

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) **公開特許公報** (A) (11)特許出願公開番号

特開2001 - 245666

(P2001 - 245666A)

(43)公開日 平成13年9月11日(2001.9.11)

(51) Int.Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マ-ト* (参考)
C 1 2 N 15/09	ZNA	A 0 1 H 5/00	A 2 B 0 3 0
A 0 1 H 5/00		A 0 1 K 67/027	2 G 0 4 5
A 0 1 K 67/027		A 6 1 K 39/395	D 4 B 0 2 4
A 6 1 K 39/395			N 4 B 0 6 3
		45/00 101	4 B 0 6 4

審査請求 未請求 請求項の数 35 O L (全126数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2000 - 60548(P2000 - 60548)

(22)出願日 平成12年3月6日(2000.3.6)

(71)出願人 000001029

協和醗酵工業株式会社

東京都千代田区大手町1丁目6番1号

(72)発明者 佐々木 克敏

東京都町田市旭町3丁目6番6号 協和醗酵工業株式会社東京研究所内

(72)発明者 中谷 幸江

東京都千代田区大手町一丁目6番1号 協和醗酵工業株式会社本社内

(72)発明者 佐伯 智

東京都町田市旭町3丁目6番6号 協和醗酵工業株式会社東京研究所内

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 新規ポリペプチド

(57)【要約】

【課題】 新規なG蛋白質共役型受容体ポリペプチドを取得し、該ポリペプチドに対するリガンド、アゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質の探索方法を提供することを課題とする。

【解決手段】 本発明によれば、ヒト胃癌細胞由来のcDNAライブラリーから選ばれるcDNAクローンをランダムにシーケンスし、新規G蛋白質共役型受容体ポリペプチドをコードするDNAを取得できる。該DNAにコードされるポリペプチドまたはその部分ポリペプチドを用いて、該ポリペプチドのリガンド、アゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質の探索系またはスクリーニングキット、該探索系またはキットを用いて得られる化合物、該ポリペプチドに対する抗体を提供できる。また該DNAを用いて、該DNAが欠損した非ヒト哺乳動物を提供できる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列番号1に記載のアミノ酸配列を有するG蛋白質共役型受容体ポリペプチド。

【請求項2】 配列番号1に記載のポリペプチドのアミノ酸配列において、1個以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加したアミノ酸配列を有するポリペプチドであり、かつ請求項1に記載のポリペプチドと実質的に同一の活性を有するポリペプチド。

【請求項3】 請求項1または2に記載のG蛋白質共役型受容体ポリペプチドの部分ペプチドであり、かつ該ポリペプチドのリガンド、アゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質との結合能を有する部分ペプチド。

【請求項4】 請求項1または2に記載のG蛋白質共役型受容体ポリペプチドをコードするDNA。

【請求項5】 配列番号2に記載のDNA中において、塩基番号175～1287番で表される塩基配列を有するDNA。

【請求項6】 請求項4または5に記載のDNAから選ばれるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAであり、かつ請求項1に記載のG蛋白質共役型受容体ポリペプチドと実質的に同一の活性を有するポリペプチドをコードするDNA。

【請求項7】 請求項3に記載のG蛋白質共役型受容体ポリペプチドの部分ペプチドをコードするDNA。

【請求項8】 請求項6に記載のDNAにコードされるポリペプチドの部分ペプチドをコードするDNAであり、かつ請求項1または2に記載のポリペプチドのリガンド、アゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質との結合能を有する部分ペプチドをコードするDNA。

【請求項9】 請求項4～8のいずれか1項に記載のDNAをベクターに組込んで得られる組換え体DNA。

【請求項10】 請求項9に記載の組換え体DNAを保有する形質転換細胞、形質転換植物または形質転換非ヒト動物。

【請求項11】 請求項10に記載の形質転換細胞、形質転換植物または形質転換非ヒト動物を用い、(i)該形質転換細胞を培地中で培養し該培養物中に、(ii)該形質転換植物を栽培し該植物中に、または(iii)該形質転換非ヒト動物を飼育し該動物中に、請求項1または2に記載のポリペプチドまたは請求項3に記載の部分ペプチドを生成蓄積させ、該培養物、該植物または該動物から該ポリペプチドまたは該部分ペプチドを採取することを特徴とする、請求項1または2に記載のポリペプチドまたは請求項3に記載のペプチドの製造方法。

【請求項12】 請求項1または2に記載のポリペプチド、または請求項3記載の部分ペプチドを認識する抗体。

【請求項13】 請求項12に記載の抗体を用いる請求項1または2に記載のポリペプチド、または請求項3に記載の部分ペプチドの免疫学的定量方法。

【請求項14】 請求項13に記載の定量方法を用いる癌、あるいは視床または小脳の機能異常症の判定方法。

【請求項15】 請求項1または2に記載のポリペプチドをコードするmRNA量を測定することによる癌、あるいは視床または小脳の機能異常症の判定方法。

【請求項16】 請求項1または2に記載のポリペプチドをコードする遺伝子の欠失、置換または付加を検出することによる癌、あるいは視床または小脳の機能異常症の判定方法。

【請求項17】 請求項1または2に記載のポリペプチド、または請求項3に記載の部分ペプチドと、被験試料とを接触させ、被験試料より請求項1または2に記載のポリペプチドのリガンド、アゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質を選択することを特徴とする、請求項1または2に記載のポリペプチドのリガンド、アゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質のスクリーニング方法。

【請求項18】 請求項1または2に記載のポリペプチド、または請求項3に記載の部分ペプチドを発現する細胞と、被験試料とを接触させ、被験試料より請求項1または2に記載のポリペプチドのリガンド、アゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質を選択することを特徴とする、請求項1または2に記載のポリペプチドのリガンド、アゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質のスクリーニング方法。

【請求項19】 (i)請求項1または2に記載のポリペプチド、または請求項3に記載の部分ペプチドと、リガンドとを接触させた場合と(ii)請求項1または2に記載のポリペプチド、または請求項3に記載の部分ペプチドと、リガンドおよび被験試料とを接触させた場合とを比較し、被験試料より請求項1または2に記載のポリペプチドのアゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質を選択することを特徴とする、請求項1または2に記載のポリペプチドのアゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質のスクリーニング方法。

【請求項20】 (i)請求項1または2に記載のポリペプチド、または請求項3に記載の部分ペプチドを発現する細胞と、リガンドとを接触させた場合と(ii)請求項1または2に記載のポリペプチド、または請求項3に記載の部分ペプチドを発現する細胞と、リガンドおよび被験試料とを接触させた場合とを比較し、被験試料より請求項1または2に記載のポリペプチドのアゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質を選択することを特徴とする、請求項1または2に記載のポリペプチドのアゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質のスクリーニング方法。

【請求項21】 請求項1または2に記載のポリペプチド、または請求項3に記載の部分ペプチドを含有することを特徴とする、請求項1または2に記載のポリペプチドのリガンド、アゴニスト、アンタゴニストまたは機能

修飾物質のスクリーニング用キット。

【請求項22】 請求項17～20に記載のスクリーニング方法、または請求項21に記載のスクリーニング用キットを用いて得られる、請求項1または2に記載のポリペプチドのリガンド、アゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質、またはその薬理的に許容される塩。

【請求項23】 請求項12に記載の抗体、請求項22に記載のリガンド、アゴニスト、アンタゴニストおよび機能修飾物質から選ばれる物質、またはその薬理的に許容される塩を含有する、癌、あるいは視床または小脳の機能異常症の治療薬。

【請求項24】 (i) 請求項1または2に記載のポリペプチドを発現する細胞と、(ii) 請求項1または2に記載のポリペプチドを発現する細胞と被験試料とを接触させた場合とを比較し、被験試料より請求項1または2に記載のポリペプチドをコードする遺伝子の発現を変動させる化合物を選択することを特徴とする、請求項1または2に記載のポリペプチドをコードするDNAの発現量を変動させる化合物のスクリーニング方法。

【請求項25】 発現量の変動を、請求項13に記載の方法、または請求項1または2に記載のポリペプチドをコードするmRNA量を定量する方法で測定することを特徴とする、請求項24に記載のスクリーニング方法。

【請求項26】 請求項1または2に記載のポリペプチドをコードする遺伝子の転写を制御する領域の下流にレポーター遺伝子の連結されたDNAを含有する形質転換体と被験試料とを接触させ、被験試料より請求項1または2に記載のポリペプチドをコードするDNAの発現量を変動させる化合物を選択することを特徴とする、請求項1または2に記載のポリペプチドをコードする遺伝子の発現量を変動させる化合物のスクリーニング方法。

【請求項27】 転写を制御する領域が、配列番号15の20202～25202番目の塩基配列で表わされるDNA中の連続する50～5000bpの塩基配列を有するDNAで規定される領域である、請求項26に記載のスクリーニング方法。

【請求項28】 請求項24～27のいずれか1項に記載のスクリーニング方法から選ばれる方法によって得られる化合物またはその薬理的に許容される塩。

【請求項29】 請求項28に記載の化合物またはその薬理的に許容される塩を含有する、癌、あるいは視床または小脳の機能異常症の治療薬。

【請求項30】 請求項4～6に記載のDNAおよび配列番号2に記載のDNAから選ばれるDNAの塩基配列中の連続した5～60塩基と同じ配列を有するオリゴヌクレオチド、該オリゴヌクレオチドと相補的な配列を有するオリゴヌクレオチド、およびこれらオリゴヌクレオチドのオリゴヌクレオチド誘導体から選ばれるDNA。

【請求項31】 請求項4～6および30に記載のDN*50

*Aから選ばれるDNAを用い、請求項1または2に記載のポリペプチドをコードするDNAの転写またはmRNAの翻訳を抑制する方法。

【請求項32】 請求項1または2に記載のポリペプチドをコードするDNAを含む遺伝子の全部または一部が欠損または置換し、請求項1または2に記載のポリペプチドの発現量が変化した遺伝子欠失または置換非ヒト動物。

【請求項33】 請求項32に記載の動物に被験試料を接種、または該動物の臓器、組織あるいは細胞と、被験試料とを接触させ、被験試料より、癌、あるいは視床または小脳の機能異常症の治療薬を選択することを特徴とする、癌、あるいは視床または小脳の機能異常症の治療薬のスクリーニング方法。

【請求項34】 請求項33に記載のスクリーニング方法で得られる化合物またはその薬理的に許容される塩。

【請求項35】 請求項34に記載の化合物またはその薬理的に許容される塩を含有する、癌、あるいは視床または小脳の機能異常症の治療薬。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、ヒト視床由来の新規G蛋白質共役型受容体ポリペプチド、該ポリペプチドの部分ペプチド、該ポリペプチドまたは該部分ペプチドをコードするDNA、該DNAが組み込まれた組換え体ベクター、該組換え体ベクターを保有する形質転換体、該ポリペプチドまたは該部分ペプチドの製造方法、該ポリペプチドを認識する抗体、該ポリペプチドまたは該部分ペプチドを用いた該ポリペプチドのリガンド、アゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質のスクリーニング方法、該ポリペプチドまたは該部分ペプチドを含有する該ポリペプチドのリガンド、アゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質のスクリーニング用キット、該スクリーニング方法またはスクリーニング用キットによって得られる化合物またはその薬理的に許容される塩、該ポリペプチドをコードする遺伝子を欠損または一部改変した動物とその利用方法に関する。

【0002】

【従来の技術】G蛋白質共役型受容体(以下、GPCRと略すこともある)は、生体の細胞や臓器の各機能細胞表面に存在し、生体の細胞や臓器の機能を調節する分子、例えばホルモン、神経伝達物質および生理活性物質等の受容体として機能することで、生理学的または病態学的に非常に重要な役割を担っている。GPCRは、光、味物質、匂い物質などの受容体としても機能している。GPCRの具体的なリガンドとしては、蛋白質、ペプチド、生体アミン、脂質メディエータ、光子、カルシウム、糖、核酸など多種多様なものが知られている。ヘテロ三量体(G、G)のG蛋白質(guanine nucl

eotide-binding protein) と共役し、G蛋白質の活性化を通して細胞内にシグナルを伝達する。GPCRは7個の膜貫通領域を有することから、7回膜貫通型受容体とも呼ばれる。

【0003】GPCRは創薬ターゲットとして非常にすぐれており、これまでにGPCRの天然リガンド、アゴニストまたはアンタゴニストが薬となっている。現在上市されている薬の約60%はGPCRをターゲットにしたものである。GPCRは遺伝病の原因にもなっており、遺伝病の診断や治療においても重要なターゲットである【Trends in Pharmacological Science, 18, 430 (1984)】。

【0004】したがって、新規なGPCRを取得し、その機能解析を行うことは、その機能と密接に関連した医薬品開発を行う上で、非常に有用な手段を提供する。例えば、脳などの中枢神経系の器官においては、多くのホルモン、ホルモン様物質、神経伝達物質あるいは生理活性物質などによって、脳の生理的な機能が調節されているが、脳内には未知のホルモン、ホルモン様物質、神経伝達物質あるいは生理活性物質が存在すると考えられる。胃、腸、膵臓などの器官の生理機能も、多くのホルモン、ホルモン様物質、神経伝達物質あるいは生理活性物質などによって調節されていることが知られており、胃、腸、膵臓などの器官には未知のホルモン、ホルモン様物質、神経伝達物質あるいは生理活性物質が存在すると考えられる。脳、胃、腸、膵臓などの器官においては、上記のホルモン、ホルモン様物質、神経伝達物質あるいは生理活性物質に対応する受容体(例えばGPCR)が存在していることも知られているが、これらの器官には未知の受容体(例えばGPCR)も存在すると考えられる。既知GPCRについても、新たなサブタイプが存在する可能性もある。

【0005】脳、胃、腸、膵臓において発現している新規なGPCR遺伝子を取得できれば、該GPCRのアミノ酸配列と既知GPCRのアミノ酸配列とを比較したり、該GPCR遺伝子の転写物の発現分布を調べることにより、該GPCRの機能を推定し、医薬品開発に有用な情報を得ることができる。また、新規GPCR遺伝子が取得できれば、該GPCRに対する天然リガンド、アゴニスト、またはアンタゴニストを効率よくスクリーニングすることが可能になる。該天然リガンド、アゴニスト、またはアンタゴニストは医薬品として期待される。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】これまで知られていないG蛋白質共役型受容体ポリペプチドおよび該ポリペプチドをコードするDNAが得られれば、該ポリペプチドのリガンド、アゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質のスクリーニングが可能になり、該スクリーニングによって得られる物質は医薬品として有用である。

【0007】本発明は、ヒト視床由来の新規G蛋白質共

役型受容体ポリペプチドまたはその部分ペプチド、該ポリペプチドまたは該部分ペプチドをコードするDNA、該DNAを含有する組換えベクター、該組換えベクターを保持する形質転換体、該ポリペプチドまたは該部分ペプチドの製造方法、該ポリペプチドに対するリガンド、アゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質のスクリーニング方法およびスクリーニング用キット、該スクリーニング方法および該スクリーニングキットを用いて得られるリガンド、アゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質と該リガンド、アゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質を含有する医薬、および該ポリペプチドまたはその部分ペプチドに対する抗体などを提供することを目的としている。

【0008】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、鋭意研究を重ねた結果、ヒト胃癌細胞株 KATOIII由来のcDNAライブラリーの各cDNAクローンの配列をランダムにシーケンスすることにより、これまでに知られていなかった新規なGPCRの一部をコードするcDNAを単離することに成功した。該cDNAはC末端部分を欠失していたため、該新規GPCRポリペプチド全長をコードするcDNAをヒト視床より取得し、全塩基配列を決定・解析することにより、本発明を完成するに至った。

【0009】本発明は、以下の(1)~(35)に関する。

(1) 配列番号1に記載のアミノ酸配列を有するG蛋白質共役型受容体ポリペプチド。

(2) 配列番号1に記載のポリペプチドのアミノ酸配列において、1個以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加したアミノ酸配列を有するポリペプチドであり、かつ(1)に記載のポリペプチドと実質的に同一の活性を有するポリペプチド。

(3) (1)または(2)に記載のG蛋白質共役型受容体ポリペプチドの部分ペプチドであり、かつ該ポリペプチドのリガンド、アゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質との結合能を有する部分ペプチド。

(4) (1)または(2)に記載のG蛋白質共役型受容体ポリペプチドをコードするDNA。

(5) 配列番号2に記載のDNA中において、塩基番号175~1287番で表される塩基配列を有するDNA。

(6) (4)または(5)に記載のDNAから選ばれたDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAであり、かつ(1)に記載のG蛋白質共役型受容体ポリペプチドと実質的に同一の活性を有するポリペプチドをコードするDNA。

(7) (3)に記載のG蛋白質共役型受容体ポリペプチドの部分ペプチドをコードするDNA。

(8) (6)に記載のDNAにコードされるポリペプチドの部分ペプチドをコードするDNAであり、かつ

(1) または (2) に記載のポリペプチドのリガンド、アゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質との結合能を有する部分ペプチドをコードする DNA。

(9) (4) ~ (8) のいずれか 1 つに記載の DNA をベクターに組込んで得られる組換え体 DNA。

(10) (9) に記載の組換え体 DNA を保有する形質転換細胞、形質転換植物または形質転換非ヒト動物。

(11) (10) に記載の形質転換細胞、形質転換植物または形質転換非ヒト動物を用い、(i) 該形質転換細胞を培地中で培養し該培養物中に、(ii) 該形質転換植物を栽培し該植物中に、または (iii) 該形質転換非ヒト動物を飼育し該動物中に、(1) または (2) に記載のポリペプチドまたは (3) に記載の部分ペプチドを生成蓄積させ、該培養物、該植物または該動物から該ポリペプチドまたは該部分ペプチドを採取することを特徴とする、(1) または (2) に記載のポリペプチドまたは (3) に記載のペプチドの製造方法。

(12) (1) または (2) に記載のポリペプチド、または (3) に記載の部分ペプチドを認識する抗体。

(13) (12) に記載の抗体を用いる (1) または (2) に記載のポリペプチド、または (3) に記載の部分ペプチドの免疫学的定量方法。

(14) (13) に記載の定量方法を用いる癌、あるいは視床または小脳の機能異常症の判定方法。

(15) (1) または (2) に記載のポリペプチドをコードする mRNA 量を測定することによる癌、あるいは視床または小脳の機能異常症の判定方法。

(16) (1) または (2) に記載のポリペプチドをコードする遺伝子の欠失、置換または付加を検出することによる癌、あるいは視床または小脳の機能異常症の判定方法。

(17) (1) または (2) に記載のポリペプチド、または (3) に記載の部分ペプチドと、被験試料とを接触させ、被験試料より (1) または (2) に記載のポリペプチドのリガンド、アゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質を選択することを特徴とする、(1) または (2) に記載のポリペプチドのリガンド、アゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質のスクリーニング方法。

(18) (1) または (2) に記載のポリペプチド、または (3) に記載の部分ペプチドを発現する細胞と、被験試料とを接触させ、被験試料より (1) または (2) に記載のポリペプチドのリガンド、アゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質を選択することを特徴とする、(1) または (2) に記載のポリペプチドのリガンド、アゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質のスクリーニング方法。

(19) (i) (1) または (2) に記載のポリペプチド、または (3) に記載の部分ペプチドと、リガンドとを接触させた場合と (ii) (1) または (2) に記載

のポリペプチド、または (3) に記載の部分ペプチドと、リガンドおよび被験試料とを接触させた場合とを比較し、被験試料より (1) または (2) に記載のポリペプチドのアゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質を選択することを特徴とする、(1) または (2) に記載のポリペプチドのアゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質のスクリーニング方法。

(20) (i) (1) または (2) に記載のポリペプチド、または (3) に記載の部分ペプチドを発現する細胞と、リガンドとを接触させた場合と (ii) (1) または (2) に記載のポリペプチド、または (3) に記載の部分ペプチドを発現する細胞と、リガンドおよび被験試料とを接触させた場合とを比較し、被験試料より (1) または (2) に記載のポリペプチドのアゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質を選択することを特徴とする、(1) または (2) に記載のポリペプチドのアゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質のスクリーニング方法。

(21) (1) または (2) に記載のポリペプチド、または (3) に記載の部分ペプチドを含有することを特徴とする、(1) または (2) に記載のポリペプチドのリガンド、アゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質のスクリーニング用キット。

(22) (17) ~ (20) に記載のスクリーニング方法、または (21) に記載のスクリーニング用キットを用いて得られる、(1) または (2) に記載のポリペプチドのリガンド、アゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質、またはその薬理的に許容される塩。

(23) (12) に記載の抗体、(22) に記載のリガンド、アゴニスト、アンタゴニストおよび機能修飾物質から選ばれる物質、またはその薬理的に許容される塩を含有する、癌、あるいは視床または小脳の機能異常症の治療薬。

(24) (i) (1) または (2) に記載のポリペプチドを発現する細胞と、(ii) (1) または (2) に記載のポリペプチドを発現する細胞と被験試料とを接触させた場合とを比較し、被験試料より (1) または (2) に記載のポリペプチドをコードする遺伝子の発現を変動させる化合物を選択することを特徴とする、(1) または (2) に記載のポリペプチドをコードする DNA の発現量を変動させる化合物のスクリーニング方法。

(25) 発現量の変動を、(13) に記載の方法、または (1) または (2) に記載のポリペプチドをコードする mRNA 量を定量する方法で測定することを特徴とする、(24) に記載のスクリーニング方法。

(26) (1) または (2) に記載のポリペプチドをコードする遺伝子の転写を制御する領域の下流にレポーター遺伝子の連結された DNA を含有する形質転換体と被験試料とを接触させ、被験試料より (1) または (2) に記載のポリペプチドをコードする DNA の発現

量を変動させる化合物を選択することを特徴とする、
(1)または(2)に記載のポリペプチドをコードする
遺伝子の発現量を変動させる化合物のスクリーニング方
法。

(27) 転写を制御する領域が、配列番号15の20
202~25202番目の塩基配列で表わされるDNA
中の連続する50~5000bpの塩基配列を有するD
NAで規定される領域である、(26)に記載のスクリ
ーニング方法。

(28) (24)~(27)のいずれか1つに記載の 10
スクリーニング方法によって得られる化合物またはその
薬理的に許容される塩。

(29) (28)に記載の化合物またはその薬理的
に許容される塩を含有する、癌、あるいは視床または小
脳の機能異常症の治療薬。

(30) (4)~(6)に記載のDNAおよび配列番
号2に記載のDNAから選ばれるDNAの塩基配列中の
連続した5~60塩基と同じ配列を有するオリゴヌクレ
オチド、該オリゴヌクレオチドと相補的な配列を有する
オリゴヌクレオチド、およびこれらオリゴヌクレオチド 20
のオリゴヌクレオチド誘導体から選ばれるDNA。

(31) (4)~(6)および(30)に記載のDN
Aから選ばれるDNAを用い、(1)または(2)に記
載のポリペプチドをコードするDNAの転写またはmR
NAの翻訳を抑制する方法。

(32) (1)または(2)に記載のポリペプチドを
コードするDNAを含む遺伝子の全部または一部が欠損
または置換し、(1)または(2)に記載のポリペプチ
ドの発現量が変化した遺伝子欠失または置換非ヒト動
物。 30

(33) (32)に記載の動物に被験試料を接種、ま
たは該動物の臓器、組織あるいは細胞と、被験試料とを
接触させ、被験試料より、癌、あるいは視床または小脳
の機能異常症の治療薬を選択することを特徴とする、
癌、あるいは視床または小脳の機能異常症の治療薬のス
クリーニング方法。

(34) (33)に記載のスクリーニング方法で得ら
れる化合物またはその薬理的に許容される塩。

(35) (34)に記載の化合物またはその薬理的
に許容される塩を含有する、癌、あるいは視床または小 40
脳の機能異常症の治療薬。

【0010】

【発明の実施の形態】(1)本発明のG蛋白質共役型受
容体ポリペプチドまたはその部分ペプチド

本発明のポリペプチドは、G蛋白質共役型受容体ポリペ
プチドであり、例えば、配列番号1で表わされるアミノ
酸配列を有するポリペプチドまたは該ポリペプチドのア
ミノ酸配列において1個以上のアミノ酸が欠失、置換若
しくは付加されたアミノ酸配列を有するポリペプチドで
あり、かつ配列番号1で表されるアミノ酸配列を有する 50

ポリペプチドと実質的に同一な活性を有するポリペプチ
ドをあげることができる。

【0011】本発明のポリペプチドの由来は特に限定さ
れるものではなく、その由来として例えば、ヒトや哺乳
動物(例えば、モルモット、ラット、マウス、ニワト
リ、ウサギ、ブタ、ヒツジ、ウシ、サルなど)の細胞、
あるいは該細胞の存在する組織をあげることができる。

【0012】該細胞の具体例としては、脾細胞、神経細
胞、グリア細胞、膵臓細胞、骨髄細胞、メサングウム
細胞、ランゲルハンス細胞、表皮細胞、上皮細胞、内皮
細胞、繊維芽細胞、繊維細胞、筋細胞、脂肪細胞、免疫
細胞(例、マクロファージ、T細胞、B細胞、ナチュラル
キラー細胞、肥満細胞、好中球、好塩基球、好酸球、
単球)、巨核球、滑膜細胞、軟骨細胞、骨細胞、骨芽細
胞、破骨細胞、乳腺細胞、肝細胞もしくは間質細胞、ま
たはこれら細胞の前駆細胞、幹細胞もしくはガン細胞な
どをあげることができる。また該組織の具体例として
は、脳、脳の各部位(例、嗅球、扁頭核、大脳基底球、
海馬、視床、視床下部、視床下核、大脳皮質、延髄、小
脳、後頭葉、前頭葉、側頭葉、被殻、尾状核、脳梁、黒
質)、脊髄、下垂体、胃、膵臓、腎臓、肝臓、生殖腺、
甲状腺、胆のう、骨髄、副腎、皮膚、筋肉、肺、消化
管、血管、心臓、胸腺、脾臓、顎下腺、末梢血、末梢血
球、腸管、前立腺、睪丸、精巣、卵巣、胎盤、子宮、
骨、関節、小腸、大腸、骨格筋などをあげることができ
る。特に、脳や脳の各部位は組織として好ましい。

【0013】また本発明のポリペプチドは、化学合成に
よって合成されたポリペプチドであってもよい。

【0014】上記の1個以上のアミノ酸の欠失、置換若
しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ配列番号
1で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチドと実質
的に同一な活性を有するポリペプチドは、Molecular cl
oning, A laboratory manual, Second Edition.(1989)
(以下、モレキュラー・クローニング第2版と略す)、
Current Protocols in Molecular Biology, John and W
ily & Sons (1987-1997)(以下、カレント・プロトコ
ルズ・イン・モレキュラー・バイオロジーと略す)、Nu
cleic Acids Research, 10, 6487 (1982)、Proc. Natl.
Acad. Sci. USA, 79, 6409 (1982)、Gene, 34, 315 (1
985)、Nucleic Acids Research, 13, 4431 (1985)、Pro
c. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 488 (1985)等に記載の
部位特異的変異導入法によりを用いて、例えば配列番号
1で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコー
ドするDNAに部位特異的変異を導入することにより取
得することができる。欠失、置換若しくは付加されるア
ミノ酸の数は特に限定されないが、上記の部位特異的
変異法等の周知の方法により欠失、置換若しくは付加でき
る程度の数であり、1~数十個程度、好ましくは1~2
0個程度、より好ましくは1~10個さらに好ましくは
1~5個である。

【0015】また、該アミノ酸の欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有するポリペプチドが配列番号1に記載のポリペプチドと実質的に同一な活性を有するには、BLAST [J. Mol. Biol., 215, 403 (1990)、Nucleic acids Research, 25, 3389 (1997)]、FASTA [Method in Enzymology, 183, 63 (1990)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 2444 (1988)]等の解析ソフトを用いて計算したときに、配列番号1で表わされるアミノ酸配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、さらに好ましくは約90%以上の相同性を有するアミノ酸配列を有することが好ましい。

【0016】上記の実質的に同一の活性としては、例えば、配列番号1に記載のアミノ酸配列で表されるペプチドの有するリガンド結合活性、シグナル情報伝達作用などが挙げられる。実質的に同一とは、それらの活性が性質的に同一であることを示す。したがって、リガンド結合活性やシグナル情報伝達作用の程度、蛋白質の分子量などの量的要素は異なってもよい。

【0017】本発明のポリペプチドとして、さらに上記ポリペプチドにおいて、N末端のメチオニン残基のアミノ基が保護基（例えば、ホルミル基、アセチル基などのC1-6アシル基など）で保護されているもの、N端側が生体内で切断され生成したグルタミル基がピログルタミン化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基（例えば、-OH、-COOH、アミノ基、イミダゾール基、インドール基、グアニジノ基など）が適当な保護基（例えば、ホルミル基、アセチル基などのC1-6アシル基など）で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖蛋白質などの複合蛋白質なども含まれる。また、上記ポリペプチドのC末端がアミド（-CONH₂）またはエステル（-COOR）のもの本発明のポリペプチドである。ここでエステル基のRとしては、メチル、エチル、n-プロピル、イソプロピルもしくはn-ブチルなどのC1-6アルキル基、例えば、シクロペンチル、シクロヘキシルなどのC3-8シクロアルキル基、例えば、フェニル、-ナフチルなどのC6-12アリール基、例えば、ベンジル、フェネチルなどのフェニル-C1-2アルキル基もしくは-ナフチルメチルなどの-ナフチル-C1-2アルキル基などのC7-14アラルキル基のほか、経口用エステルとして汎用されるピバロイルオキシメチルエステルなどであってもよい。本発明のポリペプチドがC末端以外にカルボキシル基（またはカルボキシレート）を有している場合、カルボキシル基がアミド化またはエステル化されているものも本発明のポリペプチドに含まれる。この時のエステルとしては、例えば上記のC末端のエステルなどをあげることができる。

【0018】本発明のポリペプチドの塩としては、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。このような塩としては、例えば無機酸（例えば、塩酸、リン酸、

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

【0019】本発明の部分ペプチドとは、本発明のポリペプチドの部分ペプチドであり、かつ本発明のポリペプチドのリガンド、アゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質との結合能を有するペプチドである。GPCRのリガンド結合領域は、細胞外領域、膜貫通領域、あるいは細胞外領域と膜貫通領域の両方であることが知られている [Current Opinion of Cell Biology, 6, 191 (1994)、EMBO J., 18, 1723 (1999)]。したがって、本発明のポリペプチドのリガンド、アゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質との結合能を有する本発明の部分ペプチドとしては、例えば、該ポリペプチドを発現している細胞において、該細胞の膜の外に露出している部分（細胞外領域部分）、あるいは膜結合領域部分を含む部分ペプチドなどをあげることができる。また、本発明の部分ペプチドは、個々のドメインを個別に含むペプチドでも良いし、複数のドメインを同時に含む部分ペプチドでも良い。

