に同定され、HEK293細胞（整理番号#CRL1573でATCCより入手できる）；Ltk⁻細胞（整理番号#CCL1.3でATCCより入手できる）；COS-7細胞（整理番号#CRL1651でATCCより入手できる）；CHO細胞（整理番号#CRL9618、CCL61またはCRL9096でATCCより入手できる）；DG44細胞（dhfr⁻CHO細胞；例えば、ウーラウプ（Urlaub）ら（1986）Cell. Molec. Genet. 12:555を参照）；そしてBHK細胞（ウェクターとバセルガ（Waechter and Baserga）、PNAS U.S.A. 79:1106-1110（1982）；整理番号#CRL10314でATCCより入手できる）を参照）がある。好適な細胞には、CHO細胞とHEK293細胞があり、特に液体窒素中で凍結され次に融解されて再増殖されるHEK293細胞（例えば、ゴーマン（Gorman）の米国特許第5,024,939号（またスティルマン（Stillman）ら、（1985）Mol. Cell. Biol. 5:2051-2060も参照）に記載のもの）、DG44細胞、LTK⁻細胞などがある。使用される宿主細胞にかかわらず、使用されるリガンドに誘導されるグルタミン酸産生のバックグラウンドレベルの測定、またはリガンドの非存在下での宿主細胞中に存在するグルタミン酸のバックグラウンドレベルの測定のために、比較実験を実施すべきであることは、当業者は理解できるであろう。

【0062】

DNAは当業者に公知の方法を用いて細胞内に安定に取り込まれるか、または一時的に発現される。安定にトランスフェクションされる哺乳動物細胞は、選択マーカー遺伝子（例えば、チミジンキナーゼ、ジヒドロ葉酸還元酵素、ネオマイシン耐性などの遺伝子）を有する発現ベクターで細胞をトランスフェクションし、トランスフェクションした細胞をマーカー遺伝子を発現する細胞に選択的な条件下で増殖させることにより調製される。一時的トランスフェクション体を調製するためには、哺乳動物細胞をレポーター遺伝子（例えば大腸菌β-ガラクトシダーゼ遺伝子）でトランスフェクションしてトランスフェクション効率を追跡する。

【0063】

トランスフェクション体は典型的には選択性条件下では増殖せず、普通トランスフェクション後数日以内に分析されるため、選択マーカー遺伝子は一時的トランスフェクション体には含有されない。

【0064】

このような安定トランスフェクション細胞または一時的トランスフェクション細胞を産生するために、細胞を十分な濃度のサブタイプをコードする核酸でトランスフェクションして、異種DNAにコードされるヒトサブタイプを示すヒトメタボトロピックグルタミン酸受容体を形成させる。サブタイプをコードするDNAの正確な量は経験的に決定されるか、または特定のサブタイプ、細胞および測定条件について最適化される。異種DNAまたはRNAのみにコードされるサブタイプを含有するメタボトロピックグルタミン酸受容体を発現する組換え細胞が特に好適である。

【0065】

異種DNAは細胞中でエピソーム成分として維持されるか、または細胞の染色体DNAに取り込まれる。次に得られる組換え細胞を培養し、この培養物またはサブ培養物からサブ培養（または、哺乳動物細胞の場合は継代する）する。組換え細胞のトランスフェクション、注入および培養法は当業者に公知である。同様に当業者に公知の蛋白精製法を用いて、ヒトメタボトロピックグルタミン酸受容体サブタイプが精製される。例えば1つまたはそれ以上のサブタイプに特異的に結合する抗体または他のリガンドが、ヒトメタボトロピックグルタミン酸受容体の親和性精製に使用される。

【0066】

本明細書において、異種DNAまたは外来DNAおよびRNAは、互いに交換して使用することができ、細胞のゲノムの一部としては天然には存在しないか、または天然に存在するものとは異なるゲノム中の位置に見いだされるDNAまたはRNAを意味する。典型的には異種または外来DNAおよびRNAは、宿主細胞に内因性ではなく人工的に細胞に取り込まれたDNAまたはRNAを意味する。異種DNAの例としては、ヒトメタボトロピックグルタミン酸受容体サブタイプをコードするDNA、転写、翻訳または他の制御可能な生化学過程などに影響を与えることにより内因性DNAの発現を媒介または変更するRNAまたは蛋白をコードするDNAなどがある。異種DNAを発現する細胞は、同じであるかまたは異なる発現生成物をコードするDNAを含有する。異種DNAは発現される必要はなく、宿主細胞ゲノム中に取り込まれるかまたはエピソーム的に維持される。

【0067】

機能性mGluRの発現を検出するために使用する種々の測定法を当業者は容易に見いだすことができる。その例としては、PIターンオーバー測定法[例えば、ナカジマ(Nakajima)ら、J. Biol. Chem. 267: 2437-2442(1992)および実施例3.C.2を参照]、cAMP測定法[例えば、ナカジマ(Nakajima)ら、前述、および実施例3.C.4を参照]、カルシウムイオン流入測定法[例えば、イトウ(Ito)ら、J. Neurochem. 56: 531-540(1991)、および実施例3.C.1を参照]、cGMP測定法[例えば、スタイナー(Steiner)ら、J. Biol. Chem. 247: 1106-1113(1972)]、アラキドン酸放出測定法[例えば、フェルダー(Felder)ら、J. Biol. Chem. 264: 20356-20362(1989)を参照]などがある。さらに、陽イオンをベースにした測定法(本明細書に記載)を、細胞内サイクリックヌクレオチドレベルの受容体誘導変化を追跡するために使用することができる。そのような測定法は、サイクリックヌクレオチドゲートのイオンチャネルを発現する宿主細胞を使用する。例えば棒状光受容体細胞、嗅覚細胞およびウシ腎細胞中に存在するこれらのチャネル(例えば、カウプ(Kaupp)ら、Nature 342: 762-766(1989)、ダレン(Dallen)ら、Nature 347: 184-187(1990)、およびビエル(Biel)ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 3505-3509(1994))は、cAMPまたはcGMPの結合による活性化により陽イオンに対して透過性となる。すなわち本発明の測定法において、内因性または組換えサイクリックヌクレオチドゲートのチャネルを発現する宿主細胞は、サイクリックヌクレオチドレベルに影響を与えることが疑われる受容体をコードする核酸(例えば、メタボトロピックグルタミン酸受容体をコードするDNA)でトランスフェクション(または注入)され、次にチャネルのサイクリックヌクレオチド活性化の量の変化を追跡する。チャネルのサイクリックヌクレオチドの活性化の変化を追跡すると、活性化された時cAMPまたはcGMPの変化を引き起こす受容体を機能性であるとして間接的に同定することができる。サイクリックヌクレオチドゲートのチャネルの活性化の量の変化は、チャネルを介するイオンの流入を測定するか、または電流の電気生理学的測定または細胞内陽イオンレベルの変化を測定(例えば、細胞内カルシウムの蛍光測定)することにより、決定することができる。

【0068】

活性化によりサイクリックヌクレオチドの低下を引き起こす受容体(例えば、メタボトロピックグルタミン酸受容体)を発現する細胞の測定法において、受容体活性化化合物を測定物内の細胞に添加する前に、サイクリックヌクレオチドの細胞内レベルを上昇させる

10

20

30

40

50

物質（例えば、フォルスコリンや IBMX）に細胞を暴露させることが好ましい。

【0069】

上記の測定法での使用に適した宿主細胞は、検討される受容体の発現に適した宿主細胞を含む（例えば、メタボトロピックグルタミン酸受容体の測定のための L 細胞、HEK 293 細胞、CHO 細胞またはツノガエル（Xenopus）卵母細胞）。細胞は、サイクリックヌクレオチドゲートのチャンネルをコードする核酸と受容体をコードする核酸で連続的にトランスフェクション（または注入）されるか、または細胞は 2 つの核酸で同時トランスフェクションされる。実施例 3 A と 3 B に記載の一時的または安定なトランスフェクションを実施することができる。

【0070】

サイクリックヌクレオチドゲートのチャンネルでトランスフェクション（または注入）された細胞は、機能の測定の前にインキュベートされる（典型的には約 24 - 48 時間）。チャンネルの活性は、トランスフェクションされた細胞からの引き剥がした裏返した膜パッチを用いて測定される（こうして細胞質面に達する cAMP の濃度が調節される）。トランスフェクション体はまた、内部カルシウムレベル（ $[Ca^{++}]_i$ ）の単細胞ビデオイメージングにより分析される。この方法は、細胞内カルシウムレベル（これはチャンネルのサイクリックヌクレオチド活性化により制御される、チャンネルを介するカルシウムの流入量とともに変化する）の測定によるサイクリックヌクレオチドゲートのチャンネルの分析を可能にする。イメージング測定法は、基本的に実施例 3 . C . 4 . b に記載のように実施される。

【0071】

本明細書に記載の DNA、mRNA、ベクター、受容体サブタイプおよび細胞により、選択されたメタボトロピックグルタミン酸受容体サブタイプやその受容体サブタイプに対する抗体の産生が可能である。これは、その存在が単一のメタボトロピックグルタミン酸受容体サブタイプの分析を妨害する多くの他の受容体蛋白の汚染が実質的にない、合成または組換え受容体および受容体サブタイプを調製する手段を与える。目的の受容体サブタイプが利用できることが、特定の受容体サブタイプまたはメタボトロピックグルタミン酸受容体サブタイプの組合せへの薬剤の影響を観察し、従ってヒトに特異的でありヒトメタボトロピックグルタミン酸受容体サブタイプまたはメタボトロピックグルタミン酸受容体サブタイプの組合せに特異的な試験系で、薬剤の初期のインビトロスクリーニングを行うことを可能にする。特異的抗体が利用できることは、インビボで発現されるサブタイプの組合せを同定することを可能にする。すなわち、このような特異的組合せは、薬剤スクリーニングの好適な標的として使用される。

【0072】

特異的な受容体組成物への薬剤の影響を測定するためにインビトロで薬剤物質をスクリーニングすることができることは、受容体サブタイプ特異的または疾患特異的薬剤の開発とスクリーニングを可能にするはずである。また単一の受容体サブタイプまたは種々の受容体サブタイプと種々のアゴニストまたはアンタゴニストの可能性のある物質との特定の組合せを試験することにより、個々のサブタイプの機能と活性に関する追加情報が得られ、1 つまたはそれ以上の受容体サブタイプと非常に特異的に相互作用することができる化合物の同定と設計を可能にするであろう。得られる薬剤は、種々の受容体サブタイプを発現する細胞を用いてスクリーニングすることにより同定される薬剤より、不要な副作用はより少ないであろう。

【0073】

さらに種々の疾患の薬剤開発と治療法に関して、ヒトメタボトロピックグルタミン酸受容体サブタイプをコードする DNA が利用できることは、ある種の疾患の発症に相関する遺伝子の変化（例えば、突然変異）の同定を可能にする。さらに、このような突然変異を合成 DNA 配列に特異的に導入し、次にこれを実験室動物に導入するかまたはその効果を測定するためのインビトロ測定系により、そのような疾患の動物モデルの作成が可能になる。

10

20

30

40

50

【 0 0 7 4 】

別の面において、本発明は本発明のDNAによりコードされる機能性ペプチド断片およびその機能性組合せよりなる。ペプチドがグルタミン酸受容体として機能するのに必須ではない配列中のアミノ酸の一部またはすべてを排除することにより、不要な実験をすることなく当業者はこのような機能性ペプチド断片を産生することができる。グルタミン酸受容体機能に必須のアミノ酸は、例えばペプチドをコードするDNAの体系的消化および/またはDNAへの欠失の導入により決定することができる。修飾（例えば欠失または消化）DNAは、例えばDNAを転写し、次に得られるmRNAをツノガエル（Xenopus）卵母細胞に導入して、mRNAを翻訳させることにより発現することができる。卵母細胞中のこうして発現された蛋白の機能的分析は、グルタミン酸受容体に結合しこれを機能的に活性化することが公知のリガンドに卵母細胞を暴露して、次に内因性チャネルが活性化されるか否かについて卵母細胞を追跡することにより、行われる。電流が検出されるなら、断片はグルタミン酸受容体として機能する。

10

【 0 0 7 5 】

本発明の別の実施態様において、競合的結合測定法で本発明の受容体蛋白を使用することよりなる、メタボトロピックグルタミン酸受容体サブタイプに結合する化合物の同定方法が提供される。この測定法は多数の化合物を迅速にスクリーニングして、どの化合物（もし、あるとすれば）が、特異的に結合した $[^3\text{H}]$ グルタミン酸を排除することができる（すなわち、メタボトロピックグルタミン酸受容体に結合することができる）かを調べることができる。結合することが見いだされた化合物を用いて、このような化合物が本発明の受容体のモジュレーター、アゴニストまたはアンタゴニストとして作用するのか否かをさらに調べるために、さらに詳しい測定法が実施される。

20

【 0 0 7 6 】

本発明の結合測定法の別の応用は、本発明の受容体の存在の有無に関する試料（例えば生物学的液体）の測定である。例えばグルタミン酸産生経路の機能不全に関連する症状を示す患者の血清を測定して、観察される症状がこのような受容体の型の産生過剰または不足により引き起こされるのかを決めることができる。

【 0 0 7 7 】

本発明において企図される結合測定法は、当業者は容易に判定できるように種々の方法で実施することができる。例えばラジオリセプター測定法などの競合的結合測定法を使用することができる。

30

【 0 0 7 8 】

本発明のさらなる実施態様において、本発明のヒトメタボトロピックグルタミン酸受容体サブタイプの活性を調節する化合物を同定するための生物測定法が提供され、該方法は：

（a）ヒトメタボトロピックグルタミン酸受容体サブタイプをコードするDNAを含有する細胞（この細胞は機能性メタボトロピックグルタミン酸受容体を発現する）を、受容体の活性の調節能力を測定すべき少なくとも1つの化合物に暴露させて、

（b）第二メッセンジャー活性の変化について細胞を追跡する

ことよりなる。

40

【 0 0 7 9 】

上記の生物測定法はヒトメタボトロピックグルタミン酸受容体のアゴニストやアンタゴニストおよびアロステリックモジュレーターの同定を可能にする。この方法では組換えメタボトロピックグルタミン酸受容体に「未知の」すなわち試験物質と（アンタゴニスト活性が試験される時は、さらに公知のメタボトロピックグルタミン酸アゴニストの存在下で）接触させ、この「未知の」すなわち試験物質との接触後、公知のグルタミン酸受容体の第二メッセンジャー活性を追跡し、公知のグルタミン酸受容体の活性を追跡し、公知のグルタミン酸受容体の第二メッセンジャー応答を増加または減少させる物質は、ヒトメタボトロピックグルタミン酸受容体の機能性リガンド（すなわち、モジュレーター、アゴニストまたはアンタゴニスト）として同定される。追跡することができる第二メッセンジャー

50

活性には、細胞内カルシウムイオンの濃度、 IP_3 、cAMPレベルの変化、またはアラキドン酸放出またはイオン電流の活性または阻害の追跡（細胞が卵母細胞の場合）がある。

【0080】

本発明の特定の実施態様において、組換えヒトメタボトロピックグルタミン酸受容体を発現する哺乳動物細胞または卵母細胞を試験化合物と接触させて、次に試験化合物がある場合またはない場合のメタボトロピックグルタミン酸受容体介在応答を比較し、化合物の存在に対する試験細胞または対照細胞（すなわち、メタボトロピックグルタミン酸受容体を発現しない細胞）のメタボトロピックグルタミン酸受容体介在応答を比較して、その調節作用を評価することができる。

10

【0081】

本明細書において、「メタボトロピックグルタミン酸受容体の活性を調節する」化合物またはシグナルとは、メタボトロピックグルタミン酸受容体の活性を変化させ、化合物またはシグナルの存在下ではこれらが存在しない場合とはメタボトロピックグルタミン酸受容体の活性が異なるようになる化合物またはシグナルを意味する。特にこのような化合物またはシグナルはアゴニストやアンタゴニストを含む。アゴニストという用語は、受容体機能を活性化するグルタミン酸またはACPDのような物質またはシグナルを意味し；アンタゴニストという用語は、アゴニストに誘導される受容体活性化を妨害する物質を意味する。アンタゴニストには競合的および非競合的アンタゴニストがある。競合的アンタゴニスト（または競合的ブロッカー）は、アゴニスト（例えば、リガンドまたは神経伝達物質）の近傍または特異的な部位と、その同じ部位または近傍に対して相互作用する。非競合的アンタゴニストまたはブロッカーは、アゴニストと相互作用する部位とは異なる部位と相互作用することにより、受容体の機能を不活性化する。

20

【0082】

当業者は理解できるように、ヒトメタボトロピックグルタミン酸受容体活性を調節する化合物（例えば、アゴニストおよびアンタゴニスト）の同定方法には、一般に対照との比較が必要である。「対照」細胞または「対照」培養物の1つのタイプは、試験化合物に暴露された細胞または培養物と実質的に同様に処理された細胞または培養物である（ただし、対照培養物は試験化合物に暴露されない）。例えば、電圧固定電気生理学的方法を用いる方法では、細胞を浸漬している外部溶液を単に交換することにより、試験化合物の存在下または非存在下で同じ細胞を試験することができる。別のタイプの「対照」細胞または「対照」培養物は、トランスフェクションされた細胞と同一の細胞または細胞の培養物である（ただし、対照培養物に使用される細胞は、トランスフェクションされた細胞に発現される組換えヒトメタボトロピックグルタミン酸受容体サブタイプを発現しない）。この場合、細胞または各タイプの細胞の培養物が、測定される化合物の存在下と実質的に同じ反応条件下に暴露される時、試験化合物に対する試験細胞の応答は、受容体のない（対照）細胞の試験化合物に対する応答（または応答の欠如）と比較される。

30

【0083】

本発明のさらに別の実施態様において、ヒトメタボトロピックグルタミン酸受容体の第二メッセンジャー活性は、この受容体を、上記生物測定法により同定される少なくとも1つの化合物の有効量と接触させることにより調節される。

40

【0084】

本発明のさらに別の実施態様において、上記の受容体蛋白に対して産生された抗体が提供される。この抗体は、受容体組織局在化、サブタイプ組成、機能性ドメインの構造の研究用、受容体の精製、および診断応用治療応用などに使用することができる。好ましくは治療用途では、使用される抗体はモノクローナル抗体である。

【0085】

本発明の受容体蛋白またはその部分を抗体産生の抗原として用いることにより、上記の抗体は当業者に公知の標準的方法を使用して産生することができる。抗ペプチドおよび抗融合蛋白抗体ともに使用することができる〔例えば、バホウト（Bahouth）ら、（199

50

1) Trends Pharmacol Sci. 第12巻: 338 - 343; Current Protocols in Molecular Biology (アウスベル (Ausubel) ら編、ジョン・ワイリー・アンド・サンズ (John Wiley and Sons)、ニューヨーク (1989)]。免疫原として (合成ペプチドまたは組換え産生細菌融合蛋白として) 使用するためのメタボトロピックグルタミン酸受容体サブタイプの部分を選択する場合に考慮すべき因子は、抗原性、入手し易さ (すなわち、細胞外ドメインおよび細胞質ドメイン)、特定のサブタイプに特異的であるかなどである。

【0086】

サブタイプ特異的抗体が利用できることは、(例えば、正常の脳組織対疾患の脳組織中の) 種々のサブタイプの分布と発現密度を追跡するのに免疫組織学的方法を使用することを可能にする。このような抗体はまた、診断および治療応用に利用できる。

10

【0087】

本発明のさらに別の実施態様において、有効量の上記の抗体に本発明の受容体を接触させることにより、該受容体のイオンチャネル活性を調節する方法が提供される。

【0088】

本発明の抗体は、標準的方法 (例えば、腹腔内投与、筋肉内投与、静脈内投与、または皮下注射、移植または経皮的投与法など) により、対象者に投与することができる。当業者は、使用される投与法により、投与型、治療処方などを容易に決定することができる。

【0089】

本発明のさらなる実施態様において、細胞内サイクリックヌクレオチドレベルの受容体に誘導される変化を追跡するための、陽イオンベースの生物測定法が提供され、該生物測定法は:

20

内因性または組換えサイクリックヌクレオチドゲートのチャネルを発現する宿主細胞に、細胞内サイクリックヌクレオチドレベルに影響を与えることが疑われる受容体をコードする核酸を導入し、そして

細胞内サイクリックヌクレオチドレベルに影響を与えることが疑われる、該受容体に対するリガンドの存在下または非存在下で、サイクリックヌクレオチドゲートのチャネルのサイクリックヌクレオチド活性化の量の変化を追跡することよりなる。

【0090】

以下の非限定的実施例を参照して本発明をさらに詳細に説明する。

【実施例1】

30

【0091】

ヒトメタボトロピックグルタミン酸受容体をコードするDNAの単離

A. mGluR5受容体cDNA

cDNAライブラリースクリーニング

【0092】

ヒト海馬組織から単離したRNAを、標準的方法 [例えば、グブラーとホフマン (Gubler and Hoffman)、(1983) Gene 25: 263 - 269] に従い、オリゴdT-プライムした1本鎖cDNAの合成のための鋳型として使用した。1本鎖cDNAを2本鎖cDNAに変換し、そのcDNAの末端にEcoRI/SnaBI/XhoIアダプターを付け加えた。アガロースゲル電気泳動を用いてサイズによりcDNAを分離し、> 2.5 kbのものをEcoRI消化したλgt10バクテリオファージベクターに結合させた。得られる一次ヒト海馬cDNAライブラリー (約 2×10^5 組換え体) を、ラットmGluR1受容体 (ヌクレオチド1から1723 + 5' 非翻訳配列; マス (Masu) ら、(1991) Nature 349: 760 - 765 を参照) をコードするDNAの断片に対するハイブリダイゼーションについてスクリーニングした。ハイブリダイゼーションは、42 で $5 \times$ SSPE、 $5 \times$ デンハルト (Denhart's) 溶液、50%ホルムアミド、0.2% SDSおよび200 μg/mlの変性した超音波処理したニシン精子DNA中に行ない、洗浄は65 で $1 \times$ SSPEと0.2% SDS中に行なった。3273塩基対を含有するハイブリダイズする1つのブランク (METAB1) を同定した。

40

【0093】

50

追加のヒト mGluR5 コーディングクローンを得るために、METAB1 を放射標識し、以下のように調製した 2 つのヒト小脳 cDNA ライブラリーをスクリーニングするのに使用した。ランダムプライマーを使用して、ヒト小脳組織から単離した RNA から最初の cDNA 合成をプライムして cDNA を合成した。長さを基準にして cDNA をプールし、2 つのライブラリーを作成した：1 つは 2.8 kb 以上の長さの挿入体を有し（すなわち、大挿入体ライブラリー）、もう 1 つは 1 - 2.8 kb の長さの挿入体を有する（すなわち、中挿入体ライブラリー）。ラット mGluR1 DNA 断片へのハイブリダイゼーションに対して海馬ライブラリーをスクリーニングするために使用したのと同じハイブリダイゼーション条件を用いて、METAB1 に対するハイブリダイゼーションについてライブラリーをスクリーニングした。洗浄は 55 で 1 × SSPE、0.2 % SDS 中で行なった。大挿入体ライブラリー中に 1 つのハイブリダイズするブランク (METAB2) を同定し、中挿入体ライブラリー中に 4 つのハイブリダイズするブランク (METAB3 - METAB6) を同定した。

10

20

30

40

50

【0094】

ヒト mGluR5 をコードする DNA の別のスクリーニングで、METAB1 により大挿入体または中挿入体小脳ライブラリーをスクリーニングするのに使用した条件と同じ条件を用いて、サイズが 1 - 2 kb の範囲の挿入体を含有するランダムにプライムしたヒト海馬 cDNA ライブラリー (2 × 10⁶ 組換え体) および中挿入体小脳 cDNA ライブラリーを、放射能標識した METAB5 へのハイブリダイゼーションについてスクリーニングした。海馬ライブラリーに 3 つのハイブリダイズするブランク (METAB10 - METAB12) が同定され、小脳ライブラリーの別の一次スクリーニングで 5 つの追加のハイブリダイズするブランク (METAB13 - METAB17) が同定された。選択されたブランクを精製した。

【0095】

単離されたクローンの性状解析

制限酵素マッピングと DNA 配列解析による精製したブランクの挿入体の性状解析から、単離されたクローンによりヒト mGluR5 転写体の少なくとも 3 つの明らかなスプライス変種が表されていることが判明した。METAB1 の分析により、これは翻訳開始コドンを含むが翻訳停止コドンは含まないことが示された。推測されるアミノ酸配列は、ラットの mGluR1 の推測されるアミノ酸配列に約 70 % 同一であり、ラットの mGluR5 の推測されるアミノ酸配列とは > 90 % の同一性を有している [アベ (Abe) ら、(1992) J. Biol. Chem. 267: 13361 - 13368]。

【0096】

METAB5 の DNA 配列解析は、METAB5 は 5' 末端で METAB1 の 3' 末端と重複し、3' 方向へ追加の 343 ヌクレオチドが続いていることを示した。METAB1 と METAB5 の重複領域を比較すると、METAB1 は METAB5 に存在しない 96 ヌクレオチドを有していた（すなわち、METAB1 は METAB5 に対して 96 ヌクレオチド挿入を含む）。METAB5 はまた、翻訳停止コドンを持っていない。METAB12 挿入体は 5' 末端で METAB5 の 3' 末端と重複するが、さらに 3' 末端方向に延長して翻訳停止コドンを有する。

【0097】

METAB2 の DNA 配列解析により、5' 末端の最初の 869 ヌクレオチドは METAB1 の 3' 末端の一部と重複し、同じであった。しかし、METAB1 と METAB2 の配列は METAB1 の 96 ヌクレオチド挿入の最初で分岐していた。METAB2 は 3' 末端方向に約 2700 ヌクレオチド延長し、METAB1 との分岐点の 4 ヌクレオチドだけ 3' 方向に推定翻訳停止コドンを有する。

【0098】

METAB4 の部分的 DNA 配列解析は、これが別のヒトメタボトロピック受容体である mGluR1 の一部を含むことを示していた（実施例 1.B を参照）。

【0099】

全長 mGluR5 cDNA 作成体の調製

cDNA のインビトロ転写体の調製および / または哺乳動物細胞での cDNA の発現に使用するために、ヒト mGluR5 転写体の 3 つの推定スプライス変種を表す全長作成体 (mGluR5 a、mGluR5 b そして mGluR5 c と呼ぶ) を作成し、発現ベクター中に取り込むことができる。典型的に使用される基礎となる発現ベクターは、pCMV-T7-3 または pCMV-T7-2 である (図 1 を参照)。プラスミド pCMV-T7-3 は pUC19 ベースのベクターであり、CMV (CMV) プロモーター / エンハンサー、プロモーターのすぐ下流に位置する SV40 スプライスドナー / スプライスアクセプター部位、SV40 スプライス部位のすぐ下流に位置する T7 バクテリオファージ RNA ポリメラーゼプロモーター、T7 プロモーターの下流の SV40 ポリアデニル化シグナル、および T7 プロモーターとポリアデニル化シグナルの間のポリリンカーを含有する。すなわちこのベクターは、哺乳動物宿主細胞中での異種 DNA の発現に必要なすべての制御成分を含有する (異種 DNA はポリリンカーでベクターに取り込まれる)。さらに T7 プロモーターはポリリンカーのすぐ上流に位置するため、このプラスミドは、ポリリンカーでベクターにサブクロニングされた異種 DNA のインビトロ転写体の合成に使用される。pCMV-T7-3 と pCMV-T7-2 は、ポリリンカー中の制限酵素部位の配向のみが異なる。

10

【0100】

全長 mGluR5 a 作成体 (配列番号 7 を参照) を調製するために、クローン METAB1、METAB5 および METAB12 の部分を一緒に結合させた。まず操作を容易にするために、METAB1、METAB5 および METAB12 の挿入体を EcoRI 断片として λgt10 から別々に、EcoRI 消化 pGEM-7Zf (プロメガ (Promega)、マジソン、ウィスコンシン州) に移した。METAB1 挿入体を含有する pGEM-7Zf ベクターを ScaI / NheI で消化して、アンピシリン耐性遺伝子の 5' 半分と METAB1 挿入体の 5' 部分 (配列番号 7 のヌクレオチド 1-2724) を含有する 3.8 kb 断片を放出させた。METAB5 の挿入体を含有する pGEM-7Zf ベクターを ScaI / NheI で消化して、アンピシリン耐性遺伝子の 3' 半分と METAB5 挿入体の 3' 部分 (配列番号 7 のヌクレオチド 2725-3469) を含有する 2.6 kb 断片を放出させ、この断片を、METAB1 を含有する pGEM-7Zf ベクターからの 3.8 kb 断片に結合させて pGEM-METAB1+5 を作成した。pGEM-METAB1+5 を ScaI / NheI で消化して、アンピシリン耐性遺伝子の 5' 半分と配列番号 7 のヌクレオチド 1-3316 を含有する 4.4 kb 断片を放出させた。次にこの 4.4 kb 断片を、METAB12 挿入体を含有する pGEM-7Zf ベクターの ScaI / NheI (部分) 消化により得られた 2.6 kb 断片 [この 2.6 kb 断片はアンピシリン耐性遺伝子の 3' 半分と METAB12 の 3' 部分 (配列番号 7 のヌクレオチド 3317-4085) を含有する] に結合させた。得られたベクターは pGEM-7Zf 中に完全な mGluR5 a コーディング配列を含有していた。全長 mGluR5 a cDNA を、AatII (平滑末端) - HindIII 断片としてベクターから単離し、NotI (平滑末端) / HindIII 消化 pCMV-T7-3 にサブクロニングして、作成体 mGluR5 a 1 を作成した。

20

30

40

【0101】

要約すると、作成体 mGluR5 a 1 は、METAB1 からの 5' 非翻訳配列の 369 塩基対 (配列番号 7 のヌクレオチド 1-369) と、mGluR5 受容体の mGluR5 a 変種の完全なコーディング配列 (配列番号 7 のヌクレオチド 370-3912)、および 3' 非翻訳配列の 173 塩基対 (配列番号 7 のヌクレオチド 3913-4085) を含有する。mGluR5 a をコードする配列は、哺乳動物宿主細胞中で受容体を発現するために、そしてツノガエル (Xenopus) 卵母細胞で発現される DNA のインビトロ転写体を作成するのに使用するために、pCMV-T7-3 中の制御成分に機能的に結合している。

【0102】

50

2つの追加のmG1uR5a作成体(mG1uR5a2とmG1uR5a3)を、最初のmG1uR5a作成体の5'非翻訳領域を修飾して調製した。上記のmG1uR5a作成体は、提唱されている翻訳開始コドン(配列番号7のヌクレオチド370から372)に先行する5'非翻訳領域中に7つのおそらく不適切なATGコドンを含む。mG1uR5a1作成体をBAl31で消化して、以下を行う:(1)配列の255ヌクレオチド(配列番号7のヌクレオチド1-255であり、上流のATGトリプレット7つのうち6つを含む)を除去して、mG1uR5a2を作成する、そして(2)配列の348ヌクレオチド(配列番号7のヌクレオチド1-348であり、上流のATGトリプレットのすべてを含む)を除去して、mG1uR5a3を作成する。すなわち、mG1uR5a2は、5'非翻訳配列の一部が欠如していること以外はmG1uR5a1と同じであり、従って提唱される翻訳開始コドンの上流に1つのみのATGトリプレットを含む。同様に、mG1uR5a3は、提唱される翻訳開始コドンの上流のすべてのATGトリプレットが欠如していること以外はmG1uR5a1と同じであり、5'非翻訳配列の21ヌクレオチドのみを含む。

10

20

30

50

【0103】

3つ目のmG1uR5a作成体(MMTV-hmG1uR5a)は、以下のようにmG1uR5aのMMTVプロモーター制御発現に使用するために調製した。mG1uR5a3をXbaIで消化した。SV40スプライス部位、全長mG1uR5aコーディング配列(および5'非翻訳配列の21ヌクレオチドと3'非翻訳配列の173ヌクレオチド)、およびポリアデニル化シグナルを含む4.1kb断片を単離し、平滑末端とし、pBR322の2kbのEcoRI-NdeI(平滑末端)断片に結合させて、pBR-hmG1uR5aを作成した。MMTVLTRプロモーターとアンピシリンおよびネオマイシン耐性遺伝子を含むベクターpMAMneo(クロンテック(Clontech)、パロアルト(Palo Alto)、カリフォルニア州)をBamHIで消化して、ネオマイシン耐性遺伝子を除去し、再結合させた。次にこのベクターをEcoRIで消化し、アンピシリン耐性遺伝子を含む断片を逆配向で大きい方のベクター断片に再結合させてpMAMneo-ampoppを作成した。このベクターをPstI/NheIで消化して、アンピシリン耐性遺伝子の5'部分とMMTV-LTRを含む2.3kbの断片を単離した。プラスミドpBR-hmG1uR5aをPstI/XbaIで消化し、アンピシリン耐性遺伝子の3'部分とmG1uR5a配列(SV40スプライス部位とポリアデニル化シグナルとともに)を含む5.3kbの断片を、pMAMneo-ampoppの2.3kbのPstI/NheI断片に結合させてMMTV-hmG1uR5aを作成した。

【0104】

すなわち、pMMTV-hmG1uR5aは、MMTV-LTRを含むし、mG1uR5a DNA(配列番号7のヌクレオチド349-4085を含む)と機能的に結合したSV40スプライス部位が続く、この後にポリアデニル化シグナルが続く。

【0105】

4つ目のmG1uR5a作成体(pSV-hmG1uR5a)は、以下のようにmG1uR5aのSV40プロモーター制御発現に使用するために調製した。mG1uR5a3をXhoIで部分的に消化し、クレノウ(Klenow)で処理し、自身と再結合させ、こうしてmG1uR5a DNAの3'に位置するXhoI部位を破壊した。次にプラスミドをScaI/XhoIで消化し、SV40スプライス部位、全長mG1uR5aコーディング配列(および5'非翻訳配列の21ヌクレオチドと3'非翻訳配列の173ヌクレオチド)、ポリアデニル化シグナルおよびアンピシリン耐性遺伝子の3'部分を含む断片を作成した。プラスミドpSVβ(クロンテック(Clontech)、パロアルト(Palo Alto)、カリフォルニア州)をScaI/XhoIで消化し、アンピシリン耐性遺伝子とSV40早期プロモーターを含む断片を、mG1uR5a DNAを含むScaI/XhoI断片に結合させて、pSV-hmG1uR5aを作成した。すなわち、pSV-hmG1uR5aは、SV40早期プロモーターを含むし、mG1uR5a DNA(配列番号7のヌクレオチド349-4085を含む)と機能的に結合したSV40スプライス部

位が続き、この後にポリアデニル化シグナルが続く。

【0106】

全長mGluR5b作成体を調製するために、mGluR5a作成体

(mGluR1a1、mGluR5a2またはmGluR5a3)をNheI/PmlIで消化し、配列番号7のヌクレオチド2725-3020を含有する断片を放出させる。次に残りのベクター断片を、METAB1からの単離したNheI/PmlI断片に結合させる。得られるベクター(mGluR5b)は、配列番号7のヌクレオチド2999と3000の間に位置する96塩基対の挿入体(配列番号9のヌクレオチド3000-3095)を含有する以外は、これが得られたmGluR5a作成体と同じである。配列番号9は、ベクターmGluR5a1から調製した全長mGluR5b cDNAの完全なヌクレオチド配列である。

10

【0107】

全長mGluR5c作成体を調製するために、mGluR5a作成体

(mGluR1a1、mGluR5a2またはmGluR5a3)をNheI/HindIII(HindIII部位は、mGluR5aベクターのpCMV-T7-3部分のポリリンカー内に存在する)で消化し、配列番号7のヌクレオチド2725-4085を含有する断片を放出させる。次に残りのベクター断片を、METAB2から単離したNheI/HindIII断片に結合させる。得られる全長cDNA(mGluR5c)(配列番号11)は、コーディング配列の最初の2630ヌクレオチドについては、これが調製されたmGluR5a作成体と同じであるが、コーディング配列のヌクレオチド2631で、mGluR5cとmGluR5aのコーディング配列は分岐(例えば、配列番号7のヌクレオチド3000で始まる)し、mGluR5cコーディング配列はコーディング配列のヌクレオチド2631としてグアニンヌクレオチドを有し、その後に翻訳停止コドン(配列番号11のヌクレオチド3001-3003)が続く。

20

【0108】

B. mGluR1受容体cDNA

cDNAライブラリースクリーニング

中挿入体小脳ライブラリーを、ラットのmGluR1受容体(ヌクレオチド1から3031および5'非翻訳配列:マス(Masu)ら、(1991)Nature 349:760-765)をコードするDNAの断片へのハイブリダイゼーションについてスクリーニングした。ハイブリダイゼーションは、42℃で5×SSPE、5×デンハルツ(Denhart's)溶液、50%ホルムアルミド、0.2%SDSおよび200μg/mlの変性した超音波処理したニシン精子DNA中に行ない、洗浄は55℃で1×SSPEと0.2%SDS中に行なった。3つのハイブリダイズするクローン(METAB7-METAB9)が同定された。

30

【0109】

次のスクリーニングで、ヒト中挿入体小脳cDNAライブラリーの 1×10^6 組換え体の各平板を、追加のヒトmGluR1クローンとプローブ結合させた。この平板をまず、ラットのmGluR1 cDNAのヌクレオチド1-1256(および5'非翻訳配列)を含有するDNA断片(すなわち、5'プローブ)とハイブリダイゼーションさせ、次にクローンMETAB7-METAB9を同定したこの前のスクリーニングで使用したものと同一ハイブリダイゼーション条件と洗浄条件を用いて、ラットmGluR1a cDNAのヌクレオチド2075-3310を含有するDNA断片(すなわち、3'プローブ)に連続してハイブリダイズさせた。5'プローブへのハイブリダイゼーションにより3つのクローン(METAB18、METAB21およびMETAB22)が同定され、そして3'プローブへのハイブリダイゼーションにより4つのクローン(METAB14、METAB20、METAB32およびMETAB35)が同定された。

40

【0110】

このラットのmGluR1断片をプローブとして使用して、さらなるmGluR1クローンのために大挿入体ヒト小脳cDNAライブラリーをスクリーニングした。ハイブリダ

50

イゼーションと洗浄条件は、中挿入体小脳ライブラリーから6つのmGluR1クローンを単離した時に使用したものと同一である（例えば、ハイブリダイゼーション溶液では20%ホルムアルデヒドを使用した）。3つのブランク（METAB58、METAB59およびMETAB60）がプローブにハイブリダイズした。

【0111】

単離されたクローンの性状解析

精製したブランクの挿入体を制限酵素マッピングとDNA配列解析により性状解析した。METAB58は、約2.8 kbであり、5'非翻訳配列、翻訳開始コドンおよび約2.3 kbのコーディング配列を含有する。METAB58の3'末端は、METAB14の5'末端と重複する。METAB14は3'方向へ約700塩基対延長し、翻訳停止コドンを含有する。すなわち、METAB58とMETAB14は重複して、全長mGluR1受容体をコードする（配列番号1を参照）。他のクローンも、翻訳開始コドンと翻訳停止コドンの間に位置するmGluR1コーディング配列の部分からのヌクレオチド配列を含有する、部分mGluR1 cDNAである。

10

【0112】

ヒトmGluR1転写体の3'末端をコードする追加のクローンがヒトcDNAライブラリー中に存在するか否かを測定するために、海馬/脳幹神経節および小脳ライブラリーからのcDNAの核酸増幅を行なった。5'プライマーは配列番号1のヌクレオチド2218から2240よりなり、3'プライマーは、ラットのmGluR1aコーディング配列のアミノ酸890-897に基づく縮重オリゴヌクレオチドであった（ピン（Pin）ら、（1992）Neurobiology 89:10331-10335を参照）。増幅生成物をゲル電気泳動で解析した。海馬/脳幹神経節中にのみ1つの生成物（すなわち、500塩基対断片）が検出された。

20

【0113】

mGluR1転写体の3'末端を示す追加のクローンを得るために、海馬および小脳cDNAライブラリーを、前述のヒトmGluR1 cDNAを得るのに使用した条件と同様の条件を使用してラットのmGluR1a cDNAの3'末端からの断片（例えば、ラットのmGluR1a cDNAの約2 kbのNcoI/ClaI断片）でスクリーニングすることができる。このプローブは、択一的にスプライスされるようではないmGluR1 cDNAの3'部分に対応する。次にハイブリダイズするクローンを制限酵素マッピングとDNA配列決定により解析して、異なる3'末端が示されるか否かを決定する。

30

【0114】

全長mGluR1 cDNA作成体の調製

ヒトmGluR1受容体のB型をコードする全長作成体を調製するために、クローンMETAB58とMETAB14の一部を結合させた。METAB58をEcoRI/AccIで消化し、配列番号1のヌクレオチド154-2612を含有する2459塩基対の断片を単離する。METAB14の704塩基対断片（配列番号1のヌクレオチド2613-3321を含有する）を、METAB14のAccI/XhoI消化により単離する。次にこの断片をMETAB58の2459塩基対に結合させて、EcoRI/SalI消化ベクターpCMV-T7-3に結合させる。ヒトmGluR1Bをコードする得られた作成体は、5'非翻訳配列の234ヌクレオチド（配列番号1のヌクレオチド154-387）、全mGluR1Bコーディング配列（配列番号1のヌクレオチド388-3108）、および3'非翻訳配列の213ヌクレオチド（配列番号1のヌクレオチド3109-3321）を含有する。mGluR1Bをコードする配列は、哺乳動物細胞中での発現のためのpCMV-T7-3中の制御成分に機能的に結合している。

40

【0115】

種々のヒト組織中で実際に発現されるmGluR5およびmGluR1受容体を決定するために、種々の方法が使用できる。例えば、本明細書に記載のmGluR転写体の挿入/欠失（すなわち、分岐の領域）の5'と3'に位置するヌクレオチド配列に特異的なオリゴヌクレオチドを用いて、種々の組織から単離されたRNAおよび/または種々の組織

50

から調製された cDNA ライブラリーの核酸増幅をプライムすることができる。増幅生成物の有無および生成物のサイズは、組織中で発現される変種を示す。生成物はまた、DNA 配列解析により詳細に性状解析される。

【0116】

RNAse 保護測定法を用いて、種々の組織中で発現される変種転写体を決定することもできる。これらの測定法は、総細胞性 RNA の複雑な混合物中の RNA 種を検出し定量するための感度の良い方法である。mGluR DNA の一部を標識し、細胞性 RNA とハイブリダイズさせる。細胞性 RNA 中に相補的な mRNA が存在する場合は、DNA-RNA ハイブリッドが形成する。次にこの RNA 試料を RNAse で処理して、1 本鎖 RNA を分解させる。RNA-DNA は RNAse 分解から保護され、ゲル電気泳動やオートラジオグラフィにより目視できるようにされる。

10

【0117】

例えばヒト mGluR cDNA へのハイブリダイゼーションによるヒトメタボトロピック受容体をコードする配列を含有するゲノムクローンの単離と、引き続くクローンの性状解析は、mGluR 一次転写体の可能なスプライス変種に関してさらなる情報を与える。

【0118】

C. mGluR3 受容体 cDNA

cDNA ライブラリースクリーニング

ヒト海馬 cDNA ライブラリー (ランダムプライマーを用いて cDNA 合成をプライムさせ、次に λgt10 ベクターへの結合について 1.0 - 2.8 kb の cDNA を選択することにより作成された) を、ラット mGluR2 cDNA の 500 塩基対の SmaI/XbaI 断片とラット mGluR3 cDNA の 3 kb の AccI/BamHI 断片へのハイブリダイゼーションについて選択した [タナベ (Tanabe) ら、(1992) Neuron 8: 169 - 179]。ハイブリダイゼーションは、42°C で 5 × SSPE、5 × デンハルト (Denhart's) 溶液、50% ホルムアミド、0.2% SDS および 200 μg/ml の変性した超音波処理したニシン精子 DNA 中で行ない、洗浄は 65°C で 0.5 × SSPE と 0.2% SDS 中で行なった。3 つのハイブリダイズするクローン (METAB40、METAB41、および METAB45) が同定された。

20

【0119】

次に METAB45 の 5' 末端の一部 (すなわち、最初の 244 塩基対; 配列番号 5 のヌクレオチド 2634 - 2877) を用いて、増幅した小脳ライブラリー (ランダムプライマーを用いて cDNA 合成をプライムし、次に λgt10 ベクターへの結合について > 2.8 kb の cDNA を選択することにより作成される)、そして増幅した海馬 cDNA ライブラリー (ランダムプライマーを用いて cDNA 合成をプライムし、次に λgt10 ベクターへの結合について > 2.0 kb の cDNA を選択することにより作成される) を追加の mGluR3 についてスクリーニングした。各ライブラリーから 100 万のクローンがスクリーニングされた。ハイブリダイゼーション条件と洗浄条件は、海馬ライブラリーからの METAB40、METAB41 および METAB45 を単離するのに使用したものと同じである。3 つのハイブリダイズするクローンが各ライブラリーで同定された (小脳ライブラリーでは METAB46、METAB49 および METAB50、そして海馬ライブラリーでは METAB47、METAB48 および METAB51B)。

30

40

【0120】

単離したクローンの性状解析

精製したブランクの挿入体を、制限酵素マッピングと DNA 配列解析により性状解析した。単離したクローンのおのおのは、ヒト mGluR2 受容体の一部をコードするクローンメタボトロピック 40 (例えば実施例 1.D. を参照) を除いて、ヒト mGluR3 受容体の一部である。クローン METAB41、METAB45、METAB47 - 49 は、mGluR3 コーディング配列の 3' からの配列および翻訳停止コドンを含む。クローン METAB46、METAB50 および METAB51B は、mGluR3 cD

50

N A の 5' 末端からの配列 (翻訳開始コドンと種々の量の 5' 非翻訳配列を含む) を含有する。

【 0 1 2 1 】

全長 m G l u R 3 c D N A 作成体の調製

M E T A B 4 8 と M E T A B 4 6 または M E T A B 5 1 B の一部を結合させて、全長ヒト m G l u R 3 コーディング配列を含有する 4 つの作成体を調製した。この全長コーディング配列は配列番号 5 (ヌクレオチド 1 0 6 4 - 3 7 0 3) に与えられる。クローン M E T A B 4 6 と M E T A B 5 1 B の挿入体は、E c o R I 断片として p C M V - T 7 - 3 中に別々にサブクローニングされた。クローン M E T A B 4 8 の挿入体は、E c o R I 断片として p C M V - T 7 - 2 にサブクローニングされた。

10

【 0 1 2 2 】

作成体 m G l u R 3 B を作成するために、M E T A B 5 1 B 挿入体を含有する p C M V - T 7 - 3 プラスミドを S c a I / B g l II で消化し、アンピシリン耐性遺伝子の 5' 半分と M E T A B 5 1 B 挿入体の 5' 部分 (配列番号 5 のヌクレオチド 7 4 8 - 1 6 7 1) を含有する 2.6 kb の断片を単離した。この断片を、M E T A B 4 8 の挿入体を有する p C M V - T 7 - 2 プラスミドの S c a I / B g l II 消化物から単離した 4.3 kb の断片 [この 4.3 kb の断片はアンピシリン耐性遺伝子の 3' 半分と M E T A B 4 8 の 3' 部分を有する (配列番号 5 のヌクレオチド 1 6 7 2 - 3 9 1 9)] に結合させた。得られた作成体 (m G l u R 3 B) は、316 ヌクレオチドの 5' 非翻訳配列 (配列番号 5 のヌクレオチド 7 4 8 - 1 0 6 3)、全 m G l u R 3 コーディング配列 (配列番号 5 のヌクレオチド 1 0 6 4 - 3 7 0 3)、および 216 ヌクレオチドの 3' 非翻訳配列 (配列番号 5 のヌクレオチド 3 7 0 4 - 3 9 1 9) を含有する。m G l u R 3 B をコードする配列は、哺乳動物細胞中での発現のためにベクター p C M V - T 7 - 3 と p C M V - T 7 - 2 からの制御成分に機能的に結合している。

20

【 0 1 2 3 】

作成体 m G l u R 3 C を作成するために、M E T A B 4 6 の挿入体を有する p C M V - T 7 - 3 プラスミドを、S c a I / B g l II で消化し、アンピシリン耐性遺伝子の 5' 半分と M E T A B 4 6 の 5' 部分を含有する 3.4 kb の断片 (配列番号 5 のヌクレオチド 1 - 1 6 7 1) を単離した。この断片を、M E T A B 4 8 の作成体 m G l u R 3 B で使用したものと同一 S c a I / B g l II 断片に結合させた。得られた作成体 (m G l u R 3 C) は、5' 非翻訳配列の 1 0 6 3 ヌクレオチド (配列番号 5 のヌクレオチド 1 - 1 0 6 3)、全 m G l u R 3 コーディング配列 (配列番号 5 のヌクレオチド 1 0 6 4 - 3 7 0 3)、および 3' 非翻訳配列の 216 ヌクレオチド (配列番号 5 のヌクレオチド 3 7 0 4 - 3 9 1 9) を含有する。この m G l u R 3 C をコードする配列は、哺乳動物細胞中での発現のためにベクター p C M V - T 7 - 2 と p C M V - T 7 - 3 からの制御成分に機能的に結合している。

30

【 0 1 2 4 】

作成体 m G l u R 3 A は、m G l u R 3 C を E c o R V と N o t I で消化して、配列番号 5 のヌクレオチド 1 - 1 0 3 5 を含有する断片を除去して、N o t I 部位を平滑末端として、次に大きい方のベクター断片を再結合させることにより作成した。作成体 m G l u R 3 A は、28 ヌクレオチドの 5' 非翻訳配列 (配列番号 5 のヌクレオチド 1 0 3 6 - 1 0 6 3)、全 m G l u R 3 コーディング配列 (配列番号 5 のヌクレオチド 1 0 6 4 - 3 7 0 3)、および 216 ヌクレオチドの 3' 非翻訳配列 (配列番号 5 のヌクレオチド 3 7 0 4 - 3 9 1 9) を含有する。この m G l u R 3 A をコードする配列は、哺乳動物細胞中での発現のためにベクター p C M V - T 7 - 3 と p C M V - T 7 - 2 からの制御成分に機能的に結合している。

40

【 0 1 2 5 】

作成体 p S V - h m G l u R 3 C (m G l u R 3 の S V 4 0 プロモーター制御発現に使用するため) を作成するために、M E T A B 4 6 の挿入体を有する p C M V - T 7 - 3 プラスミドを S c a I / N o t I で消化し、アンピシリン耐性遺伝子の 3' 部分と全 M E T

50

A B 4 6 挿入体を含む断片を単離した。プラスミド p S V β を S c a I / N o t I で消化し、アンピシリン耐性遺伝子 5' 部分と S V 4 0 早期プロモーターおよびスプライス部位を含む断片を、M E T A B 4 6 を有する p C M V - T 7 - 3 ベクターからの S c a I / N o t I 断片に結合させて、p S V - M E T A B 4 6 を作成した。プラスミド p S V - M E T A B 4 6 を S c a I / B g l II で消化し、アンピシリン耐性遺伝子の 5' 部分、S V 4 0 早期プロモーターおよびスプライス部位そして M E T A B 4 6 の 5' 部分 (配列番号 5 のヌクレオチド 1 - 1 6 7 1) を含む断片を単離した。この断片を、作成体 m G l u R 3 B や m G l u R 3 C で使用したものと同一 M E T A B 4 8 の S c a I / B g l II 断片に結合させた。得られた作成体 (p S V - h m G l u R 3 C) は、S V 4 0 プロモーターを含むし、m G l u R 3 DNA (配列番号 5 のヌクレオチド 1 - 3 9 1 9 を含む) と機能的に結合した S V 4 0 スプライス部位が続く、この後にポリアデニル化シグナルが続く。

10

【0126】

D. m G l u R 2 受容体 c D N A

実施例 1. C. に記載したようにヒト海馬 c D N A ライブラリーからクローン M E T A B 4 0 を単離した。この M E T A B 4 0 の挿入体 c D N A は長さが 1 1 0 0 塩基対であり、ヒト m G l u R 2 受容体の 3' 末端 (翻訳停止コドンと 3' 末端非翻訳配列を含む) をコードする。M E T A B 4 0 の最初の 3 5 5 ヌクレオチドは配列番号 3 に提供され、M E T A B 4 0 の最後の 3 4 3 ヌクレオチド (すべて 3' 非翻訳配列からである) は配列番号 1 3 に提供される。

20

【0127】

m G l u R 2 転写体の 5' 部分を示す DNA を含むクローンを単離するために、M E T A B 4 0 の 5' 末端に対応するオリゴヌクレオチドへのハイブリダイゼーションについて、ヒト海馬 c D N A ライブラリーをスクリーニングすることができる。ハイブリダイズするクローンを精製し、DNA 配列解析により性状解析する。M E T A B 4 0 に重複し翻訳開始コドンを含むクローンを、適当な制限部位で M E T A B 4 0 に結合させて、全長 m G l u R 2 をコードする c D N A 作成体を作成することができる。

【実施例 2】

【0128】

卵母細胞中の組換えヒトメタボトロピックグルタミン酸受容体の発現

30

ヒトメタボトロピック受容体をコードする DNA を含む作成体から調製したインビトロ転写体を、ツノガエル (Xenopus) 卵母細胞に注入した。2 電極の電位固定法 (例えば、スツマー (Stuhmer) (1992) Meth. Enzymol. 2 0 7 : 3 1 9 - 3 3 9 を参照) を用いて、卵母細胞トランスメンブレン電流の電気生理的測定を行なった。

【0129】

A. インビトロ転写体の調製

作成体 m G l u R 5 a 3 中に含まれるメタボトロピック受容体 c D N A のキャップされた組換え転写体を、メガスクリプト (Megascript) キット (カタログ番号 # 1 3 3 4、アンピオン社 (Ambion Inc.)、オースチン、テキサス州) を用いて、線状化したプラスミドから合成した。各合成転写体の質量を紫外吸光度法により測定し、各転写体の完全性をアガロースゲルの電気泳動により測定した。

40

【0130】

B. 電気生理学

卵母細胞 1 つにつき、1 0 - 5 0 ng のメタボトロピック受容体転写体を、ツノガエル (Xenopus) 卵母細胞に注入した。卵母細胞の調製と注入は、ダスカル (Dascal) の方法 [(1 9 8 7) Crit. Rev. Biochem. 2 2 : 3 1 7 - 3 8 7] に従って行なった。m R N A 注入の 2 から 6 日後、2 電極電位固定法を用いて卵母細胞を試験した。細胞はリンゲル溶液 (1 1 5 m M N a C l、2 . 5 m M K C l、1 . 8 m M C a C l₂、1 0 m M H E P E S、pH 7 . 3) 浴に浸漬し、膜電位は - 8 0 から - 1 0 0 mV に固定した。薬剤含有溶液の 6 0 μ l ずつをピペットで直接浴に入れた。アクソテープ (AXOTAPE) バージョン 1 . 2 ソ

50

フトウェア（アクソン・インスツルメンツ（Axon Instruments）、フォスターシティ、カリフォルニア州）を用いてPC-386中のラボマスター（Labmaster）データ採取ボードを用いて2 - 5 Hzでデータをサンプリングした。データをレーザープリンターに取り出すか、またはシグマプロット（Sigmaplot）バージョン5.0を用いてプロットした。

【0131】

メタボトロピック受容体調節化合物（すなわち、0.001 - 0.1 μ Mキスカル酸、0.1 - 10 μ Mグルタミン酸および0.1 - 300 μ M 1S, 3R-ACPD（1-アミノ-シクロペンチル-1, 3-ジカルボン酸）を浴に適用し、トランスメンブレン電流を記録した。化合物の適用後相当の電流が検出された。種々の量の各化合物を適用後の電流を比較する用量応答試験で、電流の大きさは各化合物の濃度の上昇に伴い増加することが明らかになった。これらのデータを解析した結果、各化合物のEC₅₀を計算することができ、これを化合物の相対電位の測定に使用した。

10

【実施例3】

【0132】

哺乳動物細胞におけるヒトメタボトロピックグルタミン酸受容体サブユニットの組換え発現

ヒト胎児性腎（HEK）細胞とチャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞（すなわち、DG44細胞；ウーラウプ（Urlaub）ら（1986）Som. Cell. Molec. Genet. 12 : 555を参照）を、ヒトメタボトロピック受容体をコードするDNAでトランスフェクションさせた。種々の方法（例えば、イノシトールリン酸（IP₁）測定法、Ca⁺⁺-感受性蛍光指示薬ベースの測定法、および³H-グルタミン酸結合測定法）を用いて、メタボトロピック受容体の発現について解析した。

20

【0133】

A. HEK293細胞の一時的トランスフェクション

HEK293細胞を、mGluR5a（作成体mGluR5a2とmGluR5a3および作成体MMTV-hmGluR5a）受容体をコードするDNAで一時的トランスフェクションを行なった。約2 × 10⁶のHEK293細胞を標準的CaPO₄トランスフェクション法[ウィグラー（Wigler）ら、（1979）Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 76 : 1373 - 1376を参照]に従い、目的のプラスミドの5 - 18 μ g（あるトランスフェクション体においては0.18 μ g、実施例3. C. 2. を参照）で一時的にトランスフェクションした。さらにCMVプロモーターに融合した大腸菌 β -ガラクトシダーゼ遺伝子を含む、プラスミドpCMV β gal（クロンテック・ラボラトリーズ（Clontech Laboratories）、パロアルト（Palo Alto）、カリフォルニア州）0.5 - 2 μ gを、レポーター遺伝子として同時トランスフェクションして、トランスフェクションの効率を追跡した。 β -ガラクトシダーゼとX-gal基質を含む反応の生成物の直接染色により、 β -ガラクトシダーゼ発現についてトランスフェクション体を解析した[ジョーンズ（Jones）（1986）EMBO 5 : 3133 - 3142]。トランスフェクション体はまた、 β -ガラクトシダーゼ活性の測定による β -ガラクトシダーゼ発現について解析することもできる[ミラー（Miller）（1972）分子遺伝子学実験（Experiments in Molecular Genetics）のPP. 352 - 355, コールド・スプリング・ハーバー・プレス（Cold Spring Harbor Press）]。

30

40

【0134】

5 μ gのMMTV-hmGluR5Aで一時的トランスフェクションを行なったHEK293細胞は、ラウス肉腫ウイルス（RSV）LTRプロモーターに機能的に結合した糖質コルチコイド受容体をコードするDNAを含むpRShGR（ATCC整理番号67200）5 μ gと同時にトランスフェクションをした。これらの細胞における糖質コルチコイド受容体の同時トランスフェクションは、細胞への糖質コルチコイド（例えば、デキサメタゾン）の添加によるMMTVプロモーター-mGluR5aDNAの発現の誘導を確実にする。

【0135】

50

H E K細胞のこれらのトランスフェクションの効率は、標準的効率に典型的なものであった（すなわち、約50％）。

【0136】

B．哺乳動物細胞の安定なトランスフェクション

H E K 2 9 3 細胞、L t k⁻細胞およびC H O細胞のような哺乳動物細胞は、リン酸カルシウムトランスフェクション法を用いて安定にトランスフェクションすることができる [Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, ワイリー・インターサイエンス (Wiley Inter-Science)、増刊14号、単元9.1.1 - 9.1.9 (1990)]。C H O細胞を宿主として使用するとき、ヒトメタボトロピック受容体をコードするc D N Aの発現を制御するにはS V 4 0プロモーターの使用が一般に好ましい。それぞれ1 - 2 × 10⁶細胞を含有する10cmのプレートを、メタボトロピック受容体をコードするD N A約5 - 10 μgと選択マーカー（例えば、ネオマイシン - 耐性遺伝子（すなわち、H E K 2 9 3形質転換体の選択にはネオマイシン耐性遺伝子（すなわち、p S V 2 n e o））、L t k⁻細胞トランスフェクション体にはチミジンキナーゼ遺伝子、またはD G 4 4細胞形質転換体の選択にはジヒドロ葉酸還元酵素（d h f r）遺伝子）をコードするD N A 0.5 - 1 μgを含有するD N A / リン酸カルシウム沈殿物でトランスフェクションする。適当な培地中で約14日間の増殖の後、コロニーが形成され、クローニングシリンダーを用いて個々に単離される。次に単離物を限界希釈を行いスクリーニングして、例えば後述の方法を用いてメタボトロピック受容体を発現するものを同定する。

10

20

【0137】

C．トランスフェクション体の解析

1．蛍光指示薬に基づく測定

アゴニストによるG蛋白結合メタボトロピック受容体の活性化により、ホスファチジルイノシトール（P I）加水分解 / 細胞内C a⁺⁺シグナル化経路および / または阻害性c A M Pカスケードが刺激される。細胞内カルシウム濃度の一時的上昇の検出法は、P I加水分解 / C a⁺⁺動員（mobilization）経路またはP I加水分解 / C a⁺⁺動員（mobilization）経路と阻害性c A M Pカスケードの両方にカップリングしたメタボトロピック受容体の機能性発現の解析に適用できる。細胞内カルシウムレベルを測定する1つの方法は、カルシウム感受性蛍光指示薬を用いる。