【0020】任意のGPCRの膜結合領域は、既知のGPCRとのホモロジーを基に予測することができる [EMBO J., 12, 1693 (1993)]。したがって、該方法で予測した膜結合領域を基に、任意のGPCRの細胞外領域と細胞内領域を予測することができる。また、ハイドロパシー解析（アロカ社より購入した解析ソフトMacMolIy3.5を使用）や膜結合領域予測解析（三井情報開発より購入した解析ソフトSOSUI system ver1.0/10を使用）を行うことによっても、任意のGPCRの膜結合領域、細胞外領域、および細胞内領域を予測することができる。

【0021】したがって、本発明のポリペプチドに関して上記解析を行うことにより、具体的な細胞外領域（親水性部位）、膜結合領域（疎水性領域）、および細胞内領域（親水性領域）を予測することができる。

【0022】具体的には、例えば、配列番号1で表されるアミノ酸配列を有する本発明のポリペプチドにおいては、細胞外領域としては、配列番号1で表わされるアミノ酸配列の第1番目～第49番目、第107番目～第121番目、第187番目～第208番目または第298番目～第309番目のアミノ酸配列で表される領域をあげることができ、また、膜結合領域としては、配列番号1で表わされるアミノ酸配列の第50番目～第75番目、第81番目～第106番目、第122番目～第147番目、第161番目～第186番目、第209番目～第234番目、第272番目～第297番目または第310番目～第335番目のアミノ酸配列をで表される領域をあげることができる。

【0023】本発明の部分ペプチドとして、さらに上記

の部分ペプチドにおいて、N末端のメチオニン残基のアミノ基が保護基（例えば、ホルミル基、アセチル基などのC1-6アシル基など）で保護されているもの、N端側が生体内で切断され生成したグルタミル基がピログルタミン化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基（例えば、-OH、-COOH、アミノ基、イミダゾール基、インドール基、グアニジノ基など）が適当な保護基（例えば、ホルミル基、アセチル基などのC1-6アシル基など）で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖ペプチドなどの複合ペプチドなども含まれる。また、上記部分ペプチドのC末端に存在するカルボキシル基（-COOH）またはカルボキシレート（-COO⁻）が、上記した本発明のポリペプチドと同様、アミドまたはエステル化されていてもよい。また、本発明の部分ペプチドがC末端以外にカルボキシル基（またはカルボキシレート）を有している場合、カルボキシル基がアミド化またはエステル化されているものも本発明の部分ペプチドに含まれる。この時のエステルとしては、例えば上記のC末端のエステルなどがあげられる。本発明の部分ペプチドの塩としては、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。このような塩としては、例えば無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸）との塩などがあげられる。

(2) 本発明のG蛋白質共役型受容体ポリペプチドまたはその部分ペプチドをコードするDNA

本発明のポリペプチドをコードするDNAは、本発明のポリペプチドをコードするDNAであればいかなるDNAでもよく、具体例として、(a) 配列番号2に記載の塩基配列において塩基番号175~1287番で表される塩基配列を有するDNA、(b) (a)に記載のDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ配列番号1に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドと実質的に同一の活性を有するポリペプチドをコードするDNAなどをあげることができる。

【0024】上記のストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ配列番号1に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドと実質的に同一の活性を有するポリペプチドをコードするDNAとは、上記(a)に記載のDNAをプローブとして、コロニー・ハイブリダイゼーション法、ブランク・ハイブリダイゼーション法あるいはサザンブロットハイブリダイゼーション法等を用いることにより得られるDNAを意味し、具体的には、コロニーあるいはブランク由来のDNAを固定化したフィルターを用いて、0.7~1.0 mol/LのNaCl存在下、42~65℃でハイブリダイゼーションを行った後、0.1~2倍濃度のSSC (saline-sodium citrat

e) 溶液 (1倍濃度のSSC溶液の組成は、150 mmol/L 塩化ナトリウム、15 mmol/L クエン酸ナトリウムよりなる) を用い、42~65℃条件下でフィルターを洗浄することにより同定できるDNAをあげることができる。ハイブリダイゼーションは、モレキュラー・クローニング第2版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、DNA Cloning 1: Core Techniques, A Practical Approach, Second Edition, Oxford University Press (1995)等に記載されている方法に準じて行うことができる。ハイブリダイズ可能なDNAとしては、具体的にはBLAST、FASTA等の解析ソフトを用いて計算したときに、上記の(a)に記載のDNAと少なくとも60%以上の相同性を有するDNA、好ましくは80%以上の相同性を有するDNA、より好ましくは95%以上の相同性を有するDNAをあげることができる。

【0025】本発明の部分ペプチドをコードするDNAとしては、本発明の部分ペプチドをコードするDNAであればいかなるものであってもよく、具体例として(a) 配列番号2に記載の塩基配列において塩基番号175~1287番で表される塩基配列から選ばれる部分塩基配列を有するDNAであり、かつ配列番号1に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドのリガンド、アゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質との結合能を有する部分ペプチドをコードするDNA、(b) 本発明のポリペプチドをコードするDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズするDNAを表す塩基配列から選ばれる部分塩基配列を有するDNAであり、かつ配列番号1に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドのリガンド、アゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質との結合能を有するペプチドをコードするDNA、をあげることができる。

【0026】本発明の部分ペプチドをコードするDNAとは、本発明のポリペプチドのリガンド、アゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質との結合能を有する、本発明のポリペプチドの部分ペプチドをコードするDNAであり、例えば、上記(1)に記載の方法で予測した細胞外領域または膜結合領域を含む部分ペプチドをコードするDNAをあげることができる。具体的には配列番号1で表わされるアミノ酸配列の第1番目~第49番目、第107番目~第121番目、第187番目~第208番目または第298番目~第309番目のアミノ酸配列を有する部分ペプチドをコードするDNAである、配列番号2で表わされる塩基配列の第175番目~第321番目、第493番目~第537番目、第733番目~第798番目または第1066番目~第1101番目の塩基配列を有するDNAをあげることができる。また、配列番号1で表わされるアミノ酸配列の第50番目~第75番目、第81番目~第106番目、第122番目~第147番目、第161番目~第186番目、第

209番目～第234番目、第272番目～第297番目または第310番目～第335番目のアミノ酸配列を有する部分ペプチドをコードするDNAである、配列番号2で表される塩基配列の第322番目～第399番目、第415番目～第492番目、第538番目～第615番目、第655番目～第732番目、第799番目～第876番目、第988番目～第1065番目または第1102番目～第1179番目の塩基配列をあげることができる。また、本発明の部分ペプチドをコードするDNAは、個々の部分ペプチドを個別にコードするDNAであっても良いし、個々の部分ペプチドをコードするDNAを同時に複数含むDNAであっても良い。

【0027】(3)本発明のポリペプチドをコードするDNAの取得、ならびに該DNAおよびオリゴヌクレオチドの製造

本発明のポリペプチドをコードするDNAは、例えば、ヒトや哺乳動物(例えば、モルモット、ラット、マウス、ニワトリ、ウサギ、ブタ、ヒツジ、ウシ、サルなど)のあらゆる細胞(例えば、脾細胞、神経細胞、グリア細胞、膵臓細胞、骨髄細胞、メサングウム細胞、ランゲルハンス細胞、表皮細胞、上皮細胞、内皮細胞、繊維芽細胞、繊維細胞、筋細胞、脂肪細胞、免疫細胞

(例、マクロファージ、T細胞、B細胞、ナチュラルキラー細胞、肥満細胞、好中球、好塩基球、好酸球、単球)、巨核球、滑膜細胞、軟骨細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、乳腺細胞、肝細胞もしくは間質細胞、またはこれら細胞の前駆細胞、幹細胞もしくはガン細胞など)、またはそれらの細胞が存在するあらゆる組織、例えば、脳、脳の各部位(例、嗅球、扁頭核、大脳基底球、海馬、視床、視床下部、視床下核、大脳皮質、延髄、小脳、後頭葉、前頭葉、側頭葉、被殻、尾状核、脳染、黒質)、脊髄、下垂体、胃、膵臓、腎臓、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆のう、骨髄、副腎、皮膚、筋肉、肺、消化管、血管、心臓、胸腺、脾臓、顎下腺、末梢血、末梢血球、腸管、前立腺、睾丸、精巣、卵巣、胎盤、子宮、骨、関節、小腸、大腸、骨格筋など(特に、脳や脳の各部位)に由来するゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、上記の細胞や組織由来のcDNA、またはcDNAライブラリー等から選ばれる各々のゲノムDNAまたはcDNAをランダムにシーケンシングして得ることができる。

【0028】ゲノムDNAの調製、ゲノムDNAライブラリーの作製は、例えば上記各種細胞、器官または組織を用いて常法に従い行うことができる。具体的な方法としてはモレキュラー・クローニング第2版やカレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジーに記載された方法をあげることができる。

【0029】cDNAおよびcDNAライブラリーの作製は、例えば、上記各種細胞、器官または組織由来のmRNAを用いて、常法により作製できる。具体的には、

モレキュラー・クローニング第2版やカレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、DNA Cloning 1: Core Techniques, A Practical Approach, Second Edition, Oxford University Press (1995)等に記載された方法、完全長cDNA作製法[Methods in Enzymology, 303, 19 (1999)、Gene, 138, 171 (1994)]、あるいは市販のキット、例えばスーパースクリプト・プラスミド・システム・フォー・cDNA・シンセシス・アンド・プラスミド・クローニング[SuperScript Plasmid System for cDNA Synthesis and Plasmid Cloning; ギブコBRL (Gibco BRL)社製]やザップ・cDNA・シンセシス・キット[ZAP-cDNA Synthesis Kit, ストラタジーン社製]を用いて作製できる。

【0030】ライブラリーを作製するためのクローニングベクターとしては、大腸菌K12株中で自立複製できるものであれば、ファージベクター、プラスミドベクター等いずれでも使用できる。具体的には、ZAP Express [ストラタジーン社製、Strategies, 5, 58 (1992)]、pBluescript II SK(+) [Nucleic Acids Research, 17, 949 (1989)]、zap II (ストラタジーン社製)、gt10、gt11 [DNA Cloning, A Practical Approach, 1, 49 (1985)]、TriplEx (クローンテック社製)、ExCell (ファルマシア社製)、pT7 318U (ファルマシア社製)、pCD2 [Mol. Cell. Biol., 3, 280 (1983)]、pUC18 [Gene, 33, 103 (1985)]、pAMo [J. Biol. Chem., 268, 22782-22787 (1993)、別名pAMoPRC3Sc (特開平05-336963)]、pAMo-d (実施例1参照)等をあげることができる。

【0031】ライブラリーの作製に用いる宿主微生物としては、大腸菌に属する微生物であればいずれでも用いることができる。具体的には、Escherichia coli XL1-B lueMRF' [ストラタジーン社製、Strategies, 5, 81 (1992)]、Escherichia coli C600 [Genetics, 39, 440 (1954)]、Escherichia coli Y1088 [Science, 222, 778 (1983)]、Escherichia coli Y1090 [Science, 222, 778 (1983)]、Escherichia coli NM522 [J. Mol. Biol., 166, 1 (1983)]、Escherichia coli K802 [J. Mol. Biol., 16, 118 (1966)]、Escherichia coli JM105 [Gene, 38, 275 (1985)]、Escherichia coli SOLR™ Strain (ストラタジーン社より市販)およびE. coli LE392 (モレキュラー・クローニング第2版)等を用いることができる。

【0032】より具体的なcDNAライブラリーの作製方法としては以下の方法があげられる。

【0033】ヒト胃癌細胞KATOIIIから、モレキュラー・クローニング第2版記載の方法に準じてmRNAを抽出し、オリゴキャップ法[Gene, 138, 171 (1994)]によりcDNAを合成する。次に、蛋白質 核酸 酵素, 41, 197 (1996)、Gene, 138, 171 (1994)記載の方法により第一鎖cDNAを合成した後、該cDNAの5'末端

側と3'末端側に設計したプライマーを用いてpolymerase chain reaction〔モレキュラー・クローニング第2版およびPCR Protocols Academic Press(1990)、以下PCRと略す〕により2本鎖cDNAに変換する。該cDNAは制限酵素SfiIで切断し、DraIで切断したクローニングベクター pME18SFL3(GenBank AB009864, Expression vector, 3392bp)に連結することで、cDNAライブラリーを作製できる。

【0034】cDNAの塩基配列は、cDNAライブラリーを構成する各大腸菌クローンをランダムに選び、該クローンよりプラスミドDNAを調製し、該プラスミドに含有されるcDNAの両末端側の塩基配列を、通常用いられる塩基配列解析方法、例えばサンガー(Sanger)らのジデオキシ法〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5463 (1977)〕あるいは373A・DNAシークエンサー(Perkin Elmer社製)等の塩基配列分析装置を用いて決定することができる。

【0035】このようにして得られた塩基配列と相同性のある遺伝子、あるいは該塩基配列がコードするアミノ酸配列と相同性を有する蛋白質の存在をデータベース検索により調べる。検索には、Blast、FrameSearch法(CompuGen社製)等のプログラムを利用することができる。データベースとしては、GenBank等の公的なデータベースを利用することもできるし、私的なデータベースも利用できる。該検索により、塩基レベルまたはアミノ酸レベルで既知のGPCRと相同性を示したcDNAに関しては、全塩基配列を決定し、該cDNAにコードされるポリペプチドの全アミノ酸配列を明らかにする。

【0036】該cDNAが完全長のポリペプチドをコードしていない場合は、以下のようにして完全長のポリペプチドをコードするcDNAを得ることができる。

【0037】各種臓器または各種細胞から調製した一本鎖cDNAライブラリーまたは上記記載の方法で作製できるcDNAライブラリーを鋳型にして、該cDNAに特異的なプライマーセットを用いてPCRを行うことにより、該cDNAに対応する遺伝子を発現する臓器や細胞を特定し、特定された臓器あるいは細胞由来のcDNAライブラリーに対し、該cDNAをプローブにしてコロニーハイブリダイゼーション法(モレキュラー・クローニング第2版)を行うことにより新たに該cDNAの全長を含むcDNAをcDNAライブラリーから選択することができる。

【0038】また、該cDNAに対応する遺伝子が発現している臓器または細胞由来の一本鎖cDNAライブラリーまたはcDNAライブラリーを鋳型として、5' RACE法と3' RACE法〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 8998 (1988)〕を行うことにより、該cDNAの5'末端側の断片と3'末端側の断片を取得し、両断片を連結することにより、全長cDNAを取得することもできる。また、市販のキット(例えばペーリンガー社製の5'/3' RA

CE kit)を用いて、5' RACE法と3' RACE法を行うこともできる。

【0039】各種臓器または各種細胞由来の一本鎖cDNAライブラリーは、常法または市販されているキットに従って作製することができるが、例えば以下に示すような方法で作製できる。

【0040】各種臓器または各種細胞からグアニジウムチオシアネートフェノール-クロロホルム法〔Anal. Biochem., 162, 156 (1987)〕により全RNAを抽出する。必要に応じて、全RNAをデオキシリボヌクレアーゼI(Life Technologies社製)で処理し、混入の可能性がある染色体DNAを分解する。得られた全RNA各々について、オリゴ(dT)プライマーまたはランダムプライマーを用いてSUPERSCRIPTM Preamplification System for First Strand cDNA System(Life Technologies社)により一本鎖cDNAライブラリーを作製できる。上記のようにして作製した一本鎖cDNAライブラリーとしては、例えばヒト視床から作製した一本鎖cDNAライブラリーをあげることができる。

【0041】上記のようにして取得した完全長のポリペプチドをコードするcDNAの全塩基配列を決定し、該ポリペプチドのアミノ酸配列について、再度上記と同様にしてデータベース検索を行い、既知のGPCRとの相同性を調べることができる。また、該ポリペプチドのアミノ酸配列を用いて疎水性プロット解析を行い、該ポリペプチドがGPCRに共通する7回膜貫通領域を有するかを調べ、該ポリペプチドが7回膜貫通領域を有し、かつ既知のGPCRと相同性を示せば、該ポリペプチドはGPCRであると考えられることができる。該ポリペプチドが既知GPCRとは異なる場合、該ポリペプチドは新規GPCRであると考えられることができる。

【0042】また、決定された新規ポリペプチドのアミノ酸配列に基づいて、該ポリペプチドをコードするDNAを化学合成することによっても目的のDNAを調製することができる。DNAを化学合成は、チオホスファイト法を利用した島津製作所社製のDNA合成機、フォスフォアミダイト法を利用したパーキン・エルマー社製のDNA合成機 model 392等を用いて行うことができる。

【0043】後述のオリゴヌクレオチドをセンスプライマーおよびアンチセンスプライマーとして用い、これらDNAに相補的なmRNAを発現している細胞のmRNAから調製したcDNAを鋳型として、PCRを行うことによっても、目的とするDNAを調製することができる。

【0044】上記の方法により取得される新規G蛋白質共役型受容体ポリペプチドをコードするDNAとして、例えば、配列番号1で表されるポリペプチドをコードするDNA等をあげることができ、具体的には、配列番号2に記載の塩基配列において塩基番号175~1287

番で表される塩基配列を有するDNA等をあげることができる。配列番号2に記載の塩基配列において塩基番号175～1287番で表される塩基配列を有するDNAがコードするポリペプチドは、ハイドロパシー解析、膜結合領域予測解析解析方法、およびENBO J., 12, 1693

(1993)記載の方法により、以下の構造からなると予想される(図1、および図2～10参照)。N末端の細胞外領域(49アミノ酸)、第一膜貫通領域(26アミノ酸)、第一細胞内ループ(5アミノ酸)、第二膜貫通領域(26アミノ酸)、第一細胞外ループ(15アミノ酸)、第三膜貫通領域(26アミノ酸)、第二細胞内ループ(13アミノ酸)、第四膜貫通領域(26アミノ酸)、第二細胞外ループ(22アミノ酸)、第五膜貫通領域(26アミノ酸)、第三細胞内ループ(37アミノ酸)、第六膜貫通領域(26アミノ酸)、第三細胞外ループ(12アミノ酸)、第七膜貫通領域(26アミノ酸)、C末端の細胞内領域(36アミノ酸)。

【0045】アミノ酸配列のハイドロパシー解析により、該ポリペプチドはシグナルペプチドを有していないと考えられる(図1参照)。

【0046】配列番号2に記載の塩基配列を有するDNAを含むプラスミドとしては、例えば、pBS-KATO06734Lをあげることができる。pBS-KATO06734Lを保有する大腸菌 *Escherichia coli* DH5 / pBS-KATO06734LはFERMBP-6967として平成11年12月8日付けで工業技術院生命工学工業技術研究所、日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号(郵便番号305-8566)に寄託されている。

【0047】上記の方法で取得した本発明のDNAおよびDNA断片を用いて、モレキュラー・クローニング第2版等に記載の常法により、あるいは該DNAの塩基配列情報を用いてDNA合成機により、本発明のDNAの一部の配列を有するアンチセンス・オリゴヌクレオチド、センス・オリゴヌクレオチド等のオリゴヌクレオチドを調製することができる。

【0048】該オリゴヌクレオチドとしては、本発明のDNAの塩基配列中の連続した5～60塩基と同じ塩基配列を有するDNAまたは該DNAと相補的な配列を有するDNAをあげることができ、具体的には、配列番号2に記載のDNAの塩基配列中の連続した5～60塩基と同じ配列を有するDNAまたは該DNAと相補的な配列を有するDNAをあげることができる。センスプライマーおよびアンチセンスプライマーとして用いる場合には、両者の融解温度(Tm)および塩基数が極端に変わらないオリゴヌクレオチドを選択することが好ましい。具体的には、例えば配列番号11および配列番号12で表される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドのプライマーセット、配列番号11および配列番号17で表される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドのプライマーセッ

ト、または配列番号13および配列番号14で表される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドのプライマーセットをあげることができる。

【0049】更に、これらオリゴヌクレオチドの誘導体(以下、オリゴヌクレオチド誘導体という)も本発明のオリゴヌクレオチドとして利用することができる。該オリゴヌクレオチド誘導体としては、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がホスフォロチオエート結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がN3'-P5'ホスフォアミデート結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のリボースとリン酸ジエステル結合がペプチド核酸結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のウラシルがC-5プロピニルウラシルで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のウラシルがC-5チアゾールウラシルで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のシトシンがC-5プロピニルシトシンで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のシトシンがフェノキサジン修飾シトシン(phenoxazine-modified cytosine)で置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のリボースが2'-O-プロピルリボースで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、あるいはオリゴヌクレオチド中のリボースが2'-メトキシエトキシリボースで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体等をあげることができる〔細胞工学, 16, 1463 (1997)〕。

(4)本発明のポリペプチドおよび部分ペプチドの製造法

本発明のポリペプチドまたはその塩は、前述したヒトや哺乳動物の細胞または組織から公知の蛋白質の精製方法によって製造することもできるし、後述する本発明のポリペプチドをコードするDNAを含有する形質転換体を用いても製造することができる。また、後述のペプチド合成法に準じて製造することもできる。ヒトや哺乳動物の組織または細胞から製造する場合、例えばヒトや哺乳動物の組織または細胞をホモジナイズした後、酸などで抽出を行ない、該抽出液を逆相クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーなどのクロマトグラフィーを組み合わせるにより単離・精製することができる。

【0050】本発明の部分ペプチドまたはその塩は、公知のペプチドの合成法に従って合成することもできるし、あるいは本発明のG蛋白質共役型受容体ポリペプチドを適当なペプチダーゼで切断することによっても製造することができる。ペプチドの合成法としては、例えば、固相合成法、液相合成法のいずれによっても良い。すなわち、本発明の部分ペプチドを構成し得る部分ペプチドもしくはアミノ酸と残余部分とを縮合させ、生成物が保護基を有する場合は保護基を脱離することにより目

的のペプチドを製造することができる。公知の縮合方法や保護基の脱離としては、例えば、以下の(a)~(e)に記載された方法が挙げられる。

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

(b) SchroederおよびLuebke、ザ ペプチド(The Peptide), Academic Press, New York (1965年)

(c) 泉屋信夫他、ペプチド合成の基礎と実験、丸善(株) (1975年)

(d) 矢島治明 および榊原俊平、生化学実験講座 1、タンパク質の化学IV、205、(1977年)

(e) 矢島治明監修、続医薬品の開発 第14巻 ペプチド合成 広川書店

また、反応後は通常の前製法、例えば、溶媒抽出・蒸留・カラムクロマトグラフィー・液体クロマトグラフィー・再結晶などを組み合わせて本発明の部分ペプチドを精製単離することができる。上記方法で得られる部分ペプチドが遊離体である場合は、公知の方法によって適当な塩に変換することができるし、逆に塩で得られた場合は、公知の方法によって遊離体に変換することができる。

【0051】また上記方法以外にも上記(3)で得られた本発明のDNAを宿主細胞中で発現させることにより、本発明のポリペプチドまたは部分ペプチドを製造することができる。

【0052】即ち、本発明のDNAを適当な発現ベクターのプロモーター下流に挿入した組換え体DNAを造成し、該組換え体DNAを宿主細胞に導入することにより、本発明のポリペプチドまたは部分ペプチドを発現する形質転換体を取得し、該形質転換体を培養することにより、本発明のポリペプチドまたは部分ペプチドを製造することができる。

【0053】宿主細胞としては、原核細胞、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞等、目的とする遺伝子を発現できるものであればいずれも用いることができる。また、動物個体や植物個体を用いることもできる。

【0054】発現ベクターとしては、上記宿主細胞において自立複製が可能、または染色体中への組込みが可能で、本発明のDNAの転写に適した位置にプロモーターを含有しているものを用いることができる。

【0055】細菌等の原核生物を宿主細胞として用いる場合、本発明のDNAの発現ベクターは、原核生物中で自立複製可能であると同時に、プロモーター、リボソーム結合配列、新規受容体遺伝子、転写終結配列、より構成されていることが好ましい。プロモーターを制御する遺伝子が含まれていてもよい。

【0056】発現ベクターとしては、例えば、pBTrp2、pBTac1、pBTac2 (いずれもベリンガーマンハイム社より市販)、pSE280 (インピト

ロジェン社製)、pGEMEX-1 (Promega社製)、pQE-8 (QIAGEN社製)、pKYP10 (特開昭58-110600)、pKYP200 [Agric. Biol. Chem., 48, 669 (1984)]、pLSA1 [Agric. Biol. Chem., 53, 277 (1989)]、pGEL1 [Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 82, 4306 (1985)]、pBluescript II SK(-) (STRATAGENE社)、pTrs30 (FERM BP-5407)、pTrs32 (FERM BP-5408)、pGHA2 (FERM BP-400)、pGKA2 (FERM B-6798)、pTerm2 (特開平3-22979、US4686191、US4939094、US5160735)、pKK233-2 (Pharmacia社製)、pGEX (Pharmacia社製)、pETシステム (Novagen社製)、pSupex、pUB110、pTP5、pC194、pTrxFus (Invitrogen社)、pMAL-c2 (New England Biolabs社)等をあげることができる。

【0057】プロモーターとしては、大腸菌等の宿主細胞中で発現できるものであればいかなるものでもよい。例えば、trpプロモーター (Ptrp)、lacプロモーター (Plac)、P_Lプロモーター、P_Rプロモーター等の、大腸菌やファージ等に由来するプロモーター、SPO1プロモーター、SPO2プロモーター、penPプロモーター等をあげることができる。またPtrpを2つ直列させたプロモーター (Ptrp_{x2})、tacプロモーター、lacT7プロモーター、letIプロモーターのように人為的に設計改変されたプロモーター等も用いることができる。

【0058】リボソーム結合配列としては、シャイン・ダルガノ (Shine-Dalgarno) 配列と開始コドンとの間に適当な距離 (例えば6~18塩基) に調節したプラスミドを用いることが好ましい。

【0059】本発明のDNAの発現には転写終結配列は必ずしも必要ではないが、好適には構造遺伝子直下に転写終結配列を配置することが望ましい。

【0060】宿主細胞としては、エシェリヒア属、セラチア属、バチルス属、プレビバクテリウム属、コリネバクテリウム属、ミクロバクテリウム属、シュードモナス属等に属する微生物、例えば、Escherichia coli XL1-Blue、Escherichia coli XL2-Blue、Escherichia coli DH1、Escherichia coli MC1000、Escherichia coli KY3276、Escherichia coli W1485、Escherichia coli JM109、Escherichia coli HB101、Escherichia coli No.49、Escherichia coli W3110、Escherichia coli NY49、Escherichia coli BL21(DE3)、Escherichia coli BL21(DE3)pLysS、Escherichia coli HMS174(DE3)、Escherichia coli HMS174(DE3)pLysS、Serratia ficaria、Serratia fonticola、Serratia liquefaciens、Serratia marcescens、Bacillus subtilis、Bacillus amyloliquefaciens、Corynebacterium ammoniagenes、Brevibacterium

immariophilum ATCC14068、Brevibacterium saccharol
yticum ATCC14066、Corynebacterium glutamicum ATCC13
032、Corynebacterium glutamicum ATCC14067、Coryneb
acterium glutamicum ATCC13869、Corynebacterium ace
toacidophilum ATCC13870、Microbacterium ammoniaphi
lum ATCC15354、Pseudomonas sp. D-0110等をあげるこ
とができる。

【0061】組換えベクターの導入方法としては、上記
宿主細胞へDNAを導入する方法であればいずれも用い
ることができ、例えば、エレクトロポレーション法〔Nu
cleic Acids Res., 16, 6127 (1988)〕、カルシウムイ
オンを用いる方法〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69,
2110 (1972)〕、プロトプラスト法 (特開昭63-24839
4)、Gene, 17, 107 (1982)やMolecular & General Gen
etics, 168, 111 (1979)に記載の方法等をあげることが
できる。

【0062】酵母菌株を宿主細胞として用いる場合に
は、発現ベクターとして、例えば、YEp13 (ATCC37
115)、YEp24 (ATCC37051)、YEp50 (ATCC37
419)、pHS19、pHS15等を例示することができ、
プロモーターとしては、酵母菌株中で発現できる
ものであればいかなるものでもよく、例えば、PHO5
プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモータ
ー、ADHプロモーター、gal1プロモーター、gal10
プロモーター、ヒートショック蛋白質プロモ
ーター、MF1プロモーター、CUP1プロモータ
ー等のプロモーターをあげることができる。

【0063】宿主細胞としては、サッカロマイセス属、
シゾサッカロマイセス属、クルイベロミセス属、トリコ
スポン属、シワニオミセス属等に属する酵母菌株をあ
げることができ、具体的には、Saccharomyces cerevisi
ae、Schizosaccharomyces pombe、Kluyveromyces lacti
s、Trichosporon pullulans、Schwanniomycetes alluvius
等をあげることができる。またGPCRの発現に適した
変異株を用いることもできる〔Trends in Biotechnolog
y, 15, 487 (1997)、Mol. Cell. Biol., 15, 6188 (199
5)、Mol. Cell. Biol., 16, 4700 (1996)〕。

【0064】組換えベクターの導入方法としては、酵母
にDNAを導入する方法であればいずれも用いることが
でき、例えば、エレクトロポレーション法〔Methods. i
n Enzymol., 194, 182 (1990)〕、スフェロプラスト法
〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 1929 (1978)〕、
酢酸リチウム法〔J. Bacteriol., 153, 163 (1983)〕、
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 1929 (1978)記載の
方法等をあげることができる。

【0065】動物細胞を宿主細胞として用いる場合に
は、発現ベクターとして、例えば、pcDNA1/Am
p、pcDNA1、pCDM8、pAGE107、pREP4、pAGE103、
pAMO、pAMO A、pAMO-d (実施例1参照)、pAS3-3等を例示する

ことができる。

【0066】プロモーターとしては、動物細胞中で発現
できるものであればいずれも用いることができ、例え
ば、サイトメガロウイルス(ヒトCMV)のIE (imme
diate early) 遺伝子のプロモーター、SV40の初期プ
ロモーター、モロニー・ミュリン・ロイケミア・ウイル
ス (Moloney Murine Leukemia Virus) のロング・ター
ミナル・リピート・プロモーター (Long Terminal Repe
at Promoter)、レトロウイルスのプロモーター、ヒート
ショックプロモーター、SRプロモーター、あるいはメ
タロチオネインのプロモーター等をあげることができ
る。また、ヒトCMVのIE遺伝子のエンハンサーを
プロモーターと共に用いてもよい。

【0067】宿主細胞としては、マウス・ミエローマ細
胞、ラット・ミエローマ細胞、マウス・ハイブリドーマ
細胞、CHO細胞、BHK細胞、アフリカミドリザル腎臓細
胞、Namalwa細胞、Namalwa KJM-1細胞、ヒト胎児腎臓細
胞、ヒト白血病細胞、HBT5637 (特開昭63-299)、ヒト
大腸癌細胞株、カエルの卵母細胞およびカエルのメラニ
ン細胞等をあげることができる。

【0068】さらにマウス・ミエローマ細胞としては、
SP2/0、NS0等、ラット・ミエローマ細胞としてはYB2/0
等、ヒト胎児腎臓細胞としてはHEK293等、ヒト白血病細
胞としてはBALL-1等、アフリカミドリザル腎臓細胞とし
てはCOS-1、COS-7、ヒト大腸癌細胞株としてはHCT-15等
をあげることができる。