30

【0138】

フルオ - 3（fluor - 3）やフラ - 2（fura - 2）（モレキュラー・プローブズ社（Molecular Probes Inc.）、ユージーン（Eugene）、オレゴン州）のようなカルシウム感受性指示薬は、膜透過性であるアセトキシメチルエステルとして入手できる。アセトキシメチルエステル型の指示薬が細胞内に入ると、サイトゾル性エステラーゼによりエステル基は除去され、このため遊離の指示薬はサイトゾル内に捕捉される。遊離の指示薬とカルシウムが相互作用すると、指示薬の蛍光強度が増加する。従って、指示薬を含有する細胞の細胞内C a⁺⁺濃度の上昇は直接蛍光の増強（または、フラ - 2を使用する時は、2つの波長での蛍光の比率の増強）として発現される。メタボトロピック受容体を測定するための自動蛍光検出装置が、本出願人の係属中の米国特許出願第07 / 812, 254号およびその対応するP C T特許出願U S 92 / 11090号（参考のためその全体が本明細書中に引用される）に記載されている。さらに細胞内C a⁺⁺振動を目視できるようにするために蛍光イメージング法を使用することができる。

40

【0139】

ヒトm G l u R 5 a受容体をコードするD N Aで一時的トランスフェクションを行なったH E K細胞を、自動蛍光指示薬ベースの測定法と蛍光イメージング測定法を用いて、機能性組換えメタボトロピック受容体の発現について解析した。同様に、メタボトロピック受容体D N Aで安定にトランスフェクションした細胞も、これらの測定法系を用いて機能性メタボトロピック受容体について解析した。

【0140】

a．自動蛍光測定法

50

2 × 10⁵ 細胞 / ウェルの濃度でポリ - L - リジンでプレコーティングし、20 μM フルオ - 3、0.2% プルロニック (Pluronic) F - 127 を HBS (125 mM NaCl、5 mM KCl、1.8 mM CaCl₂、0.62 mM MgCl₂、20 mM グルコース、20 mM HEPES、pH 7.4) 中に含有する培地中で、20 で 2 時間インキュベートしてフルオ - 3 を充填した 96 ウェルマイクロタイタープレート (ヌンク (Nunc)、カタログ番号 1 - 6708、アラメダ・インダストリーズ (Alameda Industries)、エスコンジド (Escondido)、カリフォルニア州) に、トランスフェクションしていない HEK293 細胞 (または pCMV - T7 - 3 で一時的にトランスフェクションした HEK293 細胞) および mGluR5a をコードする DNA でトランスフェクションした HEK293 細胞を広げた。次に細胞を測定緩衝液 (すなわち、HBS) で洗浄した。次にマイクロタイタープレートを蛍光プレートリーダー (例えば、フルオロスカン (Fluoroskan) II、ラボ・プロダクツ・インターナショナル社 (Lab Products International, Ltd.)、ラレー (Raleigh)、ノースカロライナ州) に入れ、各ウェルの基礎蛍光を測定し記録してから、ウェルにキスカル酸、グルタミン酸、トランス - ACPD (1 - アミノ - シクロペンタン - 1, 3 - ジカルボン酸)、1S, 3R - ACPD、AP3 (2 - アミノ - 3 - ホスホノプロピオン酸)、AP5 (2 - アミノ - 5 - ホスホノペンタノン酸)、および CNQX (6 - シアノ - 7 - ニトロキノキサリン - 2, 3 - ジオン) を添加した。アゴニストの添加後ウェルの蛍光を繰り返し (0.63 秒間隔で 75 回読む) 追跡する。

【0141】

一般に、トランスフェクションしていない HEK293 細胞の蛍光は、これらの化合物のどれを添加しても変化しなかった。mGluR5a3 または MMTV - h mGluR5a 作成体のいずれかで一時的にトランスフェクションした HEK293 細胞の蛍光は、グルタミン酸、キスカル酸、トランス - ACPD、または 1S, 3R - ACPD の添加に回答して上昇した。蛍光はピーク値まで増加し、次に時間とともに化合物の添加前の細胞の基礎レベルまで低下した。mGluR5a2 でトランスフェクションした細胞について、グルタミン酸、キスカル酸またはトランス - ACPD 刺激蛍光の増強に対する AP3、AP5 または CNQX の影響を調べた。これらの化合物 (AP3、AP5、または CNQX) のいずれも、これらの細胞中のアゴニスト誘導蛍光増強を阻害しなかった。

【0142】

種々の量のグルタミン酸、キスカル酸または 1S, 3R - ACPD を添加後に測定したピーク蛍光値を比較する用量応答試験で、ピーク蛍光の大きさは各化合物の濃度の上昇に伴い増加することが明らかになった。これらのデータを解析した結果、各化合物の EC₅₀ を計算することができ、これを化合物の相対電位の測定に使用した。

【0143】

MMTV - h mGluR5a および pRShgGR (糖質コルチコイド受容体作成体) で一時的に同時トランスフェクションした HEK293 細胞も、この蛍光測定法で解析した。これらの細胞の蛍光は 100 μM のキスカル酸に回答して増加し、測定前に細胞をデキサメタゾン (約 1 M) で 37 で 16 時間プレインキュベートするとピーク応答は大きかった。

【0144】

b. 蛍光イメージング測定法

細胞内 Ca⁺⁺ 濃度のメタボトロピック受容体介在変化を目視できるようにするために、mGluR5a3 で一時的にトランスフェクションした HEK293 細胞とトランスフェクションしていない HEK293 細胞 (対照) を、デジタルビデオイメージングで解析した。暗所中で室温で 25 分間細胞を 1 μM のフラ - 2 (アセトキシメチルエステル) に暴露することにより、トランスフェクション体 (ガラス挿入底を有する 35 mm 培養皿あたり 4 × 10⁵ 細胞) をフラ - 2 で充填した。次に細胞を DMEEM で 3 回そしてリングル溶液 (160 mM NaCl、5 mM KCl、2 mM CaCl₂、1 mM MgCl₂、11 mM グルコース、5 mM HEPES、pH 7.3) で 4 回洗浄した。

【0145】

次にトランスフェクション体と非トランスフェクション細胞を、紫外光源として150 Wのキセノンランプを有するアキシオベルト (Axiovert) 100TV倒立顕微鏡 (ツァイス (Zeiss)、オーベルコフレン (Oberkochen)、ドイツ) のステージの上に広げた。40 × 1.3 N.A.油浸対物レンズを介して細胞を340 nmと380 nmで交互励起するの
に、イメージ1フルオル (Fluor) システム (ユニバーサル・イメージング (Universal Imaging)、ウェストチェスター、ペンシルバニア州) を使用した。510 nmより長い波
長で出る光を、CCD72強化CCDカメラ (エム・ティー・アイ ダーゲ (MTI Da
ge)、ミシガン・シティ、インディアナ州) により集め、デジタル化した。340 nmと3
80 nmの励起イメージからバックグラウンドの蛍光を差し引いた。補正值を使用して340
/ 380強度比を計算した。較正していないフラ - 2比は、細胞内Ca⁺⁺濃度の変化の
信頼できる指標である。 10

【0146】

較正していないフラ - 2比を用いて、休止細胞内Ca⁺⁺濃度 (約100 nM) を紫色で
、高細胞内Ca⁺⁺濃度 (約1 μM) を赤色で疑色イメージを作成した。実験の各比率の
イメージについて、定量解析のために、各細胞の12 × 12ピクセル領域内の平均比をソ
フトウェアにより計算し、さらに解析しグラフを描くために表に取り込んだ。

【0147】

HEK293細胞は、PI加水分解 / Ca⁺⁺動員経路の受容体介在活性化に必要な細胞
内成分を発現することを証明するために、トランスフェクション体と非トランスフェク
ション細胞 (内因性G蛋白結合ムスカリン性アセチルコリン受容体を発現する) を1 mMの
カルバミルコリン (CCh; ムスカリン性アセチルコリン受容体アゴニスト) に暴露し、
細胞内Ca⁺⁺濃度の上昇を追跡した。典型的には、イメージング試験でCChの添加に
応答して、大多数の細胞の細胞内Ca⁺⁺濃度の上昇が検出された。 20

【0148】

トランスフェクションしたHEK293細胞およびトランスフェクションしていないH
EK293細胞を、100 μMキスカル酸に反応して細胞内Ca⁺⁺濃度が上昇するか否
かについて追跡した。平均すると、非トランスフェクション細胞の細胞内Ca⁺⁺濃度は
、キスカル酸への暴露後増加しない。これに対して、トランスフェクションした細胞の2
6.7 ± 2.3%のCa⁺⁺濃度は100 μMのキスカル酸の添加に反応して増加した
。 30

【0149】

2. ホスファチジルイノシトール加水分解 (IP₁) 測定法

G蛋白結合メタボトロピック受容体のアゴニストによる活性化により、ホスファチジル
イノシトール (PI) 加水分解経路が刺激されるため、PI加水分解の生成物 (例えば、
IP₃、IP₂ またはIP₁) の増加を検出する方法は、PI加水分解 / Ca⁺⁺動員経
路またはPI加水分解 / Ca⁺⁺動員経路と阻害性cAMPカスケードにカップリングし
たメタボトロピック受容体の機能性発現の解析に応用することができる。PIの加水分解
により生成されるIP₁ および / またはIP₂ および / またはIP₃ を測定する1つの方
法は、細胞膜リン脂質内への[³H] - ミオ - イノシトールを取り込み、次に[³H] - I
P₁、[³H] - IP₂ および[³H] - IP₃ を分離し、以下のように各画分の放射能を
定量する。 40

mGluR5a3で一時的にトランスフェクションしたHEK293細胞を、8 × 10⁵
細胞 / ウェルで24ウェルのマイクロタイタープレートに広げた。細胞を数時間沈降さ
せ、プレートの底に付着させた後、2 μCiの[³H] - ミオ - イノシトール (アマーシャ
ム (Amersham)、カタログ番号 # PT6 - 271、アーリントンハイツ (Arlington Heig
hts)、イリノイ州; 比活性 = 17.7 Ci / mmol) を各ウェルに添加し37 °Cで一晩イン
キュベートした。翌日、ニコンダイアフォト (Nikon Diaphot) 倒立顕微鏡下で細胞を観
察し、細胞の形態の健全性を評価し、ウェルがコンフルエント (confluent) な細胞層を
含有するか否かを測定した。次に培地を吸引し、細胞を0.5 mlのクレブス重炭酸緩衝液
[117.9 mM NaCl、4.72 mM KCl、2.54 mM CaCl₂、1.18 mM 50

MgSO₄、1.19 mM KH₂PO₄、2.5 mM NaHCO₃、11.1 mMデキストロース(95% O₂、5% CO₂、pH7.4で平衡化されている)で2回洗浄した。細胞を室温で45分間インキュベートした。次に各ウェルから緩衝液を吸引し、細胞を洗浄し、0.5 ml/ウェルで室温で45分間インキュベートした。次に緩衝液を各ウェルから吸引し、次に10 mM NaClの代わりに10 mMのLiClを含有する450 µlのクレブス重炭酸緩衝液(IP₁のイノシトールと無機リンへの加水分解を防ぐために)とともに細胞を37℃で20分間インキュベートした。

【0150】

メタボトロピック受容体調節化合物による細胞の処理を始める前に、50 µlのクレブス重炭酸緩衝液(対照)または化合物の最終濃度の10×のものを各ウェルに添加し、40分間インキュベートを続けた。各ウェルに1 mlの氷冷メタノールを加えてインキュベートを停止させた。

【0151】

細胞からIP₁を単離するために、プラスチックピペットのチップでプレートの細胞を掻き取って、細胞懸濁物を12×75 mmガラス試験管に移した。試験管を完全にボルテックス混合し、各反応混合物の150 µl分(すなわち、総量の10分の1)を別の試験管に移して蛋白を測定した。1 mlのクロロホルムによる抽出により、放射標識膜リン脂質から水溶性リン酸イノシトールを分離した。試験管を室温で30分間インキュベートした後、4℃で500×gで5分間遠心分離した。 [³H]-リン酸イノシトールを含有する水(上)層を、アクセルQMAセパク(Accell QMA SEP-PAK)カラム(ミリポア(Millipore)、カリフォルニア州)に接続した10 mlのシリンジに移した(これは、20 mlのシンチレーションバイアルに集められるように変更したアマーシャム・スーパーセパレーター(Amersham Superseparator)装置に結合してある)。カートリッジに水(10 ml)を入れて [³H]-イノシトール前駆体を除き、次に4 mlの0.02 M トリエチルアンモニウム水素炭酸緩衝液(TEAB、フルカ(Fluka); ニューヨーク)を加えた。カートリッジから [³H]-IP₁、 [³H]-IP₂そして [³H]-IP₃を別々に除去するために、4 mlの0.1 M TEAB、4 mlの0.3 M TEAB、そして4 mlの0.4 M TEABをカートリッジに連続的に添加して、画分を溶出させ、大きいシンチレーションバイアルに採取した。エコルメ・カクテル(Ecolume cocktail)(15 ml; ICN; カリフォルニア州)を各バイアルに加え、次にシンチレーション計測して別々の画分の各IPの量を測定した。蛋白濃度は、バイオラッド(Bio-Rad)蛋白マイクロ測定法(バイオラッド(Bio-Rad)、リッチモンド、カリフォルニア州)を用いて測定した。

【0152】

この測定法で測定した時、18 µgのmGluR5a3で一時的にトランスフェクションしたHEK293細胞は、比較的高い基礎レベルのIP₁を示した。しかし、0.18 µgのmGluR5a3で一時的にトランスフェクションしたHEK293細胞は、低い基礎IP₁レベルを示し、1 mMのグルタミン酸、1 mMのキスカル酸または1 mMの1S, 3R-ACPDで処理した時はIP₁レベルの検出できる増加を示した。IP₁レベルのキスカル酸に誘導される増加は、1 mMのAP3により影響を受けなかった。

【0153】

mGluR5a3でトランスフェクションした細胞に、種々の濃度のグルタミン酸、キスカル酸または1S, 3R-ACPDの添加後測定したIP₁レベルを比較した用量応答試験では、各化合物の濃度の上昇とともにIP₁レベルが増加することを示していた。これらのデータの解析により、各化合物のEC₅₀を計算することができ、これを化合物の相対電位の測定に使用した。

【0154】

3. メタボトロピック受容体リガンド結合測定法

mGluR5a3またはpUC19(陰性対照)で一時的にトランスフェクションしたHEK細胞を、 [³H]-グルタミン酸結合について解析した。陽性対照として結合測定法にラット脳の膜を加えた。

10

20

30

40

50

【 0 1 5 5 】

a . 膜の調製

i . ラット前脳膜

シェーブ (Schoepp) ら [(1 9 9 2) Neurosci. Lett. 1 4 5 : 1 0 0] が記載したように、ラット前脳膜を調製した。簡単に説明すると、1 0 個のラット脳からの基本的に脳皮質、線条体と海馬よりなる前脳を、2 . 5 mM CaCl_2 、pH 7 . 6 を含有する 5 0 部の 3 0 mM の氷冷トリス - 塩酸中で、ポリトロン (Polytron) (ブリンクマン (Brinkman) 、ウェストベリー (Westbury) 、ニューヨーク州)) を用いてホモゲナイズした。ホモゲネートを 4 で 3 0、0 0 0 $\times g$ で 1 5 分間遠心分離した。上澄液を捨て、ポリトロンを用いてペレットを 5 0 部の緩衝液に再懸濁し、懸濁物を 3 0、0 0 0 $\times g$ で 1 5 分間遠心分離した。この工程を 2 回繰り返した。ペレットを緩衝液に再懸濁し、3 7 で 3 0 分間インキュベートした。次に懸濁物を 4 で 3 0、0 0 0 $\times g$ で 1 5 分間遠心分離した。この工程を 3 回繰り返した。最終ペレットを 1 5 部の 5 0 mM トリス - 塩酸、pH 7 . 6 に再懸濁し、分注し、急速に凍結し、- 7 0 で保存した。

10

【 0 1 5 6 】

ii . トランスフェクションした H E K 2 9 3 細胞およびトランスフェクションしない H E K 2 9 3 細胞の膜

m G l u R 5 a をコードする DNA または p U C 1 9 (陰性対照) でトランスフェクションした H E K 2 9 3 細胞から膜を調製するために、組織培養プレートから細胞を掻き取り、プレートを 5 ml の P B S (リン酸緩衝化生理食塩水 : 1 3 7 mM NaCl 、2 . 7 mM KCl 、1 0 mM Na_2HPO_4 、1 . 7 mM KH_2PO_4) で洗浄した。卓上型遠心分離機で細胞を低速度で遠心分離し、細胞ペレットを P B S で洗浄した。0 . 5 mM PMSEF 、pH 7 . 6 を含有する 5 0 mM トリス - 塩酸 2 0 部に、細胞ペレットを再懸濁した。ダウンス (Dounce) (テフロン (登録商標) / ガラス) ホモゲナイザー中で 1 0 - 2 0 ストロークを用いて、細胞を氷の上でホモゲナイズした。ホモゲネートを 4 で 1 2 0、0 0 0 $\times g$ で 3 0 分間遠心分離した。最終の膜ペレットを、0 . 5 mM PMSEF 、pH 7 . 6 を含有する 5 0 mM トリス - 塩酸に再懸濁した。膜調製物を分注し、急速に凍結し、- 7 0 で保存した。蛋白濃度は、ブラッドフォード (Bradford) [(1 9 7 6) Anal. Biochem. 7 2 : 2 4 8] の方法で測定した。

20

【 0 1 5 7 】

b . [^3H] - グルタミン酸結合測定法

ラット前脳の膜中のメタボトロピック受容体への [^3H] - グルタミン酸の特異的結合は、基本的にシェーブ (Schoepp) ら (前述) が記載したように調製した。測定の日凍結ホモゲネートを融解し、5 0 mM トリス - 塩酸、pH 7 . 6 で 3 回洗浄した。最終ペレットを 5 0 mM トリス - 塩酸、pH 7 . 6 に再懸濁した。蛋白濃度は、ブラッドフォード (Bradford) [(1 9 7 6) Anal. Biochem. 7 2 : 2 4 8] の方法で測定した。懸濁物を 3 0、0 0 0 $\times g$ で 1 5 分間遠心分離し、ペレットを 1 mg / ml の濃度で測定緩衝液 (5 0 mM トリス - 塩酸、0 . 5 mM PMSEF 、0 . 1 % BSA 、pH 7 . 6) に再懸濁した。膜懸濁物を、総量 0 . 5 ml の測定緩衝液 [イオノトロピックグルタミン酸受容体への [^3H] - グルタミン酸の結合を組織するために、1 0 0 μM NMDA (シグマ (Sigma) 、セントルイス、ミズーリ州)、1 0 0 μM AMPA および 1 0 0 μM カイニン酸 (リサーチ・バイオケミカルズ社 (Research Biochemiclas Inc) 、ナチック (Natick) 、マサチューセッツ州) を含有し、塩化物依存性摂取部位への [^3H] - グルタミン酸の結合を阻害するために、1 0 0 μM SITS (シグマ (Sigma) 、セントルイス、ミズーリ州) を含有する] 中で、3 重測定で 1 0 または 1 0 0 nM の [^3H] - グルタミン酸 (ニュー・イングランド・ニュークレア (New England Nuclear) 、ボストン、マサチューセッツ州 ; カタログ番号 N E T - 4 9 0、比活性 = 5 7 . 4 Ci / mmol) と、氷上で 4 5 分間インキュベートした。S M - 2 4 ローター (ソーバル (Sorvall) 、ウィルミントン (Wilmington) 、デラウェア (Delaware)) 中で 4 で 2 0、0 0 0 $\times g$ で 5 分間遠心分離して、結合した放射能を遊離の放射能から分離した。ペレットを 5 - 6 ml の氷冷 5 0 mM トリス - 塩酸、pH 7 . 6 で 2

30

40

50

回洗浄した。ペレットを5 mlのエコルメシンチレーションカクテル (Ecolume scintillation cocktail) 中でボルテックス混合して可溶化させた。ベックマン (Beckman) シンチレーション計測機で放射能を測定した。総結合量から、1 mMのグルタミン酸の存在下で得られた非特異的結合量を引いて、特異的結合量を求めた。

【0158】

mGluR5aをコードするDNAまたはpUC19でトランスフェクションしたHEK293細胞から調製した膜への $[^3\text{H}]$ -グルタミン酸の特異的結合を、基本的にラット脳の膜への結合の測定で記載したように測定したが、若干の修飾を行なった。測定の日

に凍結ホモゲネートを融解し、MR-150高速冷却マイクロ遠心分離機 (ペニンシュラ・

ラボラトリーズ社 (Peninsula Laboratories Inc.)、ベルモント (Belmont)、カリホル

ニア州) で遠心分離した。ペレットを測定緩衝液 (50 mM トリス - 塩酸、0.5 mM PMSF、0.1% BSA、pH 7.6) で2回洗浄し、最終ペレットを1 mg/mlの濃度で測定

緩衝液に再懸濁した。NMDA、AMPAおよびカイニン酸を測定混合物から除きながら、HEK293細胞を $[^3\text{H}]$ -グルタミン酸への結合について解析した。

【0159】

200 μg の膜と100 nMの $[^3\text{H}]$ -グルタミン酸を用いて、ラット脳の膜への $[^3\text{H}]$ -グルタミン酸の特異的結合を測定した。総結合量対非特異結合量の比は約2:1であった。

【0160】

mGluR5a3またはpUC19でトランスフェクションしたHEK293細胞から

調製した膜への $[^3\text{H}]$ -グルタミン酸の特異的結合を、200 μg の膜と100 nMの $[^3\text{H}]$ -グルタミン酸を用いて測定した。mGluR5a3でトランスフェクションしたHEK293細胞から調製した膜への特異的結合量は、pUC19でトランスフェクションしたHEK293細胞から調製した膜への結合量より有意に高かった。競合結合試験を行い、種々の濃度の非標識グルタミン酸の存在下でmGluR5a3でトランスフェクションしたHEK293細胞から調製した膜への $[^3\text{H}]$ -グルタミン酸の特異的結合の量を測定した。これらの試験で得られたデータからIC₅₀値を求めた。

【0161】

4. サイクリックAMP (cAMP) 測定

a. RIAベースの測定

ある種のG蛋白結合受容体の活性化は、cAMPの(増加ではなく)低下を引き起こすため、細胞内cAMPレベルの測定法は、哺乳動物宿主細胞中で発現される組換えヒトメタボトロピック受容体を評価するのに使用される。ヒトメタボトロピック受容体をコードするDNAまたはpUC19 (陰性対照) で一時的にまたは安定にトランスフェクションした哺乳動物細胞を、 5×10^5 細胞/ウェルの濃度で24ウェルのマイクロタイタープレートに広げ、一晚インキュベートさせる。翌日、ニコンダイアフォト (Nikon Diaphot) 倒立顕微鏡下で細胞を観察し、細胞の形態の健全性を評価し、ウェルはコンフルエントな細胞層を含有するか否かを測定した。次に培地を吸引し、細胞を、1 mMのIBMX (3-イソブチル-1-メチルキサンチン; シグマ (Sigma)、セントルイス、ミズーリ州) と0.1% BSAを含有するクレブス重炭酸緩衝液0.5 ml (PI加水分解測定法で使用したものと同じ緩衝液: 実施例3.C.2を参照) で2回洗浄した。あるいはクレブス重炭酸緩衝液の代わりに1xPBSを使用することもできる。各洗浄の後に37°Cで30分間インキュベートを行う。各ウェルから緩衝液を吸引し、次に細胞を、1 mMのIBMXと0.1% BSAを含有する0.2 mlのクレブス重炭酸緩衝液で37°Cで20分間インキュベートする。

【0162】

メタボトロピック受容体調節化合物による細胞の処理を始める前に、50 μl のクレブス重炭酸緩衝液 (最終濃度の5xのフォルスコリンの有りまたは無し) を、一部の細胞 (基礎対照) に加え、一部の細胞 (試験細胞) に最小濃度の5xの化合物および最終濃度の5xのフォルスコリンを加え、37°Cで15分間インキュベートする。15分間のインキ

キュベートの最後に、1%トリトンX-100溶液25 μ lを加えて反応を停止させ、インキュベートをさらに10分間続ける。溶解した細胞および細胞懸濁物を、プラスチックピペットのチップで12 $\times$ 75mmのポリプロピレン試験管に移す。各ウェルを、1mMのIBM Xと0.1%BSAを含有するクレブス重炭酸緩衝液75 μ lで洗浄する。洗浄物を細胞溶解物を一緒にする。細胞溶解懸濁物を2300 $\times$ gで5分間遠心分離し、RIAキット（アマーシャム・ライフサイエンス（Amersham Life Sciences）カタログ#TRK 432；アーリントンハイツ（Arlington Heights）、イリノイ州）を用いて、上澄液のcAMPレベルを測定する。

【0163】

b. サイクリックヌクレオチドゲートのチャンネルに基づく測定法

5%の規定補足ウシ血清（ハイクローン（Hyclone））を含有するダルベッコー改変イーグル培地（DMEM；ギブコ（GIBCO））（100U/mlのペニシリンと100 μ g/mlの硫酸ストレプトマイシンを含む）中で、HEK293細胞を単層で増殖させた（10cmのポリ-D-リジン被覆プレート当たり約2 $\times$ 10⁶細胞）。CMVプロモーターに結合した5 μ gのpCMV-OCNA（嗅覚性サイクリックヌクレオチドゲートのチャンネル（ダレン（Dhallen）ら）を参照、前述）、2 μ gのpCMV- β gal（クロンテック（Clontech）、パロアルト（Palo Alto）、カリフォルニア州）、および対照プラスミドとしての13 μ gのpUC19を用いて、細胞をリン酸カルシウム法（アウスベル（Ausubel）ら、前述、pp9.1.1-9.1.7）で一時的にトランスフェクションした。ベクターpCMV-OCNAは、pBluescriptKSからの約3.0kbのEcoRI断片として嗅覚性サイクリックヌクレオチドゲートのチャンネルをコードするDNAを単離し、得られた断片をEcoRI消化pCMV-T7-3に結合させることにより、作成した。トランスフェクションの6時間後、リン酸カルシウム沈殿物を洗い流し、10%透析胎児牛血清（ハイクローン（Hyclone））、100U/mlのペニシリン、100 μ g/mlのストレプトマイシン、および2mMグルタミンが補足されたDMEMを細胞に与えた。 β -ガラクトシダーゼ活性の測定によるトランスフェクション効率は、50-70%であった。

【0164】

嗅覚性サイクリックヌクレオチドゲートのチャンネルDNAでトランスフェクションしたHEK細胞を、24-48時間インキュベートしてから、機能を試験した。まず、細胞質の面に達するcAMPの濃度が調節できるように（例えば、単一チャンネル記録（Single Channel Recording）、サクマンとネヘル（Sakman and Neher）編、プレナム・プレス（Plenum Press）、ニューヨーク、（1983））、トランスフェクションした細胞から引っ張った裏返した膜パッチを用いて、電気生理学的にチャンネルの活性を測定した。パッチの両面を、Ca⁺⁺/Mg⁺⁺を含まないリングル液に接触させた。1つのパッチでは、1mMのcAMPの存在下で膜電位を-100から+100mVへ2秒で勾配をつけて電流を発生させた。この結果は、チャンネルが機能的に発現されていることを示唆していた。

【0165】

トランスフェクション体もまた、細胞内カルシウムレベル（[Ca⁺⁺]）の単細胞ビデオイメージングにより解析した。この方法は、細胞内カルシウムレベルの測定（これはチャンネルのサイクリックヌクレオチド活性化により制御される、チャンネルを介するカルシウムの流入量とともに変化する）によるサイクリックヌクレオチドゲートのチャンネルの分析を可能にする。イメージング測定法は、基本的に実施例3.C.1.bに記載のように実施したが、若干の修飾を行なった。色素を充填後、細胞をツァイスアクシオヴェルト（Zeiss Axiovert）顕微鏡と100Wの水銀ランプ、デージ（Dage）増強CCDカメラ、そしてイメージ-1（Image-1）ハードウェアとイメージ処理のソフトウェアを用いて観察した。このソフトウェアは、20 $\times$ 1.3N.A.油浸対物レンズを介して細胞を350nmと385nmの交互励起を調節した（典型的には5秒毎）。510nmより長い波長で出る光を、CCDカメラにより集め、デジタル化し、350nmと385nmの励起イメージからバックグラウンドの発光を差し引いた後、350/385強度比を計算した。

【0166】

定量的解析のために、実験の各比率イメージについてソフトウェアにより各細胞の 12×12 ピクセル領域内の $350/385$ 平均比を計算し、さらに解析しグラフを描くために表に取り込んだ。フラ - 2 シグナルを未変性の細胞で校正し、細胞をリンゲル液 ($10 \mu\text{M}$ イオノマイシン、 10mM EGTA を含有し、および Ca^{++} の添加無し) に接触させて R_{min} を得た。次に細胞をリンゲル液 ($10 \mu\text{M}$ イオノマイシン、 10mM Ca^{++} を含有する) に接触させて 3 回洗浄して R_{max} を得た。生きている細胞中のフラ - 2 の K_d 250nM とグリーンキーウィックツ (Grynkiewicz) ら (J. Biol. Chem. **260**: 3440 (1985)) を使用して、静止 $[\text{Ca}^{++}]_i$ は典型的には 100nM であった。

【0167】

これらの実験で、細胞内 cAMP レベルを上昇させる物質に HEK293 細胞トランスフェクション体を暴露し、以後の $[\text{Ca}^{++}]_i$ の変化を追跡した。 $100 \mu\text{M}$ のフォルスコリン (アデニルシクラーゼのアクチベータ) の添加に应答して、64 個の細胞の平均した結果と各細胞で、 $[\text{Ca}^{++}]_i$ にわずかな増加が見られた。 1mM の IBMX (cAMP ホスホジエステラーゼの阻害剤) の添加後、さらに有意な増加が見られた。対照実験では、64 個の非トランスフェクション HEK293 細胞中の 1 つのみが、細胞内 cAMP レベルの上昇に対応して、 $[\text{Ca}^{++}]_i$ の増加を示した。この应答は一時的であり、サイクリックヌクレオチドゲートのチャネル DNA でトランスフェクションした HEK293 細胞中で見られた持続性应答とは明らかに異なっていた。

【0168】

これらの結果は、サイクリックヌクレオチドゲートのチャネルを発現する HEK 細胞は、活性化された時細胞内サイクリックヌクレオチドレベルに変化を引き起こす受容体 (例えば、メタボトロピック受容体) の測定において宿主細胞として使用できることを証明している。

【0169】

5. ノーザンブロットハイブリダイゼーション解析

ヒトメタボトロピック受容体をコードする DNA でトランスフェクションした細胞はまた、ノーザンブロット解析により対応する転写体の発現について解析することができる。ヒトメタボトロピック受容体をコードする DNA でトランスフェクションした約 1×10^7 個の細胞から総 RNA を単離し、 $10 - 15 \mu\text{g}$ の RNA をノーザンハイブリダイゼーション解析に使用した。ヒトメタボトロピック受容体をコードするプラスミドからの挿入体をニックトランスレーションし、プローブとして使用した。ノーザンブロットハイブリダイゼーションの典型的な条件は以下の通りである：

ハイブリダイゼーションは、 42°C で $5 \times \text{SSPE}$ 、 $5 \times$ デンハルツ (Denhart's) 溶液、 50% ホルムアルミド中に行ない、洗浄は 65°C で $0.2 \times \text{SSPE}$ と 0.1% SDS 中に行なった。

【0170】

本発明をいくつかの好適な実施態様を参照して詳細に説明したが、ここに記載され特許請求のされている本発明の精神と範囲を逸脱することなくその修飾や変更が可能であることが理解されるであろう。

【0171】

(配列の要約)

配列番号 1 は、本発明のメタボトロピックグルタミン酸受容体サブタイプ (mGluR 1B) をコードする DNA の核酸配列 (およびその推定アミノ酸配列) である。

配列番号 2 は、配列番号 1 のヌクレオチド配列の推定アミノ酸配列である。

配列番号 3 は、ヒト mGluR 2 受容体サブタイプの一部をコードする部分クローンのヌクレオチド配列 (および推定アミノ酸配列) である。

配列番号 4 は、配列番号 3 のヌクレオチド配列によりコードされるヒト mGluR 2 受容体サブタイプの一部のアミノ酸配列である。

配列番号 5 は、本発明のメタボトロピックグルタミン酸受容体サブタイプ (mGluR 3) をコードする DNA の核酸配列 (および推定アミノ酸配列) である。

10

20

30

40

50

配列番号 6 は、配列番号 5 のヌクレオチド配列の推定アミノ酸配列である。

配列番号 7 は、本発明のメタボトロピックグルタミン酸受容体 (m G l u R 5 a 1) をコードする D N A の核酸配列 (および推定アミノ酸配列) である。

配列番号 8 は、配列番号 7 のヌクレオチド配列の推定アミノ酸配列である。

配列番号 9 は、本発明の m G l u R 5 変種メタボトロピックグルタミン酸受容体 (m G l u R 5 b) をコードする D N A の核酸配列 (および推定アミノ酸配列) である。

配列番号 10 は、配列番号 9 のヌクレオチド配列の推定アミノ酸配列である。

配列番号 11 は、本発明の m G l u R 5 変種メタボトロピックグルタミン酸受容体 (m G l u R 5 c) をコードする D N A の核酸配列 (および推定アミノ酸配列) である。

配列番号 12 は、配列番号 11 のヌクレオチド配列の推定アミノ酸配列である。

配列番号 13 は、ヒト m G l u R 2 受容体サブタイプの 3' 非翻訳配列の 343 ヌクレオチドである。

10

【 0 1 7 2 】

(配列表)

(1) 一般情報 :

(i) 出願人 : ダゲット , ロリー (Daggett , Lorrie)

エリス , スティーブン・ビー (Ellis , Steven B.)