【0069】組換えベクターの導入方法としては、動物
細胞にDNAを導入する方法であればいずれも用いるこ
とができ、例えば、エレクトロポレーション法〔Cytote
chnology, 3, 133 (1990)〕、リン酸カルシウム法 (特
開平2-227075)、リポフェクション法〔Proc. Natl. Ac
ad. Sci. USA, 84, 7413 (1987)〕、Virology, 52, 456
(1973)に記載の方法等をあげることができる。形質転
換体の取得および培養は、特開平2-227075号公
報あるいは特開平2-257891号公報に記載されて
いる方法に準じて行なうことができる。

【0070】昆虫細胞を宿主として用いる場合には、例
えば、バキュロウイルス・イクスプレッション・ベクタ
ーズ ア・ラボラトリー・マニュアル〔Baculovirus Exp
ression Vectors, A Laboratory Manual, W. H. Freema
n and Company, New York (1992)〕、モレキュラー・バ
イオロジー ア・ラボラトリー・マニュアル (Molecular
Biology, A Laboratory Manual)、カレント・プロト
コールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、Bio/T
echnology, 6, 47 (1988)等に記載された方法によっ
て、ポリペプチドを発現することができる。

【0071】即ち、組換え遺伝子導入ベクターおよびバ
キュロウイルスを昆虫細胞に共導入して昆虫細胞培養上
清中に組換えウイルスを得た後、さらに組換えウイルス
を昆虫細胞に感染させ、ポリペプチドを発現させること

ができる。

【0072】該方法において用いられる遺伝子導入ベクターとしては、例えば、pVL1392、pVL1393、pBlueBac11 (すべてインビトロジェン社製)等をあげることができる。

【0073】バキュロウイルスとしては、例えば、夜盗蛾科昆虫に感染するウイルスであるアウトグラフィ・カリフォルニカ・ヌクレアー・ポリヘドロシス・ウイルス (Autographa californica nuclear polyhedrosis virus) 等を用いることができる。

【0074】昆虫細胞としては、*Spodoptera frugiperda*の卵巣細胞、*Trichoplusia ni*の卵巣細胞、カイコ卵巣由来の培養細胞等を用いることができる。*Spodoptera frugiperda*の卵巣細胞としてはSf9、Sf21 (バキュロウイルス・イクスプレッション・ベクターズ ア・ラボラトリー・マニュアル)等、*Trichoplusia ni*の卵巣細胞としてはHigh 5、BTI-TN-5B1-4 (インビトロジェン社製)等、カイコ卵巣由来の培養細胞としては*Bombyx mori* N4等をあげることができる。

【0075】組換えウイルスを調製するための、昆虫細胞への上記組換え遺伝子導入ベクターと上記バキュロウイルスの共導入方法としては、例えば、リン酸カルシウム法 (特開平2-227075)、リポフェクション法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413 (1987)]等をあげることができる。

【0076】また、動物細胞にDNAを導入する方法と同様の方法を用いて、昆虫細胞にDNAを導入することもでき、例えば、エレクトロポレーション法 [Cytotechnology, 3, 133 (1990)]、リン酸カルシウム法 (特開平2-227075)、リポフェクション法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413 (1987)]等をあげることができる。

【0077】植物細胞または植物個体を宿主として用いる場合には、公知の方法 [組織培養, 20 (1994)、組織培養, 21 (1995)、Trends in Biotechnology, 15, 45 (1997)] に準じてポリペプチドを生産することができる。

【0078】遺伝子発現に用いるプロモーターとしては、植物細胞中で発現できるものであればいずれも用いることができ、例えば、カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) の35Sプロモーター、イネアクチン1プロモーター等をあげることができる。また、プロモーターと発現させる遺伝子の間に、トウモロコシのアルコール脱水素酵素遺伝子のイントロン1等を挿入することにより、遺伝子の発現効率をあげることもできる。

【0079】宿主細胞としては、ジャガイモ、タバコ、トウモロコシ、イネ、アブラナ、大豆、トマト、小麦、大麦、ライ麦、アルファルファ、亜麻等の植物細胞等をあげることができる。

【0080】組換えベクターの導入方法としては、植物細胞にDNAを導入する方法であればいずれも用いるこ

とができ、例えば、アグロバクテリウム (*Agrobacterium*) (特開昭59-140885、特開昭60-70080、W094/00977)、エレクトロポレーション法 [Cytotechnology, 3, 133 (1990)、特開昭60-251887]、パーティクルガン (遺伝子銃) を用いる方法 (特許第2606856、特許第2517813) 等をあげることができる。

【0081】遺伝子を導入した植物の細胞や器官は、ジャーファメンターを用いて大量培養することができる。また、遺伝子導入した植物細胞を再分化させることにより、遺伝子が導入された植物個体 (トランスジェニック植物) を造成することもできる。

【0082】動物個体を用いて本発明のポリペプチドを生産することもできる。例えば、公知の方法 [American Journal of Clinical Nutrition, 63, 639S (1996)、American Journal of Clinical Nutrition, 63, 627S (1996)、Bio/Technology, 9, 830 (1991)] に準じて、遺伝子を導入した動物中に本発明のポリペプチドを生産することができる。

【0083】プロモーターとしては、動物で発現できるものであればいずれも用いることができるが、例えば、乳腺細胞特異的なプロモーターである カゼインプロモーター、カゼインプロモーター、ラクトグロブリンプロモーター、ホエー酸性プロテインプロモーター等が好適に用いられる。

【0084】本発明のポリペプチドまたは部分ペプチドをコードするDNAを組み込んだ組換え体DNAを保有する微生物、動物細胞、あるいは植物細胞由来の形質転換体を、通常の培養方法に従って培養し、該ポリペプチドを生成蓄積させ、該培養物より該ポリペプチドを採取することにより、該ポリペプチドを製造することができる。

【0085】形質転換体が動物個体または植物個体の場合は、通常の方法に従って、飼育または栽培し、該ポリペプチドを生成・蓄積させ、該動物個体または植物個体より該ポリペプチドを採取することにより、該ポリペプチドを製造することができる。

【0086】即ち、動物個体の場合、例えば、本発明のDNAを保有する非ヒトトランスジェニック動物を飼育し、該組換え体DNAのコードする本発明のポリペプチドまたは部分ペプチドを該動物中に生成・蓄積させ、該動物中より該ポリペプチドまたは部分ペプチドを採取することにより、本発明のポリペプチドまたは部分ペプチドを製造することができる。該動物中の生成・蓄積場所としては、例えば、各種細胞の細胞膜画分、該動物のミルク、卵等をあげることができる。

【0087】植物個体の場合、例えば、本発明のDNAを保有するトランスジェニック植物を栽培し、該組換え体DNAのコードする本発明のポリペプチドまたは部分ペプチドを該植物中に生成・蓄積させ、該植物中より該ポリペプチドまたは部分ペプチドを採取することによ

り、本発明のポリペプチドまたは部分ペプチドを製造することができる。

【0088】本発明のポリペプチドまたは部分ペプチドの製造用形質転換体が大腸菌等の原核生物、酵母菌等の真核生物である場合、これら生物を培養する培地は、該生物が資化し得る炭素源、窒素源、無機塩類等を含有し、形質転換体の培養を効率的に行える培地であれば天然培地、合成培地のいずれでもよい。

【0089】炭素源としては、該形質転換体が資化し得るものであればよく、グルコース、フラクトース、スクロース、これらを含む糖蜜、デンプンあるいはデンプン加水分解物等の炭水化物、酢酸、プロピオン酸等の有機酸、エタノール、プロパノール等のアルコール類が用いられる。

【0090】窒素源としては、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等の各種無機酸や有機酸のアンモニウム塩、その他含窒素化合物、並びに、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーンステープリカー、カゼイン加水分解物、大豆粕および大豆粕加水分解物、各種発酵菌体およびその消化物等が用いられることができる。

【0091】無機塩としては、リン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸銅、炭酸カルシウム等を用いることができる。

【0092】培養は、振盪培養または深部通気攪拌培養等の好氣的条件下で行う。培養温度は15～40℃がよく、培養時間は、通常16～96時間である。培養中pHは、3.0～9.0に保持する。pHの調整は、無機あるいは有機の酸、アルカリ溶液、尿素、炭酸カルシウム、アンモニア等を用いて行う。

【0093】また培養中に必要に応じて、アンピシリンやテトラサイクリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

【0094】プロモーターとして誘導性のプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときには、必要に応じてインデューサーを培地に添加してもよい。例えば、*lac*プロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときにはイソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド(IPTG)等を、*trp*プロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときにはインドールアクリル酸(IAA)等を培地に添加してもよい。

【0095】本発明のポリペプチドまたは部分ペプチドの製造用形質転換体が動物細胞である場合、該細胞を培養する培地は、一般に使用されているRPMI 1640培地〔The Journal of the American Medical Association, 199, 519 (1967)〕、EagleのMEM培地〔Science, 122, 501 (1952)〕、DMEEM培地〔Virology, 8, 396 (1959)〕、199培地〔Proceeding of the Soc

iety for the Biological Medicine, 73, 1 (1950)〕またはこれら培地に牛胎児血清等を添加した培地等を用いることができる。

【0096】培養は、通常pH6～8、30～40℃、5%CO₂存在下等の条件下で1～7日間行う。

【0097】また培養中に必要に応じて、カナマイシン、ペニシリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

【0098】昆虫細胞を宿主細胞として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているTNM-FH培地(Pharmingen社製)、Sf-900 II SFM培地(ギブコBRL社製)、ExCell 400、ExCell 405(JRH Biosciences社製)、Grace's Insect Medium〔Nature, 195, 788 (1962)〕等を用いることができる。

【0099】培養条件はpH6～7、培養温度は25～30℃、培養時間は通常1～5日間が好ましい。また、培養中に必要に応じて、ゲンタマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

【0100】本発明のポリペプチドまたは部分ペプチドは、直接発現させる以外に、モレキュラー・クローニング第2版に記載されている方法等に準じて、分泌タンパク質または融合タンパク質として発現させることもできる。融合させるタンパク質としては、 α -ガラクトシダーゼ、プロテインA、プロテインAのIgG結合領域、クロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼ、ポリ(Arg)、ポリ(Glu)、プロテインG、マルトース結合タンパク質、グルタチオンS-トランスフェラーゼ、ポリヒスチジン鎖(His-tag)、Sペプチド、DNA結合タンパク質ドメイン、Tac抗原、チオレドキシニン、グリーン・フルオロセセント・プロテイン、FLAGペプチド、および任意の抗体のエピトープなどがあげられる〔山川彰夫, 実験医学, 13, 469-474 (1995)〕。

【0101】本発明のポリペプチドまたは部分ペプチドの生産方法としては、宿主細胞内に生産させる方法、宿主細胞外に分泌させる方法、あるいは宿主細胞膜上に生産させる方法があり、使用する宿主細胞や、生産させるポリペプチドの構造を変えることにより、該方法を選択することができる。

【0102】宿主細胞外へ分泌発現させる場合、あるいは宿主細胞膜上に発現させる場合は、必要に応じて宿主に合ったシグナル配列を、本発明のポリペプチドまたは部分ペプチドのN末端側に付加する。該ポリペプチドまたは部分ペプチドのN末端を一部欠失させた上で、上記分泌シグナルを付加した方がよい場合もある。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、アルカリフォスファターゼ・シグナル配列、OmpA・シグナル配列などが、宿主がバチルス属菌である場合は、 α -アミラーゼ・シグナル配列、サブチリシン・シグナル配列などが、宿主が酵母である場合は、メイティングファクター・シグナル

配列、インペルターゼ・シグナル配列など、宿主が動物細胞である場合には、インシュリン・シグナル配列、
- インターフェロン・シグナル配列、抗体分子・シグナル配列などがそれぞれ利用できる。

【0103】本発明のポリペプチドまたは部分ペプチドに、精製または検出用のタグを付加して発現することができる。タグは任意の場所に付加することができるが、哺乳動物細胞で発現させる場合、上述した細胞外領域または細胞内領域に付加するのが好ましい。

【0104】精製・検出用のタグとしては、
10 - ガラク トシダーゼ、プロテインA、プロテインAのIgG結合領域、クロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼ、ポリ(Arg)、ポリ(Glu)、プロテインG、マルトース結合タンパク質、グルタチオンS-トランスフェラーゼ、ポリヒスチジン鎖(His-tag)、Sペプチド、DNA結合タンパク質ドメイン、Tac抗原、チオレドキシン、グリーン・フルオレッセント・プロテイン、FLAGペプチド、および任意の抗体のエピトープなどがあげられる〔山川彰夫、実験医学、13、469-474 (1995)〕。

【0105】また、特開平2-227075に記載されている方法に準じて、ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子等を用いた遺伝子増幅系を利用して生産量を上昇させることもできる。

【0106】本発明のポリペプチドまたは部分ペプチドの製造用形質転換体の培養物から、本発明のポリペプチドを単離・精製するには、通常のポリペプチドの単離・精製法を用いることができる。

【0107】例えば、本発明のポリペプチドまたは部分ペプチドが本発明のポリペプチドまたは部分ペプチド製
30 造用の形質転換体の細胞内に溶解状態で蓄積する場合には、培養物を遠心分離することにより、培養物中の細胞を集め、該細胞を洗浄した後に、超音波破碎機、フレンチプレス、マントンガウリンホモゲナイザー、ダイノミル等により細胞を破碎し、無細胞抽出液を得る。

【0108】該無細胞抽出液を遠心分離することにより得られた上清から、溶媒抽出法、硫酸等による塩析法脱塩法、有機溶媒による沈殿法、ジエチルアミノエチル
40 (DEAE)-セファロース、DIAION HPA-75 (三菱化成社製)等レジンを用いた陰イオン交換クロマトグラフィー法、S-Sepharose FF (ファルマシア社製)等のレジンを用いた陽イオン交換クロマトグラフィー法、ブチルセファロース、フェニルセファロース等のレジンを用いた疎水性クロマトグラフィー法、分子篩を用いたゲルろ過法、アフィニティークロマトグラフィー法、クロマトフォーカシング法、等電点電気泳動等の電気泳動法等の手法を用い、精製標品を得ることができる。

【0109】本発明のポリペプチドまたは部分ペプチドが本発明のポリペプチドまたは部分ペプチドの製造用の形質転換体の細胞膜上に蓄積する場合には、同様に細胞
50

を回収後破碎し、遠心分離やろ過により膜画分を得たのち、トリトンX-100などの界面活性剤を用いて該ポリペプチドまたは該部分ペプチドを膜から可溶化した後、上記と同様の単離・精製法により精製標品を得ることができる。

【0110】また、該ポリペプチドまたは該部分ペプチドが細胞内に不溶体を形成して発現した場合は、同様に細胞を回収後破碎し、遠心分離を行うことにより得られた沈殿画分より、通常の方法により該ポリペプチドまたは該ペプチドを回収後、該ポリペプチドまたは該部分ペプチドの不溶体を変性剤で可溶化する。該可溶化液を、変性剤を含まないあるいは変性剤の濃度がポリペプチドまたは該部分ペプチドが変性しない程度に希薄な溶液に希釈、あるいは透析し、該ポリペプチドまたは該部分ペプチドを正常な立体構造に構成させた後、上記と同様の単離・精製法により精製標品を得ることができる。

【0111】細胞外に該ポリペプチドまたは該部分ペプチドが分泌される場合には、該培養物を遠心分離等の手法により処理し、可溶性画分を取得する。該可溶性画分
20 から、上記無細胞抽出液上清からの単離・精製法と同様の手法により、該ポリペプチドまたは該部分ペプチドの精製標品を得ることができる。

【0112】また、本発明のポリペプチドまたは該部分ペプチドを他のタンパク質との融合タンパク質として生産し、融合したタンパク質に親和性をもつ物質を用いたアフィニティークロマトグラフィーを利用して精製することもできる〔山川彰夫、実験医学、13、469-474 (1995)〕。例えば、ロウらの方法〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 8227 (1989)、Genes Develop., 4, 1288 (1990)〕、特開平05-336963、W094/23201に記載の方法に準じて、本発明のポリペプチドまたは部分ペプチドをプロテインAとの融合タンパク質として生産し、イムノグロブリンGを用いるアフィニティークロマトグラフィーにより精製することができる。また、本発明のポリペプチドまたは部分ペプチドをFLAGペプチドとの融合タンパク質として生産し、抗FLAG抗体を用いるアフィニティークロマトグラフィーにより精製することができる〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 8227 (1989)、Genes Develop., 4, 1288 (1990)〕。

【0113】更に、本発明のポリペプチドまたは部分ペプチド自身に対する抗体を用いたアフィニティークロマトグラフィーで精製することもできる。

【0114】また、公知の方法〔J. Biomolecular NMR, 6, 129, Science, 242, 1162 (1988)、J. Biochem., 110, 166 (1991)〕に準じて、in vitro転写・翻訳系を用いて本発明のポリペプチドまたは部分ペプチドを生産することもできる。

【0115】更に、本発明のポリペプチドまたは部分ペプチドは、Fmoc法(フルオレニルメチルオキシカルボニル法)、tBoc法(t-ブチルオキシカルボニル

法)等の化学合成法によっても製造することができる。また、Advanced ChemTech社、パーキン・エルマー社、ファルマシアバイオテック社、Protein Technology Instrument社、Synthecell-Vega社、PerSeptive社、島津製作所等のペプチド合成機を利用し化学合成することもできる。

【0116】精製した本発明のポリペプチドの構造解析は、蛋白質化学で通常用いられる方法、例えば遺伝子クローニングのためのタンパク質構造解析(平野久著、東京化学同人発行、1993年)に記載の方法により実施可能である。

【0117】上記の方法で得られる本発明のポリペプチドまたは部分ペプチドが遊離体で得られた場合には、公知の方法あるいはそれに準じる方法によって塩に変換することができる。逆に塩で得られた場合には公知の方法あるいはそれに準じる方法により、遊離体または他の塩に変換することができる。なお、本発明のポリペプチドまたは部分ペプチドを、適当な蛋白修飾酵素を作用させることにより、任意に修飾を加えたり、ポリペプチドを部分的に除去することもできる。蛋白修飾酵素としては、

例えば、トリプシン、キモトリプシン、アルギニルエンドペプチダーゼ、プロテインキナーゼ、グリコシダーゼなどが用いられる。

【0118】上記方法で製造できる本発明のポリペプチドまたは部分ペプチド、若しくはそれらの塩の活性は、

標識したリガンドとの結合実験および特異抗体を用いた

エンザイムイムノアッセイなどにより測定することができる。

(5) 本発明のポリペプチドを認識する抗体

(5-1) 本発明のポリペプチドを認識する抗体の生産

(1) ポリクローナル抗体の作製

上記(4)に記載の方法により取得したポリペプチドまたは部分ペプチドを抗原として用い、動物に投与することによりポリクローナル抗体を作製することができる。

【0119】該抗原を投与する動物としては、ウサギ、ヤギ、3~20週令のラット、マウス、ハムスター等をあげることができる。該抗原の投与量は動物1匹当たり50~100 μ gが好ましい。抗原としてペプチドを用いる場合は、ペプチドをスカシガイヘモシアニン(keyhole limpet haemocyanin)や牛チログロブリンなどのキャリア蛋白に共有結合させたものを用いることができる。抗原とするペプチドは、ペプチド合成機によっても合成することができる。

【0120】該抗原の投与は、1回目の投与の後1~2週間おきに3~10回行う。各投与後、3~7日目に眼底静脈叢より採血し、該血清が免疫に用いた抗原と反応することを酵素免疫測定法〔酵素免疫測定法(ELISA法):医学書院刊1976年、Antibodies-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)]等で確認する。

【0121】免疫に用いた抗原に対し、その血清が十分な抗体価を示した上記動物より血清を取得し、該血清を分離、精製することによりポリクローナル抗体を取得することができる。

【0122】分離、精製する方法としては、遠心分離、40~50%飽和硫酸アンモニウムによる塩析、カプリル酸沈殿〔Antibodies, A Laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory, (1988)〕、またはDEAE-セファロースカラム、陰イオン交換カラム、プロテインAまたはG-カラムあるいはゲル濾過カラム等を用いるクロマトグラフィー等を、単独または組み合わせて処理する方法があげられる。

(II) モノクローナル抗体の作製

(a) 抗体産性細胞の調製

免疫に用いた本発明のポリペプチドの部分ペプチドに対し、その血清が十分な抗体価を示した上記動物を抗体産生細胞の供給源として供することができる。

【0123】該抗体価を示した上記動物に抗原物質を最終投与した後3~7日目に、脾臓を摘出する。該脾臓をMEM培地(日水製薬社製)中で細断し、ピンセットでほぐし、1,200rpmで5分間遠心分離した後、上清を捨てる。得られた沈殿画分の脾細胞をトリス-塩化アンモニウム緩衝液(pH7.65)で1~2分間処理し赤血球を除去した後、MEM培地で3回洗浄し、得られた脾細胞を抗体産生細胞として用いる。

(b) 骨髄腫細胞の調製

骨髄腫細胞としては、マウスまたはラットから取得した株化細胞を使用する。

【0124】例えば、8-アザグアニン耐性マウス(BALB/c由来)骨髄腫細胞株P3-X63Ag8-U1(以下、P3-U1と略す)〔Curr. Topics. Microbiol. Immunol., 81, 1 (1978)、Europ. J. Immunol., 6, 511 (1976)〕、SP2/0-Ag14(SP-2)〔Nature, 276, 269 (1978)〕、P3-X63-Ag8653(653)〔J. Immunol., 123, 1548 (1979)〕、P3-X63-Ag8(X63)〔Nature, 256, 495 (1975)〕等を用いることができる。

【0125】これらの細胞株は、8-アザグアニン培地〔RPMI-1640培地にグルタミン(1.5mmol/L)、2-メルカプトエタノール(5 \times 10⁻⁵mmol/L)、ジエンタマイシン(10 μ g/ml)および牛胎児血清(FCS)(CSL社製、10%)を加えた培地(以下、正常培地という)に、さらに8-アザグアニン(15 μ g/ml)を加えた培地〕で継代するが、細胞融合の3~4日前に正常培地で培養し、融合には該細胞を2 \times 10⁷個以上用いる。

(c) ハイブリドーマの作製

(a)で取得した抗体産生細胞と(b)で取得した骨髄腫細胞をMEM培地またはPBS(リン酸二ナトリウム1.83g、リン酸一カリウム0.21g、食塩7.65g、蒸留水1リットル、pH7.2)でよく洗浄し、

細胞数が、抗体産生細胞：骨髄腫細胞 = 5 ~ 10 : 1 になるよう混合し、1,200rpmで5分間遠心分離した後、上清を捨てる。

【0126】得られた沈澱画分の細胞群をよくほぐし、該細胞群に、攪拌しながら、37℃で、 10^6 抗体産生細胞あたり、ポリエチレングライコール-1000 (PEG-1000) 2g、MEM 2mlおよびジメチルスルホキシド (DMSO) 0.7mlを混合した溶液を0.2~1ml添加し、更に1~2分間毎にMEM培地1~2mlを数回添加する。添加後、MEM培地を加えて全量が50mlになるように調製する。

【0127】該調製液を900rpmで5分間遠心分離後、上清を捨てる。得られた沈澱画分の細胞を、ゆるやかにほぐした後、メスピペットによる吸込み、吹出しでゆるやかにHAT培地〔正常培地にヒポキサンチン (10^{-4} mmol/L)、チミジン (1.5×10^{-5} mmol/L) およびアミノプテリン (4×10^{-7} M) を加えた培地〕100ml中に懸濁する。

【0128】該懸濁液を96穴培養用プレートに100 μ l/穴ずつ分注し、5% CO₂インキュベーター中、37℃で7~14日間培養する。培養後、培養上清の一部をとりアンチボディズ〔Antibodies, A Laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Chapter 14 (1988)〕等に記載されている酵素免疫測定法により、本発明のポリペプチドの部分ペプチドに特異的に反応するハイブリドーマを選択する。

【0129】酵素免疫測定法の具体的例として、以下の方法をあげることができる

免疫の際、抗原に用いた本発明のポリペプチドの部分ペプチドを適当なプレートにコートし、ハイブリドーマ培養上清もしくは後述の(d)で得られる精製抗体を第一抗体として反応させ、さらに第二抗体としてビオチン、酵素、化学発光物質あるいは放射線化合物等で標識したラットまたは抗マウスイムノグロブリン抗体を反応させた後に標識物質に応じた反応を行ない、本発明のポリペプチドに特異的に反応するものを本発明のポリペプチドに対するモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマとして選択する。

【0130】該ハイブリドーマを用いて、限界希釈法によりクローニングを2回繰り返す〔1回目は、HT培地 (HAT培地からアミノプテリンを除いた培地)、2回目は、正常培地を使用する〕、安定して強い抗体価の認められたものを本発明のポリペプチドの抗ポリペプチド抗体産生ハイブリドーマ株として選択する。

(d)モノクローナル抗体の調製

プリスタン処理〔2,6,10,14-テトラメチルペンタデカン (Pristan) 0.5mlを腹腔内投与し、2週間飼育する〕した8~10週令のマウスまたはヌードマウスに、(c)で取得した本発明のポリペプチドモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ細胞5~20

$\times 10^6$ 細胞/匹を腹腔内に注射する。10~21日間でハイブリドーマは腹水癌化する。

【0131】該腹水癌化したマウスから腹水を採取し、3,000rpmで5分間遠心分離して固形分を除去する。得られた上清より、ポリクローナルで用いた方法と同様の方法でモノクローナル抗体を精製、取得することができる。

【0132】抗体のサブクラスの決定は、マウスモノクローナル抗体タイピングキットまたはラットモノクローナル抗体タイピングキットを用いて行う。蛋白質量は、ローリー法あるいは280nmでの吸光度より算出する。

(5-2)本発明の抗体の利用

(a)本発明の抗体を用いる本発明のポリペプチドの免疫学的検出および定量本発明のポリペプチドの免疫学的検出法としては、マイクロタイプレートを用いるELISA法、蛍光抗体法、ウェスタンブロット法、免疫組織染色法〔別冊 実験医学, ザ・プロトコールシリーズ, 免疫染色・in situハイブリダイゼーション, 羊土社 (1997)、Journal of Immunological Methods, 150, 5, (1992)〕等をあげることができる。

【0133】免疫学的定量法としては、液相中で本発明のポリペプチドと反応する抗体のうちエピトープが異なる2種類のモノクローナル抗体を用いたサンドイッチELISA法、¹²⁵I等の放射性同位体で標識した本発明のポリペプチドと本発明のポリペプチドを認識する抗体とを用いるラジオイムノアッセイ法等をあげることができる。

【0134】上記検出あるいは定量法は、大腸癌、胃癌等の診断に利用することができる。また、上記検出あるいは定量法を用いて本発明のポリペプチドを発現する細胞や細胞株を同定することができる。本発明のポリペプチドを発現する細胞や細胞株は、該ポリペプチドのリガンド、アゴニストまたはアンタゴニストの探索や該ポリペプチドの機能解析に有用である。

(b)本発明の抗体を含有する医薬

本発明の抗体は、医薬、例えば視床または小脳の異常症、大腸癌、胃癌等の疾患の治療薬として用いることができる。

【0135】本発明の抗体を含有する医薬は、治療薬として該化合物単独で投与することも可能ではあるが、通常は薬理学的に許容される一つあるいはそれ以上の担体と一緒に混合し、製剤学の技術分野においてよく知られる任意の方法により製造した医薬製剤として提供するのが望ましい。

【0136】投与経路は、治療に際して最も効果的なものを使用するのが望ましく、経口投与、または口腔内、気道内、直腸内、皮下、筋肉内および静脈内等の非経口投与をあげることができる。投与形態としては、噴霧剤、カプセル剤、錠剤、顆粒剤、シロップ剤、乳剤、座

剤、注射剤、軟膏、テープ剤等があげられる。

【0137】経口投与に適切な製剤としては、乳剤、シロップ剤、カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤等があげられる。例えば乳剤およびシロップ剤のような液体調製物は、水、ショ糖、ソルビトール、果糖等の糖類、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール等のグリコール類、ごま油、オリーブ油、大豆油等の油類、p-ヒドロキシ安息香酸エステル類等の防腐剤、ストロベリーフレーバー、ペパーミント等のフレーバー類等を添加剤として用いて製造できる。カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤等は、乳糖、ブドウ糖、ショ糖、マンニトール等の賦形剤、デンプン、アルギン酸ナトリウム等の崩壊剤、ステアリン酸マグネシウム、タルク等の滑沢剤、ポリビニルアルコール、ヒドロキシプロピルセルロース、ゼラチン等の結合剤、脂肪酸エステル等の界面活性剤、グリセリン等の可塑剤等を添加剤として用いて製造できる。

【0138】非経口投与に適切な製剤としては、注射剤、座剤、噴霧剤等があげられる。例えば、注射剤は、塩溶液、ブドウ糖溶液、あるいは両者の混合物からなる担体等を用いて調製する。座剤はカカオ脂、水素化脂肪またはカルボン酸等の担体を用いて調製される。また、噴霧剤は該化合物そのもの、ないしは受容者の口腔および気道粘膜を刺激せず、かつ該化合物を微細な粒子として分散させ吸収を容易にさせる担体等を用いて調製する。担体として具体的には乳糖、グリセリン等が例示される。該化合物および用いる担体の性質により、エアロゾル、ドライパウダー等の製剤が可能である。また、これらの非経口剤においても経口剤に添加剤として例示した成分を添加することもできる。

【0139】投与量または投与回数は、目的とする治療効果、投与方法、治療期間、年齢、体重等により異なるが、通常成人1日当たり10 μ g/kg~8mg/kgである。

(6)本発明のポリペプチドまたは本発明の部分ペプチドの利用

(6-1)本発明のG蛋白質共役型受容体ポリペプチドに対するリガンドのスクリーニング方法

本発明のポリペプチドまたは本発明の部分ペプチドを用いて、本発明のポリペプチドに対するリガンドを探索、決定できる。

【0140】該リガンドを探索または決定する方法としては、例えば本発明のポリペプチドまたは部分ペプチドもしくはそれらの塩と、試験物質とを接触させ、試験物質より本発明のポリペプチドに対するリガンドを選択する方法、または本発明のポリペプチドまたは部分ペプチドを発現する細胞や該細胞の膜画分と、試験物質とを接触させ、試験物質より本発明のポリペプチドに対するリガンドを選択する方法等をあげることができる。