ルー , チェン (Lu , Chen)

ボンツラー , アーロン (Pontsler , Aaron)

ジョンソン , エドウィン・シー (Johnson , Edwin C.)

ヘス , ステファン・ディー (Hess , Stephen D.)

20

(ii) 発明の名称 : ヒトメタボトロピックグルタミン酸受容体、これをコードする核酸およびその用途

(iii) 配列の数 : 13

(iv) 連絡住所 :

(A) 宛名 : プリティー、シュレーダー、ブルーゲマンおよびクラーク (Pretty , Schroeder , Brueggemann & Clark)

(B) 通り : 444 サウス・フラワー通り、スイート 2000 (444 South Flower Street , Suite 2000)

(C) 市 : ロサンゼルス

(D) 州 : カリフォルニア

(E) 国 : 米国

(F) 郵便番号 : 90071

30

(v) コンピューターで読める形式 :

(A) 媒体の型 : フロッピー (登録商標) ディスク

(B) コンピューター : IBM PC コンパチブル

(C) オペレーティング・システム : PC - DOS / MS - DOS

(D) ソフトウェア : パテントイン・リリース # 1 . 0 (Patent In Release #1.0)

、バージョン # 1 . 25

(vi) 現行出願のデータ :

(A) 出願番号 :

(B) 出願日 : 1994 年 6 月 2 日

(C) 分類 :

40

(vii) 先行出願のデータ :

(A) 出願番号 : US 08 / 072、574

(B) 出願日 : 1993 年 6 月 4 日

(viii) 弁理士 / 代理人情報 :

(A) 氏名 : ライター , ステファン・イー (Reiter , Stephen E.)

(B) 登録番号 : 31 , 192

(C) 参照 / 整理番号 : FP 41 9772

50

(ix) 電話連絡先情報：

(A) 電話：6 1 9 - 5 4 6 - 4 7 3 7

(B) ファックス：6 1 9 - 5 4 6 - 9 3 9 2

(2) 配列番号：1 の情報：

(i) 配列の特色：

(A) 長さ：3 3 2 1 塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：両形態

(D) トポロジー：両形態

(ii) 分子の型：c D N A

(ix) 配列の特徴：

(A) 名称 / 記号：C D S

(B) 存在位置：3 8 8 . . 3 1 0 8

(D) 他の情報： / 生成物 = “ ヒト m G l u R 1 B ”

(xi) 配列：配列番号：1：

30

AAG Lys	AAG Lys	CCC Pro 155	ATT Ile	GCG Ala	GGA Gly	GTG Val 160	ATC Ile	GCT Gly	CCC Pro	GCG Gly	TCC Ser 165	AGC Ser	TCT Ser	GTA Val	GCC Ala	891	
ATT Ile 170	CAA Gln	GTG Val	CAG Gln	AAC Asn	CTG Leu	CTC Leu 175	CAG Gln	CTC Leu	TTC Phe	GAC Asp	ATC Ile 180	CCC Pro	CAG Gln	ATC Ile	GCT Ala	939	
TAT Tyr 185	TCA Ser	GCC Ala	ACA Thr	AGC Ser	ATC Ile 190	GAC Asp	CTG Leu	AGT Ser	GAC Asp	AAA Lys 195	ACT Thr	TTG Leu	TAC Tyr	AAA Lys	TAC Tyr 200	987	
TTC Phe	CTG Leu	AGG Arg	GTT Val 205	GTG Val	CCT Pro	TCT Ser	GAC Asp	ACT Thr	TTG Leu 210	CAG Gln	GCA Ala	AGG Arg	GCC Ala	ATG Met 215	CTT Leu	1035	10
GAC Asp	ATA Ile	GTG Val	AAA Lys 220	CCT Arg	TAC Tyr	AAT Asn	TGG Trp	ACC Thr 225	TAT Tyr	GTG Val	TCT Ser	GCA Ala	GTG Val 230	CAC His	ACG Thr	1083	
GAA Glu	GGG Gly	AAT Asn 235	TAT Tyr	GGG Gly	GAG Glu	AGC Ser	GGA Gly 240	ATG Met	GAC Asp	GCT Ala	TTC Phe	AAA Lys 245	CAG Glu	CTG Leu	GCT Ala	1131	
CCC Ala 250	CAG Gln	GAA Glu	GGC Gly	CTC Leu	TGT Cys	ATC Ile 255	GCC Ala	CAT His	TCT Ser	GAC Asp	AAA Lys 260	ATC Ile	TAC Tyr	AGC Ser	AAC Asn	1179	
GCT Ala 265	GGG Gly	CAG Glu	AAG Lys	AGC Ser	TTT Phe 270	GAC Asp	CGA Arg	CTC Leu	TTG Leu	CGC Arg 275	AAA Lys	CTC Leu	CGA Arg	GAC Glu	AGG Arg 280	1227	20
CTT Leu	CCC Pro	AAG Lys	GCT Ala	AGA Arg 285	GTG Val	GTG Val	GTG Val	TGC Cys	TTC Phe 290	TGT Cys	GAA Glu	GGC Gly	ATG Met	ACA Thr 295	GTG Val	1275	
CGA Arg	GGA Gly	CTC Leu	CTG Leu	AGC Ser	GCC Ala	ATG Met	CGG Arg	CGC Arg 305	CTT Leu	GCC Gly	GTG Val	GTG Val	GCC Gly 310	CAG Glu	TTC Phe	1323	
TCA Ser	CTC Leu	ATT Ile 315	GGA Gly	AGT Ser	GAT Asp	GGA Gly	TGG Trp 320	GCA Ala	CAC Asp	AGA Arg	GAT Asp	GAA Glu 325	GTG Val	ATT Ile	GAA Glu	1371	
GCT Gly 330	TAT Tyr	GAG Glu	GTG Val	GAA Glu	GCC Ala	AAC Asn 335	GGG Gly	GGA Gly	ATC Ile	ACC Thr	ATA Ile 340	AAG Lys	CTG Leu	CAG Gln	TCT Ser	1419	
CCA Pro 345	GAG Glu	GTG Val	AGG Arg	TCA Ser	TTT Phe 350	GAT Asp	GAT Asp	TAT Tyr	TTC Phe	CTG Leu 355	AAA Lys	CTG Leu	AGG Arg	CTG Leu	GAC Asp 360	1467	
ACT Thr	AAC Asn	ACG Thr	AGG Arg	AAT Asn 365	CCC Pro	TGG Trp	TTC Phe	CCT Pro	GAG Glu 370	TTC Phe	TGG Trp	CAA Gln	CAT His	CGG Arg 375	TTC Phe	1515	
CAG Gln	TGC Cys	CGC Arg	CTT Leu 380	CCA Pro	GCA Gly	CAC His	CTT Leu	CTG Leu 385	GAA Glu	AAT Asn	CCC Pro	AAC Asn	TTT Phe 390	AAA Lys	CGA Arg	1563	40
ATC Ile	TGC Cys 395	ACA Thr	GCC Gly	AAT Asn	GAA Glu	AGC Ser	TTA Glu 400	GAA Glu	GAA Glu	AAC Asn	TAT Tyr	GTG Val 405	CAG Gln	GAC Asp	ACT Ser	1611	

AAG ATG GGG TTT GTC ATC AAT GCC ATC TAT GCC ATG GCA CAT GGC CTG Lys Met Gly Phe Val Ile Asn Ala Ile Tyr Ala Met Ala His Gly Leu 410 415 420	1659	
CAG AAC ATG CAC CAT GGC CTC TGC CCT GGC CAC GTG GGC CTC TGC GAT Gln Asn Met His His Ala Leu Cys Pro Gly His Val Gly Leu Cys Asp 425 430 435 440	1707	
GGC ATG AAG CCC ATC GAC GGC AGC AAG CTG CTG CAC TTC CTC ATC AAG Ala Met Lys Pro Ile Asp Gly Ser Lys Leu Leu Asp Phe Leu Ile Lys 445 450 455	1755	
TCC TCA TTC ATT GGA GTA TCT GGA GAG GAG CTG TGG TTT GAT GAG AAA Ser Ser Phe Ile Gly Val Ser Gly Glu Glu Val Trp Phe Asp Glu Lys 460 465 470	1803	10
GGA GAC GCT CCT GGA AGG TAT GAT ATC ATG AAT CTG CAG TAC ACT GAA Gly Asp Ala Pro Gly Arg Tyr Asp Ile Met Asn Leu Gln Tyr Thr Glu 475 480 485	1851	
GCT AAT CGC TAT GAC TAT GTG CAC GTT GGA ACC TGG CAT GAA GGA GTG Ala Asn Arg Tyr Asp Tyr Val His Val Gly Thr Trp His Glu Gly Val 490 495 500	1899	
CTG AAC ATT GAT GAT TAC AAA ATC CAG ATG AAC AAG AGT GGA GTG GTG Leu Asn Ile Asp Asp Tyr Lys Ile Gln Met Asn Lys Ser Gly Val Val 505 510 515 520	1947	
CGG TCT GTG TGC AGT GAG CCT TGC TTA AAG GGC CAG ATT AAG GTT ATA Arg Ser Val Cys Ser Glu Pro Cys Leu Lys Gly Gln Ile Lys Val Ile 525 530 535	1995	20
CGG AAA GGA GAA GTG AGC TGC TGC TGG ATT TGC GCG GCC TGC AAA GAG Arg Lys Gly Glu Val Ser Cys Cys Trp Ile Cys Ala Ala Cys Lys Glu 540 545 550	2043	
AAT GAA TAT GTG CAA GAT GAG TTC ACC TGC AAA GCT TGT GAC TTG GGA Asn Glu Tyr Val Gln Asp Glu Phe Thr Cys Lys Ala Cys Asp Leu Gly 555 560 565	2091	
TGG TGG CCC AAT GCA GAT CTA ACA GGC TGT GAG CCG ATT CCT GTG GGC Trp Trp Pro Asn Ala Asp Leu Thr Gly Cys Glu Pro Ile Pro Val Arg 570 575 580	2139	
TAT CTT GAG TGG AGC AAC ATC GAA TCC ATT ATA GCC ATC GCC TTT TCA Tyr Leu Glu Trp Ser Asn Ile Glu Ser Ile Ile Ala Ile Ala Phe Ser 585 590 595 600	2187	
TGC CTG GGA ATC CTT GTT ACC TTG TTT GTC ACC CTA ATC TTT GTA GTG Cys Leu Gly Ile Leu Val Thr Leu Phe Val Thr Leu Ile Phe Val Leu 605 610 615	2235	
TAC CGG GAC ACA CCA GTG GTC AAA TCC TCC AGT CCG GAG CTC TGC TAC Tyr Arg Asp Thr Pro Val Val Lys Ser Ser Ser Arg Glu Leu Cys Tyr 620 625 630	2283	
ATC ATC CTA GCT GGC ATC TTC CTT GGT TAT GTG TGC CCA TTC ACT CTC Ile Ile Leu Ala Gly Ile Phe Leu Gly Tyr Val Cys Pro Phe Thr Leu 635 640 645	2331	40
ATT GCC AAA CGT ACT ACC AGC TCC TGC TAC CTC CAG GGC CTC TTG GTT Ile Ala Lys Pro Thr Thr Thr Ser Cys Tyr Leu Gln Arg Leu Leu Val 650 655 660	2379	

GGC CTC TCC TCT GCG ATG TGC TAC TCT GCT TTA GTG ACT AAA ACC AAT Gly Leu Ser Ser Ala Met Cys Tyr Ser Ala Leu Val Thr Lys Thr Asn 665 670 675 680	2427
CGT ATT GCA CGC ATC CTG GCT GGC AGC AAG AAG AAG ATC TGC ACC CGG Arg Ile Ala Arg Ile Leu Ala Gly Ser Lys Lys Lys Ile Cys Thr Arg 685 690 695	2475
AAG CCC AGG TTC ATG AGT GCC TGG GCT CAG GTG ATC ATT GCC TCA ATT Lys Pro Arg Phe Met Ser Ala Trp Ala Gln Val Ile Ile Ala Ser Ile 700 705 710	2523
CTG ATT ACT GTG CAA CTA ACC CTG GTG GTA ACC CTG ATC ATC ATG GAA Leu Ile Ser Val Gln Leu Thr Leu Val Val Thr Leu Ile Ile Met Glu 715 720 725	2571
CCC CCT ATG CCC ATT CTG TCC TAC CCA AGT ATC AAG GAA GTC TAC CTT Pro Pro Met Pro Ile Leu Ser Tyr Pro Ser Ile Lys Glu Val Tyr Leu 730 735 740	2619
ATC TGC AAT ACC AGC AAC CTG GGT GTG GTG GCC CCT TTG GCC TAC AAT Ile Cys Asn Thr Ser Asn Leu Gly Val Val Ala Pro Leu Gly Tyr Asn 745 750 755 760	2667
GGA CTC CTC ATC ATG ACC TGT ACC TAC TAT CCC TTC AAG ACC CGC AAC Gly Leu Leu Ile Met Ser Cys Thr Tyr Tyr Ala Phe Lys Thr Arg Asn 765 770 775	2715
GTG CCC GCC AAC TTC AAC GAG GCC AAA TAT ATC GCG TTC ACC ATG TAC Val Pro Ala Asn Phe Asn Glu Ala Lys Tyr Ile Ala Phe Thr Met Tyr 780 785 790	2763
ACC ACC TGT ATC ATC TGG CTA GCT TTT GTG CCC ATT TAC TTT GGG AGC Thr Thr Cys Ile Ile Trp Leu Ala Phe Val Pro Ile Tyr Phe Gly Ser 795 800 805	2811
AAC TAC AAG ATC ATC ACA ACT TGC TTT GCA GTG AGT CTC AGT GTA ACA Asn Tyr Lys Ile Ile Thr Thr Cys Phe Ala Val Ser Leu Ser Val Thr 810 815 820	2859
GTG GCT CTG GGG TGC ATG TTC ACT CCC AAG ATG TAC ATC ATT ATT GCC Val Ala Leu Gly Cys Met Phe Thr Pro Lys Met Tyr Ile Ile Ile Ala 825 830 835 840	2907
AAG CCT GAG AGG AAT GTC CGC AGT GCC TTC ACC ACC TCT GAT GTT GTC Lys Pro Glu Arg Asn Val Arg Ser Ala Phe Thr Thr Ser Asp Val Val 845 850 855	2955
CGC ATG CAT GTT GGC GAT GGC AAG CTG CCC TGC CGC TCC AAC ACT TTC Arg Met His Val Gly Asp Gly Lys Leu Pro Cys Arg Ser Asn Thr Phe 860 865 870	3003
CTC AAC ATC TTC CGA AGA AAC AAG GCA GGG GCA GCG AAT GCC AAG AAG Leu Asn Ile Phe Arg Arg Lys Lys Ala Gly Ala Gly Asn Ala Lys Lys 875 880 885	3051
AGG CAG CCA GAA TTC TGG CCC ACC ACC CAA TCT CCC TCG GCA CAT GTG Arg Gln Pro Glu Phe Ser Pro Thr Ser Gln Cys Pro Ser Ala His Val 890 895 900	3099
CAG CTT TGAAAACCCC CAGACTCCAG TGAATCTTTC TAATGGCAAG TCTGTGTCAT Gln Leu 905	3155
GGTCTGAACC AGCTGGAGGA CAGGTGCCCA ACGGACAGCA TATGTGGCAC CGCCTCTCTG	3215
TGCACGTGAA GACCAATGAG ACGGCCTGCA ACCAAACAGC CGTCATCAAA CCCCTCACTA	3275
AAAGTTACCA AGGCTCTGGC AAGAGCCTGA CCTTTTCAGA TACGAG	3321

10

20

30

40

【 0 1 7 3 】

(2) 配列番号 : 2 の情報 :

(i) 配列の特色 :

(A) 長さ : 9 0 6 アミノ酸

(B) 型 : アミノ酸

50

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 分子の型 : 蛋白

(xi) 配列 : 配列番号 : 2 :

```

Met Val Gly Leu Leu Leu Phe Phe Phe Pro Ala Ile Phe Leu Glu Val
 1          5          10          15
Ser Leu Leu Pro Arg Ser Pro Gly Arg Lys Val Leu Leu Ala Gly Ala
          20          25          30
Ser Ser Gln Arg Ser Val Ala Arg Met Asp Gly Asp Val Ile Ile Gly
          35          40          45
Ala Leu Phe Ser Val His His Gln Pro Pro Ala Glu Lys Val Pro Glu
          50          55          60
Arg Lys Cys Gly Glu Ile Arg Glu Gln Tyr Gly Ile Gln Arg Val Glu
 65          70          75          80
Ala Met Phe His Thr Leu Asp Lys Ile Asn Ala Asp Pro Val Leu Leu
          85          90          95
Pro Asn Ile Thr Leu Gly Ser Glu Ile Arg Asp Ser Cys Trp His Ser
          100          105          110
Ser Val Ala Leu Glu Gln Ser Ile Glu Phe Ile Arg Asp Ser Leu Ile
          115          120          125
Ser Ile Arg Asp Glu Lys Asp Gly Ile Asn Arg Cys Leu Pro Asp Gly
          130          135          140
Gln Ser Leu Pro Pro Gly Arg Thr Lys Lys Pro Ile Ala Gly Val Ile
          145          150          155          160
Gly Pro Gly Ser Ser Ser Val Ala Ile Gln Val Gln Asn Leu Leu Gln
          165          170          175
Leu Phe Asp Ile Pro Gln Ile Ala Tyr Ser Ala Thr Ser Ile Asp Leu
          180          185          190
Ser Asp Lys Thr Leu Tyr Lys Tyr Phe Leu Arg Val Val Pro Ser Asp
          195          200          205
Thr Leu Gln Ala Arg Ala Met Leu Asp Ile Val Lys Arg Tyr Asn Trp
          210          215          220          225
Thr Tyr Val Ser Ala Val His Thr Glu Gly Asn Tyr Gly Glu Ser Gly
          225          230          235          240

```

10

20

30

Met Asp Ala Phe Lys Glu Leu Ala Ala Gln Glu Gly Leu Cys Ile Ala
 245 250 255
 His Ser Asp Lys Ile Tyr Ser Asn Ala Gly Glu Lys Ser Phe Asp Arg
 260 265 270
 Leu Leu Arg Lys Leu Arg Glu Arg Leu Pro Lys Ala Arg Val Val Val
 275 280 285
 Cys Phe Cys Glu Gly Met Thr Val Arg Gly Leu Leu Ser Ala Met Arg
 290 295 300
 Arg Leu Gly Val Val Gly Glu Phe Ser Leu Ile Gly Ser Asp Gly Trp
 305 310 315 320
 Ala Asp Arg Asp Glu Val Ile Glu Gly Tyr Glu Val Glu Ala Asn Gly
 325 330 335
 Gly Ile Thr Ile Lys Leu Gln Ser Pro Glu Val Arg Ser Phe Asp Asp
 340 345 350
 Tyr Phe Leu Lys Leu Arg Leu Asp Thr Asn Thr Arg Asn Pro Trp Phe
 355 360 365
 Pro Glu Phe Trp Gln His Arg Phe Gln Cys Arg Leu Pro Gly His Leu
 370 375 380
 Leu Glu Asn Pro Asn Phe Lys Arg Ile Cys Thr Gly Asn Glu Ser Leu
 385 390 400
 Glu Glu Asn Tyr Val Gln Asp Ser Lys Met Gly Phe Val Ile Asn Ala
 405 410 415
 Ile Tyr Ala Met Ala His Gly Leu Gln Asn Met His His Ala Leu Cys
 420 425 430
 Pro Gly His Val Gly Leu Cys Asp Ala Met Lys Pro Ile Asp Gly Ser
 435 440 445
 Lys Leu Leu Asp Phe Leu Ile Lys Ser Ser Phe Ile Gly Val Ser Gly
 450 455 460
 Glu Glu Val Trp Phe Asp Glu Lys Gly Asp Ala Pro Gly Arg Tyr Asp
 465 470 475 480
 Ile Met Asn Leu Gln Tyr Thr Glu Ala Asn Arg Tyr Asp Tyr Val His
 485 490 495
 Val Gly Thr Trp His Glu Gly Val Leu Asn Ile Asp Asp Tyr Lys Ile
 500 505 510
 Gln Met Asn Lys Ser Gly Val Val Arg Ser Val Cys Ser Glu Pro Cys
 515 520 525
 Leu Lys Gly Gln Ile Lys Val Ile Arg Lys Gly Glu Val Ser Cys Cys
 530 535 540
 Trp Ile Cys Ala Ala Cys Lys Glu Asn Glu Tyr Val Gln Asp Glu Phe
 545 550 555 560
 Thr Cys Lys Ala Cys Asp Leu Gly Trp Trp Pro Asn Ala Asp Leu Thr
 565 570 575
 Gly Cys Glu Pro Ile Pro Val Arg Tyr Leu Glu Trp Ser Asn Ile Glu
 580 585 590

10

20

30

40

Ser Ile Ile Ala Ile Ala Phe Ser Cys Leu Gly Ile Leu Val Thr Leu
 595 600 605
 Phe Val Thr Leu Ile Phe Val Leu Tyr Arg Asp Thr Pro Val Val Lys
 610 615 620
 Ser Ser Ser Arg Glu Leu Cys Tyr Ile Ile Leu Ala Gly Ile Phe Leu
 625 630 635 640
 Gly Tyr Val Cys Pro Phe Thr Leu Ile Ala Lys Pro Thr Thr Thr Ser
 645 650 655
 Cys Tyr Leu Gln Arg Leu Leu Val Gly Leu Ser Ser Ala Met Cys Tyr
 660 665 670
 Ser Ala Leu Val Thr Lys Thr Asn Arg Ile Ala Arg Ile Leu Ala Gly
 675 680 685
 Ser Lys Lys Lys Ile Cys Thr Arg Lys Pro Arg Phe Met Ser Ala Trp
 690 695 700
 Ala Gln Val Ile Ile Ala Ser Ile Leu Ile Ser Val Gln Leu Thr Leu
 705 710 715 720
 Val Val Thr Leu Ile Ile Met Glu Pro Pro Met Pro Ile Leu Ser Tyr
 725 730 735
 Pro Ser Ile Lys Glu Val Tyr Leu Ile Cys Asn Thr Ser Asn Leu Gly
 740 745 750
 Val Val Ala Pro Leu Gly Tyr Asn Gly Leu Leu Ile Met Ser Cys Thr
 755 760 765
 Tyr Tyr Ala Phe Lys Thr Arg Asn Val Pro Ala Asn Phe Asn Glu Ala
 770 775 780
 Lys Tyr Ile Ala Phe Thr Met Tyr Thr Thr Cys Ile Ile Trp Leu Ala
 785 790 795 800
 Phe Val Pro Ile Tyr Phe Gly Ser Asn Tyr Lys Ile Ile Thr Thr Cys
 805 810 815
 Phe Ala Val Ser Leu Ser Val Thr Val Ala Leu Gly Cys Met Phe Thr
 820 825 830
 Pro Lys Met Tyr Ile Ile Ile Ala Lys Pro Glu Arg Asn Val Arg Ser
 835 840 845
 Ala Phe Thr Thr Ser Asp Val Val Arg Met His Val Gly Asp Gly Lys
 850 855 860
 Leu Pro Cys Arg Ser Asn Thr Phe Leu Asn Ile Phe Arg Arg Lys Lys
 865 870 875 880
 Ala Gly Ala Gly Asn Ala Lys Lys Arg Gln Pro Glu Phe Ser Pro Thr
 885 890 895
 Ser Gln Cys Pro Ser Ala His Val Gln Leu
 900 905

10

20

30

40

【 0 1 7 4 】

(2) 配列番号 : 3 の情報 :

(i) 配列の特色 :

(A) 長さ : 3 5 5 塩基対

(B) 型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 両形態

(D) トポロジー : 両形態

(ii) 分子の型 : c D N A

(ix) 配列の特徴 :

50

(A) 名称 / 記号 : C D S

(B) 存在位置 : 1 . . 3 5 4

(D) 他の情報 : / 生成物 = “ ヒト m G l u R 2 断片 ”

(xi) 配列 : 配列番号 : 3 :

GCC AAG CCA TCC ACG GCA GTG TGT ACC TTA CGG CGT CTT GGT TTG GGC Ala Lys Pro Ser Thr Ala Val Cys Thr Leu Arg Arg Leu Gly Leu Gly 1 5 10 15	48	
ACT GCC TTC TCT GTC TGC TAC TCA GCC CTG CTC ACC AAG ACC AAC CGC Thr Ala Phe Ser Val Cys Tyr Ser Ala Leu Leu Thr Lys Thr Asn Arg 20 25 30	96	
ATT GCA CGC ATC TTC GGT GGG GCC CGG GAG GGT GCC CAG CGG CCA CGC Ile Ala Arg Ile Phe Gly Gly Ala Arg Glu Gly Ala Gln Arg Pro Arg 35 40 45	144	10
TTC ATC AGT CCT GCC TCA CAG GTG GCC ATC TGC CTG GAA CTT ATC TCG Phe Ile Ser Pro Ala Ser Gln Val Ala Ile Cys Leu Glu Leu Ile Ser 50 55 60	192	
GGC CAG CTG CTC ATC GTG GTC GCC TGG CTG GTG GTG GAG GCA CCG GGC Gly Gln Leu Leu Ile Val Val Ala Trp Leu Val Val Glu Ala Pro Gly 65 70 75 80	240	
ACA GGC AAG GAG ACA GCC CCC GAA CGG CGC GAG GTG GTG ACA CTG CGC Thr Gly Lys Glu Thr Ala Pro Glu Arg Arg Glu Val Val Thr Leu Arg 85 90 95	288	20
TGC AAC CAC CGC GAT GCA ACT ATG TTG GGC TCG CTG GCC TAC AAT GTG Cys Asn His Arg Asp Ala Ser Met Leu Gly Ser Leu Ala Tyr Asn Val 100 105 110	336	
CTC CTC ATC GCG CTC TGC A Leu Leu Ile Ala Leu Cys 115	355	

【 0 1 7 5 】

(2) 配列番号 : 4 の情報 :

(i) 配列の特色 :

(A) 長さ : 1 1 8 アミノ酸

(B) 型 : アミノ酸

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 分子の型 : 蛋白

(xi) 配列 : 配列番号 : 4 :

30

Ala Lys Pro Ser Thr Ala Val Cys Thr Leu Arg Arg Leu Gly Leu Gly
 1 5 10 15
 Thr Ala Phe Ser Val Cys Tyr Ser Ala Leu Leu Thr Lys Thr Asn Arg
 20 25 30
 Ile Ala Arg Ile Phe Gly Gly Ala Arg Glu Gly Ala Gln Arg Pro Arg
 35 40 45
 Phe Ile Ser Pro Ala Ser Gln Val Ala Ile Cys Leu Glu Leu Ile Ser
 50 55 60
 Gly Gln Leu Leu Ile Val Val Ala Trp Leu Val Val Glu Ala Pro Gly
 65 70 75 80
 Thr Gly Lys Glu Thr Ala Pro Glu Arg Arg Glu Val Val Thr Leu Arg
 85 90 95
 Cys Asn His Arg Asp Ala Ser Met Leu Gly Ser Leu Ala Tyr Asn Val
 100 105 110
 Leu Leu Ile Ala Leu Cys
 115

10

【 0 1 7 6 】

(2) 配列番号 : 5 の情報 :

20

(i) 配列の特色 :

(A) 長さ : 3 9 1 9 塩基対

(B) 型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 両形態

(D) トポロジー : 両形態

(ii) 分子の型 : c D N A

(ix) 配列の特徴 :

(A) 名称 / 記号 : C D S

(B) 存在位置 : 1 0 6 4 . . 3 7 0 3

(D) 他の情報 : / 生成物 = " ヒト m G l u R 3 "

30

(xi) 配列 : 配列番号 : 5 :

CGGCCTCCCT GGCTCTCACA CTCCCTCTCT GCTCCCGCTC TCCTAATCTC CTCTGGCATC 60
CGGTCACCCC CCTGCCCAGG GACCACAGGA GAGTTCTTGT AAGGACTGTT AGTCCCTGCT 120
TACCTGAAAG CCAAGCGCTC TAGCAGAGCT TTAAAGTTGG AGCCGCCACC CTCCCTACCG 180
CCCCATCCCC CTTCAACCCA CTCGAAATT CACCGACCTT TGCATGCACT GCCTAAGGAT 240
TTCAGAGTGA GGCAAAGCAG TCGGCAAATC TACCCTGGCT TTTCGTATAA AAATCCTCTC 300
GTCTAGGTAC CCTGGCTCAC TGAAGACTCT GCAGATATAC CCTTATAAGA GCGAGGGTGG 360
GGGAGGGAAG ACAACGAGAG AGGGAGGAAA GAATGAAAAG GAGAGGATGC CAGGAGCTCC 420
GTGCTTCTGC CAAGAGTCCC AATTAGATGC GACGGCTTCA GCCTGGTCAA GGTGAAGGAA 480
AGTTGCTTCC GCGCCTAGGA AGTGGGTTTG CCTGATAAGA GAAGGAGGAG GGGACTCGGC 540
TGGGAAGAGC TCCCCTCCCC TCGCGGAAG ACCACTGGGT CCCCTCTTTC GGCAACCTCC 600
TCCCTCTCTT CTACTCCACC CCTCCGTTTT CCCACTCCCC ACTGACTCGG ATGCCTGGAT 660
GTTCTGCCAC CGGGCACTGG TCCAGCGTGC AGCCGGGAGG GGGCAGGGGC AGGGGGCACT 720
GTGACAGGAA GCTGGCGGCA CAACTTGCCC ATTTGAGGG CAAAATAAGT TCTCCCTTGG 780
ATTTGGAAAG GACAAAGCCA GTAAGCTACC TCTTTTGTGT CGCATGAGGA GGACCAACCA 840

10

20

40

GCC TTC GAG CAG GAA GCC CGC CTG CGC AAC ATC TGC ATC GCT ACG GCG Ala Phe Glu Gln Glu Ala Arg Leu Arg Asn Ile Cys Ile Ala Thr Ala 230 235 240	1795	
GAG AAG GTG GGC CGC TCC AAC ATC CGC AAG TCC TAC GAC AGC GTG ATC Glu Lys Val Gly Arg Ser Asn Ile Arg Lys Ser Tyr Asp Ser Val Ile 245 250 255 260	1843	
CGA GAA CTG TTG CAG AAG CCC AAC GCG CGC GTC GTG GTC CTC TTC ATG Arg Glu Leu Leu Gln Lys Pro Asn Ala Arg Val Val Val Leu Phe Met 265 270 275	1891	
CGC AGC GAC GAC TCG CGG GAG CTC ATT GCA GCC GCC AGC CGC GCC AAT Arg Ser Asp Asp Ser Arg Glu Leu Ile Ala Ala Ala Ser Arg Ala Asn 280 285 290	1939	10
GCC TCC TTC ACC TGG GTC GCC AGC GAC GGT TGG GGC GCG CAG GAG AGC Ala Ser Phe Thr Trp Val Ala Ser Asp Gly Trp Gly Ala Gln Glu Ser 295 300 305	1987	
ATC ATC AAG GGC AGC GAG GAT GTG GCC TAC GGC GAC ATC ACC CTG GAG Ile Ile Lys Gly Ser Glu His Val Ala Tyr Gly Asp Ile Thr Leu Glu 310 315 320	2035	
CTG GCC TCC CAG CCT GTC CGC CAG TTC GGC CGC TAC TTC CAG AGC CTC Leu Ala Ser Gln Pro Val Arg Gln Phe Gly Arg Tyr Phe Gln Ser Leu 325 330 335 340	2083	
AAC CCC TAC AAC AAC CAC CGC AAC CCC TGG TTC CGG GAC TTC TGG GAG Asn Pro Tyr Asn Asn His Arg Asn Pro Trp Phe Arg Asp Phe Trp Glu 345 350 355	2131	20
CAA AAG TTT CAG TGC AGC CTC CAG AAC AAA CGC AAC CAC AGG CGC GTC Gln Lys Phe Gln Cys Ser Leu Gln Asn Lys Arg Asn His Arg Arg Val 360 365 370	2179	
TGC GAA AAG CAC CTG GCC ATC CAC AGC AGC AAC TAC GAG CAA GAG TCC Cys Glu Lys His Leu Ala Ile Asp Ser Ser Asn Tyr Glu Gln Glu Ser 375 380 385	2227	
AAG ATC ATC TTT GTG GTG AAC GCG GTG TAT GCC ATG GCC CAC CCT TTG Lys Ile Met Phe Val Val Asn Ala Val Tyr Ala Met Ala His Ala Leu 390 395 400	2275	
CAC AAA ATG CAG CGC ACC CTC TGT CCC AAC ACT ACC AAG CTT TGT GAT His Lys Met Gln Arg Thr Leu Cys Pro Asn Thr Thr Lys Leu Cys Asp 405 410 415 420	2323	30
GCT ATG AAG ATC CTG GAT GGG AAG AAG TTG TAC AAG GAT TAC TTG CTG Ala Met Lys Ile Leu Asp Gly Lys Lys Leu Tyr Lys Asp Tyr Leu Leu 425 430 435	2371	
AAA ATC AAC TTC ACG GCT CCA TTC AAC CCA AAT AAA GAT GCA GAT AGC Lys Ile Asn Phe Thr Ala Pro Phe Asn Pro Asn Lys Asp Ala Asp Ser 440 445 450	2419	
ATA GTC AAG TTT GAC ACT TTT GGA GAT GGA ATG GGG CGA TAC AAC GTC Ile Val Lys Phe Asp Thr Phe Gly Asp Gly Met Gly Arg Tyr Asn Val 455 460 465	2467	
TTC AAT TTC CAA AAT GTA GGT GGG AAG TAT TCC TAC TTG AAA GTT GGT Phe Asn Phe Gln Asn Val Gly Gly Lys Tyr Ser Tyr Leu Lys Val Gly 470 475 480	2515	40
CAC TGG GCA GAA ACC TTA TGG CTA GAT GTC AAC TCT ATC CAC TCG TCC His Trp Ala Glu Thr Leu Ser Leu Asp Val Asn Ser Ile His Trp Ser 485 490 495 500	2563	

CGG AAC TCA GTC CCC ACT TCC CAG TGC AGC GAC CCC TGT GCC CCC AAT	2611	
Arg Asn Ser Val Pro Thr Ser Gln Cys Ser Asp Pro Cys Ala Pro Asn		
505 510 515		
GAA ATG AAG AAT ATG CAA CCA GGG GAT CTC TGC TGC TGG ATT TGC ATC	2659	
Glu Met Lys Asn Met Gln Pro Gly Asp Val Cys Cys Trp Ile Cys Ile		
520 525 530		
CCC TGT GAA CCC TAC GAA TAC CTG GCT GAT GAG TTT ACC TGT ATG GAT	2707	
Pro Cys Glu Pro Tyr Glu Tyr Leu Ala Asp Glu Phe Thr Cys Met Asp		
535 540 545		
TGT GGG TCT GGA CAC TGG CCC ACT GCA GAC CTA ACT GGA TGC TAT GAC	2755	10
Cys Gly Ser Gly Gln Trp Pro Thr Ala Asp Leu Thr Gly Cys Tyr Asp		
550 555 560		
CTT CCT GAG GAC TAC ATC AGG TGG GAA GAC GCC TGC GCC ATT GGC CCA	2803	
Leu Pro Glu Asp Tyr Ile Arg Trp Glu Asp Ala Trp Ala Ile Gly Pro		
565 570 575 580		
GTC ACC ATT GCC TGT CTG GGT TTT ATG TGT ACA TGC ATG GTT GTA ACT	2851	
Val Thr Ile Ala Cys Leu Gly Phe Met Cys Thr Cys Met Val Val Thr		
585 590 595		
GTT TTT ATC AAG CAC AAC AAC ACA CCC TTG GTC AAA GCA TCG GGC CGA	2899	
Val Phe Ile Lys His Asn Asn Thr Pro Leu Val Lys Ala Ser Gly Arg		
600 605 610		
GAA CTC TGC TAC ATC TTA TTG TTT GGG GTT GGC CTG TCA TAC TGC ATG	2947	20
Glu Leu Cys Tyr Ile Leu Leu Phe Gly Val Gly Leu Ser Tyr Cys Met		
615 620 625		
ACA TTC TTC TTC ATT GCC AAG CCA TCA CCA GTC ATC TGT GCA TTG CGC	2995	
Thr Phe Phe Phe Ile Ala Lys Pro Ser Pro Val Ile Cys Ala Leu Arg		
630 635 640		
CGA CTC GGG CTG GGG AGT TCC TTC GCT ATC TGT TAC TCA GCC CTG CTG	3043	
Arg Leu Gly Leu Gly Ser Ser Phe Ala Ile Cys Tyr Ser Ala Leu Leu		
645 650 655 660		
ACC AAG ACA AAC TGC ATT GCC CGC ATC TTC GAT GGG GTC AAG AAT GCC	3091	
Thr Lys Thr Asn Cys Ile Ala Arg Ile Phe Asp Gly Val Lys Asn Gly		
665 670 675		
GCT CAG AGG CCA AAA TTC ATC AGC CCC AGT TCT CAG GTT TTC ATC TGC	3139	30
Ala Gln Arg Pro Lys Phe Ile Ser Pro Ser Ser Gln Val Phe Ile Cys		
680 685 690		
CTG GGT CTG ATC CTG GTG CAA ATT GTG ATG GTG TCT GTG TGG CTC ATC	3187	
Leu Gly Leu Ile Leu Val Gln Ile Val Met Val Ser Val Trp Leu Ile		
695 700 705		
CTG GAG GCC CCA GCC ACC AGG AGC TAT ACC CTT GCA GAG AAC CGG GAA	3235	
Leu Glu Ala Pro Gly Thr Arg Arg Tyr Thr Leu Ala Glu Lys Arg Glu		
710 715 720		
ACA GTC ATC CTA AAA TGC AAT GTC AAA GAT TGC AGC ATG TTG ATC TCT	3283	
Thr Val Ile Leu Lys Cys Asn Val Lys Asp Ser Ser Met Leu Ile Ser		
725 730 735 740		
CTT ACC TAC GAT GTG ATC CTG GTC ATC TTA TGC ACT GTC TAC GCC TTC	3331	40
Leu Thr Tyr Asp Val Ile Leu Val Ile Leu Cys Thr Val Tyr Ala Phe		
745 750 755		
AAA ACG CGG AAG TGC CCA GAA AAT TTC AAC GAA GCT AAG TTC ATA GGT	3379	
Lys Thr Arg Lys Cys Pro Glu Asn Phe Asn Glu Ala Lys Phe Ile Gly		
760 765 770		

TTT ACC ATG TAC ACC ACG TGC ATC ATC TGG TTG GCC TTC CTC CCT ATA 3427
 Phe Thr Met Tyr Thr Thr Cys Ile Ile Trp Leu Ala Phe Leu Pro Ile
 775 780 785
 TTT TAT GTG ACA TCA AGT GAC TAC AGA GTG CAG ACG ACA ACC ATG TGC 3475
 Phe Tyr Val Thr Ser Ser Asp Tyr Arg Val Gln Thr Thr Met Cys
 790 795 800
 ATC TCT GTC AGC CTG AGT GGC TTT GTG GTC TTG GGC TGT TTG TTT GCA 3523
 Ile Ser Val Ser Leu Ser Gly Phe Val Val Leu Gly Cys Leu Phe Ala
 805 810 815 820
 CCC AAG GTT CAC ATC ATC CTG TTT CAA CCG CAG AAG AAT GTT GTC ACA 3571
 Pro Lys Val His Ile Ile Leu Phe Gln Pro Gln Lys Asn Val Val Thr
 825 830 835
 CAC AGA CTG CAC CTC AAC AGG TTC AGT GTC AGT GGA ACT GCG ACC ACA 3619
 His Arg Leu His Leu Asn Arg Phe Ser Val Ser Gly Thr Gly Thr Thr
 840 845 850
 TAC TCT CAG TCC TCT GCA AGC ACG TAT GTG CCA ACG GTG TCC AAT GGG 3667
 Tyr Ser Gln Ser Ser Ala Ser Thr Tyr Val Pro Thr Val Cys Asn Gly
 855 860 865
 GCG GAA GTC CTC GAC TCC AGC ACC TCA TGT CTG TGATTGTGAA TTGCAGTTCA 3720
 Arg Glu Val Leu Asp Ser Thr Thr Ser Ser Leu 880
 GTTCTTGTGT TTTIACACTG TTAGACAAAA GTGCTCACGT GCAGCTCCAC AATATGAAAA 3780
 CAGAGCAAAA GAACAACCGT AGTACCTTTT TTTAGAAACA GTACGATAAA TTATTTTGA 3840
 GGACTGTATA TAGTCATCTG CTAGAACTTT CTAGGCTGAG TCTAGTGCCG CTATTATTAA 3900
 CAGTCCGAGT GTACGTACC 3919

10

20

【 0 1 7 7 】

(2) 配列番号 : 6 の情報 :

(i) 配列の特色 :

(A) 長さ : 8 7 9 アミノ酸

(B) 型 : アミノ酸

(D) トポロジ : 直鎖状

(ii) 分子の型 : 蛋白

(xi) 配列 : 配列番号 : 6 :

30

Met Lys Met Leu Thr Arg Leu Gln Val Leu Thr Leu Ala Leu Phe Ser
 1 5 10 15
 Lys Gly Phe Leu Leu Ser Leu Gly Asp His Asn Phe Leu Arg Arg Glu
 20 25 30
 Ile Lys Ile Glu Gly Asp Leu Val Leu Gly Gly Leu Phe Pro Ile Asn
 35 40 45
 Glu Lys Gly Thr Gly Thr Glu Glu Cys Gly Arg Ile Asn Glu Asp Arg
 50 55 60
 Gly Ile Gln Arg Leu Glu Ala Met Leu Phe Ala Ile Asp Glu Ile Asn
 65 70 75 80
 Lys Asp Asp Tyr Leu Leu Pro Gly Val Lys Leu Gly Val His Ile Leu
 85 90 95

40

Asp Thr Cys Ser Arg Asp Thr Tyr Ala Leu Glu Gln Ser Leu Glu Phe
 100 105 110
 Val Arg Ala Ser Leu Thr Lys Val Asp Glu Ala Glu Tyr Met Cys Pro
 115 120 125
 Asp Gly Ser Tyr Ala Ile Gln Glu Asn Ile Pro Leu Leu Ile Ala Gly
 130 135 140
 Val Ile Gly Gly Ser Tyr Ser Ser Val Ser Ile Gln Val Ala Asn Leu
 145 150 155 160
 Leu Arg Leu Phe Gln Ile Pro Gln Ile Ser Tyr Ala Ser Thr Ser Ala
 165 170 175
 Lys Leu Ser Asp Lys Ser Arg Tyr Asp Tyr Phe Ala Arg Thr Val Pro
 180 185 190
 Pro Asp Phe Tyr Gln Ala Lys Ala Met Ala Glu Ile Leu Arg Phe Phe
 195 200 205
 Asn Trp Thr Tyr Val Ser Thr Val Ala Ser Glu Gly Asp Tyr Gly Glu
 210 215 220
 Thr Gly Ile Glu Ala Phe Glu Gln Glu Ala Arg Leu Arg Asn Ile Cys
 225 230 235 240
 Ile Ala Thr Ala Glu Lys Val Gly Arg Ser Asn Ile Arg Lys Ser Tyr
 245 250 255
 Asp Ser Val Ile Arg Glu Leu Leu Gln Lys Pro Asn Ala Arg Val Val
 260 265 270
 Val Leu Phe Met Arg Ser Asp Asp Ser Arg Glu Leu Ile Ala Ala Ala
 275 280 285
 Ser Arg Ala Asn Ala Ser Phe Thr Trp Val Ala Ser Asp Gly Trp Gly
 290 295 300
 Ala Gln Glu Ser Ile Ile Lys Gly Ser Glu His Val Ala Tyr Gly Asp
 305 310 315 320
 Ile Thr Leu Glu Leu Ala Ser Gln Pro Val Arg Gln Phe Gly Arg Tyr
 325 330 335
 Phe Gln Ser Leu Asn Pro Tyr Asn Asn His Arg Asn Pro Trp Phe Arg
 340 345 350
 Asp Phe Trp Glu Gln Lys Phe Gln Cys Ser Leu Gln Asn Lys Arg Asn
 355 360 365
 His Arg Arg Val Cys Glu Lys His Leu Ala Ile Asp Ser Ser Asn Tyr
 370 375 380
 Glu Gln Glu Ser Lys Ile Met Phe Val Val Asn Ala Val Tyr Ala Met
 385 390 395 400
 Ala His Ala Leu His Lys Met Gln Arg Thr Leu Cys Pro Asn Thr Thr
 405 410 415
 Lys Leu Cys Asp Ala Met Lys Ile Leu Asp Gly Lys Lys Leu Tyr Lys
 420 425 430
 Asp Tyr Leu Leu Lys Ile Asn Phe Thr Ala Pro Phe Asn Pro Asn Lys
 435 440 445

10

20

30

40

Asp Ala Asp Ser Ile Val Lys Phe Asp Thr Phe Gly Asp Gly Met Gly
 450 455 460
 Arg Tyr Asn Val Phe Asn Phe Gln Asn Val Gly Gly Lys Tyr Ser Tyr
 465 470 475 480
 Leu Lys Val Gly His Trp Ala Glu Thr Leu Ser Leu Asp Val Asn Ser
 485 490 495
 Ile His Trp Ser Arg Asn Ser Val Pro Thr Ser Gln Cys Ser Asp Pro
 500 505 510
 Cys Ala Pro Asn Glu Met Lys Asn Met Gln Pro Gly Asp Val Cys Cys
 515 520 525
 Trp Ile Cys Ile Pro Cys Glu Pro Tyr Glu Tyr Leu Ala Asp Glu Phe
 530 535 540
 Thr Cys Met Asp Cys Gly Ser Gly Gln Trp Pro Thr Ala Asp Leu Thr
 545 550 555 560
 Gly Cys Tyr Asp Leu Pro Glu Asp Tyr Ile Arg Trp Glu Asp Ala Trp
 565 570 575
 Ala Ile Gly Pro Val Thr Ile Ala Cys Leu Gly Phe Met Cys Thr Cys
 580 585 590
 Met Val Val Thr Val Phe Ile Lys His Asn Asn Thr Pro Leu Val Lys
 595 600 605
 Ala Ser Gly Arg Glu Leu Cys Tyr Ile Leu Leu Phe Gly Val Gly Leu
 610 615 620
 Ser Tyr Cys Met Thr Phe Phe Phe Ile Ala Lys Pro Ser Pro Val Ile
 625 630 635 640
 Cys Ala Leu Arg Arg Leu Gly Leu Gly Ser Ser Phe Ala Ile Cys Tyr
 645 650 655
 Ser Ala Leu Leu Thr Lys Thr Asn Cys Ile Ala Arg Ile Phe Asp Gly
 660 665 670
 Val Lys Asn Gly Ala Gln Arg Pro Lys Phe Ile Ser Pro Ser Ser Gln
 675 680 685
 Val Phe Ile Cys Leu Gly Leu Ile Leu Val Gln Ile Val Met Val Ser
 690 695 700
 Val Trp Leu Ile Leu Glu Ala Pro Gly Thr Arg Arg Tyr Thr Leu Ala
 705 710 715 720
 Glu Lys Arg Glu Thr Val Ile Leu Lys Cys Asn Val Lys Asp Ser Ser
 725 730 735
 Met Leu Ile Ser Leu Thr Tyr Asp Val Ile Leu Val Ile Leu Cys Thr
 740 745 750
 Val Tyr Ala Phe Lys Thr Arg Lys Cys Pro Glu Asn Phe Asn Glu Ala
 755 760 765
 Lys Phe Ile Gly Phe Thr Met Tyr Thr Thr Cys Ile Ile Trp Leu Ala
 770 775 780
 Phe Leu Pro Ile Phe Tyr Val Thr Ser Ser Asp Tyr Arg Val Gln Thr
 785 790 795 800

10

20

30

40

```

Thr Thr Met Cys Ile Ser Val Ser Leu Ser Gly Phe Val Val Leu Gly
      805      810      815
Cys Leu Phe Ala Pro Lys Val His Ile Ile Leu Phe Gln Pro Gln Lys
      820      825      830
Asn Val Val Thr His Arg Leu His Leu Asn Arg Phe Ser Val Ser Gly
      835      840      845
Thr Gly Thr Thr Tyr Ser Gln Ser Ser Ala Ser Thr Tyr Val Pro Thr
      850      855      860
Val Cys Asn Gly Arg Glu Val Leu Asp Ser Thr Thr Ser Ser Leu
865      870      875

```

10

【 0 1 7 8 】

(2) 配列番号 : 7 の情報 :

(i) 配列の特色 :

(A) 長さ : 4 0 8 5 塩基対

(B) 型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 両形態

(D) トポロジー : 両形態

(ii) 分子の型 : c D N A

(ix) 配列の特徴 :

(A) 名称 / 記号 : C D S

(B) 存在位置 : 3 7 0 . . 3 9 1 2

(D) 他の情報 : / 生成物 = “ ヒ ト m G l u R 5 A ”

20

(xi) 配列 : 配列番号 : 7 :

```

CAGCTCGGCT GTTCTCGGCA CGCTGAGCGG AGGGAATGAG CTTGAGATCA TCTTGGGGGG      60
GAAGCCGGGG ACTGGACAAG CCGGCTCTGC CCTGCTGATC CCCGTGGGCC AACTTTTCGG      120
GGGGCTAGCT AGACCGAGTC TCACTGCTCG CAGCGCAGCC AACAGGGGGG TTTAGAAGAT      180
CATGACCACA TGGATCATCT AACTAAATGG TACATCGGCA CAAAATGGTC CTTTACAAAA      240
TACATCTGAA TTGCTGGCTA ATTTCTTGAT TTGCGACTCA ACGTAGGACA TCGCTTGTTT      300
GTACCTATCA GAACCCTCGT GAATTTTCCC CACCATGCTA TCTTTATTGG GTTCAACTCC      360
TTTCCTAAA ATG GTC CTT CTG TTC ATC CTG TCA GTC TTA CTT TCG AAA      408
      1      5      10
Met Val Leu Leu Leu Ile Leu Ser Val Leu Leu Trp Lys

GAA GAT GTC CCT GGG AGT GCA CAG TCC AGT GAG AGG AGG GTG GTG CCT      456
Glu Asp Val Arg Gly Ser Ala Gln Ser Ser Glu Arg Arg Val Val Ala
      15      20      25

CAC ATG CCG CCT CAC ATC ATT ATT GGA GCT CTC TTT TCT GTT CAT CAC      504
His Met Pro Gly Asp Ile Ile Ile Gly Ala Leu Phe Ser Val His His
      30      35      40      45

CAG CCT ACT CTC CAC AAA GTT CAT GAG AGG AAG TGT GCG GCG GTC GGT      552
Gln Pro Thr Val Asp Lys Val His Glu Arg Lys Cys Gly Ala Val Arg
      50      55      60

GAA CAG TAT GCG ATT CAG AGA CTG GAG GCC ATG CTG CAT ACC CTG GAA      600
Glu Gln Tyr Gly Ile Gln Arg Val Glu Ala Met Leu His Thr Leu Glu
      65      70      75

```

30

40

AGG ATC AAT TCA GAC CCC ACA CTC TTG CCC AAC ATC ACA CTG GGC TGT Arg Ile Asn Ser Asp Pro Thr Leu Leu Pro Asn Ile Thr Leu Gly Cys 80 85 90	648	
GAG ATA AGG GAC TCC TGC TGG CAT TCG GCT GTG GCC CTA GAG CAG AGC Glu Ile Arg Asp Ser Cys Trp His Ser Ala Val Ala Leu Glu Gln Ser 95 100 105	696	
ATT GAG TTC ATA AGA GAT TCC CTC ATT TCT TCA GAA GAG GAA GAA GGC Ile Glu Phe Ile Arg Asp Ser Leu Ile Ser Ser Glu Glu Glu Glu Gly 110 115 120 125	744	
TTG GTA CGC TGT GTG GAT GGC TCC TCC TCT TCC TTC CGC TCC AAG AAG Leu Val Arg Cys Val Asp Gly Ser Ser Ser Ser Phe Arg Ser Lys Lys 130 135 140	792	10
CGC ATA GTA GGG CTC ATT GGG CCT GGC TCC AGT TCT GTA GCC ATT CAG Pro Ile Val Gly Val Ile Gly Pro Gly Ser Ser Ser Val Ala Ile Gln 145 150 155	840	
GTC CAG AAT TTG CTC CAG CTT TTC AAC ATA CCT CAG ATT GCT TAC TCA Val Gln Asn Leu Leu Gln Leu Phe Asn Ile Pro Gln Ile Ala Tyr Ser 160 165 170	888	
GCA ACC AGC ATC GAT CTG AGT GAC AAG ACT CTG TTC AAA TAT TTC ATG Ala Thr Ser Met Asp Leu Ser Asp Lys Thr Leu Phe Lys Tyr Phe Met 175 180 185	936	
AGG GTT GTG CCT TCA GAT GCT CAG CAG GCA AGG GCC ATG GTG GAC ATA Arg Val Val Pro Ser Asp Ala Gln Gln Ala Arg Ala Met Val Asp Ile 190 195 200 205	984	20
GTG AAG AGG TAC AAC TGG ACC TAT GTA TCA GCC GTG CAC ACA GAA GGC Val Lys Arg Tyr Asn Trp Thr Tyr Val Ser Ala Val His Thr Glu Gly 210 215 220	1032	
AAC TAT GGA GAA AGT GGG ATG GAA GCC TCC AAA GAT ATG TCA GCG AAG Asn Tyr Gly Glu Ser Gly Met Glu Ala Ser Lys Asp Met Ser Ala Lys 225 230 235	1080	
GAA GGG ATT TGC ATC GCC CAC TCT TAC AAA ATC TAC AGT AAT GCA GGG Glu Gly Ile Cys Ile Ala His Ser Tyr Lys Ile Tyr Ser Asn Ala Gly 240 245 250	1128	
GAG CAG AGC TTT GAT AAG CTG CTG AAG AAG CTC ACA AGT CAC TTG CCC Glu Gln Ser Phe Asp Lys Leu Leu Lys Lys Leu Thr Ser His Leu Pro 255 260 265	1176	30
AAG GCC CGC GTG GTG GCC TGC TTC TGT GAG GGC ATG ACG CTC AGA GGT Lys Ala Arg Val Val Ala Cys Phe Cys Glu Gly Met Thr Val Arg Gly 270 275 280 285	1224	
CTG CTG ATG GCC ATG AGG CGC CTC GGT CTA CGC GGA CAA TTT CTG CTT Leu Leu Met Ala Met Arg Arg Leu Gly Leu Ala Gly Glu Phe Leu Leu 290 295 300	1272	
CTG GGC ACT GAT GGC TGG GCT GAC ACG TAT GAT GTG ACA GAT GGA TAT Leu Gly Ser Asp Gly Trp Ala Asp Arg Tyr Asp Val Thr Asp Gly Tyr 305 310 315	1320	
CAG CGA GAA GCT GTT GGT GGC ATC ACA ATC AAG CTC CAA TCT CCC GAT Gln Arg Glu Ala Val Gly Gly Ile Thr Ile Lys Leu Gln Ser Pro Asp 320 325 330	1368	40
GTC AAG TGG TTT GAT GAT TAT TAT CTC AAG CTC CGG CCA GAA ACA AAC Val Lys Trp Phe Asp Asp Tyr Tyr Leu Lys Leu Arg Pro Glu Thr Asn 335 340 345	1416	