【0141】試験物質としては、公知のリガンド〔例えば、アンギオテンシン、ボンベシン、カナビノイド、コ

レシストキニン、グルタミン、セロトニン、メラトニン、ニューロペプチドY、オピオイド、プリン、バソプレッシン、オキシトシン、PACAP(ピチユイタリ アデニレートシクラーゼ アクティブエイティング プロテイン)、セクレチン、グルカゴン、カルシトニン、アドレノメジュリン、ソマトスタチン、GHRH(グロースホルモン リリーシング ホルモン)、CRF(コルチコトロピン リリーシング ファクター)、ACTH(アドレノコルチコトロピック ホルモン)、メラニンステイミュレーションホルモン、GRP(ガストリン リリーシング ペプチド)、PTH(パラチロイド ホルモン)、VIP(バソアクティブ インテスティナル アンチリレイテッド ポリペプチド)、ドーパミン、モチリン、アミリン、ブラジキニン、CGRP(カルシトニンジーンリレーティッド ペプチド)、ロイコトリエン、パンクレアスタチン、プロスタグランジン、トロンボキササン、アデノシン、アドレナリン、および β -ケモカイン〔例えば、IL-8(インターロイキン-8)、GRO(グロース リレーティッド ジーン)、GRO、GRO、NAP-2(ニューロナル カルモジュリン バインディング プロテイン-2)、ENA-78(エピセリアルセル-デライド ニュトロフィル-アクティブエイティング プロテイン-78)、PF4(プレートレット ファクター-4)、IP10(インターフェロン インデュシブル プロテイン オブ 10kd)、GCP-2(グラニューロサイト ケモタクティック プロテイン-2)、MCP-1(モノサイト ケモアトラクタント プロテイン-1)、HC14、MCP-3、I-309、MIP1(マクロファージ インフラマトリ プロテイン1)、MIP-1、RANTES(レギュレティッド オン アクチベーション、ノーマル Tセル エクスプレッドアンド セクレテッド)など〕、エンドセリン、エンテログアストリン、ヒスタミン、ニューロテンシン、TRH、パンクレアティックポリペプチド、ガラニン、ウロテンシンIおよびII、ニューロペプチドFF、オレキシンおよびメラニン コンセントレーティングホルモンなど)の他に、例えば、ヒトまたは哺乳動物(例えば、マウス、ラット、ブタ、ウシ、ヒツジ、サルなど)の組織抽出物や該抽出物由来の精製物、細胞培養上清や該上清由来の精製物などの生体試料や、既知蛋白質、組換え技術を用いて生産された組換え蛋白質、微生物の菌体抽出液や該抽出液由来の精製物、微生物培養上清や該上清由来の精製物、既知化合物、コンビナトリアルケミストリーを用いて合成された化合物などがあげられる。

【0142】具体的な本発明のポリペプチドに対するリガンドの探索または決定方法としては、本発明のポリペプチドまたは部分ペプチド、若しくはその塩、あるいは本発明のポリペプチドまたは部分ペプチドを発現する細胞に対して試験物質を作用させ、本発明のポリペプチド

または部分ペプチド、若しくはその塩に対する試験物質の結合量を測定する、あるいは本発明のポリペプチドを発現する細胞の応答を検出する方法をあげることができる。

【0143】より具体的には、(a) 標識した試験物質を、本発明のポリペプチドまたは部分ペプチドもしくはそれらの塩に接触させた場合における、標識した試験物質の該ポリペプチドまたは部分ペプチド若しくはそれらの塩に対する結合量を測定し、該試験物質から本発明のポリペプチドまたはその塩に対するリガンドを選択することを特徴とする、本発明のポリペプチドに対するリガンドの決定方法、(b) 標識した試験物質を、本発明のポリペプチドまたは部分ペプチドを含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合における、標識した試験物質の該細胞または該膜画分に対する結合量を測定し、該試験物質から本発明のポリペプチドに対するリガンドを選択することを特徴とする、本発明のポリペプチドに対するリガンドの決定方法、(c) 試験物質を、本発明のポリペプチドを含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合における、標識したGTPaseのG 20
 蛋白質への結合量を測定し、試験物質から本発明のポリペプチドに対するリガンドを選択することを特徴とする、本発明のポリペプチドに対するリガンドの決定方法、(d) 試験物質を、本発明のポリペプチドを含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合におけるGTPase活性を測定し、試験物質より本発明のペプチドに対するリガンドを選択することを特徴とする、本発明のポリペプチドに対するリガンドの決定方法、(e) 試験物質を、本発明のポリペプチドを含有する細胞に接触させた場合における、ポリペプチドを介した細胞刺激活性(例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca²⁺遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fos活性化、pHの低下、細胞増殖活性、メラニン色素の凝集または拡散、またはレポーター遺伝子の発現量などを促進する活性または抑制する活性など)を測定し、試験物質より本発明のポリペプチドに対するリガンドを選択することを特徴とする、本発明のポリペプチドに対するリガンドの決定方法、をあげることができる。

【0144】以下に、本発明のリガンドを探索、または決定する方法をより詳細に説明する。

(I) 試験物質の結合量を測定する方法

上記(a)および(b)に示したように、本発明のポリペプチドまたは部分ペプチド若しくはその塩、あるいは本発明のポリペプチドまたは部分ペプチドを発現する細胞に対して標識した試験物質を作用させ、本発明のポリペプチドに対する試験物質の結合量を測定し、試験物質より本発明のポリペプチドに対するリガンドを選択することにより、本発明のポリペプチドに対するリガンドを探 50

索または決定することができる。

【0145】試験物質としては、例えば、³H、¹⁴C、¹²⁵I、³⁵S、³²P等の放射性同位元素で標識した公知のGPCRのリガンド〔アンギオテンシン、ボンベシン、カナビノイド、コレシストキニン、グルタミン、セロトニン、メラトニン、ニューロペプチドY、オピオイド、プリン、バソプレッシン、オキシトシン、PACAP、セクレチン、グルカゴン、カルシトニン、アドレノメジュリン、ソマトスタチン、GHRH、CRF、ACTH、メラニンスティミュレーションホルモン、GRP、PTH、VIP、ドーパミン、モチリン、アミリン、ブラジキニン、CGRP、ロイコトリエン、パンクレアスタチン、プロスタグランジン、トロンボキササン、アデノシン、アドレナリン、および -ケモカイン(例えば、IL-8、GRO、GRO、GRO、NAP-2、ENA-78、PF4、IP10、GCP-2、MCP-1、HC14、MCP-3、I-309、MIP1、MIP-1、RANTESなど)、エンドセリン、エンテロガストリン、ヒスタミン、ニューロテンシン、TRH、パンクレアティックポリペプチド、ガラニン、ウロテンシンIおよびII、ニューロペプチドFF、オレキシンおよびメラニンコンセントレーティングホルモンなど〕を用いることができる。また、³H、¹⁴C、¹²⁵I、³⁵S、³²P等の放射性同位元素で標識した任意の蛋白質、ペプチドまたは化合物を用いることもできる。

【0146】上記方法において、本発明のポリペプチドまたは部分ペプチドとして、該ポリペプチドまたは部分ペプチドを直接用いることもできるが、該ポリペプチドまたは部分ペプチドを含有する細胞そのもの、またはその細胞膜画分を用いることもできる。細胞膜画分を用いる際の部分ペプチドとしては、リガンド結合能を有する親水性部位と細胞膜貫通領域である疎水性部位の両方を有する部分ペプチドが好ましい。該ポリペプチドまたは部分ペプチドを含有する細胞を用いる場合、該細胞をグルタルアルデヒド、ホルマリンなどで固定化してもよい。

【0147】また、本発明のポリペプチドまたは部分ペプチドとして、天然に存在するポリペプチドまたは部分ペプチド、あるいは遺伝子組換えの手法を用いて作製した組換えポリペプチドまたは組換え部分ペプチドのいずれも用いることができる。本発明のポリペプチドとして、(3)に記載の方法により、配列番号2で表される塩基配列を有するDNAに変異を導入して得られる変異DNAにコードされるポリペプチドのうち、構成的に活性型となった変異型ポリペプチドは特に有用である。

【0148】G蛋白質共役型受容体(GPCR)の中には、GPCRポリペプチドを細胞に過剰に発現させた際に、リガンドが存在しなくてもシグナルを流すものが存在し、これらは構成活性型GPCRと呼ばれる。また、

ももとは構成活性型ではないGPCRにおいても、アミノ酸の置換、欠失などの変異を導入することにより構成活性型になることが知られている。構成活性型に変化した変異GPCRでは、アゴニストとの親和性が増加する可能性があることが知られていることから、構成活性型の変異GPCRはリガンドの探索において有用と考えられる〔Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 275, 1274 (1995)、Endocrinology, 137, 3936 (1996)、J. Biol. Chem., 272, 1822 (1997)〕。

【0149】該構成活性型GPCRは既知の方法に従って取得することができる〔J. Biol. Chem., 271, 1857 (1996)、Science, 268, 98 (1995)、Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 275, 1274 (1995)、J. Biol. Chem., 272, 1822 (1997)、Journal of Receptor and Signal Transduction Research, 17, 57 (1997)、W098/46995〕。

【0150】上記の細胞膜画分とは、細胞を破碎した後、それ自体公知の方法で得られる細胞膜が多く含まれる画分のことをいう。細胞の破碎方法としては、Potter-Elvehjem型ホモジナイザーで細胞を押し潰す方法、ワーリングブレンダーやポリトロン(Kinematica社製)による破碎、超音波による破碎、フレンチプレスなどで加圧しながら細胞を細いノズルから噴出させることによる破碎などが挙げられる。細胞膜の分画には、分画遠心分離法や密度勾配遠心分離法などの遠心力による分画法が主として用いられる。例えば、細胞破碎液を低速(500~3000rpm)で短時間(通常、約1~10分)遠心分離し、上清をさらに高速(15000~30000rpm)で通常30分~2時間遠心分離し、得られる沈澱を膜画分とする。該膜画分中には、発現した受容体蛋白質と細胞由来のリン脂質や膜蛋白質などの膜成分が多く含まれる。

【0151】本発明のポリペプチドを発現する細胞としては、上記(4)に記載したように、該ポリペプチドをコードするDNAを含む組換え体DNAを適当な宿主細胞に導入して得られる形質転換細胞のように大量に該ポリペプチドを発現している細胞を用いることもできる。大腸菌、枯草菌、酵母などの微生物の他、昆虫細胞、カエルの卵母細胞、カエルのメラニン細胞、動物細胞、植物細胞などがあげられるが、該形質転換体が生産する本発明のポリペプチドが高次構造を保ち、リガンドとの結合性を保持するためには、酵母、昆虫細胞、カエルの卵母細胞、カエルのメラニン細胞、動物細胞、植物細胞などで発現させるのが好ましい。

【0152】本発明のポリペプチドまたは部分ペプチドを含有する細胞やその細胞膜画分中のポリペプチドまたは部分ペプチドの量は、例えば1細胞当たり $10^3 \sim 10^8$ 分子であるのが好ましく、 $10^5 \sim 10^7$ 分子であるのが好適である。なお、発現量が多いほど膜画分当たりのリガンド結合活性(比活性)が高くなり、高感度なスクリーニング

グ系の構築が可能になるばかりでなく、同一ロットで大量の試料を測定できるようになる。

【0153】以下、具体例を示す。

【0154】本発明のポリペプチドまたは部分ペプチドを含有する細胞または該細胞の細胞膜画分を、適当なバッファーに懸濁することにより本発明のポリペプチドの標品を調製する。バッファーは、リガンドと本発明のポリペプチドとの結合を阻害しないバッファーであればいずれでもよく、例えばpH4~10(望ましくはpH6~8)のリン酸バッファーやTris-HClバッファーなどが用いられる。また、非特異的結合を低減させる目的で、CHA PS、Tween-80、ジギトニン、デオキシコール酸などの界面活性剤やウシ血清アルブミンやゼラチンなどの各種蛋白質をバッファーに加えることもできる。さらに、プロテアーゼによる本発明のポリペプチドやリガンドの分解を抑える目的でPMSF、ロイペプチン、E-64、ペプスタチンなどのプロテアーゼ阻害剤を添加することもできる。10 μ l~10mlの該ポリペプチド標品に、放射性同位元素(^3H 、 ^{125}I 、 ^{14}C 、 ^{35}S 、 ^{32}P など)で標識した一定の放射能の試験物質を共存させる。非特異的結合量(NSB)を知るために大過剰の未標識の試験物質を加えた反応チューブも用意する。反応は約0~50分、望ましくは約4~37分で、約20分~24時間、望ましくは約30分~3時間行なう。反応後、ガラス繊維濾紙等で濾過し、適量の同バッファーで洗浄した後、ガラス繊維濾紙に残存する放射活性を液体シンチレーションカウンターあるいは β -カウンターで計測する。全結合量(B)から非特異的結合量(NSB)を引いたカウント(B-NSB)が0cpmを越える試験物質を本発明のポリペプチドに結合する物質として選択することができる。これらの内、本発明のポリペプチドを含有する細胞または該細胞の細胞膜画分への結合活性が強く、かつ本発明のポリペプチドを含有しない細胞または該細胞の細胞膜画分への結合活性が弱い物質を、本発明のポリペプチドのリガンドとして選択することができる。

【0155】上記方法において、本発明のポリペプチドまたは部分ペプチドを含有する細胞として、本発明のポリペプチドを発現しない宿主細胞に該ポリペプチドまたは該部分ペプチドをコードするDNAをベクターDNAに組み込んだ組換え体DNAを導入して得られる該ポリペプチドまたは該部分ペプチド発現細胞を用い、本発明のポリペプチドを含有しない細胞として、同宿主細胞にベクターのみを導入することによって作製した該ポリペプチドを発現しないコントロール細胞を用いることにより、リガンドの判定をより正確に行うことができる。

(II)GTP SのG蛋白質への結合量を測定する方法

上記(c)に示したように、本発明のポリペプチドを含有する細胞または細胞の膜画分に試験物質を接触させ、

標識したGTP SのG蛋白質(膜画分)への結合量を測定することにより、該ポリペプチドのリガンドを探索または決定することができる〔Molecular Pharmacology, 47, 848 (1995)、W098/46995〕。

【0156】試験物質としてはいかなる物質も使用できるが、例えば、既知ペプチド、既知GPCRリガンド、既知蛋白質、組換え技術を用いて生産された組換え蛋白質、細胞抽出液や該抽出液由来の精製物、細胞培養上清や該上清由来の精製物、血清などの生体試料や該生体試料由来の精製物、微生物の菌体抽出液や該抽出液由来の精製物、微生物培養上清や該上清由来の精製物、既知化合物、コンビナトリアルケミストリーを用いて合成された化合物などを使用することができる。標識したGTP Sとしては、例えば³⁵Sで標識したGTP Sを用いることができる。

【0157】本発明のポリペプチドを含有する細胞または該細胞の膜画分としては、上記(I)に記載したものを使用することができる。

【0158】以下、具体例を示す。

【0159】本発明のポリペプチドを含有する細胞または細胞膜画分標品を、上記(I)に記載した方法により調製する。10 μ l~10mlの該ポリペプチド標品に、試験化合物、放射性同位元素(³⁵Sなど)で標識した一定の放射能のGTP S、およびGDPを共存させる。非特異的結合量(NSB)を知る必要がある場合は、大過剰の未標識のGTP Sを加えた反応チューブを用意する。全結合量(B)から非特異的結合量(NSB)を引いたカウント(B-NSB)が特異的結合量である。反応は約0~50、望ましくは約4~37で、約20分~24時間、望ましくは約30分~3時間行なう。反応後、ガラス繊維濾紙等で濾過し、適量の同バッファーで洗浄した後、ガラス繊維濾紙に残存する放射活性を液体シンチレーションカウンターで計測する。同様の操作を本発明のポリペプチドを発現しない細胞または細胞膜画分を用いて行い、放射活性を測定する。

【0160】本発明のポリペプチドを含有する細胞または該細胞の膜画分を用いた際のGTP Sの細胞または該細胞の膜画分への結合活性と、本発明のポリペプチドを発現していない細胞または該細胞の膜画分を用いた際の、GTP Sの細胞または細胞膜画分への結合活性を比較し、試験試料より、本発明のポリペプチドを含有する細胞または該細胞の膜画分を用いた際にGTP Sの膜画分への結合を増強する活性が強い物質を、本発明のポリペプチドのリガンドとして選択することができる。

【0161】上記方法において、本発明のポリペプチドを含有する細胞として、本発明のポリペプチドを発現しない宿主細胞に該ポリペプチドをコードするDNAをベクターに組み込んだ組換え体DNAを導入して得られる、本発明のポリペプチドを発現する細胞を用い、本発明のポリペプチドを含有しない細胞として、同宿主細胞

にベクターのみを導入することによって作製した、本発明のポリペプチドを発現しないコントロール細胞を用いることにより、リガンドの判定をより正確に行うことができる。

(III) GTPase活性を測定する方法

上記(d)に示したように、本発明のポリペプチドを含有する細胞または細胞の膜画分に試験物質を接触させ、GTPase活性を測定することにより、本発明のポリペプチドのリガンドを探索または決定することができる〔J. Biol. Chem., 271, 1857 (1996)、J. Biol. Chem., 271, 1857 (1996)、W098/46995〕。

【0162】試験物質としては、上記(II)に記載した物質を使用することができる。

【0163】本発明のポリペプチドを含有する細胞または該細胞の膜画分としては、上記(I)に記載したものを使用することができる。

【0164】以下、具体例を示す。

【0165】本発明のポリペプチドを含有する細胞または細胞膜画分標品を、上記(I)に記載した方法により調製する。10 μ l~10mlの該ポリペプチド標品に、試験化合物、放射性同位元素(³²Pなど)で標識した一定の放射能のGTP(例えば[³²P]GTP)を共存させる。反応は約0~50、望ましくは約4~37で、約20分~24時間、望ましくは約30分~3時間行なう。反応後、反応液の上清を回収し、遊離した[³²P]Piの放射活性を液体シンチレーションカウンターで計測する。反応液をガラス繊維濾紙等で濾過し、適量の同バッファーで洗浄した後、濾過液中の放射活性を液体シンチレーションカウンターで計測してもよい。同様に、本発明のポリペプチドを含有しない細胞または細胞膜画分についても、濾過液中の放射活性を測定する。

【0166】本発明のポリペプチドを含有する細胞または該細胞の膜画分を用いた際のGTPase活性と、本発明のポリペプチドを発現していない細胞または該細胞の膜画分を用いた際のGTPase活性を比較し、試験化合物中より、本発明のポリペプチドを含有する細胞または該細胞の膜画分を用いた際にGTPase活性を増強する活性が強い化合物を本発明のポリペプチドのリガンドとして選択することができる。

【0167】上記方法において、本発明のポリペプチドを含有する細胞として、本発明のポリペプチドを発現しない宿主細胞に該ポリペプチドをコードするDNAをベクターに組み込んだ組換え体DNAを導入して得られる、本発明のポリペプチドを発現する細胞を用い、本発明のポリペプチドを含有しない細胞として、同宿主細胞にベクターのみを導入することによって作製した、本発明のポリペプチドを発現しないコントロール細胞を用いることにより、リガンドの判定をより正確に行うことができる。

(IV) 細胞の応答を検出する方法

上記(e)に示したように、本発明のポリペプチドを発現する細胞に試験物質を接触させ、該ポリペプチドの活性化を細胞の応答を指標として検出することにより、該ポリペプチドのリガンドを探索または決定することができる。細胞の応答としては、例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca²⁺遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cAMP減少、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fos活性化、pHの低下、細胞増殖活性、メラニン色素の凝集または拡散、またはレポーター遺伝子の発現量などをあげることができる〔J. Biol. Chem., 271, 1857 (1996)、Science, 268, 98 (1995)、Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 275, 1274 (1995)、J. Biol. Chem., 272, 1822 (1997)、Journal of Receptor and Signal Transduction Research, 17, 57 (1997)、Endocrinology 138, 1400 (1997)、Endocrinology 138, 1471 (1997)、Nat. Biotechnol., 16, 1334 (1998)、Biochem. Biophys. Res. Commun., 251, 471 (1998)、Brit. J. Pharmacol., 125, 1387 (1998)、Trends Biotechnol., 15, 48 (1997)、Anal. Biochem., 252, 115 (1997)、Nature, 358, 325 (1992)、Nature, 393, 272 (1998)、Cell, 92, 573 (1998)、J. Biol. Chem., 272, 27497 (1997)、Trends Pharmacol. Sci., 18, 430 (1997)、Trends Pharmacol. Sci., 20, 370 (1999)、WO98/46995〕。

【0168】レポーター系を用いて細胞の応答をモニターする場合は、例えば、本発明のポリペプチドを発現する細胞に、該ポリペプチドの活性化により発現が誘導される遺伝子のプロモーター配列の下流に適当なレポーター遺伝子を連結したDNAを導入することにより、該ポリペプチドの活性化をレポーター遺伝子の発現で測定することができる。該プロモーターとしては、例えばICAM-1遺伝子のプロモーター、c-fosのプロモーター、Krox-24のプロモーター〔Biochem. J., 320, 145 (1996)〕などが利用できる。また、該プロモーターは、適当な転写因子の結合配列と基本プロモーターからなる人工プロモーターでもよい。転写因子の結合配列としては、例えばCRE (CREB binding element)、TRE (TPA responsive element)、SRE (serum responsive element)などが利用できる。レポーター遺伝子としては、クロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼ遺伝子、 β -グルクロニダーゼ遺伝子、 β -ガラクトシダーゼ遺伝子、 β -ラクタマーゼ遺伝子、エウオリン遺伝子、ルシフェラーゼ遺伝子およびグリーン・フルオレッセント・プロテイン遺伝子などが利用できる。

【0169】上記方法で用いられる本発明のポリペプチドを含有する細胞としては、上記(I)に記載したものを使用することができる。

【0170】本発明のポリペプチドを発現する細胞とし

ては、上記(4)に記載したように、該ポリペプチドをコードするDNAを含む組換え体DNAを適当な宿主細胞に導入して得られる形質転換細胞のように大量に該ポリペプチドを発現している細胞を用いることもできる。宿主細胞としては、大腸菌、枯草菌、酵母などの微生物の他、昆虫細胞、カエルの卵母細胞、カエルのメラニン細胞、動物細胞、植物細胞などを用いることができるが、該形質転換細胞が発現する該ポリペプチドが高次構造を保ち、リガンドとの結合性や機能性を保持するためには、酵母、昆虫細胞、カエルの卵母細胞、カエルのメラニン細胞、動物細胞、植物細胞などで発現させるのが好ましい。また酵母の変異株や改変G蛋白質を発現させた酵母などを宿主として利用することもできる〔Trends in Biotechnology, 15, 487 (1997)、Mol. Cell. Biol., 15, 6188 (1995)、Mol. Cell. Biol., 16, 4700 (1996)〕。

【0171】試験物質としては、上記(II)に記載した物質を使用することができる。

【0172】以下具体例を示す。

【0173】本発明のポリペプチドを発現する細胞をマルチウェルプレート等に培養する。培養後、必要に応じて新鮮な培地あるいは細胞に毒性を示さない適当なバッファーに交換し、試験化合物を添加して一定時間インキュベートする。その後、細胞の応答(例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca²⁺遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fos活性化、pHの低下、細胞増殖活性、メラニン色素の凝集または拡散、またはレポーター遺伝子の発現量などを促進する活性または抑制する活性など)を測定する。例えば、上記細胞の抽出液や上清を用いて、該細胞の応答により生成した産物を常法に従って定量する。細胞刺激活性の指標とする物質(例えば、アラキドン酸など)の生成が、細胞が含有する分解酵素によって検定困難な場合は、該分解酵素に対する阻害剤を添加して定量してもよい。また、cAMP産生抑制などの活性については、フォルスコリンなどで細胞のcAMP産生量を増大させておいた細胞に対する産生抑制作用として検出することができる。

【0174】同様の操作を、本発明のペプチドを発現しない細胞についても行い、上記の細胞の応答を測定する。

【0175】本発明のポリペプチドを含有する細胞を用いた際の細胞の応答と、本発明のポリペプチドを発現していない細胞を用いた際の細胞の応答を比較し、試験物質より、本発明のポリペプチドを含有する細胞を用いた際に細胞の応答が強く検出される物質を、本発明のポリペプチドのリガンドとして選択することができる。

【0176】上記方法において、本発明のポリペプチドを含有する細胞として、本発明のポリペプチドを発現し

ない宿主細胞に該ポリペプチドをコードするDNAをベクターに組み込んだ組換え体DNAを導入して得られる、本発明のポリペプチドを発現する細胞を用い、本発明のポリペプチドを含有しない細胞として、同宿主細胞にベクターのみを導入することによって作製した、本発明のポリペプチドを発現しないコントロール細胞を用いることにより、リガンドの判定をより正確に行うことができる。

(6-2) 本発明のG蛋白質共役型受容体ポリペプチドに対するリガンドのスクリーニング用キット

本発明のポリペプチドまたはその塩に結合するリガンドのスクリーニング用キットは、本発明のポリペプチドまたは本発明の部分ペプチドもしくはそれらの塩、本発明のポリペプチドまたは本発明の部分ペプチドを含有する細胞、または該細胞の膜画分などを含有する。本発明のリガンドのスクリーニング用キットの例としては、次のものがあげられる。

(a) リガンドスクリーニング用試薬

測定用緩衝液および洗浄用緩衝液

Hanks' Balanced Salt Solution (ギブコ社製) に、0.205%のウシ血清アルブミン (シグマ社製) を加えたもの。孔径0.45 μmのフィルターで濾過滅菌し、4°Cで保存するか、あるいは用時調製しても良い。

本発明のポリペプチドまたは部分ペプチド標品
本発明のポリペプチドまたは部分ペプチドを発現させたCHO細胞を、12穴プレートに5×10⁵個/穴で継代し、5%CO₂、95%air インキュベーター中、37°Cで2日間培養したもの。

標識試験化合物

市販の [³H]、[¹²⁵I]、[¹⁴C]、[³⁵S] などで標識した化合物、または適当な方法で標識化した化合物。該化合物の水溶液状態のものを4°Cあるいは-20°Cにて保存し、用時に測定用緩衝液にて1 μmol/Lに希釈する。水に難溶性を示す試験化合物については、ジメチルホルムアミド、DMSO、メタノール等に溶解する。

非標識試験化合物

標識化合物の100~1000倍濃度に調製した非標識化合物。

(b) 測定法

12穴組織培養用プレートを用いて培養した本発明のポリペプチドを発現するCHO細胞を、測定用緩衝液1 mlで2回洗浄した後、490 μlの測定用緩衝液を各穴に加える。

標識試験化合物を5 μl加え、室温で1時間反応させる。非特異的結合量を知るために非標識試験化合物を5 μl加えておいたものを準備してもよい。

反応液を除去し、1 mlの洗浄用緩衝液で3回洗浄する。細胞に結合した標識試験化合物を溶解液 (0.2 mol/L NaOH、1% SDS) で溶解し、4 mlの

液体シンチレーターA (和光純薬製) と混合する。

液体シンチレーションカウンター (ベックマン社製) を用いて放射活性を測定する。

【0177】本発明のポリペプチドのリガンドとしては、例えば、脳、視床下部、下垂体、膵臓などに存在する物質などが挙げられるが、本発明のリガンドには、既知のリガンドは含まれない。既知のリガンドとしては、アンギオテンシン、ボンベシン、カナビノイド、コレシストキニン、グルタミン、セロトニン、メラトニン、ニューロペプチドY、オピオイド、プリン、バソプレッシン、オキシトシン、PACAP、セクレチン、グルカゴン、カルシトニン、アドレノメジュリン、ソマトスタチン、GHRH、CRF、ACTH、メラニンステイミュレーションホルモン、GRP、PTH、VIP、ドーパミン、モチリン、アミリン、ブラジキニン、CGRP、ロイコトリエン、パンクレアスタチン、プロスタグランジン、トロンボキサン、アデノシン、アドレナリン、およびケモカイン (例えば、IL-8、GRO-α、GRO-β、GRO-γ、NAP-2、ENA-78、PF4、IP10、GCP-2、MCP-1、HC14、MCP-3、I-309、MIP1-α、MIP1-β、RANTESなど)、エンドセリン、エンテロガストリン、ヒスタミン、ニューロテンシン、TRH、パンクレアティックポリペプチド、ガラニン、ウロテンシンIおよびII、ニューロペプチドFF、オレキシンおよびメラニンコンセントレーティングホルモンなどがあげられる。

(6-3) 本発明のG蛋白質共役型受容体ポリペプチドに対するリガンドの定量法

本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドもしくはそれらの塩は、リガンドに対して結合性を有しているので、生体内におけるリガンド濃度を感度良く定量することができる。本発明の定量法は、例えば、競合法と組み合わせることによって用いることができる。すなわち、被検体を本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドもしくはそれらの塩と接触させることによって、被検体中のリガンド濃度を測定することができる。具体的には、例えば、既知の方法 [入江寛編「ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和49年発行)、入江寛編「続ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和54年発行)] あるいはそれに準じる方法に従って行うことができる。

(6-4) 本発明のG蛋白質共役型受容体ポリペプチドのアゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質のスクリーニング方法

本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドもしくはそれらの塩、あるいは本発明のポリペプチドまたは部分ペプチドを発現する細胞や該細胞の膜画分は、本発明のポリペプチドに対するアゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質を選択するための試薬として有用である。

【0178】本発明のポリペプチドのアゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質のスクリーニング方法としては、例えば、(A) 本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドもしくはそれらの塩と、リガンドとを接触させた場合と、本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドもしくはそれらの塩と、リガンドおよび試験物質とを接触させた場合との比較を行ない、試験物質より本発明のポリペプチドのアゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質を選択することを特徴とする方法、(B) 本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドを発現する細胞または該細胞膜画分と、リガンドとを接触させた場合と、本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドを発現する細胞または該細胞膜画分と、リガンドおよび試験物質とを接触させた場合との比較を行ない、試験物質より本発明のポリペプチドのアゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質を選択することを特徴とする方法、(C) 上記(6-1)の(a)~(d)に記載した本発明のポリペプチドのリガンドの探索法と同じ方法を用いることを特徴とする方法、をあげることができる。

【0179】また、上記(6-1)の(a)~(d)に記載した本発明のポリペプチドのリガンドの探索法においては(6-1)に記載した構成活性型の変異ポリペプチドを用いることを特徴とする、本発明のポリペプチドのアゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質のスクリーニング方法もあげることができる。

【0180】より具体的には、(a) 標識したリガンドを、本発明のポリペプチドまたは部分ペプチドもしくはそれらの塩に接触させた場合と、標識したリガンドおよび試験物質を本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドもしくはそれらの塩に接触させた場合における、標識したリガンドの該ポリペプチドまたはその部分ペプチドもしくはそれらの塩に対する結合量を測定して比較し、標識したリガンドより本発明のポリペプチドのアゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質を選択することを特徴とする、本発明のポリペプチドのアゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質のスクリーニング方法、(b) 標識したリガンドを、本発明のポリペプチドまたは部分ペプチドを含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合と、標識したリガンドおよび試験物質を本発明のポリペプチドまたは部分ペプチドを含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合における、標識したリガンドの該細胞または該膜画分に対する結合量を測定して比較し、標識したリガンドより本発明のポリペプチドのアゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質を選択することを特徴とする、本発明のポリペプチドのアゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質のスクリーニング方法、(c) リガンドを本発明のポリペプチドを含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合と、リガンドと試験物質