CAC His 350	CGA Arg	AAC Asn	CCT Pro	TGG Trp	TTT Phe 355	CAA Gln	GAA Glu	TTT Phe	TGG Trp	CAG Gln 360	CAT His	CCT Arg	TTT Phe	CAG Gln	TGC Cys 365	1464	
CGA Arg	CTG Leu	GAA Glu	GCG Ala	TTT Phe 370	CCA Pro	CAG Gln	GAG Glu	AAC Asn	AGC Ser 375	AAA Lys	TAC Tyr	AAC Asn	AAG Lys	ACT Thr 380	TGC Cys	1512	
AAT Asn	AGT Ser	TCT Ser	CTG Leu 385	ACT Thr	CTG Leu	AAA Lys	ACA Thr	CAT His 390	CAT His	GTT Val	CAG Gln	GAT Asp	TCC Ser 395	AAA Lys	ATG Met	1560	
GGA Gly	TTT Phe	GTG Val 400	ATC Ile	AAC Asn	GCC Ala	ATC Ile	TAT Tyr 405	TGC Ser	ATG Met	GCC Ala	TAT Tyr	GGG Gly 410	CTC Leu	CAC His	AAC Asn	1608	10
ATG Met 415	CAG Gln	ATG Met	TCC Ser	CTC Leu	TGC Cys	GCA Pro 420	GGC Gly	TAT Tyr	GCA Ala	GGA Gly	CTC Leu 425	TGT Cys	GAT Asp	GCC Ala	ATG Met	1656	
AAG Lys 430	CCA Pro	ATT Ile	GAT Asp	GGA Gly	CGG Arg 435	AAA Lys	CTT Leu	TTG Leu	GAG Glu	TCC Ser 440	CTG Leu	ATG Met	AAA Lys	ACC Thr	AAT Asn 445	1704	
TTT Phe	ACT Thr	GGG Gly	GTT Val	TCT Ser 450	GGA Gly	GAT Asp	ACG Thr	ATC Ile	CTA Leu 455	TTC Phe	GAT Asp	GAG Glu	AAT Asn	GGA Gly 460	GAC Asp	1752	
TCT Ser	CCA Pro	GGA Gly	AGG Arg 465	TAT Tyr	GAA Glu	ATA Ile	ATG Met	AAT Asn 470	TTC Phe	AAG Lys	GAA Glu	ATG Met	GGA Gly 475	AAA Lys	GAT Asp	1800	20
TAC Tyr	TTT Phe	GAT Asp 480	TAT Tyr	ATC Ile	AAC Asn	GTT Val	GGA Gly 485	AGT Ser	TGG Trp	GAC Asp	AAT Asn	GGA Gly 490	GAA Glu	TTA Leu	AAA Lys	1848	
ATG Met 495	GAT Asp	GAT Asp	GAT Asp	GAA Glu	GTA Val	TGG Trp 500	TCC Ser	AAG Lys	AAA Lys	AGC Ser	AAC Asn 505	ATC Ile	ATC Ile	AGA Arg	TCT Ser	1896	
GTG Val 510	TGC Cys	ACT Ser	GAA Glu	CCA Pro	TGT Cys 515	GAG Glu	AAA Lys	GGC Gly	CAG Gln	ATC Ile 520	AAG Lys	GTG Val	ATC Ile	CGA Arg	AAG Lys 525	1944	
GGA Gly	GAA Glu	GTC Val	AGC Ser	TGT Cys 530	TGT Cys	TGG Trp	ACC Thr	TGT Cys	ACA Thr 535	CCT Pro	TGT Cys	AAG Lys	GAC Glu	AAT Asn 540	GAG Glu	1992	30
TAT Tyr	GTC Val	TTT Phe	GAT Asp 545	GAG Glu	TAC Tyr	ACA Thr	TGC Cys	AAG Lys 550	GCA Ala	TGC Cys	CAA Gln	CTG Leu	GGG Gly 555	TCT Ser	TGG Trp	2040	
CCC Pro	ACT Thr	GAT Asp 560	GAT Asp	CTC Leu	ACA Thr	GGT Gly	TGT Cys 565	GAC Asp	TTG Leu	ATC Ile	CCA Pro	CTA Val 570	GAG Gln	TAT Tyr	CTT Leu	2088	
CGA Arg 575	TGG Trp	GGT Gly	CAC Asp	CCT Pro	GAA Glu	CCC Pro 580	ATT Ile	GCA Ala	GCT Ala	GTG Val	GTG Val 585	TTT Phe	GCC Ala	TGC Cys	CTT Leu	2136	
GGC Gly 590	CTC Leu	CTG Leu	GCC Ala	ACC Thr	CTG Leu 595	TTT Phe	GTT Val	ACT Thr	GTA Val	GTG Val 600	TTC Phe	ATC Ile	ATT Ile	TAC Tyr	CCT Arg 605	2184	40
GAT Asp	ACA Thr	CCA Pro	GTA Val 610	GTC Val	AAG Lys	TCC Ser	TCA Ser	AGC Ser	AGG Arg 615	GAA Glu	CTC Leu	TGC Cys	TAC Tyr	ATT Ile 620	ATC Ile	2232	

CTT GCT GGC ATC TGC CTG GGC TAC TTA TGT ACC TTC TGC CTC ATT GCG	2280	
Leu Ala Gly Ile Cys Leu Gly Tyr Leu Cys Thr Phe Cys Leu Ile Ala		
625 630 635		
AAG CCC AAA CAG ATT TAC TGC TAC CTT CAG AGA ATT GGC ATT GGT CTC	2328	
Lys Pro Lys Gln Ile Tyr Cys Tyr Leu Gln Arg Ile Gly Ile Gly Leu		
640 645 650		
TCC CCA GCC ATG AGC TAC TCA GCC CTT GTA ACA AAG ACC AAC CGT ATT	2376	
Ser Pro Ala Met Ser Tyr Ser Ala Leu Val Thr Lys Thr Asn Arg Ile		
655 660 665		
GCA AGG ATC CTC GCT GCC AGC AAG AAG AAG ATC TGT ACC CCC AAG CCC	2424	10
Ala Arg Ile Leu Ala Gly Ser Lys Lys Lys Ile Cys Thr Pro Lys Pro		
670 675 680 685		
AGA TTC ATG AGT GCC TGT GCC CAG CTA GTG ATT GCT TTC ATT CTC ATA	2472	
Arg Phe Met Ser Ala Cys Ala Gln Leu Val Ile Ala Phe Ile Leu Ile		
690 695 700		
TGC ATC CAG TTG GGC ATC ATC GTT GCC CTC TTT ATA ATG GAG CGT CCT	2520	
Cys Ile Gln Leu Gly Ile Ile Val Ala Leu Phe Ile Met Glu Pro Pro		
705 710 715		
GAC ATA ATG CAT GAC TAC CCA AGC ATT CGA GAA GTC TAC CTG ATC TGT	2568	
Asp Ile Met His Asp Tyr Pro Ser Ile Arg Glu Val Tyr Leu Ile Cys		
720 725 730		
AAC ACC ACC AAC CTA GGA GTT GTC ACT CCA CTT GGA AAC AAT GGA TTG	2616	20
Asn Thr Thr Asn Leu Gly Val Val Thr Pro Leu Gly Asn Asn Gly Leu		
735 740 745		
TTG ATT TTG AGC TGC ACC TTC TAT GCG TTC AAG ACC AGA AAT GTT CCA	2664	
Leu Ile Leu Ser Cys Thr Phe Tyr Ala Phe Lys Thr Arg Asn Val Pro		
750 755 760 765		
GCT AAC TTC CCC GAG GCC AAG TAT ATC GCC TTC ACA ATG TAC ACG ACC	2712	
Ala Asn Phe Pro Glu Ala Lys Tyr Ile Ala Phe Thr Met Tyr Thr Thr		
770 775 780		
TGC ATT ATA TGG CTA GCT TTT GTT CCA ATC TAC TTT GGC AGC AAC TAC	2760	
Cys Ile Ile Trp Leu Ala Phe Val Pro Ile Tyr Phe Gly Ser Asn Tyr		
785 790 795		
AAA ATC ATC ACC ATG TGT TTC TCG GTC AGC CTC AGT GCC ACA GTG GCC	2808	30
Lys Ile Ile Thr Met Cys Phe Ser Val Ser Leu Ser Ala Thr Val Ala		
800 805 810		
CTA GCC TGC ATG TTT GTC CCG AAG GTG TAC ATC ATC CTG GCC AAA CCA	2856	
Leu Gly Cys Met Phe Val Pro Lys Val Tyr Ile Ile Leu Ala Lys Pro		
815 820 825		
GAG AGA AAC GTG CGC AGC GCC TTC ACC ACA TCT ACC GTG GTG CGC ATG	2904	
Glu Arg Asn Val Arg Ser Ala Phe Thr Thr Ser Thr Val Val Arg Met		
830 835 840 845		
CAT GTA GGG GAT GGC AAG TCA TCC TCC GCA GCC AGC AGA TCC AGC AGC	2952	
His Val Gly Asp Gly Lys Ser Ser Ser Ala Ala Ser Arg Ser Ser Ser		
850 855 860		
CTA GTC AAC CTG TGG AAG AGA AGG GGC TCC TCT GGG GAA ACC TTA AGT	3000	40
Leu Val Asn Leu Trp Lys Arg Arg Gly Ser Ser Gly Glu Thr Leu Ser		
865 870 875		
TCC AAT GGA AAA TCC GTC ACC TGG GCC CAG AAT GAG AAG AGC AGC CGG	3048	
Ser Asn Gly Lys Ser Val Thr Trp Ala Gln Asn Glu Lys Ser Ser Arg		
880 885 890		

GGG CAG CAC CTC TCG CAG CGC CTG TCC ATC CAC ATC AAC AAG AAA GAA Gly Gln His Leu Trp Gln Arg Leu Ser Ile His Ile Asn Lys Lys Glu 895 900 905	3096	
AAC CCC AAC CAA ACG GCC CTC ATC AAG CCC TTC CCC AAG ACC ACG GAG Asn Pro Asn Gln Thr Ala Val Ile Lys Pro Phe Pro Lys Ser Thr Glu 910 915 920 925	3144	
AGC CGT GGC CTG GGC GCT GGC GGC GCA GCC GGC AGC GCT GGG GGC Ser Arg Gly Leu Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly Ser Ala Gly Gly 930 935 940	3192	
GTG GCG GCC ACC GGC GGT GCG GGC TGC GCA GCG GCC GGC CCA GCG GCG Val Gly Ala Thr Gly Gly Ala Gly Cys Ala Gly Ala Gly Pro Gly Gly 945 950 955	3240	10
CCC GAG TCC CCA GAC GCC GGC CCC AAG GCG CTG TAT GAT CTG GCC GAG Pro Glu Ser Pro Asp Ala Gly Pro Lys Ala Leu Tyr Asp Val Ala Glu 960 965 970	3288	
GCT GAG GAG CAC TTC CCG GCG CCC GCG CCG CCG CGC TCA CCC TCG CCC Ala Glu Glu His Phe Pro Ala Pro Ala Arg Pro Arg Ser Pro Ser Pro 975 980 985	3336	
ATC ACC ACG CTG ACC CAC CGC GCG GGC TCG GCC AGC CGC ACC GAC GAC Ile Ser Thr Leu Ser His Arg Ala Gly Ser Ala Ser Arg Thr Asp Asp 990 995 1000 1005	3384	
GAT CTC CCG TCC CTG CAC TCG GAG CCT GTG GCG CGC AGC AGC TCC TCG Asp Val Pro Ser Leu His Ser Glu Pro Val Ala Arg Ser Ser Ser Ser 1010 1015 1020	3432	20
CAG GCG TCC CTC ATG GAG CAG ATC AGC AGT GTG CTC ACC CGC TTC ACG Gln Gly Ser Leu Met Glu Gln Ile Ser Ser Val Val Thr Arg Phe Thr 1025 1030 1035	3480	
GCC AAC ATC AGC GAG CTC AAC TCC ATG ATG CTG TCC ACC GCG GCC CCC Ala Asn Ile Ser Glu Leu Asn Ser Met Met Leu Ser Thr Ala Ala Pro 1040 1045 1050	3528	
AGC CCC GCG GTC GGC GCC CCG CTC TGC TCG TCC TAC CTG ATC CCC AAA Ser Pro Gly Val Gly Ala Pro Leu Cys Ser Ser Tyr Leu Ile Pro Lys 1055 1060 1065	3576	
GAG ATC CAG TTG CCC AGC ACC ATG ACC ACC TTT GCC GAA ATC CAG CCT Glu Ile Gln Leu Pro Thr Thr Met Thr Thr Phe Ala Glu Ile Gln Pro 1070 1075 1080 1085	3624	30
CTG CCG GCC ATC GAA GTC ACC GGC GCG GCT CAG CCC GCG GCA GGG GCG Leu Pro Ala Ile Glu Val Thr Gly Gly Ala Gln Pro Ala Ala Gly Ala 1090 1095 1100	3672	
CAG GCG GCT GGC CAC GCG GCC CCG GAG AGC CCC GCG GCC GGT CCC GAG Gln Ala Ala Gly Asp Ala Ala Arg Glu Ser Pro Ala Ala Gly Pro Glu 1105 1110 1115	3720	
GCT GCG GCC GCC AAG CCA GAC CTG GAG GAG CTG GTG GCT CTC ACC CCG Ala Ala Ala Lys Pro Asp Leu Glu Glu Leu Val Ala Leu Thr Pro 1120 1125 1130	3768	
CCG TCC CCC TTC AGA GAC TCG GTG GAC TCG GCG AGC ACA ACC CCC AAC Pro Ser Pro Phe Arg Asp Ser Val Asp Ser Gly Ser Thr Thr Pro Asn 1135 1140 1145	3816	40
TCG CCA GTG TCC GAG TCG GCC CTC TGT ATC CCG TCG TCT CCC AAA TAT Ser Pro Val Ser Glu Ser Ala Leu Cys Ile Pro Ser Ser Pro Lys Tyr 1150 1155 1160 1165	3864	
GAC ACT CTT ATC ATA AGA GAT TAC ACT CAG AGC TCC TCG TCG TTG Asp Thr Leu Ile Arg Asp Tyr Thr Gln Ser Ser Ser Ser Leu 1170 1175 1180	3909	
TGAATGTCCC TGGAAAGCAC GCCGGGCTGC GCCTGCGGAG CGGAGCCCCC CGTGTTCACA	3969	
CACACACAAT GGCAAGCATA GTGGCCTGGT TACGGCCGAG GGGGAAGATG CCAAGGGCAC	4029	
CGCTTAATGC AAACACGAGA TCAGTAGTGC TATCTCATGA CAACCGACGA AGAAAC	4085	

(2) 配列番号 : 8 の情報 :

(i) 配列の特色 :

(A) 長さ : 1 1 8 0 アミノ酸

(B) 型 : アミノ酸

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 分子の型 : 蛋白

(xi) 配列 : 配列番号 : 8 :

```

Met Val Leu Leu Leu Ile Leu Ser Val Leu Leu Trp Lys Glu Asp Val
 1          5          10
Arg Gly Ser Ala Gln Ser Ser Glu Arg Arg Val Val Ala His Met Pro
          20          25
Gly Asp Ile Ile Ile Gly Ala Leu Phe Ser Val His His Gln Pro Thr
 35          40          45
Val Asp Lys Val His Glu Arg Lys Cys Gly Ala Val Arg Glu Gln Tyr
 50          55          60
Gly Ile Gln Arg Val Glu Ala Met Leu His Thr Leu Glu Arg Ile Asn
 65          70          75          80
Ser Asp Pro Thr Leu Leu Pro Asn Ile Thr Leu Gly Cys Glu Ile Arg
          85          90          95
Asp Ser Cys Trp His Ser Ala Val Ala Leu Glu Gln Ser Ile Glu Phe
          100          105          110
Ile Arg Asp Ser Leu Ile Ser Ser Glu Glu Glu Glu Gly Leu Val Arg
          115          120          125
Cys Val Asp Gly Ser Ser Ser Ser Phe Arg Ser Lys Lys Pro Ile Val
          130          135          140
Gly Val Ile Gly Pro Gly Ser Ser Ser Val Ala Ile Gln Val Gln Asn
          145          150          155          160
Leu Leu Gln Leu Phe Asn Ile Pro Gln Ile Ala Tyr Ser Ala Thr Ser
          165          170          175
Met Asp Leu Ser Asp Lys Thr Leu Phe Lys Tyr Phe Met Arg Val Val
          180          185          190
Pro Ser Asp Ala Gln Gln Ala Arg Ala Met Val Asp Ile Val Lys Arg
          195          200          205
Tyr Asn Trp Thr Tyr Val Ser Ala Val His Thr Glu Gly Asn Tyr Gly
          210          215          220
Glu Ser Gly Met Glu Ala Ser Lys Asp Met Ser Ala Lys Glu Gly Ile
          225          230          235          240

```

10

20

30

Cys Ile Ala His Ser Tyr Lys Ile Tyr Ser Asn Ala Gly Glu Gln Ser
 245 250 255
 Phe Asp Lys Leu Leu Lys Lys Leu Thr Ser His Leu Pro Lys Ala Arg
 260 265 270
 Val Val Ala Cys Phe Cys Glu Gly Met Thr Val Arg Gly Leu Leu Met
 275 280 285
 Ala Met Arg Arg Leu Gly Leu Ala Gly Glu Phe Leu Leu Leu Gly Ser
 290 295 300
 Asp Gly Trp Ala Asp Arg Tyr Asp Val Thr Asp Gly Tyr Gln Arg Glu
 305 310 315 320
 Ala Val Gly Gly Ile Thr Ile Lys Leu Gln Ser Pro Asp Val Lys Trp
 325 330 335
 Phe Asp Asp Tyr Tyr Leu Lys Leu Arg Pro Glu Thr Asn His Arg Asn
 340 345 350
 Pro Trp Phe Gln Glu Phe Trp Gln His Arg Phe Gln Cys Arg Leu Glu
 355 360 365
 Ala Phe Pro Gln Glu Asn Ser Lys Tyr Asn Lys Thr Cys Asn Ser Ser
 370 375 380
 Leu Thr Leu Lys Thr His His Val Gln Asp Ser Lys Met Gly Phe Val
 385 390 395 400
 Ile Asn Ala Ile Tyr Ser Met Ala Tyr Gly Leu His Asn Met Gln Met
 405 410 415
 Ser Leu Cys Pro Gly Tyr Ala Gly Leu Cys Asp Ala Met Lys Pro Ile
 420 425 430
 Asp Gly Arg Lys Leu Leu Glu Ser Leu Met Lys Thr Asn Phe Thr Gly
 435 440 445
 Val Ser Gly Asp Thr Ile Leu Phe Asp Glu Asn Gly Asp Ser Pro Gly
 450 455 460
 Arg Tyr Glu Ile Met Asn Phe Lys Glu Met Gly Lys Asp Tyr Phe Asp
 465 470 475 480
 Tyr Ile Asn Val Gly Ser Trp Asp Asn Gly Glu Leu Lys Met Asp Asp
 485 490 495
 Asp Glu Val Trp Ser Lys Lys Ser Asn Ile Ile Arg Ser Val Cys Ser
 500 505 510
 Glu Pro Cys Glu Lys Gly Gln Ile Lys Val Ile Arg Lys Gly Glu Val
 515 520 525
 Ser Cys Cys Trp Thr Cys Thr Pro Cys Lys Glu Asn Glu Tyr Val Phe
 530 535 540
 Asp Glu Tyr Thr Cys Lys Ala Cys Gln Leu Gly Ser Trp Pro Thr Asp
 545 550 555 560
 Asp Leu Thr Gly Cys Asp Leu Ile Pro Val Gln Tyr Leu Arg Trp Gly
 565 570 575
 Asp Pro Glu Pro Ile Ala Ala Val Val Phe Ala Cys Leu Gly Leu Leu
 580 585 590

10

20

30

40

Ala Thr Leu Phe Val Thr Val Val Phe Ile Ile Tyr Arg Asp Thr Pro
 595 600 605
 Val Val Lys Ser Ser Ser Arg Glu Leu Cys Tyr Ile Ile Leu Ala Gly
 610 615 620
 Ile Cys Leu Gly Tyr Leu Cys Thr Phe Cys Leu Ile Ala Lys Pro Lys
 625 630 635 640
 Gln Ile Tyr Cys Tyr Leu Gln Arg Ile Gly Ile Gly Leu Ser Pro Ala
 645 650 655
 Met Ser Tyr Ser Ala Leu Val Thr Lys Thr Asn Arg Ile Ala Arg Ile
 660 665 670
 Leu Ala Gly Ser Lys Lys Lys Ile Cys Thr Pro Lys Pro Arg Phe Met
 675 680 685
 Ser Ala Cys Ala Gln Leu Val Ile Ala Phe Ile Leu Ile Cys Ile Gln
 690 695 700
 Leu Gly Ile Ile Val Ala Leu Phe Ile Met Glu Pro Pro Asp Ile Met
 705 710 715 720
 His Asp Tyr Pro Ser Ile Arg Glu Val Tyr Leu Ile Cys Asn Thr Thr
 725 730 735
 Asn Leu Gly Val Val Thr Pro Leu Gly Asn Asn Gly Leu Leu Ile Leu
 740 745 750
 Ser Cys Thr Phe Tyr Ala Phe Lys Thr Arg Asn Val Pro Ala Asn Phe
 755 760 765
 Pro Glu Ala Lys Tyr Ile Ala Phe Thr Met Tyr Thr Thr Cys Ile Ile
 770 775 780
 Trp Leu Ala Phe Val Pro Ile Tyr Phe Gly Ser Asn Tyr Lys Ile Ile
 785 790 795 800
 Thr Met Cys Phe Ser Val Ser Leu Ser Ala Thr Val Ala Leu Gly Cys
 805 810 815
 Met Phe Val Pro Lys Val Tyr Ile Ile Leu Ala Lys Pro Glu Arg Asn
 820 825 830
 Val Arg Ser Ala Phe Thr Thr Ser Thr Val Val Arg Met His Val Gly
 835 840 845
 Asp Gly Lys Ser Ser Ser Ala Ala Ser Arg Ser Ser Ser Leu Val Asn
 850 855 860
 Leu Trp Lys Arg Arg Gly Ser Ser Gly Glu Thr Leu Ser Ser Asn Gly
 865 870 875 880
 Lys Ser Val Thr Trp Ala Gln Asn Glu Lys Ser Ser Arg Gly Gln His
 885 890 895
 Leu Trp Gln Arg Leu Ser Ile His Ile Asn Lys Lys Glu Asn Pro Asn
 900 905 910
 Gln Thr Ala Val Ile Lys Pro Phe Pro Lys Ser Thr Glu Ser Arg Gly
 915 920 925
 Leu Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly Gly Ser Ala Gly Gly Val Gly Ala
 930 935 940

10

20

30

40

Thr Gly Gly Ala Gly Cys Ala Gly Ala Gly Pro Gly Gly Pro Glu Ser
 945 950 955 960
 Pro Asp Ala Gly Pro Lys Ala Leu Tyr Asp Val Ala Glu Ala Glu Glu
 965 970 975
 His Phe Pro Ala Pro Ala Arg Pro Arg Ser Pro Ser Pro Ile Ser Thr
 980 985 990
 Leu Ser His Arg Ala Gly Ser Ala Ser Arg Thr Asp Asp Asp Val Pro
 995 1000 1005
 Ser Leu His Ser Glu Pro Val Ala Arg Ser Ser Ser Ser Gln Gly Ser
 1010 1015 1020
 Leu Met Glu Gln Ile Ser Ser Val Val Thr Arg Phe Thr Ala Asn Ile
 1025 1030 1035 1040
 Ser Glu Leu Asn Ser Met Met Leu Ser Thr Ala Ala Pro Ser Pro Gly
 1045 1050 1055
 Val Gly Ala Pro Leu Cys Ser Ser Tyr Leu Ile Pro Lys Glu Ile Gln
 1060 1065 1070
 Leu Pro Thr Thr Met Thr Thr Phe Ala Glu Ile Gln Pro Leu Pro Ala
 1075 1080 1085
 Ile Glu Val Thr Gly Gly Ala Gln Pro Ala Ala Gly Ala Gln Ala Ala
 1090 1095 1100
 Gly Asp Ala Ala Arg Glu Ser Pro Ala Ala Gly Pro Glu Ala Ala Ala
 1105 1110 1115 1120
 Ala Lys Pro Asp Leu Glu Glu Leu Val Ala Leu Thr Pro Pro Ser Pro
 1125 1130 1135
 Phe Arg Asp Ser Val Asp Ser Gly Ser Thr Thr Pro Asn Ser Pro Val
 1140 1145 1150
 Ser Glu Ser Ala Leu Cys Ile Pro Ser Ser Pro Lys Tyr Asp Thr Leu
 1155 1160 1165
 Ile Ile Arg Asp Tyr Thr Gln Ser Ser Ser Ser Leu
 1170 1175 1180

10

20

30

40

【 0 1 8 0 】

(2) 配列番号 : 9 の情報 :

(i) 配列の特色 :

(A) 長さ : 4 1 8 1 塩基対

(B) 型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 両形態

(D) トポロジー : 両形態

(ii) 分子の型 : c D N A

(ix) 配列の特徴 :

(A) 名称 / 記号 : C D S

(B) 存在位置 : 3 7 0 . . 4 0 0 8

(D) 他の情報 : / 生成物 = “ ヒト m G l u R 5 B ” / 注 = “ ヌクレオチド 2 9 9 8 と 2 9 9 9 の間に 9 6 塩基対が挿入された m G l u R 5 A 変種 ”

(xi) 配列 : 配列番号 : 9 :

CAGCTCGGCT GTTCTGGGCA CGCTGAGCGG AGGGAATGAG CTTGAGATCA TCTTGGGGGG	60	
GAAGCCGGGG ACTGGAGAGG CCGGCTCTGC CCTGCTGATC CCCGTGGCCC AACTTTTCGG	120	
GGGGCTAGCT AGACCGAGTC TCACTGCTCG CAGCGCAGCC AACAGGGGGG TTTAGAAGAT	180	
CATGACCACA TGGATCATCT AACTAAATGG TACATGGGGA CAAAATGGTC CTTTAGAAAA	240	
TACATCTGAA TTGCTGGCTA ATTTCTTGAT TTGCGACTCA ACGTAGGACA TCGCTTGTTT	300	
GTAGCTATCA GAAGCCTCCT GAATTTTCCC CACCATGCTA TCTTTATTGG CTTGAACTCC	360	
TTTCTCTAAA ATG GTC CTT CTG TTG ATC GTG TCA GTC TTA CTT TGG AAA	408	
Met Val Leu Leu Leu Ile Leu Ser Val Leu Leu Trp Lys		10
1 5 10		
GAA GAT GTC CGT GGG AGT GCA CAG TCC AGT GAG AGG AGG GTG GTG GCT	456	
Glu Asp Val Arg Gly Ser Ala Gln Ser Ser Glu Arg Arg Val Val Ala		
15 20 25		
CAC ATG CCG GGT GAC ATC ATT ATT GGA GCT CTC TTT TCT GTT CAT CAC	504	
His Met Pro Gly Asp Ile Ile Ile Gly Ala Leu Phe Ser Val His His		
30 35 40 45		
CAG CCT ACT GTG GAC AAA GTT CAT CAG AGG AAG TGT GGG GCG GTG CGT	552	
Gln Pro Thr Val Asp Lys Val His Glu Arg Lys Cys Gly Ala Val Arg		
50 55 60		
GAA CAG TAT GGC ATT CAG AGA GTG GAG GCC ATG CTG CAT ACC CTG GAA	600	
Glu Gln Tyr Gly Ile Gln Arg Val Glu Ala Met Leu His Thr Leu Glu		20
65 70 75		
AGG ATC AAT TCA GAC CCC ACA CTC TTG CCC AAC ATC ACA CTG GGC TGT	648	
Arg Ile Asn Ser Asp Pro Thr Leu Leu Pro Asn Ile Thr Leu Gly Cys		
80 85 90		
GAG ATA AGG GAC TCC TGC TGG CAT TCG GCT GTG GCC CTA GAG CAG AGC	696	
Glu Ile Arg Asp Ser Cys Trp His Ser Ala Val Ala Leu Glu Gln Ser		
95 100 105		
ATT GAG TTC ATA AGA GAT TCC CTC ATT TCT TCA GAA GAG GAA GAA GCC	744	
Ile Glu Phe Ile Arg Asp Ser Leu Ile Ser Ser Glu Glu Glu Glu Gly		
110 115 120 125		
TTG GTA CGC TGT GTG GAT GGC TCC TCC TCT TCC TTC CGC TCC AAG AAG	792	
Leu Val Arg Cys Val Asp Gly Ser Ser Ser Ser Phe Arg Ser Lys Lys		30
130 135 140		
CCC ATA GTA GGG GTC ATT GGG CCT GGC TCC AGT TCT GTA GCC ATT CAG	840	
Pro Ile Val Gly Val Ile Gly Pro Gly Ser Ser Ser Val Ala Ile Gln		
145 150 155		
GTC CAG AAT TTG CTC CAG CTT TTC AAC ATA CCT CAG ATT GCT TAC TCA	888	
Val Gln Asn Leu Leu Gln Leu Phe Asn Ile Pro Gln Ile Ala Tyr Ser		
160 165 170		
GCA ACC AGC ATG GAT CTG AGT CAC AAG ACT CTG TTC AAA TAT TTC ATG	936	
Ala Thr Ser Met Asp Leu Ser Asp Lys Thr Leu Phe Lys Tyr Phe Met		
175 180 185		
AGG GTT GTG CCT TCA GAT GCT CAG CAG GCA AGG GCC ATG GTG GAC ATA	984	
Arg Val Val Pro Ser Asp Ala Gln Gln Ala Arg Ala Met Val Asp Ile		40
190 195 200 205		

GTG AAG ACG TAC AAC TGG ACC TAT GTA TCA GCC GTG CAC ACA GAA GCC	1032
Val Lys Arg Tyr Asn Trp Thr Tyr Val Ser Ala Val His Thr Glu Gly	
210 215 220	
AAC TAT GGA GAA AGT GCG ATG GAA GCC TCC AAA GAT ATG TCA GCG AAG	1080
Asn Tyr Gly Glu Ser Gly Met Glu Ala Ser Lys Asp Met Ser Ala Lys	
225 230 235	
GAA GGG ATT TGC ATC GCC CAC TCT TAC AAA ATC TAC AGT AAT GCA GCG	1128
Glu Gly Ile Cys Ile Ala His Ser Tyr Lys Ile Tyr Ser Asn Ala Gly	
240 245 250	
GAG CAG AGC TTT GAT AAG CTG CTG AAG AAG CTC ACA AGT CAC TTG CCC	1176
Glu Gln Ser Phe Asp Lys Leu Leu Lys Lys Leu Thr Ser His Leu Pro	
255 260 265	
AAG GCC CGG GTG GTG GCC TGC TTC TGT GAG GCG ATG ACG GTG AGA GGT	1224
Lys Ala Arg Val Val Ala Cys Phe Cys Glu Gly Met Thr Val Arg Gly	
270 275 280 285	
CTG CTG ATG GCC ATG AGG CCG CTG GGT CTA GCG GGA GAA TTT CTG CTT	1272
Leu Leu Met Ala Met Arg Arg Leu Gly Leu Ala Gly Glu Phe Leu Leu	
290 295 300	
CTG GGC AGT GAT GGC TGC GCT GAC AGG TAT GAT GTG ACA GAT GCA TAT	1320
Leu Gly Ser Asp Gly Trp Ala Asp Arg Tyr Asp Val Thr Asp Gly Tyr	
305 310 315	
CAG CGA GAA GCT GTT GGT GGC ATC ACA ATC AAG CTC CAA TCT CCC GAT	1368
Gln Arg Glu Ala Val Gly Gly Ile Thr Ile Lys Leu Gln Ser Pro Asp	
320 325 330	
GTG AAG TGG TTT GAT GAT TAT TAT CTG AAG CTC CGG CCA GAA ACA AAC	1416
Val Lys Trp Phe Asp Asp Tyr Tyr Leu Lys Leu Arg Pro Glu Thr Asn	
335 340 345	
CAC CGA AAC CCT TGC TTT CAA GAA TTT TGC CAG CAT CGT TTT CAG TGC	1464
His Arg Asn Pro Trp Phe Gln Glu Phe Trp Gln His Arg Phe Gln Cys	
350 355 360 365	
CGA CTG GAA GCG TTT CCA CAG GAG AAC ACC AAA TAC AAC AAG ACT TGC	1512
Arg Leu Glu Ala Phe Pro Gln Glu Asn Ser Lys Tyr Asn Lys Thr Cys	
370 375 380	
AAT AGT TCT CTG ACT CTG AAA ACA CAT CAT GTT CAG GAT TCC AAA ATG	1560
Asn Ser Ser Leu Thr Leu Lys Thr His His Val Gln Asp Ser Lys Met	
385 390 395	
GGA TTT GTG ATC AAC GCC ATC TAT TCG ATG GCC TAT GCG CTC CAC AAC	1608
Gly Phe Val Ile Asn Ala Ile Tyr Ser Met Ala Tyr Gly Leu His Asn	
400 405 410	
ATG CAG ATG TCC CTC TGC CCA GGC TAT GCA GGA CTC TCT GAT GCC ATG	1656
Met Gln Met Ser Leu Cys Pro Gly Tyr Ala Gly Leu Cys Asp Ala Met	
415 420 425	
AAG CCA ATT GAT GGA CCG AAA CTT TTG GAG TCC CTG ATG AAA ACC AAT	1704
Lys Pro Ile Asp Gly Arg Lys Leu Leu Glu Ser Leu Met Lys Thr Asn	
430 435 440 445	
TTT ACT GGG GTT TCT GGA GAT ACG ATC CTA TTC GAT GAG AAT GCA GAC	1752
Phe Thr Gly Val Ser Gly Asp Thr Ile Leu Phe Asp Glu Asn Gly Asp	
450 455 460	
TCT CCA GGA AGC TAT GAA ATA ATG AAT TTC AAG GAA ATG GGA AAA CAT	1800
Ser Pro Gly Arg Tyr Glu Ile Met Asn Phe Lys Glu Met Gly Lys Asp	
465 470 475	