を本発明のポリペプチドを含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合における、標識したGTP SのG蛋白質(膜画分)への結合量を測定して比較し、試験物質より本発明のポリペプチドのアゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質を選択することを特徴とする本発明のポリペプチドのアゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質のスクリーニング方法、(d) リガンドを本発明のポリペプチドを含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合と、リガンドと試験物質を本発明の受容体蛋白質を含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合におけるGTPase活性を測定して比較し、試験物質より本発明のポリペプチドのアゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質を選択することを特徴とする、本発明のポリペプチドのアゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質のスクリーニング方法、(e) リガンドを本発明のポリペプチドを含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合と、リガンドと試験物質を本発明のポリペプチドまたは部分ペプチドを含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合における本発明のポリペプチドを介した細胞刺激活性(例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca²⁺遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fos活性化、pHの低下、細胞増殖活性、メラニン色素の凝集または拡散、またはレポーター遺伝子の発現量などを促進する活性または抑制する活性など)を測定して比較し、試験物質より本発明のポリペプチドのアゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質を選択することを特徴とする、本発明の受容体蛋白質のアゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質のスクリーニング方法、(f) 試験物質を本発明のポリペプチドを含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合における、標識したGTP SのG蛋白質(膜画分)への結合量を測定し、試験物質より本発明のポリペプチドのアゴニストまたは機能修飾物質を選択することを特徴とする、本発明のポリペプチドのアゴニストまたは機能修飾物質のスクリーニング方法、(g) 試験物質を本発明のポリペプチドを含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合におけるGTPase活性を測定し、試験物質より本発明のポリペプチドのアゴニストまたは機能修飾物質を選択することを特徴とする本発明のポリペプチドのアゴニストまたは機能修飾物質のスクリーニング方法、(h) 試験物質を、本発明のポリペプチドを含有する細胞に接触させた場合における、本発明のポリペプチドまたは部分ペプチドを介した細胞刺激活性(例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca²⁺遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fos活性化、pHの低下、メラニン色素の凝集または

拡散、またはレポーター遺伝子の発現量などを促進する活性または抑制する活性など)を測定し、試験物質より本発明のポリペプチドのアゴニストまたは機能修飾物質を選択することを特徴とする、本発明のポリペプチドのアゴニストまたは機能修飾物質のスクリーニング方法、(i)上記(a)~(h)において、本発明のポリペプチドとして構成活性型に変異させたポリペプチドを使用することを特徴とする本発明のポリペプチドのアゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質のスクリーニング方法、をあげることができる。

【0181】上記(a)および(b)で選択された物質は、上記(c)~(i)の方法を用いて、アゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質かを区別することができる。一方、上記(a)~(i)の方法で選択された物質の中には、本発明のポリペプチドのアゴニストやアンタゴニストではないが、本発明のポリペプチドの機能を修飾できる物質(機能修飾物質)も含まれる。例えば、(a)~(i)の方法で選択された物質の中には、本発明のポリペプチドとG蛋白質の共役を阻害したり増強したりする物質も含まれると考えられる。また、(c)~(i)の方法で選択された物質の中には、本発明のポリペプチドより下流のシグナルを阻害したり増強する物質も含まれると考えられる。これら機能修飾物質も医薬品の候補として有用である。

【0182】上記方法による本発明のポリペプチドのアゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質のスクリーニング方法の詳細な説明を以下にする。

(1)リガンドの結合量を測定する方法

上記(a)および(b)に示したように、本発明のポリペプチドまたは部分ペプチド若しくはそれらの塩、あるいは本発明のポリペプチドまたは部分ペプチドを発現する細胞に対して試験物質と標識したリガンドを作用させ、本発明のポリペプチドまたは部分ペプチド若しくはその塩に対するリガンドの結合量を測定することにより、本発明のポリペプチドに対するアゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質のスクリーニングを行うことができる。

【0183】標識したリガンドとしては、標識したリガンド、標識したリガンドアナログ化合物などを用いることができる。例えば、 $[^3\text{H}]$ 、 $[^{125}\text{I}]$ 、 $[^{14}\text{C}]$ 、 $[^{35}\text{S}]$ などで標識されたリガンドなどを用いることができる。

【0184】試験物質としてはいかなる物質も使用できるが、例えば、既知ペプチド、既知GPCRリガンド、既知蛋白質、組換え技術を用いて生産された組換え蛋白質、細胞抽出液や該抽出液由来の精製物、細胞培養上清や該上清由来の精製物、血清などの生体試料や該生体試料由来の精製物、微生物の菌体抽出液や該抽出液由来の精製物、微生物培養上清や該上清由来の精製物、既知化合物、コンビナトリアルケミストリーを用いて合成され

た化合物などを使用することができる。

【0185】本方法に用いる本発明のポリペプチドまたは部分ペプチドとしては、該ポリペプチドまたは部分ペプチドを含有するものであれば何れのものであってもよく、該ポリペプチドまたは部分ペプチドを含有する細胞から精製した該ポリペプチドまたは部分ペプチドでもよいし、該ポリペプチドまたは部分ペプチドを含有する細胞そのものまたはその細胞膜画分を用いてもよい。該ポリペプチドまたは部分ペプチドを含有する細胞を用いる場合、該細胞をグルタルアルデヒド、ホルマリンなどで固定化してもよい。

【0186】また、本発明のポリペプチドまたは部分ペプチドとしては、天然に存在するポリペプチドまたは部分ペプチド、あるいは遺伝子組換えの手法を用いて作製した組換えポリペプチドまたは組換え部分ペプチドのいずれでもよいが、(3)に記載の方法により、配列番号2で表される塩基配列を有するDNAに変異を導入して得られる変異DNAにコードされるポリペプチドのうち、構成的に活性型となった変異型ポリペプチドは特に有用である。

【0187】構成活性型に変異したGPCRについては(6-1)に記載したように、該変異GPCRでは、アゴニストとの親和性が増加する場合があることが知られていることから、構成活性型の変異GPCRはアゴニストの探索において有用である。アンタゴニストの探索には、普通はリガンドを使用する必要があるが、リガンドが不明のGPCR(オーファンGPCRと呼ばれる)の場合はリガンドを使用することができない。しかし、天然型または変異型の構成活性型GPCRを用いれば、リガンドがなくてもアンタゴニストの探索が可能になる。例えば、構成活性型GPCRポリペプチドを細胞に過剰に発現させた際に流れるシグナルやG蛋白質の活性化を抑制する物質を探索することにより、アンタゴニストを選択することが可能である。この際、アンタゴニストとともにGPCRの機能修飾物質も選択されうる。また、構成活性型GPCRポリペプチドを細胞に過剰に発現させた際に流れるシグナルやG蛋白質の活性化を増強する物質を探索することにより、アゴニストや機能修飾物質も選択することができる。

【0188】GPCRに変異が生じて構成活性型に変化したことが原因で起こる疾患が多数知られている〔日本臨床, 56, 1658 (1998)、日本臨床, 56, 1843 (1998)、日本臨床, 56, 1856 (1998)、日本臨床, 56, 1931 (1998)、Trends in Endocrinology and Metabolism, 9, 27 (1998)、Endocrinology, 137, 3936 (1996)〕。これらの構成活性型変異GPCRの活性を抑制できるアンタゴニスト(インバースアゴニストと呼ばれる)は、構成活性型変異GPCRが原因で起こる疾患の治療に有用である。アンタゴニストは、ニュートラルアンタゴニストとインバースアゴニストに分類される。インバースアゴニ

ストは構成活性型GPCRの活性を抑制することができるが、ニュートラルアンタゴニストは構成的活性を抑制することができない。構成活性型変異GPCRは、インバースアゴニストの探索に有用である。

【0189】上記方法に用いられる細胞膜画分は、上記(6-1)に記載した方法により調製することができる。

【0190】本発明のポリペプチドまたは部分ペプチドを発現する細胞としては、上記(4)に記載したように、該ポリペプチドをコードするDNAを含む組換え体DNAを適当な宿主細胞に導入して得られる形質転換細胞のように大量に該ポリペプチドを発現している細胞を用いることもできる。宿主細胞としては大腸菌、枯草菌、酵母などの微生物の他、昆虫細胞、カエルの卵母細胞、カエルのメラニン細胞、動物細胞、植物細胞などが用いられる。該形質転換細胞が発現する本発明のポリペプチドが高次構造を保ち、リガンドとの結合性を保持するためには、酵母、昆虫細胞、カエルの卵母細胞、カエルのメラニン細胞、動物細胞、植物細胞などで発現させるのが好ましい。酵母の変異株や改変G蛋白質を発現させた酵母などを宿主として利用することもできる〔Trends in Biotechnology, 15, 487 (1997)、Mol. Cell. Biol., 15, 6188 (1995)、Mol. Cell. Biol., 16, 4700 (1996)〕。

【0191】本発明のポリペプチドまたは部分ペプチドを含有する細胞やその細胞膜画分中のGPCRの量は、1細胞当たり $10^3 \sim 10^8$ 分子であるのが好ましく、 $10^5 \sim 10^7$ 分子であるのが好適である。なお、発現量が多いほど膜画分当たりのリガンド結合活性(比活性)が高くなり、高感度なスクリーニング系の構築が可能になるばかりでなく、同一ロットで大量の試料を測定できるようになる。

【0192】以下、具体例を示す。

【0193】本発明のポリペプチドまたは部分ペプチドの標品を、上記(6-1)に記載した方法により調製する。10 μ l \sim 10mlの該ポリペプチドまたは部分ペプチド標品に、試験物質と放射性同位元素(^3H 、 ^{125}I 、 ^{14}C 、 ^{35}S 、 ^{32}P など)で標識した一定の放射エネルギーのリガンドを共存させる。非特異的結合量(NSB)を知るために大過剰の未標識のリガンドを加えた反応チューブも用意する。反応は約0 \sim 50分、望ましくは約4 \sim 37分で、約20分 \sim 24時間、望ましくは約30分 \sim 3時間行なう。反応後、ガラス繊維濾紙等で濾過し、適量の同バッファーで洗浄した後、ガラス繊維濾紙に残存する放射活性を液体シンチレーションカウンターあるいは β -カウンターで計測する。全結合量(B)から非特異的結合量(NSB)を引いたカウント(B-NSB)が特異的結合量である。試験物質非存在下におけるリガンドの特異的結合量と、試験物質存在下におけるリガンドの特異的結合量を比較して、リガンドの特異的結合量を減少させ

る物質を本発明の受容体蛋白質のアゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質として選択することができる。

【0194】上記方法において、本発明のポリペプチドまたは部分ペプチドを含有する細胞として、本発明のポリペプチドを発現しない宿主細胞に該ポリペプチドまたは該部分ペプチドをコードするDNAをベクターDNAに組み込んだ組換え体DNAを導入して得られる該ポリペプチドまたは該部分ペプチドの大量発現細胞を用いることにより、本発明の受容体蛋白質のアゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質をより感度良く選択することができる。また、同宿主細胞にベクターのみを導入することによって得られる該ポリペプチドを発現しない細胞や、同宿主細胞に他のG蛋白質共役型受容体ポリペプチドの発現プラスミドを導入することによって得られる他のG蛋白質共役型受容体ポリペプチドの発現細胞を用いて同様の実験を行うことにより、取得したアゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質の本発明のG蛋白質共役型受容体ポリペプチドに対する特異性を調べることができる。

(II) GTP SのG蛋白質への結合量を測定する方法

上記(c)に示したように、本発明のポリペプチドを含有する細胞の膜画分に試験物質とリガンドを接触させ、標識したGTP SのG蛋白質(膜画分)への結合量を測定することにより、該GPCRのアゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質をスクリーニングすることができる〔Molecular Pharmacology, 47, 848-854 (1995)、W098/46995〕。

【0195】また、上記(f)に示したように、本発明のポリペプチドを含有する細胞の膜画分に試験物質を接触させ、標識したGTP SのG蛋白質(膜画分)への結合量を測定することにより、該ポリペプチドのアゴニストまたは機能修飾物質をスクリーニングすることができる〔Molecular Pharmacology, 47, 848-854 (1995)、W098/46995〕。

【0196】試験物質としてはいかなる物質も使用できるが、例えば、既知ペプチド、既知GPCRリガンド、既知蛋白質、組換え技術を用いて生産された組換え蛋白質、細胞抽出液や該抽出液由来の精製物、細胞培養上清や該上清由来の精製物、血清などの生体試料や該生体試料由来の精製物、微生物の菌体抽出液や該抽出液由来の精製物、微生物培養上清や該上清由来の精製物、既知化合物、コンビナトリアルケミストリーを用いて合成された化合物などを使用することができる。標識したGTP Sとしては、例えば ^{35}S で標識したGTP Sを用いることができる。

【0197】本発明のポリペプチドを含有する細胞または該細胞の膜画分としては、上記(I)に記載したものを使用することができる。

【0198】以下、具体例を示す。

【0199】本発明のポリペプチド標品を、上記(6-1)に記載した方法により調製する。

【0200】アゴニストのスクリーニングの際には、10 μ l ~ 10 ml の該ポリペプチド標品に、試験物質、放射性同位元素 (^{35}S など) で標識した一定の放射エネルギーの GTP、および GDP を共存させる。非特異的結合量 (NSB) を知る必要がある場合には、大過剰の未標識の GTP を加えた反応チューブを用意する。全結合量 (B) から非特異的結合量 (NSB) を引いたカウント (B - NSB) が特異的結合量である。反応は約 0 ~ 50 分、望ましくは約 4 ~ 37 分で、約 20 分 ~ 24 時間、望ましくは約 30 分 ~ 3 時間行なう。反応後、ガラス繊維濾紙等で濾過し、適量の同バッファーで洗浄した後、ガラス繊維濾紙に残存する放射活性を液体シンチレーションカウンターで計測する。GTP の膜画分への結合を増強する活性を有する物質を、本発明のポリペプチドのアゴニストまたは機能修飾物質として選択することができる。

【0201】アンタゴニストや機能修飾物質のスクリーニングの際には、10 μ l ~ 10 ml の上記ポリペプチド標品に、リガンド、試験物質、放射性同位元素 (^{35}S など) で標識した一定の放射エネルギーの GTP、および GDP を共存させて同様の実験を行う。試験物質非存在下における GTP の結合量と、試験物質存在下におけるリガンドの結合量を比較して、GTP の結合量を減少させる物質を本発明のポリペプチドのアンタゴニストまたは機能修飾物質として選択することができる。一方、GTP の結合量を増加させる物質を本発明のポリペプチドの機能修飾物質またはアゴニストとして選択することができる。

【0202】本発明のポリペプチドを含有する細胞として、本発明のポリペプチドを発現しない宿主細胞に該ポリペプチドをコードする DNA をベクターに組み込んだ組換え体 DNA を導入して得られる該ポリペプチドの大量発現細胞を用いることにより、本発明の受容体蛋白質のアゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質をより感度良く選択することができる。また、同宿主細胞にベクターのみを導入することによって得られる該ポリペプチドを発現しない細胞や、同宿主細胞に他の G 蛋白質共役型受容体ポリペプチドの発現プラスミドを導入することによって作製した他の G 蛋白質共役型受容体ポリペプチドの発現細胞を用いて同様の実験を行うことにより、取得したアゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質の本発明の G 蛋白質共役型受容体ポリペプチドに対する特異性を調べることができる。

(III) GTPase 活性を測定する方法

上記(d)に示したように、本発明のポリペプチドを含有する細胞の膜画分にリガンドと試験物質を接触させ、GTPase 活性を測定することにより、該ポリペプチ

ドのアゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質をスクリーニングすることができる [J. Biol. Chem., 271, 1857-1860 (1996)、WO98/46995]。

【0203】また、上記(e)に示したように、本発明のポリペプチドを含有する細胞の膜画分に試験物質を接触させ、GTPase 活性を測定することにより、該ポリペプチドのアゴニストまたは機能修飾物質をスクリーニングすることができる [J. Biol. Chem., 271, 1857-1860 (1996)、WO98/46995]。

【0204】試験物質としてはいかなる物質も使用できるが、例えば、既知ペプチド、既知GPCRリガンド、既知蛋白質、組換え技術を用いて生産された組換え蛋白質、細胞抽出液や該抽出液由来の精製物、細胞培養上清や該上清由来の精製物、血清などの生体試料や該生体試料由来の精製物、微生物の菌体抽出液や該抽出液由来の精製物、微生物培養上清や該上清由来の精製物、既知化合物、コンビナトリアルケミストリーを用いて合成された化合物などを使用することができる。

【0205】本発明のポリペプチドを含有する細胞または該細胞の膜画分としては、上記(1)に記載したものを使用することができる。

【0206】以下、具体例を示す。

【0207】本発明のポリペプチド標品を、上記(6-1)に記載した方法により調製する。

【0208】アゴニストのスクリーニングの際には、10 μ l ~ 10 ml の該ポリペプチド標品に、試験化合物、放射性同位元素 (^{32}P など) で標識した一定の放射エネルギーの GTP (例えば [^{32}P] GTP) を共存させる。反応は約 0 ~ 50 分、望ましくは約 4 ~ 37 分で、約 20 分 ~ 24 時間、望ましくは約 30 分 ~ 3 時間行なう。反応後、反応液の上清を回収し、放出された [^{32}P] Pi の放射活性を液体シンチレーションカウンターで計測する。反応液をガラス繊維濾紙等で濾過し、適量の同バッファーで洗浄した後、濾過液中の放射活性を液体シンチレーションカウンターで計測してもよい。GTPase 活性を増強する活性を有する物質を、本発明のポリペプチドのアゴニストまたは機能修飾物質として選択することができる。

【0209】アンタゴニストや機能修飾物質のスクリーニングの際には、10 μ l ~ 10 ml の該ポリペプチド標品に、リガンド、試験化合物、放射性同位元素 (^{32}P など) で標識した一定の放射エネルギーの GTP (例えば [^{32}P] GTP) を共存させて同様の実験を行う。試験物質非存在下における GTPase 活性と、試験物質存在下における GTPase 活性を比較して、GTPase 活性を減少させる物質を本発明のポリペプチドのアンタゴニストまたは機能修飾物質として選択することができる。一方、GTPase 活性を増加させる物質を本発明のポリペプチドの機能修飾物質またはアゴニストとして選択することができる。

【0210】本発明のポリペプチドを含有する細胞として、本発明のポリペプチドを発現しない宿主細胞に該ポリペプチドをコードするDNAをベクターに組み込んだ組換え体DNAを導入することによって得られる該ポリペプチドの大量発現細胞を用いることにより、本発明の受容体蛋白質のアゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質をより感度良く選択することができる。また、同宿主細胞にベクターのみを導入することによって得られる該ポリペプチドを発現しない細胞や、同宿主細胞に他のG蛋白質共役型受容体ポリペプチドの発現プラスミドを導入することによって得られる他のG蛋白質共役型受容体ポリペプチドの発現細胞を用いて同様の実験を行うことにより、取得したアゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質の本発明のG蛋白質共役型受容体ポリペプチドに対する特異性を調べることができる。

(IV) 細胞の応答を検出する方法

上記(e)に示したように、本発明のポリペプチドを発現する細胞にリガンドと試験物質を接触させ、該ポリペプチドの活性化を細胞の応答を指標として検出することにより、該ポリペプチドのアゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質をスクリーニングすることができる。

【0211】また、上記(h)に示したように、本発明のポリペプチドを発現する細胞に試験物質を接触させ、該ポリペプチドの活性化を細胞の応答を指標として検出することにより、該ポリペプチドのアゴニストまたは機能修飾物質をスクリーニングすることができる。

【0212】細胞の応答としては、例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca²⁺遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cAMP減少、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fos活性化、pHの低下、細胞増殖活性、メラニン色素の凝集または拡散などを測定する。また、レポーター系を用いて細胞の応答をモニターすることもできる。例えば、機能的な本発明のポリペプチドを発現する細胞に、該ポリペプチドの活性化により発現が誘導される遺伝子のプロモーター配列の下流に適切なレポーター遺伝子を連結したDNAを導入することにより、該ポリペプチドの活性化をレポーター遺伝子の発現で測定することができる。該プロモーターとしては、例えばICAM-1遺伝子のプロモーター、c-fosのプロモーター、Krox-24のプロモーターなどが利用できる。また、該プロモーターは、適当な転写因子の結合配列と基本プロモーターからなる人工プロモーターでもよい。転写因子の結合配列としては、例えばCRE、TRE、SRE、などが利用できる。レポーター遺伝子としては、クロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼ遺伝子、 β -グルクロニダーゼ遺伝子、 β -ガラクトシダーゼ遺伝子、 β -ラクタマーゼ遺伝子、ルシフェラーゼ遺伝子、エクオリン遺伝子および

グリーン・フルオロセセント・プロテイン遺伝子などが利用できる。

【0213】本発明のポリペプチドを発現する細胞としては、上記(4)に記載したように、該ポリペプチドをコードするDNAを含む組換え体DNAを適当な宿主細胞に導入して得られる形質転換細胞のように、大量に該ポリペプチドを発現している細胞を用いることもできる。該宿主細胞としては、大腸菌、枯草菌、酵母などの微生物の他、昆虫細胞、カエルの卵母細胞、カエルのメラニン細胞、動物細胞、植物細胞などが用いられる。該形質転換細胞が発現する本発明のポリペプチドが高次構造を保持し、リガンドとの結合性や機能性を保持するためには、酵母、昆虫細胞、カエルの卵母細胞、カエルのメラニン細胞、動物細胞、植物細胞などで発現させるのが好ましい。酵母の変異株や改変G蛋白質を発現させた酵母などを宿主として利用することもできる。

【0214】試験物質としてはいかなる物質も使用できるが、例えば、既知ペプチド、既知GPCRリガンド、既知蛋白質、組換え技術を用いて生産された組換え蛋白質、細胞抽出液や該抽出液由来の精製物、細胞培養上清や該上清由来の精製物、血清などの生体試料や該生体試料由来の精製物、微生物の菌体抽出液や該抽出液由来の精製物、微生物培養上清や該上清由来の精製物、既知化合物、コンビナトリアルケミストリーを用いて合成された化合物などを使用することができる。

【0215】以下具体例を示す。

アゴニストのスクリーニング方法

本発明のポリペプチドを発現する細胞をマルチウェルプレート等に培養する。必要に応じて新鮮な培地あるいは細胞に毒性を示さない適当なバッファーに交換し、試験物質を添加して一定時間インキュベートする。その後、細胞の応答(例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca²⁺遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fos活性化、pHの低下、メラニン色素の凝集または拡散、またはレポーター遺伝子の発現量などを促進する活性または抑制する活性など)を測定する。例えば、細胞の抽出液や上清を用いて、細胞の応答により生成した産物を常法に従って定量する。細胞刺激活性の指標とする物質(例えば、アラキドン酸など)の生成が、細胞が含有する分解酵素によって検定困難な場合は、該分解酵素に対する阻害剤を添加して定量してもよい。また、cAMP産生抑制などの活性については、フォルスコリンなどで細胞のcAMP産生量を増大させておいた細胞に対する産生抑制作用として検出することができる。細胞の応答を増強する活性を有する物質を、本発明のポリペプチドのアゴニストまたは機能修飾物質として選択することができる。

アンタゴニストまたは機能修飾物質のスクリーニン

本発明のポリペプチドを発現する細胞をマルチウェルプレート等に培養する。必要に応じて新鮮な培地あるいは細胞に毒性を示さない適当なバッファーに交換し、リガンドと試験物質を添加して一定時間インキュベートする。その後、上記と同様の方法により細胞の応答を測定する。試験物質非存在下における細胞応答と、試験物質存在下における細胞応答を比較して、細胞応答を減少させる物質を本発明のポリペプチドのアンタゴニストまたは機能修飾物質として選択することができる。一方、細胞応答を増加させる物質を本発明のポリペプチドの機能修飾物質またはアゴニストとして選択することができる。

【0216】本発明のポリペプチドを含有する細胞として、本発明のポリペプチドを発現しない宿主細胞に該ポリペプチドをコードするDNAをベクターに組み込んだ組換え体DNAを導入して得られる該ポリペプチドの大量発現細胞を用いることにより、本発明の受容体蛋白質のアゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質をより感度良く選択することができる。また、同宿主細胞にベクターのみを導入することによって得られる該ポリペプチドを発現しない細胞や、同宿主細胞に他のG蛋白質共役型受容体ポリペプチドの発現プラスミドを導入することによって得られる他のG蛋白質共役型受容体ポリペプチドの発現細胞を用いて同様の実験を行うことにより、取得したアゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質の本発明のG蛋白質共役型受容体ポリペプチドに対する特異性を調べることができる。

(6-5) 本発明のG蛋白質共役型受容体ポリペプチドのアゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質のスクリーニング用キット

本発明のポリペプチドのアゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質のスクリーニング用キットは、本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドもしくはそれらの塩、または本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドを含有する細胞または該細胞の膜画分を含有するものなどである。本発明のスクリーニング用キットとして、たとえば下記の試薬と測定法をあげることができる。

(a) スクリーニング用試薬

測定用緩衝液および洗浄用緩衝液

Hanks' Balanced Salt Solution (ギブコ社製) に、0.05% のウシ血清アルブミン (シグマ社製) を加えたもの。孔径 0.45 μm のフィルターで濾過滅菌し、4°C で保存するか、あるいは用時調製しても良い。

本発明のポリペプチド標品

本発明のポリペプチドを発現させたCHO細胞を、12穴プレートに 5×10^5 個/穴で継代し、5% CO₂、95% air インキュベーター中、37°C で2日間培養したもの。

標識リガンド

市販の [³H]、[¹²⁵I]、[¹⁴C]、[³⁵S] などで標識したリガンド。水溶液の状態のものを4°Cあるいは-20°Cにて保存し、用時に測定用緩衝液にて1 μmol/Lに希釈する。

リガンド標準液

リガンドを0.1%ウシ血清アルブミン (シグマ社製) を含むPBSで1 mmol/Lとなるように溶解し、-20°Cで保存する。

(b) 測定法

12穴組織培養用プレートにて培養した本発明のポリペプチド発現CHO細胞を、測定用緩衝液1 mlで2回洗浄した後、490 μlの測定用緩衝液を各穴に加える。

$10^{-3} \sim 10^{-10}$ mol/Lの試験物質溶液を5 μl加えた後、標識リガンドを5 μl加え、室温にて1時間反応させる。非特異的結合量を知るためには試験物質のかわりに 10^{-3} mol/Lのリガンドを5 μl加えておく。

反応液を除去し、1 mlの洗浄用緩衝液で3回洗浄する。細胞に結合した標識リガンドを溶解液 (0.2 mol/L NaOH、1% SDS) で溶解し、4 mlの液体シンチレーターA (和光純薬製) と混合する。

液体シンチレーションカウンター (ベックマン社製) を用いて放射活性を測定し、Percent Maximum Binding (PMB) を下記式で求める。

$$PMB = (B - NSB) \div B0 \times 100$$

PMB: Percent Maximum Binding

B: 検体を加えた時の値

NSB: Non-specific Binding (非特異的結合量)

B0: 最大結合量

上記(6-4)のスクリーニング方法または本スクリーニング用キットを用いて得られる物質またはその塩は、本発明のポリペプチドのアゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質である。該物質としては、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物などが挙げられ、これら物質は新規な物質であってもよいし、公知の物質であってもよいが、該公知物質は、本発明のアゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質には含まれない。本発明のポリペプチドに対するアゴニストは、本発明のポリペプチドに対するリガンドが有する生理活性と同様の作用を有しているため、該リガンド活性に応じて安全で低毒性な医薬組成物として有用である。逆に、本発明のポリペプチドに対するアンタゴニストは、本発明のポリペプチドに対するリガンドが有する生理活性を抑制することができるため、該リガンド活性を抑制する安全で低毒性な医薬組成物として有用である。また、本発明のポリペプチドの機能修飾物質は、本発明のポリペプチドに対するリガンドが有する生理活性を増強または抑制することができるため、該リガンド活性を増強または抑制する安全で低毒性な医薬組成物として有用である。

【0217】上記(6-4)のスクリーニング方法または本スクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩を上記の医薬組成物として使用する場合は、常法に従って製剤化することができる。例えば、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、該化合物またはその塩を生理学的に認められる担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などととも一般に認められた製薬実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な容量が得られるようにするものである。錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えば、ゼラチン、コーンスターチ、トラガント、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸などのような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンのよう

な甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのような香味剤などが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、前記タイプの材料にさらに油脂のような液状担体を含むことができる。注射のための無菌組成物は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などのような天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施にしたがって処方することができる。

【0218】注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液(例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなど)などが用いられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール(例えば、エタノール)、ポリアルコール(例えば、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール)、非イオン性界面活性剤(例えば、ポリソルベート80(TM)、HCO-50)などと併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油などが用いられ、溶解補助剤である安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。また、緩衝剤(例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液)、無痛化剤(例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど)、安定剤(例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど)、保存剤(例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど)、酸化防止剤などと配合してもよい。調整された注射液は通常、適当なアンプルに充填される。このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトや哺乳動物(例えば、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど)に対して投与することができる。該化合物またはその塩の投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法

などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に成人(60kgとして)においては、一日につき約0.1~100mg、好ましくは約1.0~50mg、より好ましくは約1.0~20mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形では通常成人(60kgとして)においては、一日につき約0.01~30mg程度、好ましくは約0.1~10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kgあたりに換算した量を投与することができる。

(7)本発明のDNAまたはオリゴヌクレオチドの利用
(7-1)本発明のポリペプチドをコードする染色体遺伝子の取得および該遺伝子の利用

(1)本発明のポリペプチドをコードする染色体遺伝子の取得

本発明のDNAまたはオリゴヌクレオチドをプローブとして、公知の方法〔東京大学医科学研究所 制癌研究部編、新細胞工学実験プロトコル、秀潤社(1993年)〕を用いて、本発明のポリペプチドをコードする染色体遺伝子および該遺伝子の発現制御領域を取得することが可能である。

【0219】また、本発明のポリペプチドをコードするヒトcDNAの配列と、公開されているデータベースに登録されているヒト染色体遺伝子の配列とを比較することにより、本発明のポリペプチドをコードするヒト染色体遺伝子を同定し、その構造を明らかにできる可能性がある。cDNAの配列と一致する染色体遺伝子配列が登録されていれば、本発明のDNAの配列と染色体遺伝子の配列を比較することにより、本発明のポリペプチドをコードする染色体遺伝子のエクソンおよびイントロン構造、ならびに該染色体遺伝子の発現制御領域(例えばプロモーター領域など)を決定することができる。

【0220】プロモーター領域としては、哺乳動物細胞において本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の転写に關与するすべてのプロモーター領域があげられる。具体的には、例えば、ヒトの視床、小脳、全脳、海馬、黒質、胎児脳、胎児腎、胎児肝臓、心臓、肝臓、乳腺、胎盤、前立腺、唾液腺、骨格筋、胸腺、甲状腺、子宮、ヒト大腸癌細胞、またはヒト胃癌細胞において、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の転写に關与するプロモーター領域をあげることができる。

【0221】上記プロモーター領域の具体的例としては、配列番号15に記載の塩基配列において塩基番号20202~25202番で表される塩基配列を有するDNA中、50~5000bpの連続した塩基配列を有するDNAをあげることができる。

(11)本発明のポリペプチドをコードする染色体遺伝子および該遺伝子の利用方法

下記(8)で示すように、該プロモーター領域は本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の転写を制御する物質のスクリーニングに有用である。また、該プロモーター領域の配列情報を用いて、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の転写を抑制するためのデコイDNA〔Nippon Rinsho - Japanese Journal of Clinical Medicine, 56, 563 (1998)、Circulation Research, 82, 1023 (1998)、Experimental Nephrology, 5, 429 (1997)、Nippon Rinsho - Japanese Journal of Clinical Medicine, 54, 2583 (1996)〕を作製することができる。(7-2)本発明のG蛋白質共役型受容体ポリペプチドをコードする遺伝子の転写産物量の測定ノーザンハイブリダイゼーション法(モレキュラー・クロニング第2版)、PCR法〔PCR Protocols, Academic Press (1990)〕、定量的PCR法〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 2725 (1990)〕、Real Time PCR法〔Juniko Stevens, 実験医学(増刊), 15, 46 (1997)〕等の方法により、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の転写産物量を測定することができる。特に、定量的PCR法やReal Time PCR法は定量性に優れている点で好ましい方法である。該転写産物を定量することにより、本発明のポリペプチドの発現異常に基づく疾患の診断が可能である。したがって、本発明のDNAまたはオリゴヌクレオチドは、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の転写産物を定量するための遺伝子診断剤として有用である。

(7-3)本発明のG蛋白質共役型受容体ポリペプチドをコードする遺伝子の変異および多型の検出GPCR遺伝子またはGPCR遺伝子の発現制御領域には変異や多型が存在することが知られている。例えば、GPCR遺伝子の変異によりGPCRの機能が不活性化または活性化し、各種の疾患が起こることが知られている〔日本臨床, 56, 1658 (1998)、日本臨床, 56, 1836 (1998)、日本臨床, 56, 1843 (1998)、日本臨床, 56, 1848 (1998)、日本臨床, 56, 1856 (1998)、日本臨床, 56, 1871 (1998)、日本臨床, 56, 1876 (1998)、日本臨床, 56, 1931 (1998)、Trends in Endocrinology and Metabolism, 9, 27 (1998)〕。また、GPCR遺伝子またはGPCR遺伝子の発現制御領域の変異によりGPCRの発現量が増加または低下し、各種の疾患が起こる場合もある。したがって、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子または該遺伝子の発現制御領域の変異を調べることにより、本発明の受容体蛋白質の機能の不活性化または活性化、あるいは本発明のポリペプチドの発現の増加または低下に基づく疾患の診断を行うことができる。

【0222】また、GPCR遺伝子やGPCR遺伝子の発現制御領域の多型により、GPCRの性質やGPCRの発現量が変化し、疾患の発症率や進展速度が異なることが知られている〔Cancer. Res., 59, 3561 (1999)、Ann. Rev. Immunol., 17, 657 (1999)、日本臨床, 56, 50

1871 (1998)〕。例えば、 β アドレナリン受容体の64番目のトリプトファンがアルギニンに置換した該変異受容体蛋白質を有する人では、肥満や糖尿病の発症率が高いことが知られている。したがって、本発明のG蛋白質共役型受容体ポリペプチドをコードする遺伝子または該遺伝子の発現制御領域の変異を調べることにより、本発明のポリペプチドの性質や発現量の変化に基づく疾患の発症率や進展速度の予測を行うことができる。

【0223】また、現在使用されている薬剤の多くはGPCRをターゲットとしたものであるが、GPCR遺伝子やGPCR遺伝子の発現制御領域の多型により、GPCRの性質やGPCRの発現量が変化し、薬剤への感受性が変化することが知られている〔Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 275, 1274 (1995)、J. Biol. Chem., 272, 1822 (1997)、Pharmacogenetics, 5, 318 (1995)、J. Biol. Chem., 274, 12670 (1999)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95, 9608 (1998)、Science, 286, 487 (1999)〕。したがって、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子または該遺伝子の発現制御領域の変異を調べることにより、本発明のポリペプチドの性質や発現量の変化に基づく薬剤の感受性の予測を行うことができる。

【0224】本発明のポリペプチドをコードする遺伝子または該遺伝子の発現制御領域の変異または多型の検出は、該遺伝子または該制御領域の塩基配列情報を用いて行うことができる。具体的には、サザンブロット法、ダイレクトシーケンス法、PCR法、DNAチップ法などを用いて遺伝子の変異や多型を検出することができる〔臨床検査, 42, 1507-1517 (1998)、臨床検査, 42, 1565-1570 (1998)〕。

【0225】本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドをコードするDNA、および本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の発現制御領域中の塩基配列を有するDNAを、プローブまたはプライマーとして使用することにより、ヒトまたは哺乳動物(例えば、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど)における本発明のポリペプチドをコードする遺伝子ならびに該遺伝子の発現制御領域の変異や多型を検出することができる。したがって、本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドをコードするDNA、および本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の発現制御領域中の塩基配列を有するDNAは、上記変異や多型を検出するための遺伝子診断剤として有用である。

(7-4)本発明のG蛋白質共役型受容体ポリペプチドの発現量または機能が亢進した疾患の治療剤アンチセンスRNA/DNA技術〔バイオサイエンスとインダストリー, 50, 322 (1992)、化学, 46, 681 (1991)、Biotechnology, 9, 358 (1992)、Trends in Biotechnology, 10, 87 (1992)、Trends in Biotechnology, 10, 152 (1992)、細胞工学, 16, 1463 (1997)〕、トリ

ブル・ヘリックス技術 [Trends in Biotechnology, 10, 132 (1992)]、リボザイム技術 [Current Opinion in Chemical Biology, 3, 274 (1999)、FEMS Microbiology Reviews, 23, 257 (1999)、Frontiers in Bioscience, 4, D497 (1999)、Chemistry & Biology, 6, R33 (1999)、Nucleic Acids Research, 26, 5237 (1998)、Trends In Biotechnology, 16, 438 (1998)]、あるいはデコイDNA法 [Nippon Rinsho - Japanese Journal of Clinical Medicine, 56, 563 (1998)、Circulation Research, 82, 1023 (1998)、Experimental Nephrology, 5, 4 29 (1997)、Nippon Rinsho - Japanese Journal of Clinical Medicine, 54, 2583 (1996)]を用いて任意の遺伝子の発現を抑制することができる。

【0226】例えば、上記(2)に記載の本発明のDNA、オリゴヌクレオチドまたはその誘導体を用いて、本発明のポリペプチドをコードするDNAの転写の抑制、あるいは本発明のポリペプチドをコードする転写産物の翻訳の抑制を行うことが可能である。すなわち、本発明のDNA、オリゴヌクレオチドまたはその誘導体を投与することにより、本発明のポリペプチドの生産を抑制することができる。

【0227】例えば、本発明のポリペプチドの発現増加または該ポリペプチドのリガンドの発現増加が原因で受容体を介した生理作用が亢進している患者がいる場合、本発明のDNA、オリゴヌクレオチドまたはその誘導体を患者に投与することにより、該生理作用を抑制することができる。すなわち、本発明のDNA、オリゴヌクレオチドまたはその誘導体は、本発明のポリペプチドの発現量または機能が亢進した疾患の治療剤として有用である。

【0228】本発明のDNA、オリゴヌクレオチドまたはその誘導体を上記治療剤として使用する場合は、本発明のDNA、オリゴヌクレオチドまたはその誘導体を単独あるいはレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルスアソシエートドウイルスベクターなどの適当なベクターに挿入した後、上記(6-5)に記載した常法に従って製剤化、処方および投与することができる。

(7-5)本発明のG蛋白質共役型受容体ポリペプチドの発現量または機能が低下した疾患の遺伝子予防・治療剤

本発明のポリペプチドをコードするDNAは、本発明のポリペプチドの発現量または機能が低下した疾患の遺伝子予防・治療剤などの医薬として使用することができる。例えば、本発明のポリペプチドの発現低下や変異のためにリガンドの生理作用が期待できない患者がいる場合に、(i)本発明のポリペプチドをコードするDNAを該患者に投与し発現させることによって、あるいは(ii)対象となる細胞に本発明のポリペプチドをコードするDNAを挿入し発現させた後に、該細胞を該患者に

移植することなどによって、患者の体内における本発明のポリペプチドの量を増加させ、リガンドの作用を十分に発揮させることができる。したがって、本発明のポリペプチドをコードするDNAは、本発明のポリペプチドの発現量または機能が低下した疾患に対して安全で低毒性な遺伝子予防・治療剤として有用である。

【0229】本発明のポリペプチドをコードするDNAを上記予防・治療剤として使用する場合は、本発明のDNAを単独あるいはレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルスアソシエートドウイルスベクターなどの適当なベクターに挿入した後、上記(7-4)に記載した常法に従って製剤化、処方および投与することができる。

(7-6)本発明のG蛋白質共役型受容体ポリペプチドをコードする遺伝子の転写または翻訳を制御する物質のスクリーニング方法

本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の転写過程、あるいは転写産物からタンパク質への翻訳過程を促進または抑制する化合物は、該ポリペプチドの発現を制御することにより、該ポリペプチドを介して発揮される細胞機能を制御することが可能である。したがって、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の転写過程、あるいは転写産物からタンパク質への翻訳過程を促進または抑制する化合物は、本発明のポリペプチドに対するリガンドが有する生理活性を増強または抑制することができるので、該リガンドの活性を増強または抑制する安全で低毒性な医薬組成物として有用である。

【0230】該化合物は、以下(a)~(c)に示す方法により取得できる。

(a) [i] 本発明のポリペプチドを発現する細胞と、[ii] 試験物質の存在下、本発明のポリペプチドを発現する細胞を、上記(4)に記載の培養法で2時間から1週間培養後、細胞中の該ポリペプチド量を、上記(5)に記載した本発明の抗体を用いて測定、比較し、該ポリペプチド量を増加または低下させる活性を有する化合物を選択し取得する方法。

【0231】本発明の抗体を用いた測定法としては、例えば、マイクロタイタープレートを用いるELISA法、蛍光抗体法、ウェスタンブロット法、免疫組織染色等を用いた検出法をあげることができる。

(b) [i] 本発明のポリペプチドを発現する細胞と、[ii] 試験物質の存在下、本発明のポリペプチドを発現する細胞を、上記(4)に記載の培養法で2時間から1週間培養後、細胞中の該ポリペプチドをコードするDNAの転写産物量を、上記(7-2)に記載したノーザンハイブリダイゼーション法またはPCR法等の方法を用いて測定、比較し、該転写産物量を増加または低下させる活性を有する化合物を選択し取得する方法。

(c) 上記(7-2)で取得したプロモーターの下流にレポーター遺伝子を連結したDNAを組み込んだプラス

ミドを公知の方法により作製し、上記(5)に記載の方法に準じて動物細胞に導入し、形質転換体を取得する。
 [i] 該形質転換体と、[ii] 試験物質の存在下、該形質転換体を、上記(5)に記載の培養法で2時間から1週間培養し、細胞中のレポーター遺伝子の発現量を公知の方法〔東京大学医科学研究所 制癌研究部編、新細胞工学実験プロトコル、秀潤社(1993)、Biotechniques, 20, 914 (1996)、J. Antibiotics, 49, 453 (1996)、Trends in Biochemical Sciences, 20, 448 (1995)、細胞工学, 16, 581 (1997)〕を用いて測定、比較し、該発現量を増加または低下させる活性を有する化合物を選択・取得する方法。

【0232】レポーター遺伝子としては、例えば、クロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼ遺伝子、 β -グルクロニダーゼ遺伝子、 β -ガラクトシダーゼ遺伝子、 β -ラクタマーゼ遺伝子、ルシフェラーゼ遺伝子、エクオリン遺伝子またはグリーン・フルオレセント・プロテイン(GFP)遺伝子等をあげることができる。

(7-7) 本発明のDNAが欠損または置換した動物の作製

本発明のDNAが欠損または置換した動物は、本発明のDNAを含む遺伝子の全部または一部が欠損または置換しており、本発明のポリペプチドの発現量が変化した動物である。該動物、または該動物の臓器、組織または細胞は、上記の方法により取得される医薬、例えば、大腸癌、胃癌または視床、小脳の機能異常等の疾患の治療薬の評価に用いることができ、薬剤評価モデル動物、臓器、組織または細胞として有用である。

【0233】該動物は、本発明のDNAを含むベクターを用い、目的とする動物、例えばウシ、ヒツジ、ヤギ、ブタ、ウマ、ニワトリ、マウス等の非ヒト哺乳動物の胚性幹細胞(embryonic stem cell)において染色体上の本発明のポリペプチドをコードするDNAを公知の相同組換えの手法〔例えば、Nature, 326, 295 (1987)、Cell, 51, 3, 503 (1987)等〕により不活化または任意の配列と置換した変異胚性幹細胞クローンを作成することができる〔Nature, 350, 243 (1991)〕。

【0234】このようにして作成した胚性幹細胞クローンをを用い、動物の受精卵の胚盤胞(blastocyst)への注入キメラ法または集合キメラ法等の手法により胚性幹細胞クローンと正常細胞からなるキメラ個体を作成することができる。このキメラ個体と正常個体の掛け合わせにより、全身の細胞の染色体上の本発明のポリペプチドをコードするDNAに任意の変異を有する個体を得ることができ、さらにその個体の掛け合わせにより相同染色体の双方に変異が入った、ホモ個体(ノックアウト動物)を得ることができる。

【0235】このようにして動物個体において、染色体上の本発明のポリペプチドをコードするDNAの任意の

位置へ変異の導入が可能である。例えば染色体上の本発明のポリペプチドをコードするDNAの翻訳領域中への塩基の欠失、置換若しくは付加等の変異を導入することにより、その産物の活性を変化させることができる。

【0236】またその発現制御領域への同様な変異の導入により、発現の程度、時期、組織特異性等を改変させることも可能である。さらにCre-loxP系との組合せにより、より積極的に発現時期、発現部位、発現量等を制御することも可能である。

【0237】このような例としては脳のある特定の領域で発現されるプロモーターを利用して、その領域でのみ目的遺伝子を欠失させた例〔Cell, 87, 1317 (1996)〕やCreを発現するアデノウィルスを用いて、目的の時期に、臓器特異的に目的遺伝子を欠失させた例〔Science, 278, 5335 (1997)〕が知られている。

【0238】従って染色体上の本発明のポリペプチドをコードするDNAについてもこのように任意の時期や組織で発現を制御できる、または任意の塩基の欠失、置換若しくは付加をその翻訳領域や、発現制御領域に有する動物個体を作成することが可能である。

【0239】このような動物は任意の時期、任意の程度または任意の部位で、本発明のポリペプチドに起因する種々の疾患、例えば、癌や視床または小脳の機能異常等の症状を誘導することができる。

【0240】従って、本発明のノックアウト動物は、本発明のポリペプチドに起因する種々の疾患、例えば、癌や視床または小脳の機能異常等の治療や予防において極めて有用な動物モデルとなる。特にその治療薬、予防薬、また機能性食品、健康食品等の評価用モデルとして非常に有用である。

【0241】

【実施例】以下の実施例中に記載の方法については、とくに断らない限り、モレキュラー・クローニング第二版記載の方法に従って行った。

実施例1 新規G蛋白質共役型受容体(KATO6734Lポリペプチド)をコードするcDNAのクローニング(1) KATOIII細胞由来cDNAライブラリーの作製
 ヒト胃癌組織細胞株 KATOIIIから、mRNAを抽出し、精製した。それぞれのpolyA(+)RNAよりオリゴキャップ法〔Gene, 138, 171 (1994)〕によりcDNAライブラリーを作成した。Oligo-cap linker(配列番号3で表される塩基配列を有するDNA)およびOligo dT primer(配列番号4で表される塩基配列を有するDNA)を用いて、蛋白質核酸酵素, 41, 197 (1996)、Gene, 200, 149 (1997)記載の方法に従ってBAP(Bacterial Alkaline Phosphatase)処理、TAP(Tobacco Acid Pyrophosphatase)処理、RNAライゲーション、第一鎖cDNAの合成とRNAの除去を行った。次いで、配列番号5で表される塩基配列を有するDNA(5'末端側)と配列番号6で表される塩基配列を有するDNA(3'末端側)をプライマ

ーセットとして用いたPCRにより2本鎖cDNAに変換した後、制限酵素SfiIで切断した。該cDNAをDraIIIで切断したベクターpME18SFL3 (GenBank accession no. AB009864, Expression vector, 3392 bp) に組み込み、cDNAライブラリーを作製した。上記方法により、cDNAは発現が可能なように一方向に組み込まれる。

(2) ランダムシークエンス

上記(1)で調製したcDNAライブラリーの各大腸菌クローンから常法に従ってプラスミドDNAを取得し、各プラスミドが含有するcDNAの5'末端側の塩基配列を決定した。塩基配列の決定は、Dye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit, dRhodamine Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction KitまたはBigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (PE Biosystems社製) とDNAシークエンサー・ABI PRISM 377 (PE Biosystems社製) を用いて行った。塩基配列決定用のプライマーとしては、配列番号7および8で表される塩基配列を有するDNAを使用した。

【0242】得られた塩基配列についてはBlast、Fast a、FrameSearch等のプログラムを利用して、相同性のある遺伝子や蛋白質の解析を行った。その結果、pME-KAT06734と名づけたプラスミドが含有するcDNA (KAT06734 cDNAと呼ぶ) は、ヒトバソプレッシン受容体やヒト黄体形成ホルモン放出ホルモン受容体と相同性を有する蛋白質をコードしていることがわかった。

(3) KAT06734 cDNAの全塩基配列の決定
上記(2)で得られたpME-KAT06734が含有するcDNA (KAT06734 cDNA) の3'末端側の塩基配列も決定し、該cDNAの全塩基配列を決定した。塩基配列の決定には、パーキンエルマー社のDNAシークエンサー377とApplied Biosystems社製の反応キット (ABI Prism™ BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit) を使用した。

【0243】KAT06734 cDNAは880bpで、143アミノ酸からなるポリペプチドをコードしていた (配列番号19)。相同性解析およびヒドロパシー解析から、本cDNAのコードする蛋白質は、C末端を欠失した新規GPCRであると考えられた。

(4) ヒト視床からの完全長cDNA (KAT06734L cDNA) の取得

ヒト胃癌細胞株KATOIIIおよび大腸癌細胞株Colo205由来の全RNAを鋳型として3'-RACE法を行うことにより、KAT06734 cDNAで欠失していた3'末端側のcDNA断片を取得した。3'-RACE法には、5'/3' RACE キット (ベーリンガー社製) を用い、配列番号9で表される塩基配列を有するDNA (図7の06734-5-1) をKAT06734 cDNA特異的プライマーとして用いた。3'-RACE法で取得したcDNA断片の

配列を決定し、KAT06734 cDNAの配列と連結した配列 (KAT06734-3') を作成した (図11~13参照)。本配列においては、途中でOpen Reading Frameがずれてしまうことから、再度PCRにより全長cDNAの取得を試みることにした。その際、癌細胞株ではプライミング異常がある可能性が考えられたため、cDNAソースとしてはヒト正常組織 (ヒト視床) を用いた。

【0244】下記の実施例4の方法で調製したヒト視床由来の1本鎖cDNAを鋳型として、配列番号11で表される塩基配列を有するDNA (図7の06734SP5) と配列番号12で表される塩基配列を有するDNA (図10の06734-3-3) をプライマーセットとして用いてPCRを行い、新たなcDNA断片を取得した。PCR反応は、実施例4の(a)で合成したヒト視床由来の1本鎖cDNA (6.25μl) に、Forwardプライマー (配列番号11に記載のDNA) を10pmol、Reverseプライマー (配列番号12に記載のDNA) を10pmol、2.5mmol/L dNTP混合液を2.5μl、5単位/μlのTakara Ex Taq™ (Takara社製) を0.1μl、10×反応緩衝液 (Takara社製) を2.5μl添加し、滅菌水を加えて全量を25μlに調製した。サーマルサイクラーDNA engine (MJ Research社製) を用い、955分間の熱処理によりDNAを変性させた後、96で15秒間、68で1分48秒間からなる反応を35サイクル行った。その後、さらに72で10分間反応を行った。

【0245】上記PCRで増幅したcDNA断片の配列を、ABI Prism™ BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (PE Applied Biosystems社製) を用いたダイレクトシークエンスにより決定した。プライマーとしては、配列番号9、11、12で表される塩基配列を有するDNA、および配列番号18で表される塩基配列を有するDNA (図9の06734-3-2) を使用した。決定した塩基配列と、KAT06734 cDNAの5'末端側配列およびKAT06734-3'の3'末端側配列とを連結した配列を作成した (図7~10参照)。本合成配列を有するcDNAをKAT06734L cDNAと呼び、その塩基配列を配列番号2に示す。本cDNAは371アミノ酸の蛋白質をコードしていた (図7~10参照)。該アミノ酸配列を有するポリペプチドをKAT06734Lポリペプチドと呼び、そのアミノ酸配列を配列番号1に示した。

【0246】ヒドロパシープロフィールから、該ポリペプチドは7つの膜結合領域を有すると考えられた (図1)。膜結合領域部分の具体的な予測はEMBO J., 12, 1693 (1993) に記載の方法に従って行った。

【0247】該ポリペプチドは、アミノ酸レベルで既知のG蛋白質共役型受容体と相同性を有していたが、中で

もヒトバソプレッシン1A受容体、ヒトバソプレッシン1B受容体、ヒトバソプレッシン2受容体、ヒトオキシトシン受容体、ヒト黄体形成ホルモン放出ホルモン受容体、ホワイトサッカーのバソトシン受容体と高い相同性を示した。KAT06734Lポリペプチドと上記既知G蛋白質共役型受容体のアミノ酸配列を用いて作成したデンドログラムを図14に示す。デンドログラムは、CLUSTAL X Multiple Sequence Alignment Program (<ftp://ftp-igbmc.u-strasbg.fr/pub/ClustalX/>)を用いて作成した。同プログラムを用いて、KAT06734Lポリペプチドと上記既知GPCRのアミノ酸配列をアラインメントした結果を図2~6に示す。KAT06734Lポリペプチド中の予想される7つの膜貫通領域(TM1~TM7)を下線で示してある。

【0248】KAT06734Lポリペプチドはアミノ酸レベルで、ヒトバソプレッシン1A受容体と24.8%、マウスバソプレッシン1A受容体と26.4%、ヒトバソプレッシン1B受容体と27.8%、ヒトバソプレッシン2受容体と22.9%、ヒトオキシトシン受容体と25.6%、ヒト黄体形成ホルモン放出ホルモン受容体と19.0%、ホワイトサッカーのバソトシン受容体と26.7%の相同性を示した。

【0249】以上の結果から、該ポリペプチドは新規なG蛋白質共役型受容体であることが明らかになった。ヒトおよびマウスのバソプレッシン1A受容体、ヒトバソプレッシン1B受容体、ヒトバソプレッシン2受容体、ヒトオキシトシン受容体、ヒト黄体形成ホルモン放出ホルモン受容体、ホワイトサッカーのバソトシン受容体の天然リガンドはいずれもペプチドであることから、該新規G蛋白質共役型受容体のリガンドもペプチドであると推定された。また、該新規G蛋白質共役型受容体は上記既知G蛋白質共役型受容体と19.0~27.8%の相同性を示すことから、該新規G蛋白質共役型受容体のリガンドは、上記既知G蛋白質共役型受容体のリガンドとは異なると推定された。

実施例2 KAT06734Lポリペプチドのヒト培養細胞株における発現

(1) pBS-KAT06734Lの造成

下記の実施例4の方法で調製したヒト視床由来の1本鎖cDNAを鋳型として、配列番号13で表される塩基配列を有するDNA(図7の06734-F)と配列番号14で表される塩基配列を有するDNA(図9の06734-R)をプライマーセットとして用いてPCRを行い、KAT06734LポリペプチドをコードするcDNA断片を取得した。PCR反応は、後述の実施例4の(a)で合成したヒト視床由来の一本鎖cDNA(6.25μl)に、Forwardプライマー(配列番号13で表される塩基配列を有するDNA)を10pmol、Reverseプライマー(配列番号14で表される塩基配列を有するDNA)を10pmol、2.5mmol/L dNTP

混合液を2.5μl、5単位/μlのTakara Ex Taq™(Takara社製)を0.1μl、10×反応緩衝液(Takara社製)を2.5μl添加し、滅菌水を加えて全量を25μlに調製した。サーマルサイクラーDNA engine(MJ Research社製)を用い、95℃で5分間、熱処理によりDNAを変性させた後、94℃で30秒間、65℃で1分間、72℃で2分間からなる反応を1サイクルとして、35サイクル行った。その後、さらに72℃で10分間反応を行った。

【0250】該cDNA断片を制限酵素HindIIIとXbaIで切断後、1.1kbのHindIII-XbaI断片を取得した。また、pBluescript II SK(+)を制限酵素HindIIIとXbaIで切断後、3.0kbのHindIII-XbaI断片を取得した。上記2断片を結合することにより、pBS-KAT06734Lを造成した。PCR増幅断片にエラーのないことはシーケンスにより確認した。pBS-KAT06734Lを含む大腸菌であるEscherichia coli DH5α/pBS-KAT06734Lは、平成11年12月8日付で工業技術院生命工学工業技術研究所にFERMBP-6967として寄託されている。

(2) KAT06734Lポリペプチド発現用プラスミドpAMo-KAT06734Lの造成

上記(1)で造成したpBS-KAT06734Lを制限酵素HindIIIとNotIで切断後、1.1kbのHindIII-NotI断片を取得した。また、pAMo[J. Biol. Chem., 268, 22782 (1993)]、別名pAMoPRC3Sc(特開平05-336963)を制限酵素HindIIIとNotIで切断後、8.7kbのHindIII-NotI断片を取得した。上記2断片を結合することにより、pAMo-KAT06734Lを造成した。

(3) KAT06734Lポリペプチドのヒト培養細胞株における発現

コントロールプラスミド(pAMo)およびKAT06734Lポリペプチド発現用プラスミド(pAMo-KAT06734L)を、それぞれ1μg/μlになるようにTEに溶解した後、エレクトロポレーション法[Cytotechnology, 3, 133 (1990)]によりNalwa KJM-1細胞[Cytotechnology, 1, 151(1988)]に導入し、形質転換細胞を得た。

【0251】1.6×10⁶細胞あたり4μgのプラスミドを導入した後、8mlのRPMI1640・ITPSG培地[7.5% NaHCO₃を1/40量、200mmol/L L-グルタミン溶液(GIBCO社製)を3%、ペニシリン・ストレプトマイシン溶液(GIBCO社製、5000 units/ml ペニシリン、5000 μg/ml ストレプトマイシン)を0.5%、10mmol/LN-2-ヒドロキシエチルピペラジン-N'-2-エタン sulfonick・アシッド(N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-hydroxypropane-3-sulfonic acid; HEPES)、

3 µg/ml インシュリン、5 µg/ml トランスフェリン、5mmol/L ピルビン酸ナトリウム、125nmol/L 亜セレン酸ナトリウム、1mg/ml ガラクトースを添加した R P M I 1 6 4 0 培地 (日水製薬社製) に懸濁し、CO₂ インキュベーターで37 で24時間培養した。その後、G418 (ギブコ社製) を0.5mg/mlになるように添加し、さらに14日間培養して安定形質転換株を取得した。該形質転換株は、0.5mg/mlのG418を含む R P M I 1 6 4 0 ・ I T P S G 培地で継代した。

【0252】該安定形質転換株またはその膜画分は、上記(6-1)に記載した方法に準じて、K A T 0 6 7 3 4 L ポリペプチド (新規G蛋白質受容体) のリガンド、アゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質の探索にも利用することができる。

実施例3 K A T 0 6 7 3 4 L 染色体遺伝子の構造解析
本発明のK A T 0 6 7 3 4 L cDNAの配列と、データベースに登録されてるヒト染色体遺伝子の配列とを比較することにより、本発明のK A T 0 6 7 3 4 L ポリペプチドをコードするヒト染色体遺伝子 (K A T 0 6 7 3 4 L 染色体遺伝子と呼ぶ) を同定し、そのプロモーター領域、エクソンおよびイントロン構造を下記の方法により決定した。

【0253】K A T 0 6 7 3 4 L cDNAの塩基配列 (配列番号2) とGenBank [インターネット上のNational Center for Biotechnology Information (NCBI) のホームページ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) からアクセスできる] に登録されている配列とを比較した結果、登録番号AC005493、AC005680、AC005174、AC005862、AC005853のヒト染色体DNA配列の一部が、K A T 0 6 7 3 4 L cDNAの塩基配列の一部と一致することが判明した。解析の結果、K A T 0 6 7 3 4 L 染色体遺伝子は9個のエクソンと8個のイントロンから構成される非常に大きな遺伝子であることが明らかとなった。AC005493とAC005680の配列はつながり、エクソン1とエクソン2を含んでいた (配列番号15で表される塩基配列を有するDNA)。AC005174、AC005862、およびAC005853の配列はつながり、エクソン3~9を含んでいた (配列番号16で表される塩基配列を有するDNA)。エクソン1の上流配列 (1~5 kb) は、K A T 0 6 7 3 4 L 染色体遺伝子のプロモーター領域 (転写制御領域を含む) と考えられた。登録番号AC005680の配列は、ヒト染色体7p14-15に位置することから、K A T 0 6 7 3 4 L 染色体遺伝子はヒト染色体7p14-15に位置することが判明した。K A T 0 6 7 3 4 L 染色体遺伝子の染色体上の位置と構造 (プロモーター領域、エクソン領域、イントロン領域) は、本研究によってK A T 0 6 7 3 4 L cDNAの構造が明らかになることにより、初めて特定できたものである。

【0254】エクソン1の上流配列 (5 kb) について、配列解析ソフトGENETYX-MAC 10.1のTranscription

Factor Database [Nucleic Acids Research 18, 1749 (1990)、Trends in Biochemical Sciences 16, 455(1991)、Nucleic Acids Research 20S, 2091 (1992)、Nucleic Acids Research 21S, 3117 (1993)] をもとに作成されたMotif Search Programを用いて、転写因子の結合配列のコンセンサス配列の存在について解析した結果、該配列はプロモーター領域を有する配列であると判断された。

【0255】K A T 0 6 7 3 4 L cDNA、K A T 0 6 7 3 4 cDNA、およびK A T 0 6 7 3 4 L-3'の塩基配列、ならびにK A T 0 6 7 3 4 L 染色体遺伝子と比較した結果、K A T 0 6 7 3 4 cDNAとKATOIII細胞から3'-RACE法で取得したDNA断片は、スプライシングの異常によって生じたバリエーションと考えられた。

実施例4 K A T 0 6 7 3 4 L 染色体遺伝子からの転写産物のヒト各種細胞における発現量の検討

K A T 0 6 7 3 4 L 染色体遺伝子からの転写産物 (K A T 0 6 7 3 4 L 転写産物と呼ぶ) の定量は、常法 [PCR Protocols, Academic Press(1990)] にしたがって半定量的PCR法により行った。