10

20

30

40

TAC	TTT	GAT	TAT	ATC	AAC	GTT	GGA	AGT	TGC	GAC	AAT	GGA	GAA	TTA	AAA	1848	
Tyr	Phe	Asp	Tyr	Ile	Asn	Val	Gly	Ser	Trp	Asp	Asn	Gly	Glu	Leu	Lys		
		480					485					490					
ATG	GAT	GAT	GAT	GAA	GTA	TGG	TCC	AAG	AAA	AGC	AAC	ATC	ATC	AGA	TCT	1896	
Met	Asp	Asp	Asp	Glu	Val	Trp	Ser	Lys	Lys	Ser	Asn	Ile	Ile	Arg	Ser		
	495					500					505						
GTG	TGC	AGT	GAA	CCA	TGT	GAG	AAA	GGC	CAG	ATC	AAG	CTG	ATC	CGA	AAG	1944	
Val	Cys	Ser	Glu	Pro	Cys	Glu	Lys	Gly	Gln	Ile	Lys	Val	Ile	Arg	Lys		
510					515					520					525		
GGA	GAA	GTC	AGC	TGT	TGT	TGG	ACC	TGT	ACA	CCT	TGT	AAG	GAG	AAT	GAG	1992	
Gly	Glu	Val	Ser	Cys	Cys	Trp	Thr	Cys	Thr	Pro	Cys	Lys	Glu	Asn	Glu		10
				530					535					540			
TAT	GTC	TTT	GAT	GAG	TAC	ACA	TGC	AAG	GCA	TGC	CAA	CTG	GGG	TCT	TGG	2040	
Tyr	Val	Phe	Asp	Glu	Tyr	Thr	Cys	Lys	Ala	Cys	Gln	Leu	Gly	Ser	Trp		
			545						550					555			
CCC	ACT	GAT	GAT	CTC	ACA	GGT	TGT	GAC	TTG	ATC	CGA	GTA	CAG	TAT	CTT	2088	
Pro	Thr	Asp	Asp	Leu	Thr	Gly	Cys	Asp	Leu	Ile	Pro	Val	Gln	Tyr	Leu		
		560					565					570					
CGA	TGC	GCT	GAC	CCT	GAA	CCC	ATT	GCA	GCT	GTG	GTG	TTT	GCC	TGC	CTT	2136	
Arg	Trp	Gly	Asp	Pro	Glu	Pro	Ile	Ala	Ala	Val	Val	Phe	Ala	Cys	Leu		
	575					580					585						
GGC	CTC	GTG	GCC	ACC	CTG	TTT	GTT	ACT	GTA	GTC	TTC	ATC	ATT	TAC	CGT	2184	
Gly	Leu	Leu	Ala	Thr	Leu	Phe	Val	Thr	Val	Val	Phe	Ile	Ile	Tyr	Arg		20
590					595					600					605		
GAT	ACA	CCA	GTA	GTC	AAG	TCC	TCA	AGC	AGG	GAA	CTC	TGC	TAC	ATT	ATC	2232	
Asp	Thr	Pro	Val	Val	Lys	Ser	Ser	Ser	Arg	Glu	Leu	Cys	Tyr	Ile	Ile		
				610					615					620			
CTT	GCT	GGC	ATC	TGC	CTC	GGC	TAC	TTA	TGT	ACC	TTC	TGC	CTC	ATT	GCG	2280	
Leu	Ala	Gly	Ile	Cys	Leu	Gly	Tyr	Leu	Cys	Thr	Phe	Cys	Leu	Ile	Ala		
			625					630					635				
AAG	CCC	AAA	CAG	ATT	TAC	TGC	TAC	CTT	CAG	AGA	ATT	GGC	ATT	GGT	CTC	2328	
Lys	Pro	Lys	Gln	Ile	Tyr	Cys	Tyr	Leu	Gln	Arg	Ile	Gly	Ile	Gly	Leu		
		640					645					650					
TCC	CCA	GCC	ATG	AGC	TAC	TCA	GCC	CTT	GTA	ACA	AAG	ACC	AAC	CGT	ATT	2376	
Ser	Pro	Ala	Met	Ser	Tyr	Ser	Ala	Leu	Val	Thr	Lys	Thr	Asn	Arg	Ile		30
		655				660					665						
GCA	AGG	ATC	CTG	GCT	GGC	AGC	AAG	AAG	AAG	ATC	TGT	ACC	CCC	AAG	CCC	2424	
Ala	Arg	Ile	Leu	Ala	Gly	Ser	Lys	Lys	Lys	Ile	Cys	Thr	Pro	Lys	Pro		
670					675					680					685		
AGA	TTC	ATG	AGT	GCC	TGT	GCC	CAG	CTA	GTG	ATT	GCT	TTC	ATT	CTC	ATA	2472	
Arg	Phe	Met	Ser	Ala	Cys	Ala	Gln	Leu	Val	Ile	Ala	Phe	Ile	Leu	Ile		
				690					695					700			
TGC	ATC	CAG	TTG	GGC	ATC	ATC	GTT	GCC	CTC	TTT	ATA	ATG	GAG	CCT	CCT	2520	
Cys	Ile	Gln	Leu	Gly	Ile	Ile	Val	Ala	Leu	Phe	Ile	Met	Glu	Pro	Pro		
			705					710					715				
GAC	ATA	ATG	CAT	GAC	TAC	CCA	AGC	ATT	CGA	GAA	GTC	TAC	CTG	ATC	TGT	2568	
Asp	Ile	Met	His	Asp	Tyr	Pro	Ser	Ile	Arg	Glu	Val	Tyr	Leu	Ile	Cys		40
		720					725					730					
AAC	ACC	ACC	AAC	CTA	GGA	GTT	GTC	ACT	CCA	CTT	GGA	AAC	AAT	GGA	TTG	2616	
Asn	Thr	Thr	Asn	Leu	Gly	Val	Val	Thr	Pro	Leu	Gly	Asn	Asn	Gly	Leu		
		735				740					745						

TTG Leu 750	ATT Ile	TTG Leu	ACC Ser	TGC Cys 755	ACC Thr	TTC Phe	TAT Tyr	GGG Ala	TTC Phe 760	AAG Lys	ACC Thr	AGA Arg	AAT Asn	GTT Val	CCA Pro 765	2664	
GCT Ala	AAC Asn	TTC Phe	CCC Pro	GAG Glu 770	GCC Ala	AAG Lys	TAT Tyr	ATC Ile	CCC Ala 775	TTC Phe	ACA Thr	ATG Met	TAC Tyr	ACG Thr 780	ACC Thr	2712	
TGC Cys	ATT Ile	ATA Ile	TGG Trp 785	CTA Leu	GCT Ala	TTT Phe	GTT Val	CCA Pro 790	ATC Ile	TAC Tyr	TTT Phe	GGC Gly	AGC Ser 795	AAC Asn	TAC Tyr	2760	
AAA Lys	ATC Ile	ATC Ile	ACC Thr 800	ATG Met	TGT Cys	TTC Phe	TCG Ser 805	GTC Val	AGC Ser	CTC Leu	AGT Ser	GCC Ala 810	ACA Thr	GTG Val	GCC Ala	2808	10
CTA Leu	GGC Gly 815	TGC Cys	ATG Met	TTT Phe	GTG Val	CCG Pro 820	AAG Lys	GTG Val	TAC Tyr	ATC Ile	ATC Ile 825	CTG Leu	GCC Ala	AAA Lys	CCA Pro	2856	
GAG Glu 830	AGA Arg	AAC Asn	GTG Val	CGC Arg	AGC Ser 835	GCC Ala	TTC Phe	ACC Thr	ACA Thr	TCT Ser 840	ACC Thr	GTG Val	GTG Val	CGC Arg	ATG Met 845	2904	
CAT His	GTA Val	GGG Gly	GAT Asp	GGC Gly 850	AAG Lys	TCA Ser	TCC Ser	TCC Ser	GCA Ala 855	GCC Ala	AGC Ser	AGA Arg	TCC Ser	AGC Ser 860	AGC Ser	2952	
CTA Leu	GTC Val	AAC Asn	CTG Leu 865	TGG Trp	AAG Lys	AGA Arg	AGG Arg	GGC Gly 870	TCC Ser	TCT Ser	GGG Gly	GAA Glu	ACC Thr 875	TTA Leu	AGG Arg	3000	20
TAC Tyr	AAA Lys	GAC Asp 880	AGG Arg	AGA Arg	CTG Leu	GCC Ala	CAG Gln 885	CAC His	AAG Lys	TCG Ser	GAA Glu	ATA Ile 890	GAG Glu	TGT Cys	TTC Phe	3048	
ACC Thr 895	CCC Pro	AAA Lys	GGG Gly	AGT Ser	ATG Met	GGG Gly 900	AAT Asn	GGT Gly	GGG Gly	AGA Arg	GCA Ala 905	ACA Thr	ATG Met	AGC Ser	AGT Ser	3096	
TCC Ser 910	AAT Asn	GGA Gly	AAA Lys	TCC Ser	GTC Val 915	ACG Thr	TGG Trp	GCC Ala	CAG Gln	AAT Asn 920	GAG Glu	AAG Lys	AGC Ser	AGC Ser	CGG Arg 925	3144	
GGG Gly	CAG Gln	CAC His	CTG Leu	TGG Trp 930	CAG Gln	CGC Arg	CTG Leu	TCC Ser	ATC Ile 935	CAC His	ATC Ile	AAC Asn	AAG Lys	AAA Lys 940	GAA Glu	3192	30
AAC Asn	CCC Pro	AAC Asn	CAA Gln 945	ACG Thr	GCC Ala	GTC Val	ATC Ile	AAG Lys 950	CCC Pro	TTC Phe	CCC Pro	AAG Lys	AGC Ser 955	ACG Thr	GAG Glu	3240	
AGC Ser	CGT Arg	GGC Gly 960	CTG Leu	GGC Gly	GCT Ala	GCC Gly	GCT Ala 965	GGC Gly	GCA Ala	GGC Gly	GGG Gly	AGC Ser 970	GCT Ala	GGG Gly	GGC Gly	3288	
GTG Val 975	GGC Gly	GCC Ala	ACG Thr	GGC Gly	GCT Ala	GCC Gly 980	GCC Gly	TGC Cys	GCA Ala	GGC Gly	GCC Gly 985	GGC Gly	CCA Pro	CGC Gly	GGC Gly	3336	
CCC Pro 990	GAG Glu	TCC Ser	CCA Pro	GAC Asp 995	GCC Ala	GCC Gly	CCC Pro	AAG Lys	GGC Ala	CTG Leu 1000	TAT Tyr	GAT Asp	GTG Val	GCC Ala	GAG Glu 1005	3384	40
GCT Ala	GAG Glu	GAG Glu	CAC His	TTC Phe 1010	CCG Pro	GCC Ala	CCC Pro	GCG Ala	CGG Arg 1015	CCG Pro	CGC Arg	TCA Ser	CCG Pro	TCC Ser 1020	CCC Pro	3432	

ATC AGC ACG CTG AGC CAC CGC GCG GCC TCG GCC AGC CGC ACG GAC GAC Ile Ser Thr Leu Ser His Arg Ala Gly Ser Ala Ser Arg Thr Asp Asp 1025 1030 1035	3480	
GAT GTG CCG TCG CTG CAC TCG GAG CCT GTG GCG CGC AGC AGC TCC TCG Asp Val Pro Ser Leu His Ser Glu Pro Val Ala Arg Ser Ser Ser Ser 1040 1045 1050	3528	
CAG GGC TCC CTC ATG GAG CAG ATC AGC AGT GTG GTC ACC CGC TTC ACG Gln Gly Ser Leu Met Glu Gln Ile Ser Ser Val Val Thr Arg Phe Thr 1055 1060 1065	3576	
GCC AAC ATC AGC GAG CTC AAC TCC ATG ATG CTG TCC ACC GCG GCC CCC Ala Asn Ile Ser Glu Leu Asn Ser Met Met Leu Ser Thr Ala Ala Pro 1070 1075 1080 1085	3624	10
AGC CCC GGC GTC GGC GCC CCG CTC TGC TCG TCC TAC CTG ATC CCC AAA Ser Pro Gly Val Gly Ala Pro Leu Cys Ser Ser Tyr Leu Ile Pro Lys 1090 1095 1100	3672	
GAG ATC CAG TTC CCC ACG ACC ATG ACG ACC TTT GCC GAA ATC CAG CCT Glu Ile Gln Leu Pro Thr Thr Met Thr Thr Phe Ala Glu Ile Gln Pro 1105 1110 1115	3720	
CTG CCG GCC ATC GAA GTC ACG GGC GCG GCT CAG CCC GCG GCA GGG GCG Leu Pro Ala Ile Glu Val Thr Gly Gly Ala Gln Pro Ala Ala Gly Ala 1120 1125 1130	3768	
CAG GCG GCT GGG GAC GCG GCC CCG GAG AGC CCC GCG GCC GGT CCC GAG Gln Ala Ala Gly Asp Ala Ala Arg Glu Ser Pro Ala Ala Gly Pro Glu 1135 1140 1145	3816	20
GCT GCG GCC GCC AAG CCA GAC CTG GAG GAG CTG GTG GCT CTC ACC CCG Ala Ala Ala Ala Lys Pro Asp Leu Glu Glu Leu Val Ala Leu Thr Pro 1150 1155 1160 1165	3864	
CCG TCC CCC TTC AGA GAC TCG GTG GAC TCG GGG AGC ACA ACC CCC AAC Pro Ser Pro Phe Arg Asp Ser Val Asp Ser Gly Ser Thr Thr Pro Asn 1170 1175 1180	3912	
TCG CCA GTG TCC GAG TCG GCC CTC TGT ATC CCG TCG TCT CCC AAA TAT Ser Pro Val Ser Glu Ser Ala Leu Cys Ile Pro Ser Ser Pro Lys Tyr 1185 1190 1195	3960	
GAC ACT CTT ATC ATA AGA GAT TAC ACT CAG AGC TCC TCG TCG TTC Asp Thr Leu Ile Ile Arg Asp Tyr Thr Gln Ser Ser Ser Ser Leu 1200 1205 1210	4005	30
TGAATGTCCTC TGGAAAGCAC GCCGGCCTGC GCGTGCGGAG CGGAGCCCCC CGTGTTTACA	4065	
CACACACAAT GGCAAGCATA GTCCCTGCT TACGGCCAG GGGCAAGATG CCAAGGGCAC	4125	
CCCTTAATGC AAACACGAGA TCAGTACTGC TATCTCATGA CAACCGACGA AGAAAC	4181	

【 0 1 8 1 】

(2) 配列番号 : 1 0 の情報 :

(i) 配列の特色 :

(A) 長さ : 1 2 1 2 アミノ酸

(B) 型 : アミノ酸

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 分子の型 : 蛋白

(xi) 配列 : 配列番号 : 1 0 :

Met Val Leu Leu Leu₅ Ile Leu Ser Val Leu₁₀ Leu Trp Lys Glu Asp Val₁₅
 Arg Gly Ser Ala₂₀ Gln Ser Ser Glu Arg₂₅ Arg Val Val Ala His Met Pro₃₀
 Gly Asp Ile₃₅ Ile Ile Gly Ala Leu₄₀ Phe Ser Val His His₄₅ Gln Pro Thr
 Val Asp₅₀ Lys Val His Glu Arg₅₅ Lys Cys Gly Ala Val₆₀ Arg Glu Gln Tyr
 Gly₆₅ Ile Gln Arg Val Glu₇₀ Ala Met Leu His Thr₇₅ Leu Glu Arg Ile Asn₈₀
 Ser Asp Pro Thr Leu₈₅ Leu Pro Asn Ile Thr₉₀ Leu Gly Cys Glu Ile Arg₉₅
 Asp Ser Cys Trp₁₀₀ His Ser Ala Val Ala₁₀₅ Leu Glu Gln Ser Ile Glu Phe₁₁₀
 Ile Arg Asp₁₁₅ Ser Leu Ile Ser Ser₁₂₀ Glu Glu Glu Glu Gly₁₂₅ Leu Val Arg
 Cys Val Asp Gly Ser Ser Ser₁₃₅ Ser Phe Arg Ser Lys₁₄₀ Lys Pro Ile Val
 Gly Val Ile Gly Pro Gly₁₅₀ Ser Ser Ser Val Ala₁₅₅ Ile Gln Val Gln Asn₁₆₀
 Leu Leu Gln Leu Phe₁₆₅ Asn Ile Pro Gln Ile Ala Tyr Ser Ala Thr Ser₁₇₅
 Met Asp Leu Ser₁₈₀ Asp Lys Thr Leu Phe₁₈₅ Lys Tyr Phe Met Arg₁₉₀ Val Val
 Pro Ser Asp Ala Gln Gln Ala Arg₂₀₀ Ala Met Val Asp Ile Val Lys Arg₂₀₅
 Tyr Asn Trp Thr Tyr Val Ser₂₁₅ Ala Val His Thr Glu Gly Asn Tyr Gly₂₂₀
 Glu Ser Gly Met Glu Ala Ser Lys Asp Met Ser Ala Lys Glu Gly Ile₂₄₀
 Cys Ile Ala His Ser₂₄₅ Tyr Lys Ile Tyr Ser₂₅₀ Asn Ala Gly Glu Gln Ser₂₅₅
 Phe Asp Lys Leu Leu Lys Lys Leu Thr Ser His Leu Pro Lys Ala Arg₂₇₀
 Val Val Ala Cys Phe Cys Glu Gly Met Thr Val Arg Gly Leu Leu Met₂₈₅
 Ala Met Arg Arg Leu Gly Leu Ala Gly Glu Phe Leu Leu Leu Gly Ser₃₀₀
 Asp Gly Trp Ala Asp Arg Tyr Asp Val Thr Asp Gly Tyr Gln Arg Glu₃₂₀
 Ala Val Gly Gly Ile Thr Ile Lys Leu Gln Ser Pro Asp Val Lys Trp₃₃₅
 Phe Asp Asp Tyr Tyr Leu Lys Leu Arg Pro Glu Thr Asn His Arg Asn₃₅₀

10

20

30

40

Pro Trp Phe Gln Glu Phe Trp Gln His Arg Phe Gln Cys Arg Leu Glu
 355 360 365
 Ala Phe Pro Gln Glu Asn Ser Lys Tyr Asn Lys Thr Cys Asn Ser Ser
 370 375 380
 Leu Thr Leu Lys Thr His His Val Gln Asp Ser Lys Met Gly Phe Val
 385 390 395 400
 Ile Asn Ala Ile Tyr Ser Met Ala Tyr Gly Leu His Asn Met Gln Met
 405 410 415
 Ser Leu Cys Pro Gly Tyr Ala Gly Leu Cys Asp Ala Met Lys Pro Ile
 420 425 430
 Asp Gly Arg Lys Leu Leu Glu Ser Leu Met Lys Thr Asn Phe Thr Gly
 435 440 445
 Val Ser Gly Asp Thr Ile Leu Phe Asp Glu Asn Gly Asp Ser Pro Gly
 450 455 460
 Arg Tyr Glu Ile Met Asn Phe Lys Glu Met Gly Lys Asp Tyr Phe Asp
 465 470 475 480
 Tyr Ile Asn Val Gly Ser Trp Asp Asn Gly Glu Leu Lys Met Asp Asp
 485 490 495
 Asp Glu Val Trp Ser Lys Lys Ser Asn Ile Ile Arg Ser Val Cys Ser
 500 505 510
 Glu Pro Cys Glu Lys Gly Gln Ile Lys Val Ile Arg Lys Gly Glu Val
 515 520 525
 Ser Cys Cys Trp Thr Cys Thr Pro Cys Lys Glu Asn Glu Tyr Val Phe
 530 535 540
 Asp Glu Tyr Thr Cys Lys Ala Cys Gln Leu Gly Ser Trp Pro Thr Asp
 545 550 555 560
 Asp Leu Thr Gly Cys Asp Leu Ile Pro Val Gln Tyr Leu Arg Trp Gly
 565 570 575
 Asp Pro Glu Pro Ile Ala Ala Val Val Phe Ala Cys Leu Gly Leu Leu
 580 585 590
 Ala Thr Leu Phe Val Thr Val Val Phe Ile Ile Tyr Arg Asp Thr Pro
 595 600 605
 Val Val Lys Ser Ser Ser Arg Glu Leu Cys Tyr Ile Ile Leu Ala Gly
 610 615 620
 Ile Cys Leu Gly Tyr Leu Cys Thr Phe Cys Leu Ile Ala Lys Pro Lys
 625 630 635 640
 Gln Ile Tyr Cys Tyr Leu Gln Arg Ile Gly Ile Gly Leu Ser Pro Ala
 645 650 655
 Met Ser Tyr Ser Ala Leu Val Thr Lys Thr Asn Arg Ile Ala Arg Ile
 660 665 670
 Leu Ala Gly Ser Lys Lys Lys Ile Cys Thr Pro Lys Pro Arg Phe Met
 675 680 685
 Ser Ala Cys Ala Gln Leu Val Ile Ala Phe Ile Leu Ile Cys Ile Gln
 690 695 700

10

20

30

40

Leu Gly Ile Ile Val Ala Leu Phe Ile Met Glu Pro Pro Asp Ile Met
 705 710 715 720
 His Asp Tyr Pro Ser Ile Arg Glu Val Tyr Leu Ile Cys Asn Thr Thr
 725 730 735
 Asn Leu Gly Val Val Thr Pro Leu Gly Asn Asn Gly Leu Leu Ile Leu
 740 745 750
 Ser Cys Thr Phe Tyr Ala Phe Lys Thr Arg Asn Val Pro Ala Asn Phe
 755 760 765
 Pro Glu Ala Lys Tyr Ile Ala Phe Thr Met Tyr Thr Thr Cys Ile Ile
 770 775 780
 Trp Leu Ala Phe Val Pro Ile Tyr Phe Gly Ser Asn Tyr Lys Ile Ile
 785 790 795 800
 Thr Met Cys Phe Ser Val Ser Leu Ser Ala Thr Val Ala Leu Gly Cys
 805 810 815
 Met Phe Val Pro Lys Val Tyr Ile Ile Leu Ala Lys Pro Glu Arg Asn
 820 825 830
 Val Arg Ser Ala Phe Thr Thr Ser Thr Val Val Arg Met His Val Gly
 835 840 845
 Asp Gly Lys Ser Ser Ser Ala Ala Ser Arg Ser Ser Ser Leu Val Asn
 850 855 860
 Leu Trp Lys Arg Arg Gly Ser Ser Gly Glu Thr Leu Arg Tyr Lys Asp
 865 870 875 880
 Arg Arg Leu Ala Gln His Lys Ser Glu Ile Glu Cys Phe Thr Pro Lys
 885 890 895
 Gly Ser Met Gly Asn Gly Gly Arg Ala Thr Met Ser Ser Ser Asn Gly
 900 905 910
 Lys Ser Val Thr Trp Ala Gln Asn Glu Lys Ser Ser Arg Gly Gln His
 915 920 925
 Leu Trp Gln Arg Leu Ser Ile His Ile Asn Lys Lys Glu Asn Pro Asn
 930 935 940
 Gln Thr Ala Val Ile Lys Pro Phe Pro Lys Ser Thr Glu Ser Arg Gly
 945 950 955 960
 Leu Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly Gly Ser Ala Gly Gly Val Gly Ala
 965 970 975
 Thr Gly Gly Ala Gly Cys Ala Gly Ala Gly Pro Gly Gly Pro Glu Ser
 980 985 990
 Pro Asp Ala Gly Pro Lys Ala Leu Tyr Asp Val Ala Glu Ala Glu Glu
 995 1000 1005
 His Phe Pro Ala Pro Ala Arg Pro Arg Ser Pro Ser Pro Ile Ser Thr
 1010 1015 1020
 Leu Ser His Arg Ala Gly Ser Ala Ser Arg Thr Asp Asp Asp Val Pro
 1025 1030 1035 1040
 Ser Leu His Ser Glu Pro Val Ala Arg Ser Ser Ser Ser Gln Gly Ser
 1045 1050 1055

10

20

30

40

Leu Met Glu Gln Ile Ser Ser Val Val Thr Arg Phe Thr Ala Asn Ile
 1060 1065 1070
 Ser Glu Leu Asn Ser Met Met Leu Ser Thr Ala Ala Pro Ser Pro Gly
 1075 1080 1085
 Val Gly Ala Pro Leu Cys Ser Ser Tyr Leu Ile Pro Lys Glu Ile Gln
 1090 1095 1100
 Leu Pro Thr Thr Met Thr Thr Phe Ala Glu Ile Gln Pro Leu Pro Ala
 1105 1110 1115 1120
 Ile Glu Val Thr Gly Gly Ala Gln Pro Ala Ala Gly Ala Gln Ala Ala
 1125 1130 1135
 Gly Asp Ala Ala Arg Glu Ser Pro Ala Ala Gly Pro Glu Ala Ala Ala
 1140 1145 1150
 Ala Lys Pro Asp Leu Glu Glu Leu Val Ala Leu Thr Pro Pro Ser Pro
 1155 1160 1165
 Phe Arg Asp Ser Val Asp Ser Gly Ser Thr Thr Pro Asn Ser Pro Val
 1170 1175 1180
 Ser Glu Ser Ala Leu Cys Ile Pro Ser Ser Pro Lys Tyr Asp Thr Leu
 1185 1190 1195 1200
 Ile Ile Arg Asp Tyr Thr Gln Ser Ser Ser Ser Leu
 1205 1210

10

【 0 1 8 2 】

(2) 配列番号 : 1 1 の情報 :

(i) 配列の特色 :

20

(A) 長さ : 3 2 8 2 塩基対

(B) 型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 両形態

(D) トポロジー : 両形態

(ii) 分子の型 : c D N A

(ix) 配列の特徴 :

(A) 名称 / 記号 : C D S

(B) 存在位置 : 3 7 0 . . 3 0 0 3

(D) 他の情報 : / 生成物 = “ ヒト m G l u R 5 C ” / 注 = “ 3 ' 末端が切り取られた m G l u R 5 a の変種 ”

30

(xi) 配列 : 配列番号 : 1 1 :

CAGCTCGGCT GTTCTCCGCA CGCTGACCCG AGGGAATGAG CTTGAGATCA TCTTGGGGGG 60
 GAAGCCGGGG ACTCGAGAGC CCGCTCTGCG CTTGCTGATC CCGTGGCCC AACTTTTCGG 120
 GGGGCTAGCT AGACCGAGTC TCACTGCTCG CAGCGCAGCC AACAGGGGGG TTTAGAAGAT 180
 CATGACCACA TGCATCATCT AACTAAATCG TACATGGGCA CAAAATGCTC CTTTAGAAAA 240
 TACATCTCAA TTGCTGGCTA ATTTCTTGAT TTGGGACTCA AGCTAGGACA TCGCTTGTTC 300
 GTAGCTATCA GAACCTCCT CAATTTTCCC CACCATGCTA TCTTTATTGG CTTGAACTCC 360
 TTTCCTAAA ATG GTC CTT CTC TTG ATC CTC TCA GTC TTA CTT TCG AAA 408
 Met Val Leu Leu Leu Ile Leu Ser Val Leu Leu Trp Lys
 1 5 10