【0256】また、どの細胞でも同程度発現していると考えられる - アクチンの転写産物の定量も同時に行い、細胞間でのmRNA量の違いや、サンプル間での逆転写酵素によるmRNAから一本鎖cDNAへの変換効率に大差ないことを確認した。

【0257】 - アクチン転写産物の定量は、常法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 2725 (1990)、J. Biol. Chem., 269, 14730 (1994)、特開平06-181759] にしたがって定量的PCR法により行った。

(a) 各種細胞および細胞株由来の一本鎖cDNAの合成

ヒト細胞株としては、T細胞株 (Jurkat, Molt-3, Molt-4, HUT78)、B細胞株 (Namalwa KJM-1, Daudi, Raji)、顆粒球/単球系細胞株 (HL-60, U-937, THP-1)、血管内皮細胞株 (IVEC, HUVEC)、メラノーマ細胞株 (WM266-4, WM115)、神経芽細胞腫細胞株SK-N-MC、肺癌細胞株 (PC-9, HLC-1, QG90)、前立腺癌細胞株PC-3、胃癌細胞株KATOIII、膵臓癌細胞株 (Capan-1, Capan-2)、大腸癌細胞株 (Colo205, SW1116, LS180) を用いた。Jurkat, QG90およびSW1116は愛知癌センターより入手した。HLC-1は大阪大学癌研究所より入手した。KATOIIIおよびPC-9は免疫生物研究所より入手した。HUVEC (human umbilical vascular endothelial cell) はクラボ社より入手した。IVEC [J. Cell. Physiol., 157, 41 (1993)] はN. T. L. FRANCE社より入手した。Molt-4, DaudiはJapanese Collection of Research Bioresources (JCRB) cell bank [インターネットアドレス<http://cellbank.nih.go.jp/>] より入手した。それ以外の細胞は、アメリカン・タイプ・カルチャ

ー・コレクション (American Type Culture Collection) より入手した。

【0258】また、健康な成人の末梢血より Polymorph rep™ (Nycomed Pharma社製) を用いて多形核白血球と単核球を分離取得した。次いで、取得した単核球から NyronFiber (和光純薬社製) を用いてT細胞を取得した。方法はNyron Fiberの説明書に従った。J. Immunol., 150, 1122 (1993)に記載の方法に従って、取得したT細胞を以下の3種の条件で培養し、活性化T細胞を取得した。

10% FCSを含むRPMI 1640培地を用いて 1×10^6 細胞/mlでシードしたT細胞に、50 ng/mlのインターロイキン2 (IL-2)、1 μ g/mlのphytohemagglutinin-P (PHA-P)、および5 ng/mlのトランスフォーミング・グロース・ファクター (TGF- β) を添加し、2日間、4日間、6日間、または8日間培養後、細胞を回収した。

10% FCSを含むRPMI 1640培地を用いて 1×10^6 細胞/mlでシードしたT細胞に、50 ng/mlのIL-2と1 μ g/mlのPHA-Pを添加し、4日間、6日間、または8日間培養後、細胞を回収した。

抗CD3抗体をコートした培養容器に、10% FCSを含むRPMI 1640培地を用いて 1×10^6 細胞/mlでT細胞をシードし、50 ng/mlのIL-2の存在下、2日間、4日間、6日間、または8日間培養後、細胞を回収した。

【0259】各細胞の全RNAは常法 [Biochemistry, 18, 5294 (1977)] にしたがって調製した。全RNAから一本鎖cDNAの合成はキット (SUPERSCRIP™ Pre-amplification System; BRL社製) を用いて行った。細胞株については5 μ gの全RNAから一本鎖cDNAを合成し、それぞれ水で50倍希釈してPCRの鋳型として使用した。プライマーとしては、オリゴ(dT)プライマーを用いた。

【0260】また、ヒト各種臓器由来のmRNA (Clontech社製) から同様にして一本鎖cDNAを合成した。1 μ gのmRNAから一本鎖cDNAを合成し、水で240倍希釈してPCRの鋳型として使用した。プライマーとしては、オリゴ(dT)プライマーを用いた。mRNAとしては、以下の35種類の臓器由来のmRNAを使用した。1 副腎、2 脳、3 尾状核、4 海馬、5 黒質、6 視床、7 腎、8 膵臓、9 脳下垂体、10 小腸、11 骨髄、12 扁桃腺、13 小脳、14 脳梁、15 胎児脳、16 胎児腎、17 胎児肝臓、18 胎児肺、19 心臓、20 肝臓、21 肺、22 リンパ節、23 乳腺、24 胎盤、25 前立腺、26 唾液腺、27 骨格筋、28 脊髄、29 脾臓、30 胃、31 精巣、32 胸腺、33 甲状腺、34 気管、35 子宮。

(b) 定量的PCR用のスタンダードおよび内部コントロールの調製

pBS-KAT06734LをcDNA部分を切り出す制限酵素HindIIIとNotIで切断して直鎖状DNAに変換した後、酵母のトランスファーRNAを1 μ g/mlで含む水で段階的に希釈して、定量用のスタンダードとして用いた。

【0261】また、 α -アクチンをコードするcDNAを含有するpUC119-ACT、および β -アクチンをコードするcDNAの一部を欠損させたcDNAを含有するpUC119-ACTdのそれぞれのcDNA部分を制限酵素HindIIIとAsp718で切断して直鎖状DNAに変換した後、酵母のトランスファーRNAを1 μ g/mlで含む水で段階的に希釈して、それぞれ α -アクチンの転写産物定量用のスタンダードおよび内部コントロールとして用いた [J. Biol. Chem., 269, 14730 (1994)、特開平06-181759]。

(c) PCR法を用いたKAT06734L転写産物の定量 (a) で調製した各種組織および細胞株由来の一本鎖cDNAを鋳型としてPCRを行った。PCRには、配列番号9 (図7の0634-5') および配列番号17 (図8の06734-3') で表される塩基配列を有するDNAをプライマーセットとして用いた。また、上記(b) で作製したスタンダードを鋳型として同様にPCRを行うことにより検量線を作製した。

【0262】PCR反応は、(a) で合成した一本鎖cDNA (5 μ l) に、Forwardプライマー(配列番号9に記載のDNA)を10 pmol、Reverseプライマー(配列番号17に記載のDNA)を10 pmol、2.5 mmol/L dNTP混合液を1.6 μ l、ジメチルスルフォキシドを1 μ l、5単位/ μ lのRecombinant Taq DNA Polymerase (Takara社製)を0.1 μ l、10 \times 反応緩衝液 (Takara社製)を2 μ l添加し、滅菌水を加えて全量を20 μ lに調製した。サーマルサイクラーDNA engine (MJ Research社製)を用い、94 $^{\circ}$ Cで3分間の熱処理によりDNAを変性させ後、94 $^{\circ}$ Cで1分間、60 $^{\circ}$ Cで1分間、72 $^{\circ}$ Cで1分間からなる反応を1サイクルとして25~35サイクル行った。該反応液の一部(8 μ l)をアガロースゲル電気泳動に供した後、ゲルをSYBR Green I nucleic acid stain (Molecular Probes社)で染色した。増幅されたDNA断片のパターンをフルオロイメージャー (FluorImager SI; Molecular Dynamics社製)で解析することにより、増幅されたDNA断片の量を測定した。より正確な転写産物の定量を行なうため、PCRのサイクル数を変えて同様のPCRを行った。スタンダードの量はPCRのサイクル数に応じて変化させた。

【0263】 α -アクチンの転写産物の定量についてはJ. Biol. Chem., 269, 14730 (1994)および特開平06-181759に記載の方法と同様に行った。

【0264】KAT06734L転写産物は、ヒト正常組織では視床と小脳で比較的多く発現していた。全脳、

海馬、黒質、胎児脳、胎児腎、胎児肝臓、心臓、肝臓、乳腺、胎盤、前立腺、唾液腺、骨格筋、胸腺、甲状腺、子宮でも発現が見られた(図15)。KAT06734Lポリペプチドは、上記発現組織において重要な生理学的機能を果たしていると推定される。

【0265】ヒト培養細胞株では、大腸癌細胞株(LS-180、Colo205)および胃癌細胞株(KATOIII)でKAT06734L転写産物の発現がみられた。その他の細胞株では発現はみられなかった(図16)。KAT06734L転写産物が発現している上記細胞株は、上記(6-1)に記載した方法に準じてKAT06734Lポリペプチドのリガンド、アゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質の探索に利用することができる。

【0266】

【配列表フリーテキスト】

配列番号3 - 人工配列の説明：合成DNA

SEQUENCE LISTING

<110> KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD

<120> Novel Polypeptides

<130> H11-1931A4

<140>

<141>

<160> 18

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 371

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Pro Ala Asn Phe Thr Glu Gly Ser Phe

Asp Ser Ser Gly Thr Gly

1 5 10 15

Gln Thr Leu Asp Ser Ser Pro Val Ala Cys

Thr Glu Thr Val Thr Phe

Thr Glu Val Val Glu Gly Lys Glu Thr Gly 30

Ser Phe Tyr Tyr Ser Phe

35 40 45

Lys Thr Glu Gln Leu Ile Thr Leu Trp Val

Leu Phe Val Phe Thr Ile

50 55 60

Val Gly Asn Ser Val Val Leu Phe Ser Thr

Trp Arg Arg Lys Lys Lys

65 70 75 80

Ser Arg Met Thr Phe Phe Val Thr Gln Leu

Ala Ile Thr Asp Ser Phe

85 90 95

Thr Gly Leu Val Asn Ile Leu Thr Asp Ile

Asn Trp Arg Phe Thr Gly

100 105 110

Asp Phe Thr Ala Pro Asp Leu Val Cys Arg

Val Val Arg Tyr Leu Gln

*配列番号4 - 人工配列の説明：合成DNA

配列番号5 - 人工配列の説明：合成DNA

配列番号6 - 人工配列の説明：合成DNA

配列番号7 - 人工配列の説明：合成DNA

配列番号8 - 人工配列の説明：合成DNA

配列番号9 - 人工配列の説明：合成DNA

配列番号10 - 人工配列の説明：合成DNA

配列番号11 - 人工配列の説明：合成DNA

配列番号12 - 人工配列の説明：合成DNA

10 配列番号13 - 人工配列の説明：合成DNA

配列番号14 - 人工配列の説明：合成DNA

配列番号17 - 人工配列の説明：合成DNA

配列番号18 - 人工配列の説明：合成DNA

【0267】

【配列表】

act gag caa ttg ata act ctg tgg gtc ctc
 ttt gtt ttt acc att gtt 369
 Thr Glu Gln Leu Ile Thr Leu Trp Val Leu
 Phe Val Phe Thr Ile Val
 50 55 60 65

gga aac tcc gtt gtg ctt ttt tcc aca tgg
 agg aga aag aag aag tca 417
 Gly Asn Ser Val Val Leu Phe Ser Thr Trp
 Arg Arg Lys Lys Lys Ser
 70 75 80

aga atg acc ttc ttt gtg act cag ctg gcc
 atc aca gat tct ttc aca 465
 Arg Met Thr Phe Phe Val Thr Gln Leu Ala
 Ile Thr Asp Ser Phe Thr
 85 90 95

gga ctg gtc aac atc ttg aca gat att aat
 tgg cga ttc act gga gac 513
 Gly Leu Val Asn Ile Leu Thr Asp Ile Asn
 Trp Arg Phe Thr Gly Asp
 100 105 110

ttc acg gca cct gac ctg gtt tgc cga gtg
 gtc cgc tat ttg cag gtt 561
 Phe Thr Ala Pro Asp Leu Val Cys Arg Val
 Val Arg Tyr Leu Gln Val
 115 120 125

gtg ctg ctc tac gcc tct acc tac gtc ctg
 gtg tcc ctc agc ata gac 609
 Val Leu Leu Tyr Ala Ser Thr Tyr Val Leu
 Val Ser Leu Ser Ile Asp
 130 135 140 1

45

aga tac cat gcc atc gtc tac ccc atg aag
 ttc ctt caa gga gaa aag 657
 Arg Tyr His Ala Ile Val Tyr Pro Met Lys
 Phe Leu Gln Gly Glu Lys
 150 155 160

caa gcc agg gtc ctc att gtg atc gcc tgg
 agc ctg tct ttt ctg ttc 705
 Gln Ala Arg Val Leu Ile Val Ile Ala Trp
 Ser Leu Ser Phe Leu Phe
 165 170 175

tcc att ccc acc ctg atc ata ttt ggg aag
 agg aca ctg tcc aac ggt 753
 Ser Ile Pro Thr Leu Ile Ile Phe Gly Lys
 Arg Thr Leu Ser Asn Gly
 180 185 190

gaa gtg cag tgc tgg gcc ctg tgg cct gac
 gac tcc tac tgg acc cca 801
 Glu Val Gln Cys Trp Ala Leu Trp Pro Asp
 Asp Ser Tyr Trp Thr Pro
 195 200 205

cag gag cgt ttc tat gcc tct gtg atc att
cag aac ctg cca gca ttg 1137
Gln Glu Arg Phe Tyr Ala Ser Val Ile Ile
Gln Asn Leu Pro Ala Leu
310 315 320
aat agt gcc atc aac ccc ctc atc tac tgt
gtc ttc agc agc tcc atc 1185
Asn Ser Ala Ile Asn Pro Leu Ile Tyr Cys
Val Phe Ser Ser Ser Ile
325 330 335
tct ttc ccc tgc agg gag caa aga tca cag
gat tcc aga atg acg ttc 1233
Ser Phe Pro Cys Arg Glu Gln Arg Ser Gln
Asp Ser Arg Met Thr Phe
340 345 350
cgg gag aga act gag agg cat gag atg cag
att ctg tcc aag cca gaa 1281
Arg Glu Arg Thr Glu Arg His Glu Met Gln
Ile Leu Ser Lys Pro Glu
355 360 365
ttc atc tagaccctag ggcagtgcc a gtgctag
gct gagcaccatc agctctcca 1337
Phe Ile 78
370
ggtctgac acctgcttgg gcacgtgcat ggaa
cctgag30caacttcac cccaccctcg 1397
tcttctadnag ggagatgcac aagacaaatg ttct
atgacatgcctgcatgctcagat 1457
tcttctaacac gaactcccca gttattcatg ccag
cctggaaggaaatctgac ofcattctccia517
a sequence synthesized by actgcca gcac
cctgac3ccagtgaaca caggcatcag 1577
aggaccgggg cggcgggggg gggccaggg gtag
acaggc aagcagaggg gacaaaggt301637
gctgggtat acatgaatat tctcattaca atag
gctgaa42taaaagact taattaagcc 1697
cctttaaadaa aaaaaaa
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial
Sequence: synthetic DNA
<400> 4
gcggctgaag acggcctatg tggccttttt tttt
tttttt tt 42
<210> 5
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial
Sequence: synthetic DNA

<400> 5
agcatcgagt cggccttggt g
 79 21

<210> 6
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial
Sequence: synthetic DNA

<400> 6
gctggctgaag acggcctatg t
 21

<210> 7
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial
Sequence: synthetic DNA

<400> 7
cttctgctct aaaagctgcg
 20

<210> 8
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial
Sequence: synthetic DNA

<400> 8

tgtgggaggt tttttctcta
 20

<210> 9
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial
Sequence: synthetic DNA

<400> 9
agagggcagc ttcgattcca gtg
 23

<210> 10
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
 <221> exon
 <222> (25203)..(25523)
 <220>
 <221> exon
 <222> (51516)..(51648)
 <400> 15
 gatctttgac aaacctgaca aaaacaagaa atgg
 ggaaag gattccctat ttaataatg 60
 gtgctgggaa aactggctag ccatatgtag aaag
 ctgaaa ctggatccct tccttacacc 120
 ttatataaaa attaattcaa gatggattaa agac
 ttaaac gttagaccta aaaccataaa 180
 aaccctagaa gaaaatctag gcaataccat tcag
 gacata ggcatgggca aggacttcat 240
 gtctaaaaca ccaaagcaa tggcaacaaa agcc
 aaaatt gacaaatggg atctaataca 300
 actaaagagc ttctgcacag caaaagaac tacc
 atcaga gtgaacaggc aacctacaga 360
 atgggagaaa agttttgcaa tctactcatc tgac
 aaaggg ctaatatcca gaatctaca 420
 tgaactccaa caaatctaca agaaaaaac aaac
 aacccc atcaacaagt gggcaaagga 480
 catgaacaga cacttctcaa aagaagacat ttat
 gcagcc aaaagacaca tgaaaaatg 540
 ctcatcatca atggccatca aagaaatgca aatc
 aaaact acaatgagat accatctcac 600
 accagttaga atggcaatca ttaaaaagtc agga
 aacaac aggtgctgga gaggatgtgg 660
 agaaatagga acacttttac actgttggtg ggac
 tgtaaa ctagtccaac cattgtggaa 720
 gtcagtgtgg cgattcctca gggatctaga acta
 gaaata ccatttgacc cagcaatccc 780

 attactgggt atacacccaa aggattataa atca
 agctgc tataagaca catgcacatg 840
 tatgtttatt gtggcactat tcacgatagc aaag
 acttgg aaccaacca aatctccaac 900
 aatggtagac tggattaaga aaatgtggtg cata
 tacacc atggaatact atgcagccat 960
 aaaaaatgat gagttcatgc cctttgtagg gaca
 cggatg aagatgaaa ccatcactct 1020
 cagcaaaacta tcgcaaggac aaaaatccaa acac
 tgtatg ttctcactca taggtgggaa 1080
 ttgaacaatg agaacacatg gacacaggaa gggg
 aacatc acacacaggg gcctgttgtg 1140
 ggggtgtggg aggtggggag ggatagcatt tgga
 gatata cctaattgta aatgacgagt 1200
 tactgggtgc agcacaccaa catggcatat gtat
 acatat gtaactaacc tgcacattgt 1260
 gcacatgtac cctaaaactt aaagtataat aaat
 aacaaa aaaaaaaaaa gaaaaggaac 1320
 aaacaaatcc tctgagaaat atagaactat gtga

aggatattca ggacttgaac tcagctctgg attg
agcaga cctaatagac atctccacc 2520

caaattaaca gaatatacct tcttctcagc acct
catggc acttattcta aaattgacca 2580
cataattgga agtgaaacac tcctcagcaa atgc
aaaaga acggaaatca taacagtctc 2640
tcagaccaca gtgcaatcaa attagaacct aaga
ttaaga aactcattca aaactgcaca 2700
accacaagga aactgaacaa cctgcccctg aatg
actact gggtaacataa tgaatcaag 2760
gcagaaataa ataagttctt tgaaccaat gaga
acaag acacagtgtc ccagaatctc 2820
tgggacacag ctaaagcagt gtttagagga aaat
ttatag cactaaatgc ccacaggaga 2880
aagtagaaaa gatctaaaa caacacccta acat
cagaat taaaagaact agagaagcaa 2940
gggcaaagaa attcaaaagc tagcagaagg caag
aaataa ctaagatcag agcagaactg 3000
aaggagatag agacatgaaa aacccttaa aata
tcaacg aaccaggag ctggtgtttt 3060
gaaaagatta acaaataga tagaccgcta gcca
gactaa taaagaagaa aatagagaaa 3120
aatcaaatag acacaataaa aatgataaa ggga
taccat cactgatccc acagaaagac 3180
aaaccacat cagagaatac tataaacatc tcta
tgcaaa taaactagaa catctagaag 3240
aatggataa attcctggac acatacacac tccc
aagacc aaaccaggaa gaagttgatc 3300
cctgaataga ccagtaacaa gttctgaaat tgag
gcagta attaatagcc taccaacaa 3360
aaaaaccaca ggaccagatg gattcactgc caaa
ttctac cagaggtaca aagaggagct 3420

ggtactattc cttctgaaat tttccaac aaca
aaaaaa gagggactcc tcctaactc 3480
attttaagag accagcatca tcctgatact aaaa
cctggc agagacacaa caaaaaaga 3540
aattttaggc caatatccct gatgaacatc aatg
tgaaaa tcctcaataa aatactggca 3600
aaccaaatcc agcagcacat caaatagctt atcc
accaca atcaagttgg ctctacacct 3660
gggctgcaag gctagttaa cttatggaaa tcaa
taaacg taatccatca cataaacaga 3720
accaatgaca gaaaccacat gattatctca atag
atgcag aaaaggcctt tgacaaaatt 3780
caacaccctc tcagtctaaa aactctcaat aaac
taggta ttgatggaac atatctcaa 3840
ataataagag ctatttatga caaaccaca gcca
gtatca cactgaacgg gcaaaagctg 3900
gaagcattcc ctttgaaac cagcacaaga caag
gatgcc ctctctctcc actcctattc 3960
aacatagaat tggaagttct ggccagggca atca

catcactggt cattagagaa atgcagatca aaac
cacaat gagataccgt ctcattgccag 5280
ttagaatggc gatcattaca aagtcaggaa acaa
cagatg ctggagagga tgtggagaaa 5340
taggaaagct tttacactac tggtagggagt gtaa
attagt tcaaccattg tggagacag 5400
tgtggcgatt cctcaaggat ctagaaccag aaat
accatt tgaccagcc atcccattac 5460
tgggtatata cccaaggat tataaatcat tcta
ctataa agatgatgc atacgtagg 5520
ttattgcagc actagtcaca atagtaaca cttg
gaacca acccaaatgc ccatcagtaa 5580
tagactggat aaagcaaatg tggcacatat acac
catggg atactatgca cctataaaaa 5640
aggatgggtt catgtccttt gcagggatgt gaat
gaagct ggaaacatc attctcagca 5700
aactaacaca gaaacagaaa accaaact gcat
gttctc actcataagt gggagttgaa 5760
caatgagaac agatggacac agggaggaca tcac
acacca tggcctgccca gggggttaga 5820
ggctagggga gagatagcat tcaagaaata ccta
atgtag atgacagggt gatgggtgca 5880
gcaaaccaac atggcatgc catacctatg taac
aaacct gcacattctg cacatgtatc 5940
ccagaactta aagtataatt ttaaaaaagt aggt
tggaga ttcatattta aagtgaact 6000

aagccaaaat ttgtattatt tttcttaata attt
ccaaaa tgcaatctaa gttttacctt 6060
ttaagccaat ctgatcaact tctcatggca ctac
cttgag aaaaactcta aggtatacta 6120
agacacagtg gttctcagtg ccataatcca tcag
tgaatg tggggacagg cagcaggcac 6180
agagagtggg gagtgtgccc agctctgaca taaa
gaacaa caatatgttg atgcaacatc 6240
aagaagtgc ttctctcctg ggcttcttg tagc
cgttat cagctattac ccaactcagc 6300
tactctacag tcattttcaa cacttttctt cctt
tctgtg tccattgcc aagtctttaa 6360
aagccaggca ctcattttc aagaccctt tcat
aaggcc aggggttgct gtataaccta 6420
gttattgcca gtaggatgta aagagataat tgtc
atcatc ttcataagca tcatgaaaat 6480
attttctct ctgaacagag aaacagatga agaa
gaatgt cttctctac caccagcatc 6540
ctccccacc ctccgaccta tttgttgtt gttg
atttt gtttctgtt tgagacggag 6600
tctcgctctg tgcaccaggc tggagtgcag tggc
gcaatc ttggctcact gcaacctctg 6660
cctcccagg tcaagcgatt ctctgcctc agcc
tcccga gtagttggga ttacaggcac 6720
cctgccccca cgctggcta attttgtat tttt
agtaga gatgaggttt caccatgtt 6780

ttgataatgt aaaatttaaa gttgcttcag ataa
tgtgac aaccctggag tataatacat 8100
taggactcat ctctctgaac gaacagcaac ttg
caaaag aggaaacggg gctgcctggt 8160
ctgttactgt cacatctgat ttttatttgt atat
gacttg accagccttt atagctctca 8220
ccacacagca cttccatggt ccataatgga cctg
ttcaaa ggaagccata tcaactccact 8280
tgatttgctt ctgataccag ttccaggggt attg
atctgt cttgagtaat gtgttattgt 8340
tgacagagag gtttcttgac tcaactgtagg tgac
ttttta tgccctttaa agttctgaaa 8400
agcccataaa gataatgttt aaattacaag tcat
acacaa cagaagagag tctggagcag 8460
ccacacaggc aactgcatag taccagaagg actg
tggaca tggaatcaga ctacacagtt 8520
ccatagctga ctgggtatat tactctttcc tcaa
tttctt catatgtgaa atgtaaggc 8580
taatatctac ctgacatagt tttctgaaga tttt
ataaga gatcacatat ataaagcacc 8640

taaccttggt aatccataga agaaatgtaa taaa
tatcag aaaaagaaga gatTTTTTT 8700
ctcccttctt ttgtatttc atgctataaa tttt
accatt ttctgggttt aagtacaatg 8760
cgtttatgct aaggtttaac acggtggctt catc
ttttag tcattctaata taatttcagc 8820
attgactgaa cccagtggcc cctgtagata aaaa
caggac caaccactaa acattaaact 8880
ctcaagcacc cacctgtaata cacttaaaca gcta
gagggtg gctccactga tacttattaa 8940
acagatgttc actctgtaac aaaagtgtac caat
ctcatc ctgaagccca gaaaatagaa 9000
aagaagatag gacagcctct gttaccaatg gcag
aaatat gacagggcta tatgaggcta 9060
agataaagga tatcaaactc aaaaccaaga gtga
taagca aggagactgt gttagactgt 9120
ttcaataatt aaggtagaaa atgatggcag cctg
aagtgt gattttcatg atggagatgg 9180
ggagaaatag atagttaaa aactgttaaa aagg
agcatt ggcagaactc attaatgaa 9240
cagatgcaga tagcaggtag gctgggggag ggag
gtgta catatgacaa catgacatat 9300
tctgttaata ctaattgaag gcctctatgg tgga
atcact tacttaggtg acttgggaat 9360
acagggagggt aaagtcacat tcctggctcc caag
aatgt atagtacatt taaagggata 9420
agacataaca acatcttttt agtatctgct ctg
tttatt attttatttt ttagggcctt 9480

attctgttct caaaaaaaaa aaaaaaaaaa gtag
taagga tgaaaagggg tagggcatct 9540
ggaaaaaact ttggagaagc ctcaggaaca tccc

tggggcagcg atttcacctt catctcacag agtt
caatga gtatgttgcc aagggacatt 10920
ttgagtgccca attcactaat ttacagaaa ctct
gtaatt ggttgaatt gctaaggta 10980
gggattgtac atttctgtc accttcctc agag
ggctaa tttctgtttt ctctctcgga 11040
tgcatctat agtcaaaca gcagatgcat tctc
ttgcag tgggaataa aggccattct 11100
tggacaggcc caattgctct actaagttag aagg
aacctc ctttttagct gacataaat 11160
caatcagcat gcattcgggt tagagcaatg aatc
ttctgt aagtgacaag agactggatt 11220

tgtaatttt gcttcagca aatgtacctt aata
tggata tttctaagat tcttggcagc 11280
aatataattt aaaacatggt ttagtgtgac aata
caagag catgatgttc tgattctgat 11340
aaaattttgt cacatatgag agaaggaaga aaaa
aaagggt tagtagttca gataagagaa 11400
aataattggc tgaagcctt ttatatttga gaat
gatata aaagtggaaa gtgaaatcat 11460
tgacatgaac tgagaacttt gacggacctt tact
ctggaa ccgcaattgc ccagctgtgc 11520
ctgacatgat cccattttaa gtcaggggtc atga
tataaa cctctcatct ctgattttcc 11580
cctaaccagg gctccaatgg acatctcaga attc
ctcaga acccccacac tctccaacag 11640
ctgactttga tagtttgctt gttacgaatc aggg
cagcaa tttgatcact tctcatatgg 11700
tccaatacat atgttgtaa gtaaagtaaa aaga
tagcac aagaaatttt tactagatat 11760
aattgcattt gaatcacatc caactatgca ttaa
aacagc atagatatca cctaagactc 11820
ttactaacga aagttcccca caaataatct tagt
gcagtg attctcaaag ttgtgttata 11880
tatcggaatc accaggggga acttgtaaa atgc
agaagc ccaggctttt gctacttga 11940
tgaatctgag cccctattct ttattaactc cccc
aggtaa ttctaaaaca ctctgagtt 12000
tgagaaccac tgatgtagtg ttatagaag taag
tagaga aaaggatgag ctatagataa 12060
gagggcaaca ctttctgccc cttttccac tgca
tgtagg acatgttgag gagtggttta 12120

gctggatggg aaagcaagtg tctttttca tcac
ttttca ctgagcaggc agtttctca 12180
ttgcagcgcc tctccctct gactccatgc ccat
acacac attatgaatc cgagggccgg 12240
tgcccatgca gccatacaat agagacaagg acca
atttac ttgccaacta aacatgtagg 12300
gacatgctgt ctatcctcaa cacagataaa acct
gcaggt gctcttctt tgttgagccc 12360
agtgcttctc aaccttggtt gcacattaca attg

actctgtaaa ttactagaa gttaattaag ttgt
gtactt aaaatgggtg aattttatga 13740
tatatatatt ataataaagc tatttagaaa aaca
tgtaga attgacttta caattctgca 13800
aaaataatgt aaaaatttaa gtagatataa catg
caaaaa taaagcttat tactttggaa 13860

aaaattactt caaaaatag aaaatagttt aagc
tgcagg aattttttta aaaaaacaaa 13920
cctaaaaatg ataataattga gcattgacta tatt
ccaggc attattctaa gtgctttata 13980
tcattttgtc ctataaatga gcctctaagt ttga
tgttat gttccattgt actagtattg 14040
aaactgaggt ctaactagag ataaaagact gatg
ctagaa taagaagaca gattaaaagg 14100
aagatgtag tactaaagaa ataatttgag taat
ttatag tgcgtttgca taattgtaac 14160
tggattaaa aagaatgaaa aagagaatag agac
ccaaat ctagtgttga tcagatgaag 14220
attaaagaca tcacagacaa tgcagagaaa aagg
agaaag agattaaggt gatcagagaa 14280
tagatgatag atagatacag atgacataaa atga
ggaaca gagtagggat aattagtgtt 14340
cttgggtgac agaggagaat caacataaaa atat
taaaga tattatttaa aatgtctttt 14400
tagctgaaga gaattctaaa cataaataat acta
tcatta gcaagaataa atatcaggca 14460
ataatgtacc acaactgcac tgagcacaca tcag
ctcctt gaaccatcac aacaacccta 14520
ggaagcatga actataattt ccattttaca aagg
atccct agagctaaga tgactagata 14580
tcttgtttgc ttaggacaat tctggtttac tgca
tgtaaa ctacctaaaa taccattttt 14640
attctcaaat ttatgagtct ggacaataaa ttac
atgac accctatttt gagtctaaga 14700