40

GAA GAT CTC CGT GGG AGT GCA CAG TCC AGT CAG ACG AGG CTC CTG GCT Glu Asp Val Arg Gly Ser Ala Gln Ser Ser Glu Arg Arg Val Val Ala 15 20 25	456	
CAC ATC CCG GGT GAC ATC ATT ATT GGA GCT CTC TTT TCT GTT CAT CAC His Met Pro Gly Asp Ile Ile Gly Ala Leu Phe Ser Val His His 30 35 40 45	504	
CAG CCT ACT GTG GAC AAA GTT CAT GAG AGG AAG TGT GGG GCG GTC CGT Gln Pro Thr Val Asp Lys Val His Glu Arg Lys Cys Gly Ala Val Arg 50 55 60	552	
GAA CAG TAT GGC ATT CAG AGA GTG GAG GCC ATG CTG CAT ACC CTG GAA Glu Gln Tyr Gly Ile Gln Arg Val Glu Ala Met Leu His Thr Leu Glu 65 70 75	600	10
AGG ATC AAT TCA GAC CCC ACA CTC TTG CCC AAC ATC ACA CTG GGC TGT Arg Ile Asn Ser Asp Pro Thr Leu Leu Pro Asn Ile Thr Leu Gly Cys 80 85 90	648	
CAG ATA AGG GAC TCC TCC TGG CAT TCG GCT GTG GCC CTA GAG CAG AGC Glu Ile Arg Asp Ser Cys Trp His Ser Ala Val Ala Leu Glu Gln Ser 95 100 105	696	
ATT GAG TTC ATA AGA GAT TCC CTC ATT TCT TCA GAA GAG GAA GAA GGC Ile Glu Phe Ile Arg Asp Ser Leu Ile Ser Ser Glu Glu Glu Glu Gly 110 115 120 125	744	
TTG GTA CGC TGT GTG GAT GGC TCC TCC TCT TCC TTC CGC TCC AAG AAG Leu Val Arg Cys Val Asp Gly Ser Ser Ser Ser Phe Arg Ser Lys Lys 130 135 140	792	20
CCC ATA GTA GGG GTC ATT GGG CCT GGC TCC AGT TCT GTA GCC ATT CAG Pro Ile Val Gly Val Ile Gly Pro Gly Ser Ser Ser Val Ala Ile Gln 145 150 155	840	
GTC CAG AAT TTG CTC CAG CTT TTC AAC ATA CCT CAG ATT GCT TAC TCA Val Gln Asn Leu Leu Gln Leu Phe Asn Ile Pro Gln Ile Ala Tyr Ser 160 165 170	888	
GCA ACC AGC ATG GAT CTG AGT GAC AAG ACT CTG TTC AAA TAT TTC ATG Ala Thr Ser Met Asp Leu Ser Asp Lys Thr Leu Phe Lys Tyr Phe Met 175 180 185	936	
AGG GTT GTG CCT TCA GAT GCT CAG CAG GCA AGG GCC ATG GTG GAC ATA Arg Val Val Pro Ser Asp Ala Gln Gln Ala Arg Ala Met Val Asp Ile 190 195 200 205	984	30
GTG AAG AGG TAC AAC TGG ACC TAT GTA TCA GCC GTG CAG ACA GAA GGC Val Lys Arg Tyr Asn Trp Thr Tyr Val Ser Ala Val His Thr Glu Gly 210 215 220	1032	
AAC TAT GGA GAA AGT GGG ATG GAA GCC TCC AAA GAT ATG TCA GCG AAG Asn Tyr Gly Glu Ser Gly Met Glu Ala Ser Lys Asp Met Ser Ala Lys 225 230 235	1080	
GAA GGC ATT TGC ATC GCC CAC TCT TAC AAA ATC TAC AGT AAT GCA GGG Glu Gly Ile Cys Ile Ala His Ser Tyr Lys Ile Tyr Ser Asn Ala Gly 240 245 250	1128	
GAG CAG AGC TTT GAT AAG CTG CTG AAG AAG CTC ACA AGT CAC TTG CCC Glu Gln Ser Phe Asp Lys Leu Leu Lys Lys Leu Thr Ser His Leu Pro 255 260 265	1176	40
AAG GCC CGC GTG CTG GCC TGC TTC TGT CAG GCC ATG ACG GTG AGA GGT Lys Ala Arg Val Val Ala Cys Phe Cys Glu Gly Met Thr Val Arg Gly 270 275 280 285	1224	

CTG CTG ATC GCC ATG ACC CGC CTC GGT CTA GCG CGA GAA TTT CTG CTT	1272	
Leu Leu Met Ala Met Arg Arg Leu Gly Leu Ala Gly Glu Phe Leu Leu		
290 295 300		
CTG GGC AGT GAT GGC TGG GCT GAC AGG TAT GAT GTG ACA GAT GGA TAT	1320	
Leu Gly Ser Asp Gly Trp Ala Asp Arg Tyr Asp Val Thr Asp Gly Tyr		
305 310 315		
CAG CGA GAA GCT GTT GGT GGC ATC ACA ATC AAG CTC CAA TCT CCC GAT	1368	
Gln Arg Glu Ala Val Gly Gly Ile Thr Ile Lys Leu Gln Ser Pro Asp		
320 325 330		
GTC AAG TGC TTT GAT GAT TAT TAT CTG AAG CTC CGG CCA GAA ACA AAC	1416	10
Val Lys Trp Phe Asp Asp Tyr Tyr Leu Lys Leu Arg Pro Glu Thr Asn		
335 340 345		
CAC CGA AAC CCT TGG TTT CAA GAA TTT TGG CAG GAT CGT TTT CAG TGC	1464	
His Arg Asn Pro Trp Phe Gln Glu Phe Trp Gln His Arg Phe Gln Cys		
350 355 360 365		
CGA CTG GAA GCG TTT CCA CAG GAG AAC AGC AAA TAC AAC AAG ACT TGC	1512	
Arg Leu Glu Ala Phe Pro Gln Glu Asn Ser Lys Tyr Asn Lys Thr Cys		
370 375 380		
AAT AGT TCT CTG ACT CTG AAA ACA CAT CAT GTT CAG GAT TCC AAA ATG	1560	
Asn Ser Ser Leu Thr Leu Lys Thr His His Val Gln Asp Ser Lys Met		
385 390 395		
GGA TTT GTG ATC AAC GCC ATC TAT TCG ATG GCC TAT GGG CTC CAC AAC	1608	20
Gly Phe Val Ile Asn Ala Ile Tyr Ser Met Ala Tyr Gly Leu His Asn		
400 405 410		
ATG CAG ATG TCC CTC TGC CCA GGC TAT GCA GGA CTC TGT GAT GCC ATG	1656	
Met Gln Met Ser Leu Cys Pro Gly Tyr Ala Gly Leu Cys Asp Ala Met		
415 420 425		
AAG CGA ATT GAT GGA CGG AAA CTT TTG GAG TCC CTC ATG AAA ACC AAT	1704	
Lys Pro Ile Asp Gly Arg Lys Leu Leu Glu Ser Leu Met Lys Thr Asn		
430 435 440 445		
TTT ACT GCG GTT TCT GGA GAT ACC ATC CTA TTC CAT GAG AAT GCA GAC	1752	
Phe Thr Gly Val Ser Gly Asp Thr Ile Leu Phe Asp Glu Asn Gly Asp		
450 455 460		
TCT CCA GGA ACC TAT GAA ATA ATG AAT TTC AAG CAA ATG GCA AAA GAT	1800	30
Ser Pro Gly Arg Tyr Glu Ile Met Asn Phe Lys Glu Met Gly Lys Asp		
465 470 475		
TAC TTT GAT TAT ATC AAC GTT GGA AGT TGG GAC AAT GCA GAA TTA AAA	1848	
Tyr Phe Asp Tyr Ile Asn Val Gly Ser Trp Asp Asn Gly Glu Leu Lys		
480 485 490		
ATG GAT GAT GAT GAA GTA TGG TCC AAG AAA AGC AAC ATC ATC AGA TCT	1896	
Met Asp Asp Asp Glu Val Trp Ser Lys Lys Ser Asn Ile Ile Arg Ser		
495 500 505		
GTG TGC AGT GAA CCA TGT GAG AAA GGC CAG ATC AAG GTG ATC CGA AAG	1944	
Val Cys Ser Glu Pro Cys Glu Lys Gly Gln Ile Lys Val Ile Arg Lys		
510 515 520 525		
GGA GAA CTC ACC TGT TGT TGC ACC TGT ACA CCT TGT AAG GAG AAT GAG	1992	40
Gly Glu Val Ser Cys Cys Trp Thr Cys Thr Pro Cys Lys Glu Asn Glu		
530 535 540		
TAT GTC TTT GAT GAG TAC ACA TGC AAG GCA TGC CAA CTC GGG TCT TGG	2040	
Tyr Val Phe Asp Glu Tyr Thr Cys Lys Ala Cys Gln Leu Gly Ser Trp		
545 550 555		

CCC Pro	ACT Thr	GAT Asp 560	GAT Asp	CTC Leu	ACA Thr	GGT Gly	TGT Cys 565	GAC Asp	TTG Leu	ATC Ile	CCA Pro	GTA Val 570	CAG Gln	TAT Tyr	CTT Leu	2088	
CGA Arg	TGG Trp 575	GGT Gly	GAC Asp	GCT Pro	GAA Glu	CCC Pro 580	ATT Ile	GCA Ala	GCT Ala	GTG Val	GTG Val 585	TTT Phe	GCC Ala	TGC Cys	CTT Leu	2136	
GGC Gly 590	CTC Leu	CTG Leu	GCC Ala	AGC Thr	CTG Leu 595	TTT Phe	GTT Val	ACT Thr	GTA Val	GTG Val 600	TTC Phe	ATC Ile	ATT Ile	TAC Tyr	GGT Arg 605	2184	
GAT Asp	ACA Thr	CCA Pro	GTA Val	CTC Val 610	AAG Lys	TCC Ser	TCA Ser	AGC Ser	AGG Arg 615	GAA Glu	CTC Leu	TGC Cys	TAC Tyr	ATT Ile 620	ATC Ile	2232	10
CTT Leu	GCT Ala	GGC Gly	ATC Ile 625	TGC Cys	CTG Leu	GGC Gly	TAC Tyr 630	TTA Leu	TGT Cys	ACC Thr	TTC Phe	TGC Cys 635	CTC Leu 635	ATT Ile	GGC Ala	2280	
AAG Lys	CCC Pro	AAA Lys 640	CAG Gln	ATT Ile	TAC Tyr	TGC Cys	TAC Tyr 645	CTT Leu	CAG Gln	AGA Arg	ATT Ile	GGC Gly 650	ATT Ile	GGT Gly	CTC Leu	2328	
TCC Ser	CCA Pro 655	GCC Ala	ATG Met	AGC Ser	TAC Tyr	TCA Ser 660	CCC Ala	CTT Leu	GTA Val	ACA Thr	AAG Lys 665	ACC Thr	AAC Asn	CGT Arg	ATT Ile	2376	
GCA Ala 670	AGG Arg	ATC Ile	CTG Leu	GCT Ala	GGC Gly 675	AGC Ser	AAG Lys	AAG Lys	ATC Ile 680	TGT Cys	ACC Thr	CCC Pro	AAG Lys	CCC Pro 685		2424	20
AGA Arg	TTC Phe	ATG Met	AGT Ser	GCC Ala 690	TGT Cys	GGC Ala	CAG Gln	CTA Leu	GTG Val 695	ATT Ile	GCT Ala	TTC Phe	ATT Ile 700	CTC Leu 700	ATA Ile	2472	
TGC Cys	ATC Ile	CAG Gln 705	TTG Leu	GGC Gly	ATC Ile	ATC Ile	GTT Val	GCC Ala 710	CTC Leu	TTT Phe	ATA Ile	ATG Met	GAG Glu 715	CCT Pro	CCT Pro	2520	
GAC Asp	ATA Ile 720	ATG Met	CAT His	GAC Asp	TAC Tyr	CCA Pro	AGC Ser 725	ATT Ile	CGA Arg	GAA Glu	GTC Val	TAC Tyr 730	CTG Leu	ATC Ile	TGT Cys	2568	
AAC Asn 735	ACC Thr	ACC Thr	AAC Asn	CTA Leu	GGA Gly	GTT Val 740	GTC Val	ACT Thr	CCA Pro	CTT Leu	GGA Gly 745	AAC Asn	AAT Asn	GGA Gly	TTG Leu	2616	30
TTG Leu 750	ATT Ile	TTG Leu	AGC Ser	TGC Cys	ACC Thr 755	TTC Phe	TAT Tyr	GCG Ala	TTC Phe	AAG Lys 760	ACC Thr	AGA Arg	AAT Asn	GTT Val	CCA Pro 765	2664	
GCT Ala	AAC Asn	TTC Phe	CCC Pro	GAG Glu 770	GCC Ala	AAG Lys	TAT Tyr	ATC Ile	GCC Ala 775	TTC Phe	ACA Thr	ATG Met	TAC Tyr	ACG Thr 780	ACC Thr	2712	
TGC Cys	ATT Ile	ATA Ile 785	TGG Trp	CTA Leu	GCT Ala	TTT Phe	GTT Val	CCA Pro 790	ATC Ile	TAC Tyr	TTT Phe	GCC Gly	AGC Ser 795	AAC Asn	TAC Tyr	2760	
AAA Lys	ATC Ile 800	ATC Thr	ACC Met	ATG Cys	TGT Cys	TTC Phe 805	TGG Ser	GTC Val	AGC Ser	CTC Leu	AGT Ser 810	GCC Ala 810	ACA Thr	GTG Val	GCC Ala	2808	40
CTA Leu 815	GGC Gly	TGC Cys	ATG Met	TTT Phe	GTG Val	CCG Pro 820	ACG Thr	CTG Val	TAC Tyr	ATC Ile	ATC Ile 825	CTC Leu	GCC Ala	AAA Lys	GCA Pro	2856	

GAG ACA AAC GTG CGC ACC GCC TTC ACC ACA TCT ACC GTG GTG CGC ATG 2904
 Glu Arg Asn Val Arg Ser Ala Phe Thr Thr Ser Thr Val Val Arg Met 845
 830 835 840 845
 CAT CTA GGG GAT GGC AAG TCA TCC TCC CCA GCC ACC AGA TCC ACC AGC 2952
 His Val Gly Asp Gly Lys Ser Ser Ser Ala Ala Ser Arg Ser Ser Ser 860
 850 855 860
 CTA GTC AAC CTG TCG AAG AGA AGG GGC TCC TCT GCG GAA ACC TTA AGC 3000
 Leu Val Asn Leu Trp Lys Arg Arg Gly Ser Ser Gly Glu Thr Leu Arg 875
 865 870 875
 TAAAAGTTCT GGGGGCTTAC AGGGATGCTG GCCCCTAAAA CTGGAGCAGA GGCATGTGTT 3060
 TCCTGGGTCT TTTAAATGGG AGAAATCTGG GTAAATGACA CCATCTGAGG CAGGGTGACT 3120
 TACGGCATGG ACCTCCTCAT AAAATGGTAT TTATGGGGTT AATGGGATGT GGCTCCACTT 3180
 ACTTAGCCCA AGTCTAGAAA CATGGAAGTC AAATCTCTTA ATAAAGCAGA GCTACAGCGT 3240
 CGGGGGAGTG ACCTTTGACA GGGCAGACAG ACCAGACTTC AG 3282

10

【 0 1 8 3 】

(2) 配列番号 : 1 2 の情報 :

(i) 配列の特色 :

(A) 長さ : 8 7 7 アミノ酸

(B) 型 : アミノ酸

(D) トポロジー : 直鎖状

20

(ii) 分子の型 : 蛋白

(xi) 配列 : 配列番号 : 1 2 :

Met Val Leu Leu Leu Ile Leu Ser Val Leu Leu Trp Lys Glu Asp Val
 1 5 10 15
 Arg Gly Ser Ala Gln Ser Ser Glu Arg Arg Val Val Ala His Met Pro
 20 25 30
 Gly Asp Ile Ile Ile Gly Ala Leu Phe Ser Val His His Gln Pro Thr
 35 40 45
 Val Asp Lys Val His Glu Arg Lys Cys Gly Ala Val Arg Glu Gln Tyr
 50 55 60
 Gly Ile Gln Arg Val Glu Ala Met Leu His Thr Leu Glu Arg Ile Asn
 65 70 75 80
 Ser Asp Pro Thr Leu Leu Pro Asn Ile Thr Leu Gly Cys Glu Ile Arg
 85 90 95
 Asp Ser Cys Trp His Ser Ala Val Ala Leu Glu Gln Ser Ile Glu Phe
 100 105 110
 Ile Arg Asp Ser Leu Ile Ser Ser Glu Glu Glu Glu Gly Leu Val Arg
 115 120 125
 Cys Val Asp Gly Ser Ser Ser Ser Phe Arg Ser Lys Lys Pro Ile Val
 130 135 140
 Gly Val Ile Gly Pro Gly Ser Ser Ser Val Ala Ile Gln Val Gln Asn
 145 150 155 160
 Leu Leu Gln Leu Phe Asn Ile Pro Gln Ile Ala Tyr Ser Ala Thr Ser
 165 170 175

30

40

Met Asp Leu Ser Asp Lys Thr Leu Phe Lys Tyr Phe Met Arg Val Val
 180 185 190
 Pro Ser Asp Ala Gln Gln Ala Arg Ala Met Val Asp Ile Val Lys Arg
 195 200 205
 Tyr Asn Trp Thr Tyr Val Ser Ala Val His Thr Glu Gly Asn Tyr Gly
 210 215 220
 Glu Ser Gly Met Glu Ala Ser Lys Asp Met Ser Ala Lys Glu Gly Ile
 225 230 235 240
 Cys Ile Ala His Ser Tyr Lys Ile Tyr Ser Asn Ala Gly Glu Gln Ser
 245 250 255
 Phe Asp Lys Leu Leu Lys Lys Leu Thr Ser His Leu Pro Lys Ala Arg
 260 265 270
 Val Val Ala Cys Phe Cys Glu Gly Met Thr Val Arg Gly Leu Leu Met
 275 280 285
 Ala Met Arg Arg Leu Gly Leu Ala Gly Glu Phe Leu Leu Leu Gly Ser
 290 295 300
 Asp Gly Trp Ala Asp Arg Tyr Asp Val Thr Asp Gly Tyr Gln Arg Glu
 305 310 315 320
 Ala Val Gly Gly Ile Thr Ile Lys Leu Gln Ser Pro Asp Val Lys Trp
 325 330 335
 Phe Asp Asp Tyr Tyr Leu Lys Leu Arg Pro Glu Thr Asn His Arg Asn
 340 345 350
 Pro Trp Phe Gln Glu Phe Trp Gln His Arg Phe Gln Cys Arg Leu Glu
 355 360 365
 Ala Phe Pro Gln Glu Asn Ser Lys Tyr Asn Lys Thr Cys Asn Ser Ser
 370 375 380
 Leu Thr Leu Lys Thr His His Val Gln Asp Ser Lys Met Gly Phe Val
 385 390 395 400
 Ile Asn Ala Ile Tyr Ser Met Ala Tyr Gly Leu His Asn Met Gln Met
 405 410 415
 Ser Leu Cys Pro Gly Tyr Ala Gly Leu Cys Asp Ala Met Lys Pro Ile
 420 425 430
 Asp Gly Arg Lys Leu Leu Glu Ser Leu Met Lys Thr Asn Phe Thr Gly
 435 440 445
 Val Ser Gly Asp Thr Ile Leu Phe Asp Glu Asn Gly Asp Ser Pro Gly
 450 455 460
 Arg Tyr Glu Ile Met Asn Phe Lys Glu Met Gly Lys Asp Tyr Phe Asp
 465 470 475 480
 Tyr Ile Asn Val Gly Ser Trp Asp Asn Gly Glu Leu Lys Met Asp Asp
 485 490 495
 Asp Glu Val Trp Ser Lys Lys Ser Asn Ile Ile Arg Ser Val Cys Ser
 500 505 510
 Glu Pro Cys Glu Lys Gly Gln Ile Lys Val Ile Arg Lys Gly Glu Val
 515 520 525

10

20

30

40

Ser Cys Cys Trp Thr Cys Thr Pro Cys Lys Glu Asn Glu Tyr Val Phe
 530 535 540
 Asp Glu Tyr Thr Cys Lys Ala Cys Gln Leu Gly Ser Trp Pro Thr Asp
 545 550 555 560
 Asp Leu Thr Gly Cys Asp Leu Ile Pro Val Gln Tyr Leu Arg Trp Gly
 565 570 575
 Asp Pro Glu Pro Ile Ala Ala Val Val Phe Ala Cys Leu Gly Leu Leu
 580 585 590
 Ala Thr Leu Phe Val Thr Val Val Phe Ile Ile Tyr Arg Asp Thr Pro
 595 600 605
 Val Val Lys Ser Ser Ser Arg Glu Leu Cys Tyr Ile Ile Leu Ala Gly
 610 615 620
 Ile Cys Leu Gly Tyr Leu Cys Thr Phe Cys Leu Ile Ala Lys Pro Lys
 625 630 635 640
 Gln Ile Tyr Cys Tyr Leu Gln Arg Ile Gly Ile Gly Leu Ser Pro Ala
 645 650 655
 Met Ser Tyr Ser Ala Leu Val Thr Lys Thr Asn Arg Ile Ala Arg Ile
 660 665 670
 Leu Ala Gly Ser Lys Lys Lys Ile Cys Thr Pro Lys Pro Arg Phe Met
 675 680 685
 Ser Ala Cys Ala Gln Leu Val Ile Ala Phe Ile Leu Ile Cys Ile Gln
 690 695 700
 Leu Gly Ile Ile Val Ala Leu Phe Ile Met Glu Pro Pro Asp Ile Met
 705 710 715 720
 His Asp Tyr Pro Ser Ile Arg Glu Val Tyr Leu Ile Cys Asn Thr Thr
 725 730 735
 Asn Leu Gly Val Val Thr Pro Leu Gly Asn Asn Gly Leu Leu Ile Leu
 740 745 750
 Ser Cys Thr Phe Tyr Ala Phe Lys Thr Arg Asn Val Pro Ala Asn Phe
 755 760 765
 Pro Glu Ala Lys Tyr Ile Ala Phe Thr Met Tyr Thr Thr Cys Ile Ile
 770 775 780
 Trp Leu Ala Phe Val Pro Ile Tyr Phe Gly Ser Asn Tyr Lys Ile Ile
 785 790 795 800
 Thr Met Cys Phe Ser Val Ser Leu Ser Ala Thr Val Ala Leu Gly Cys
 805 810 815
 Met Phe Val Pro Thr Val Tyr Ile Ile Leu Ala Lys Pro Glu Arg Asn
 820 825 830
 Val Arg Ser Ala Phe Thr Thr Ser Thr Val Val Arg Met His Val Gly
 835 840 845
 Asp Gly Lys Ser Ser Ser Ala Ala Ser Arg Ser Ser Ser Leu Val Asn
 850 855 860
 Leu Trp Lys Arg Arg Gly Ser Ser Gly Glu Thr Leu Arg
 865 870 875

10

20

30

40

【 0 1 8 4 】

(i) 配列の特色 :

(A) 長さ : 3 4 3 塩基対

(B) 型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 両形態

(D) トポロジ : 両形態

(ii) 分子の型 : c D N A

50

(ix) 配列の特徴：

(A) 名称 / 記号：種々の特徴

(B) 存在位置：1 . . 3 4 3

(D) 他の情報： / 注 = “ m G 1 u R 2 の部分配列 - 3 ' 非翻訳配列 ”

(xi) 配列：配列番号：1 3：

```

TGGAGAGGCC ATACTGCCGC GCTGACACAG CTGCTCCTGG GCACCTAGTG CAGACCCACC    60
TCCAGGGCCA GGAGGAAGTT GGCTGGAGCA CTGCAATAAT TTATTACCCA GCCTATGTCT    120
GCCCCCGCAG TCACTTACCC ACCTCCTTAC CCCAGCTCTT CAGACTCAGA AGTCAGGAGC    180
CTTGGCCAGG AGCCTCTGCA GTGGCCACTA ACTGCCCTTG TAGCTGTGTT TCCTCCTGGC    240
CAGGCCCAGG GCTCAGAGAG GAGCAAGCCA GGCTTCACTC TCCCCTGGAC CCGGCTGGCT    300
GAGGACGGCA GGCCCCAGTC GTAACCAGCA AAGGTGCTTC CAG                          343
  
```

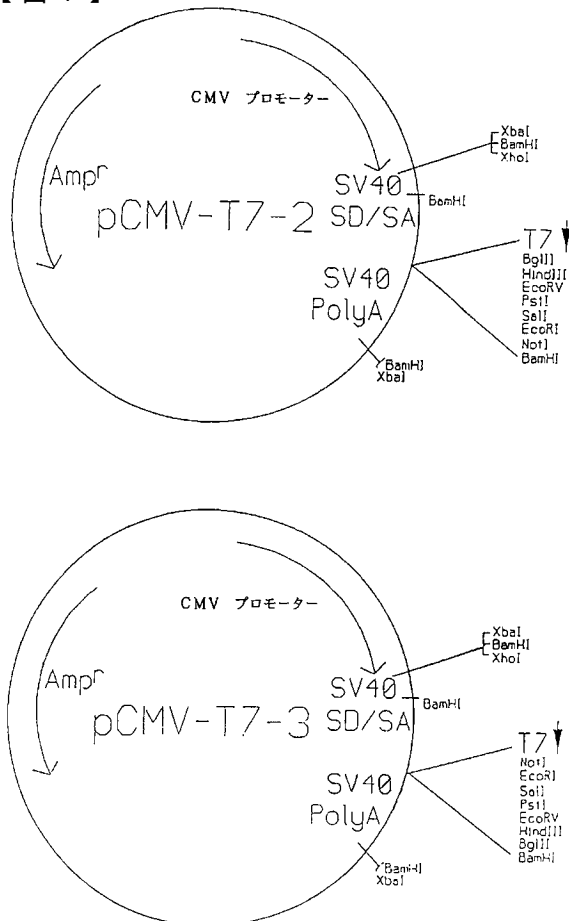
10

【図面の簡単な説明】

【 0 1 8 5 】

【 図 1 】 図 1 は、CMV プロモーターをベースにしたベクターである pCMV - T7 - 2 と pCMV - T7 - 3 を示す。

【 図 1 】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 1/21	4 H 0 4 5
C 1 2 N 5/10	C 1 2 P 21/08	
C 1 2 P 21/08	C 1 2 Q 1/68	A
C 1 2 Q 1/68	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/53	M
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/566	
G 0 1 N 33/566	C 1 2 N 5/00	A
	C 1 2 N 5/00	B

(72)発明者 ダゲット, ローリー

アメリカ合衆国 9 2 1 2 4 カリフォルニア州サン ディエゴ, レペチョ ドライブ 5 3 1 0
, ナンバー ブイ 1 0 2

(72)発明者 エリス, スチーブン ビー.

アメリカ合衆国 9 2 1 2 9 カリフォルニア州サン ディエゴ, オビエド ストリート 8 9 3
9

(72)発明者 リアウ, チェン

アメリカ合衆国 9 2 1 2 9 カリフォルニア州サン ディエゴ, サリックス プレイス 7 6 6
8

(72)発明者 ポンツラー, アーロン

アメリカ合衆国 9 2 0 7 1 カリフォルニア州サンティエ, ケリガン コート 1 0 5 7 9

(72)発明者 ジョンソン, エドウィン シー.

アメリカ合衆国 9 2 1 2 9 カリフォルニア州サン ディエゴ, グンナー アベニュー 1 3 2
4 0

(72)発明者 ヘス, スチーブン ディー.

アメリカ合衆国 9 2 1 2 7 カリフォルニア州サン ディエゴ, サウスビュー ドライブ 3 7
3 5, ナンバー 3 0 9

F ターム(参考) 2G045 AA40 CB01 DA12 DA13 DA14 DA36 FB03
4B024 AA01 BA43 BA63 CA04 CA12 DA01 DA02 DA11 EA04 GA01
GA11 HA08 HA12
4B063 QA01 QA18 QQ43 QQ53 QQ61 QQ91 QR08 QR32 QR42 QR50
QR55 QR77 QS25 QS34 QS36 QS39 QX01
4B064 AG27 CA10 CA20 CC24 DA01 DA13
4B065 AA57X AA87X AA90Y AB01 AB02 BA02 BA08 CA24 CA25 CA44
4H045 AA10 AA11 AA30 BA09 CA40 DA50 DA76 EA20 EA50 FA74

专利名称(译)	人代谢型谷氨酸受体，编码其的核酸及其用途		
公开(公告)号	JP2005160480A	公开(公告)日	2005-06-23
申请号	JP2004340504	申请日	2004-11-25
[标]申请(专利权)人(译)	严重神经科学公司		
申请(专利权)人(译)	严重 - 神经科学公司		
[标]发明人	ダゲットローリー エリススチーブンビー リアウチェン ポンツラーアーロン ジョンソンエドウィンシー ヘススチーブンディー		
发明人	ダゲット,ローリー エリス,スチーブン ビー. リアウ,チェン ポンツラー,アーロン ジョンソン,エドウィン シー. ヘス,スチーブン ディー.		
IPC分类号	G01N33/566 A61K39/395 A61K45/00 A61P25/00 A61P25/08 A61P25/28 A61P43/00 C07K14/705 C07K16/28 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00 C12N5/10 C12N15/02 C12N15/09 C12N15/12 C12P21/02 C12P21/08 C12Q1/02 C12Q1/68 C12R1/91 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53		
CPC分类号	A01K2217/05 A61P25/00 A61P25/08 A61P25/28 A61P37/02 A61P43/00 C07K14/70571 G01N33/5008 G01N33/502 G01N33/5058 G01N33/5091 G01N2333/70571		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K14/705 C07K16/28 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/08 C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.M G01N33/566 C12N5/00.A C12N5/00.B C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A C12N5/00.101 C12N5/00.102 C12N5/12		
F-TERM分类号	2G045/AA40 2G045/CB01 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/FB03 4B024 /AA01 4B024/BA43 4B024/BA63 4B024/CA04 4B024/CA12 4B024/DA01 4B024/DA02 4B024/DA11 4B024/EA04 4B024/GA01 4B024/GA11 4B024/HA08 4B024/HA12 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063 /QQ43 4B063/QQ53 4B063/QQ61 4B063/QQ91 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR42 4B063/QR50 4B063/QR55 4B063/QR77 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QS39 4B063/QX01 4B064 /AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA57X 4B065/AA87X 4B065/AA90Y 4B065/AB01 4B065/AB02 4B065/BA02 4B065/BA08 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065 /CA44 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA09 4H045/CA40 4H045/DA50 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74		
代理人(译)	池田幸		
优先权	08/072574 1993-06-04 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

解决的问题：提供编码人代谢型谷氨酸受体蛋白亚型2和5的核酸，以及由此编码的蛋白。 人类代谢型谷氨酸受体编码mGluR2和mGluR5的亚型。 这些核酸除了可用于产生代谢型谷氨酸受体亚型外，还可用作探针，因此本领域技术人员将能够无需过度实验即可鉴定和分离相关受体亚基。 有可能 此外，除了公开新型的代谢型谷氨酸受体蛋白亚型以外，还影响此类受体功能的化合物（例如，激动剂，拮抗剂和谷氨酸受体功能的调节剂（活性调节剂））使用此类受体亚型来鉴定和表征。 [选择图]无

(51) Int. Cl. ⁷		F I	テーマコード (5
C 1 2 N	15/09	C 1 2 N	15/00 Z N A A
C O 7 K	14/705	C O 7 K	14/705
C O 7 K	16/28	C O 7 K	16/28
C 1 2 N	1/15	C 1 2 N	1/15
C 1 2 N	1/19	C 1 2 N	1/19
審査請求 有 請求項の数 17 O L (全 82 頁) 最			
(21) 出願番号		特願2004-340504 (P2004-340504)	
(22) 出願日		平成16年11月25日 (2004.11.25)	
(62) 分割の表示		特願2003-362046 (P2003-362046)	
原出願日		平成6年6月3日 (1994.6.3)	
(31) 優先権主張番号		08/072,574	
(32) 優先日		平成5年6月4日 (1993.6.4)	
(33) 優先権主張国		米国 (US)	
(71) 出願人		500019948 シビア・ニューロサイエンス ーボレイテッド アメリカ合衆国92037-46 フォルニア州ラ・ホヤ、コースト バード・サウス505番、スウィ O	
(74) 代理人		100066692 弁理士 浅村 皓	
(74) 代理人		100072040 弁理士 浅村 肇	
(74) 代理人		100088926 弁理士 長沼 曜夫	
(74) 代理人		100102897	