actacaggtg gtaaactgca gaacaaaaac ttat
tggaga agtctccaaa gcctttgttc 14760
ttaaccattt tgttatacta aatctgcaga gcta
aaggtt tcatcacaaa gcgacacaac 14820
ttgtaaaaaa taagtgatta taccaagaaa ttct
gcattt caaagataaa taacaactc 14880
tatatgcatt cagtagaagt aagtcattta aaaa
ggaaaa agatattaat taatttcata 14940
agtaaatgaa aaatagtacc ctggatttct tctt
tacaac attaaatgcc agaaaacaat 15000
gtctacaaag tcaagttaga attaatggaa gctc
tcaaat atacaagtag ctaagaatca 15060
agaagtcaag caactactta aagacattgt ccag
ctaatt taggtagaaa tcaaaattta 15120
gacttcacaa acacataagt aagatacaga agta
cttata gtgggcaatg aatccacttt 15180
aatatcaaat tatgtaacag ttgatctggt aaat

taaaaattat tttctggcat ataatgttgt aaag
aaaaaa ttcaagatac tgtttttta 16500
tttacttact aaattaatat agtatttctt tatt
agtgac tcacttttac tgaatgcatg 16560
taaaacttgt ttatccttga aatacaggat tcct
tggtag aaccactttt ttttctaaaa 16620
ctagtttgtt tctttatgat gaacactata atag
ctctgc agatttagtg taataaaagg 16680
gttaagaaca atagctttgg agacttccat gact
gaaagt tttggttctg caacttacca 16740
actctagttc ttaggcccaa agtaaggta tcat
gttatt taccttgtgt cttcaccaca 16800
ataccttgac tctatctttc ttgagggaaa gaca
aacaag cattctgttt tgttcaaatt 16860
gctctttttt taagatctct gtacttggac taaa
aagcaa ttattaactg atatcagcac 16920
ataaaattag tttataaca atcaaatcc aagg
tgaaaa aattatatga gagtctttt 16980
acttgatggt tgacaaattc aacataatca cgtg
tgtcat gaatctttt atgacaacaa 17040
tacagcatca aaatgtacag ttagaccta gagg
aaatac aaagagaaac acagggcccc 17100
aataataatg gaaaacataa acaaacctt ctgt
gccttt gacaaattag gtagacaaaa 17160
gctaaaagg aaagaaatga gattctagag actt
cagtag aactaagagt acctaataa 17220
atgcttctaa aaatatgtgt gtgtgctgc gcac
atgtgc acacacacag gcatttga 17280
aattatctta taaatagaat tccaggtatt tttt
caaaaa ctgaacatat atatataatg 17340

ttttaaata tttcaaaaga tagaacttgc cttc
aaaata taattcaaga aataaacia 17400
acttgaatt aactgaaca aaaatataa catt
tagaag tcacttccaa gtaattctt 17460
ggtctaagaa gaaatcagac acacattgta tttt
ttgtag aaaataatga aatgaaaat 17520
accacatatac agacttcca ggtcacagct aaaa
gcagat tcagaggaaa attcgttgc 17580
ttaaagctt caattataa tatgaatga tga
aataaa cgtaagtat ttaatccaag 17640
cattcagatt ttttaagac agcaaaatta agaa
agaaaa agaaggaatt gatgaagatg 17700
tagtaatagc aattgtactt caataaaata tttt
gaggaa ataacagac aagagctcaa 17760
gaatgttgt tcggtgctgt ttctggaac tcag
aaaaaa cttaaatctt tattatagg 17820
atgattgaat aatcataac acatttcatg ttag
cagaac aaagagacac taaaatata 17880
accttaatac aaaaatctac aacaagtga atta
aaaagc agaatgcaga gctgaatata 17940
agaatcacia ttgggcactg aggaatacat tagc
agttaa tataagttgt gtctttacat 18000

aaacactctg agaatgtcca aaaacaattt ggca
cttagg taagaagaga ctttattcag 19320
gctgggtgcg gtgggtggct cacgcctgta atcc
cagccc ttcgggaggc cgagggcggc 19380
ggatcacaag gtcaagaaat cgagaccatc ctgg
acaaaa tggtgaaacc cagtctctac 19440
taaaaataca aaaattagct gggcgtggg ccat
gggcct gtagtcccag ctactgggga 19500
ggctgagaca ggagaattcc ttgaaccgg gagg
cggaga ttgcaataag ctgagatcac 19560
gccagtgcac tccagcctgg caacagagca agac
tccatc ttaaaataga ataaaaataa 19620
ataaagagac tttattcgaa aggattagtg caag
agggag actggacat tacagtaagg 19680
agaaaggggc tgtttagtt tggagaacat tctt
atcatg agatctggaa gtatctcaag 19740
ggttaggaaa aaagagattc tctttcatag gaaa
gaatag acaaggctag aaagaaccag 19800
gtgtggagaa gtacatgac aggagtgaca cgat
ctgcca gtagatgagg gaatatttta 19860
ccctgaactc tgcagcgtac tccagggaga ggct
gtggag gaggagctgt gtgctggctg 19920

aggctgaggg cgggacaaaag ttcagcctag gaga
agcaaa gaatcttaac caaagttgg 19980
ttagcctgca ttttttctg attgatcagt gggg
acaaaa cagcttagct aatatcattt 20040
atgagacaaa caaaaggaat ttagagggtc tgcg
tctggc cttgttataa gtgttgatgg 20100
ctatttactc tgtgttgcta caaaaatata tgtg
aaattg ggtaatttaa aaagaacaga 20160
ggttcatttg gttcacagtt ctgcaggctg taca
agaagc atagtgtcag catttgcttc 20220
tggtgagggc cttgggaagc ttacaatcat ggca
gaaggc aaagtaggaa caggcacgcc 20280
acatggcaag agagggagca agagagaaag gagg
aggtgc caggctcttt gaacaaccag 20340
atctcatgag aactaaaac aagaactcac tcat
tactgc aagaacagca ccaagccctt 20400
catgagggat ccaccccat gatcgaaca cctc
ccacca ggccccacct ccaacattag 20460
aggtcacatt tcaacatgag attgaaggg gaca
aaacat ttgaaccata tcaatgcca 20520
caaggcagca ttgtgaatc tgatttaagt caca
tgggga ataattggtta gctgcacaaa 20580
gccctttctg gaacacaaaag cagtgggggc attt
attaac cttttctgtt ttccaggatc 20640
acagggttct ggtaaagttc aaacttgtca gagg
atacaa ggagaaaagg tgcagtgtct 20700
ccattcagga atttgagac taaagaaaga gtca
aggaaa aattgttcac atttttaaaa 20760
atagtaacga ttaagcagaa gacaagaagg aaga
caatta gatctcattt gatttccaat 20820

tcccaaacg tataagaact aatgataatc cacc
accctt tgctgactct cttttcagac 22140
tcagcccacc tgcacccagg tgaataaac agcc
atgttg ctcacacaaa gcctgtttgg 22200
tgctctcttc acacggacgc gcatgaaagc aagc
tggaga cccaggagag ctgatgtgta 22260
gttccagtct gagtatgaag gcctgagaac cagg
agagcc aatggtgtag ttccagtctg 22320
aaagctggca ggcttgagac ccaggaagaa ctga
tgtttc agttcaagcc caaaagccag 22380
aaaaaaaaaca atgtcccagc tcaaagaagt cagg
caagag gaggttccccg cttttcacag 22440
aagaattagc ctatttattc tattcaggcc ttta
attgaa tggatgagag ccattcacat 22500
tagggagggc aatctgcttt actcagtctg ccaa
ttcaaa tgctaattctc atccagagcc 22560

acctcacaga cacaccaga ataatgttta acta
tttggg cactccatgg cccagtcaaa 22620
ctgacacata cagttaatca ttataccatg ttag
tttgtc ttcttgtcca ctcaactttc 22680
ttctaactac tgtatagtat tccatttgtt tata
tacatg cacagttata ctttataaag 22740
atgaaagggc tgggcacagt ggctcacacc tgta
atcca gcactttggg aggccgaggc 22800
agggtgatca cgaggtcagg agatcaagac catc
ctggct aacatggtga aaccctgtct 22860
ctactaaaaa tacaaaaaat tagccaggcg tgg
ggcagg cgctgtagt cccagctact 22920
tgggaggttg aggcaggaga atggcgtgaa ccca
ggaggc agaacttgca gtaagccgag 22980
atcgtgcat tgcactccag cctgggcaac agaa
aaagac tccatctcaa aaaaaaaaaa 23040
aaaaaaaaag gaaacaacca tatttattat tttg
cttaat attatgtttg taagttccat 23100
ttatgttatt tttggctaca gatcattttc ttat
tgctat atagtatttc atgtgtgac 23160
tacatgaaaa tttattcattc cagtgtatgg acat
ttgggt ggtttccagt ttgggatgat 23220
tcattgattt tgacatcatg aatatttagg ttgc
ttctga tacgtttctt taatactttg 23280
cgaaggcatc atttgcatg actgcttgta taga
tacata aatgtttctc ttgggtggcc 23340
acaggttaaa caatggtcta tctggatcat gaat
ggagag aaaaggaac aaccagaaag 23400

ctctctctcc ccacctattc tctgtccatg gcat
ctgcca ctttctctca ctctgccct 23460
accacactgt gacctaacca gcttctacct tctc
ccagga gttcctcaca gattttgtct 23520
tataaacatt ttcttgaagt aaaacatacc taca
gaaaag tgcatatgtt ttaagtatgt 23580
agtgcaaaga atttatgtga attgagcata tgta

caacctcagc tgaacaaat gcataattat aatt
tgattt cagaagtgga aacatgaccc 24960
gaattcatgc acctactgat tagtccaaat tcct
ttattg ttgaagctgg agcagaagtg 25020
ggggtccacc gtggaagtaa ggaaaagcaa aaca
gaacag gggctctatc cagggagcca 25080
tgtcgatggc tatggggagc tccacctgic tctt
ggggtg gggccctggc cctgggtggg 25140

actgtggggg gatgagggtt gtgctatgct ggct
acctgg tggttaattgc caaggagaga 25200
gcagcacgta gatcctccct gtcacaggc agag
ctcttc agtgagggtg gctcagggag 25260
ggctctgtgc ctccgttcag cagagctgca gctg
ctgccc agctctcagg aggcaagctg 25320
gactccctca ctacagctgca ggagcaagga cagt
gaggct caaccccgcc tgagccatgc 25380
cagccaactt cacagagggc agcttcgatt ccag
tgggac cgggcagacg ctggattctt 25440
ccccagtggc ttgactgaa acagtgactt ttac
tgaagt ggtggaagga aaggaatggg 25500
gttccttcta ctactccttt aagtaagtt tctt
gcctgc gactctgaac actgacttat 25560
aacaatgaga ctgctggaac ttaagagtgt caat
tgaagt atcatagcca gtatttgtaa 25620
tgagtgttat tttctttact aaaaaggatt tita
aaagtc tgaagtgcta aaacaacaag 25680
ctgtagtgtg cagagaccta gattgtagtt tctt
aggaat acaggtgacg tttttcttc 25740
tgatgctgct ggaaatgtgt gaatcgtgag taac
atztat gagtggatga tttttacttt 25800
ccccctttcc ttaggtgaaa gcacttttaa ttaa
tcctat agcagtactt gaaatgtctg 25860
tttctagtag gggttagagc tatgagtttt ttgc
taggaa caccagagat gcgaaaagct 25920
cacaatcccc aggacagtga ctgatatgat gaga
aacaac attgaataag gcaggaagga 25980
cgacactttc ttgatgatc ctittcatta aaca
tcagtg aggaatatat tttttgagg 26040

gtagttgatg atgccacat ttgcaacaaa ttac
ctccta gaacaaatga aggacagaga 26100
gtttggtgag tttcaccttc aaagtatcca aggg
ccacac tgaggaagga tcttcattaa 26160
gctaatactg tattgtttct tattccgcaa caag
atcttg tggacagaaa tgaaccgcac 26220
atitgggaaa agaacagttt cctgcttctt gcct
cagaat gctgggttgt caggttatit 26280
cacacctgic taacgatatg tttagtcatt gcaa
taattc acaggtctca aactggtcct 26340
ttccactgaa gaaaaaatac ttcaaaaaga ttct
agttgt tgctttgttg ggtttgttg 26400
ttgtttgtgt tgttaacct ctgtatgttc ttga

cggtcctgcc ttccatcttc atctgtttat ctca
atttta cccagtctat aaagctcagc 27780

ttgggttgct tcctccatga agccctcctt gact
catccc tccctgactc atccctccct 27840
gagcttcatt agtgcacgg actgtacctc tctt
cttgcc acttaatgca gttctgtctt 27900
aaactgctat ttccatagt gttggctgaa tgtg
ttacag tcctcaagct ccttgagtaa 27960
aatgaatgcc ttatatttgt ttcatatttt ctcc
caggac ctaccactat gtagtcata 28020
ctcaataaac attgactgca taacaaatt gtga
tgtgtt ttttcttcca attaccaaca 28080
ttttgtcaaa taagcaacag aaagcatgta ttcc
ctgtga cagaggtggg tgggggctct 28140
cattaaccaa gtttccacc atcagcccct accc
tgcttg gtctctatac tcaccagggt 28200
ccctttctgc aagcatgttc agcttctccc tatt
ccattt ctaagccaat gagaccaaag 28260
tcggttctag attccagtgg gtgggtatg gaat
tagctg aggcacatg agctgttacc 28320
aagtacctgg tccagccctg gggaaatccat ctct
attgca tggcagcctt acctagtctc 28380
agctgtcttg ctccgtccac ttacctaggc tctt
gacttc gtttccatc tcacattcta 28440
gttcttatcc tctgaactcc aaagctcttt cagg
aggaga caaagcacc cgtctagatc 28500
ttactggcac ttccttcaca ggcttagagt ctgt
tccttc ctcccacctc caccctttaa 28560
ttctggcttc tgcttccacc cctctaacct actc
tacctt cctaagcatg tgaggctctt 28620

ggaaatgagc agggaggtct aggggtgggt cacc
catccc atcttccacc atgggccttg 28680
tgtaactaac cctacgtgtt ctgggttca agat
tctcag ctacagacct ggctcccttc 28740
acagtttcca gttttgtgtg cttttaagat caca
tccagc tcacctcttc aagacctagg 28800
tcttggcact aaggaattat atgctttca agaa
tctacc agaagtttc aaggggaaat 28860
gggaaccagc tcatcagaaa ataaatgagg tate
tgaata taaggctgtc caaatcaaaa 28920
acaaatacaa aactcttcac acagaaagcc ctta
atittg ctgggtgaatt caccagcaat 28980
gtttcctgaa tctctgatac ttaatgagaa acct
aattag aagtaactgg gagggagacc 29040
tgtcttgatt agtgaattat ctaaattata aaat
aatgta aatgaaactt agttttatta 29100
ctcataggtg agcacagaaa catgaactaa gact
gctaaa tatcacctaa taacaatctt 29160
ttattgcgcc tccttcgggtg gatagttaca agtg
atacac aattagtcta ttgtttatat 29220
gtaaagtgtt gcttctaagt gcttgagggt gatt

agtaagtga cctcagcgcc cttccaatcc tgtg
ctcccc aatgtagca aatgttctct 30540
cttccctccgc ttttctctgc taacccttgg aggg
gggcaa tccaataccc tcttgtcatt 30600
gtctcagttg cctcgcacatc ccccagcatc tgac
accact gctgcgcat caaactcttc 30660
catcgccctc agcgaccccc ctgtcatggg gaaa
ttgatg acacagtgtt ctccgaatt 30720
tattattcca ggctctctgt tctgaatgct caaa
agtcac accctcttgc aacagaaaaa 30780
accatttct cttccagctg ttaagatat cctc
actgag gtattttgaa agcccagtc 30840
tgacttgttt ctgtccatct gcattgataa agag
tgcagt ctgaggacag tggggctgcc 30900
tgggctggg gacagtgtat caaagaagt gaaa
gaagca catccattca tgcttgacaa 30960
tgtcattctg ccatccttca aataatttcc tght
gatgaa gtaagaatgt ttcaagccat 31020
gcaactcagg agataagaaa tctaacta tttt
tcttaa ataaactgag cttctctctg 31080
gacctctcag tcccccaagt aaactcaggc tttt
gagctt tctccatcat ttcaatgagg 31140
cagtgtggct cagagagcag gcttttagac caga
cttctg gggtaaatic ccagtgccac 31200
accatctagc agagtgactt tgggcacttt actt
ccaccg gtgtctcagt ttctcatcc 31260

aacaaacaaa gctaataatt gcatgtcctg taga
gagttg ttgtgaatag ttaagtgaga 31320
gaatgcttgt atagccttaa agaacagcaa gcgg
cccca ggagtgttca ttattcataa 31380
ttagagtccc aggaattcgt cattccactc tttt
ctcaag acaactactg agaggtgagg 31440
aggcagcatt agctgtaagg aagaagttc ggaa
gatgct gagagagacc actgcaggtg 31500
gaagcacttc aggacagctt cgatatgcag gtgg
tctca aacaatggc atgaattaag 31560
ctgtttcttt tcttttttt aaaaaaaaaa atg
agacca tgaaaatga gaataagata 31620
tagatataga gggaaaattt ccatttctta cttt
gtcatc ctgatattat gtctagctat 31680
tatctaagca aacttaatgg cccactacat gaaa
ggctat ttgcagaaa agcaaattat 31740
gccctatctg gagaaagaaa gaaatggctt cttc
tctgct gtgaagattt tccagggcac 31800
agatggcaaa atcacccaag gtcagagga agtt
gtaagg aataatcaag tttcttgttt 31860
tcccacttag gcaatattga tggctgccta aaaa
tgatag atctattact ctgtcagca 31920
ctttacagtt tgcaatatga tttcacaata tcac
ctttga acctccatc agctctaggg 31980
ggatttaaaa tagcattctt tttctttgag caga
tatgaa actaaagtct gaggaagtt 32040

tcctcacttt cccagctaag tactcactct ccta
gtctcc cttgcagtta aaggtagcac 33360
agtttgggaa gcttaattgg aagtctctga gatt
tctaataaagatTTTT ccttttctga 33420
tgaaagcggga aagatattgc tggcattctg atgt
ccccct gacttgaatt cagacataat 33480
gcatggagcc gcagcagcca tttgtgacc acag
gaaaaa aaagccaagg gaatcttagc 33540
aaattgagtt cagcagcaac atatcttcag attt
cttatt atatgaaaaa aaataaatct 33600
ttgtttaagc cactgctaag ctgaatactt tcct
aattga tataaatact aagtgaata 33660
cgacattgac agtattgaag ccaagatctt aaaa
catggc cccagagag tcaagcagac 33720
attgcattat tacacatttg gaggtacag aggc
tggatc tgcccatggt tttgtcttg 33780
ttattatcta cattacaaag agattgaata gatt
cttata aaaactgatt cagactagat 33840

tgtatggttt tgagtaacca agaaagtaaa agtt
tctccc cctcctcaaa gaaaagggcc 33900
ttacattttt caaatgattc tctacattcc agat
aataac aatgccattc acttatgtaa 33960
ttctatgaaa aaatactaaa accattctga aaac
atcagc tcaaaaaact acccaaaaca 34020
tttgctcatt ttttcatgat ggctcaataa gaag
atTTTT ttattctcct ccaaaaagca 34080
taaggaatca catcctttcc tgacagctta aaac
atccaa gcaaaatgtg agctggagcc 34140
atgggctctg gacctggcag gcaggtgtgg acct
tcagca caccacaggg ctgctctagc 34200
cccaggcatt tctgccctgg gtacagaaca ataa
ccacca tccctgcctg gatgggtgaag 34260
taggaatgga gccagtctc atgtgggagg aaga
gttttg agagacagga gaaagggggg 34320
tagtcatgga ggagtctgc ttactaatct gtga
caatcc tctccaagcc cagagaaggt 34380
gggaggtagg ggaggaccga tgccttccc catc
aaaggc cagcctccta gactctccat 34440
tcatccagct tcttaccct cctggcctct ccac
tttccc cgcctttcca ctactcaga 34500
ttctccacct ttccagacac tccatcctca aaga
ctctcc acccaccag gctagtcatg 34560
cattgctaaa gataaataaa aaagaaactt cctg
ggactc tttcctcctt ctaaagacag 34620
gagtaggtgg ttggaaagga ataagatgca atca
taactt tgacaagact cacaagaacc 34680
ctcatgaaga ttccctgccc tctcacaagc ctct
cttttc ccagccttaa ctgcttgccc 34740

tcatccttac cagggcattc agcttgact ttgc
acgctc agtttttaa aaacagtct 34800
gtctccccct ttctacat cctcttita tctc

ttcttaagca gttgtcaggg gaatatgaaa taaa
gaattt tggaagcacc acatattata 36180
caccattata tacttagagg atgcattcac catt
taactc tctgagaagt cttacagtaa 36240
ggaaacttgt ttatggtggc tcacgcctgt aatc
ccagca ctttgggaga tcaaagcggg 36300
tggatcattt gaggtcagga gttttagacc agcc
tggcca acatgataaa accccatctc 36360
tactaaaaat acaaaaatta gccagcgtg gtgg
caggtg cctgcagtcc cagccactca 36420
ggaggctgag gctgaggcag gagaattgct tgat
cccggg aggcagagga tgcagtgagc 36480

caagatcaca ccattacact ccagcctggg cgac
agagcg agactctgtt tcaaaaaaaaa 36540
aaaaagaaag aaagaaaaga aacttgitta attc
titaat atgcattttc caagtctatt 36600
tgaccacaga gcattacaat attacctcta ataa
tgacca ctggcacaca cttcagaaaa 36660
cactctgtta tgtgttttcc tgaagagcc tacc
agacaa ccaaacagaa ctagctcttt 36720
gagcagatga ggcccagaga agtaaagtga cctt
ccaag gttacatagc tggtagatgg 36780
tagagtcagg acaagaactg caatctctaa ctat
ccaagt tggagcttct gtcagctgt 36840
cgagaggatc gtgaaaaaac gagagtgttt tata
aactgg aaagcgctat tcgaatttaa 36900
gatagcatta attctctagg tgaagcatta ctga
aatata tagaatacat ggaaggacat 36960
gaggtgcttc aagataggat gattaaattt ggtg
aagatg tcaattctcc ccaaattagc 37020
atataatgtt tgaataaatt ttaatcaaaa ctic
aatgtg attgttttaa attgattaaa 37080
taatttgaaa tttttattha aaaaataggt gaga
aaagct cagaaatttg aacacaaaca 37140
actatgggga agaaagatgt ttccctatta gtta
ttaata aatgtatctc cacagtaagc 37200
aaaacattac agaactagca aaataattga caga
tggatc aataataaga aatattttgc 37260
actgaaaata aagtcctggt acatataatga actt
aatggt acaagaaac taccacagtt 37320

agtaaaaaag gaactagtat ttttgaaca aaag
tagtgg gtgaataatg gttcttatat 37380
aaagttgtaa atctcagcta gattgcggaa ctaa
attttt acaaaatagc tagaaaaatt 37440
atataatgat gacactaatt tcaggactag caag
cattat tcaagcctaa aaacaaaaat 37500
ttaaagggaa acaacaaact aagaaaaattha ttig
caataa aaataaatat ataattat 37560
agctaatagt atatacatta attatataaa aata
taacat ggttaaagtc cttaatatgt 37620
aaagagccct tgagggaaaa taataatat ttct

attttaatta cgtggatcat caggaataat acat
tctggg tatttttatt atatagtaat 39000
tactttggtt cctacgacat tntagagatt tgga
cttaat ttgctcaaat gttagttttc 39060

catatttcaa gagtctagtg cttaaatagc aatt
taaatg ttaatctcag ttcttgttat 39120
gtagctgaca tttcattcgt ttattcagca aata
ttaatt actacataga ctggaagccc 39180
agtgggtttc caaatgattt ctaacatctg tgg
ttgcta tattatggga attcagatgg 39240
aatctcagaa ttttaattgt tcaaagcttt caat
acatgc tattagtggg taatttggaa 39300
gtcctcttgc gatccaagaa caaattgcaa gaag
agattc acgttaaaat gattgcagaa 39360
cattggcatt tctgtttctg gtgaaattca agga
ttcacc agtaaccaga aactgaatt 39420
cgaaagtaac gcaagtgcag tcccacatgc caag
ccctga tcgaaatgag aacgtttagg 39480
atgtgggaga ttaacattgt taataaagca tgat
ctacgg cccatggtac tgatgataaa 39540
aactccaaac caatgactat gtctttctgg tcag
agtaga aatgactaat gcagttattc 39600
aacatgtcct ggagactaaa ctaagaaatc aatg
tcaggc agtaatccag agtccactga 39660
atcactttcc tgtacagtcc cagtctgaag gtgc
tagtat tacattctgt cacttghtaat 39720
catggtgttg agaggaagg caaaggcaat tcag
gtgaag acaactgagg aagatcgag 39780
atggacaaga atctctcctc ctgacagcag attc
ttctaa ctccggacaa tgacacaggc 39840
cctggacctt gtcccattat tgaataaatt ggct
ttcaga ccgagctcca gcttgctcat 39900
tgtaaacctt tctctgctgt tactacctca aaag
tgcttg aatggccact atctgtcctc 39960

actaacctgc agttctcact ctctgccttc actt
acgctg ttgccaggca ccctacttct 40020
tagcttggct acttctactc attgtttcag actc
agctca cataacagtc tctctaggct 40080
atacctgctg accaaccatg accagctcct cccc
aggttc tattacatgt tccttatttg 40140
ggtttctaca acatctttat catagaagtt caca
ttgaaa attctggttg acgtacctgc 40200
ctccaccatc agactataag ctcttgtct tcgc
ctccct tttatcccca aagtatgttg 40260
aactttgata ctgattctc agaaatgttt atgg
aatttg attgtacaga ttacaaacca 40320
gtataatcat gtctccagct ccatgatttt cagg
agagtt tcccacttcc ggctgagtg 40380
tcatttctac accaaccatgt aagccaaggc tctc
tcctct ggataaatgc ctttccctct 40440
gccatactac atgggagttc acagaatgac tctc

gctgatgtag ctgcatcttg tgtgacattt atca
ctactg ttgtgtggag gccacatggt 41760
gccatagagt ccctccattc ctccaatgca tgga
ccttat gctcagtcct gagggagaca 41820
gtcatgaatc caaccagcc ccagaaacct agct
tcaggc aagttttggc tcagaaagaa 41880
aatgaagatt tgtctcccc ttgaaaatg aaag
taaag aggcaacttt cactatctta 41940
aaccaaaatt ggggcagaaa actactagag taag
cagggc atggctttc cagttaagca 42000
aaactacatg caaatcccag ctgcatcacc taat
gagcca gtaaccagg taagtaactt 42060
ctctgagctt catttcctta cctataagat tgag
gacagt gataactcgt tggtcagggt 42120
gttatggta agtgagcaat atgtaagcct tctt
aatga tgcttggcac atggcaatca 42180
atcaaaaata tttattgtgc acctactaca taca
ttacaa actcagtaag ccatgtactg 42240
gattaatgtg attcactcaa attatttcat tccc
tttcac cctataattg ttaaagatac 42300
ttaggctttt tgtcttccag ttttcagcac ctaa
ctgaaa aaggagatca ctattccttg 42360
gatctggata aatccagact agcctgacag atcc
agaatc aactagagta actaatgtct 42420
tgtatttctt gagataattc ccatttcaaa tgac
ctttc tgtgattctt gtaagtagct 42480
ttgcaactgt catcaaccaa gtttccatct gaca
gagatt tattaagcac ctctacggg 42540

ccagacagat gccaggggtg gagtttgac ccag
gcttag tgccctgccag catgggcatc 42600
cttttggctc tggaagcatg gctcatggag ccac
atccca gctatcagcc ctgtggcagc 42660
atcacatca tcaaaggaac cctgcaattc atct
ttctaa atcccaattt gcaattctct 42720
aagtctgcag aaaactgatg tcaactgtga gcct
gactaa cttgaggtga aaagccaatc 42780
agtcatgtgc cagcaacat gtaattgagc tgag
aacagg ccaatcttta gtattgaaa 42840
cattttaaat acatttctta tttccactca gtat
tggacc atctggctgg aattttgcct 42900
cacatcacca ctagggggca ttttatgccc aact
atattc tgcaatagt tgggggtgt 42960
gttgggacac catcagcaca gtgtggtggg gggg
gggtag ggagaatgct tcttaggctt 43020
agtgaaattc cgatagactg gtaccgaaaa tagg
gtgaac agggatgaatt caagcatcac 43080
tctgaaaagg cagttagtga gttatcacc ctca
aatgta catatgtagt ccacaaacct 43140
aaggaggag ataaaccaat tttattgca tatic
tactat gtaacaggca ctgagctaaa 43200
aatctccatc ttcatcatct tatctaccca tcac
aactat cctgagatag gttttgtctt 43260

aataggaag gtcgatgact tccctattcc ctic
cacctg ctggaaaact ggaggaatgc 44580
ccacaaggtag tagagtaggt aagacattct gagg
gagggg ccaacagatt cgtctgctct 44640
ctgacaggaa gtaaaggcct tcctggggag gtca
gtagag aagagaccag ccccagggga 44700
ttccactcct cagagtccat cactgaggc tggg
gccatc tccagtgagc aaatttctgt 44760
gggaggttta ctgaatgctg cagacctcac aaaa
aaggat tttggccagt gccttctccc 44820
agctaaagga gtgtggacag ctggctaagt aaaa
cttggg cgaggccatg gatggtgcca 44880
gtgaagacag agcctcagta aggaaaacag tcct
gtatct actatcttcc tcacattcca 44940
cccttgctc cttctttggc tgctcccaga catt
gttctc acctctcca ccatggagac 45000
gtggatttct gatctggcaa agaacaatca caag
tgcttt aacttttctc ttcttcttc 45060
atccaagaat gaaagttaa cagagaccaa taca
gttctg gacaagtga agaataaac 45120
catccccag caccatccag gtcagaaaa aatg
ctggat atgatacaag gctttgcaat 45180

tccttttttt ttttttttt ttttttgaca gagt
ctcatt ctatctccag gctggagtgc 45240
agtggcgcca tctcagctca ctgcaacctc cgcc
tcccgg gttcaagcga ttctcctggc 45300
tcagcctccc gagtagctgg gactacaagc acgc
accacc acgaccagct aattgcaatt 45360
tttaaagaag aaattgcttt aaggcattaa catg
cttctc tttatgaac agatccccta 45420
aaagaaacag gagtaaatct tggaaaatct ctt
cttgta ttctcagcag agcttgaaag 45480
gacattgcat taagaaaagg gacacagtgg ccgg
gcgagg tggctcacat ctgtaatctc 45540
agcactttgg gagggccagg aggttgatc atga
ggtcag gagatcgaga ccatcttggc 45600
taacacagtg aaacccctc tctactaaaa atac
aaaaaa ttagctgggc atggtggtgg 45660
ttgctgcag tccatctac tcgggaggct gagg
caggag aatggcgtga acccggcagg 45720
cggagcttgc agtgagccga gattgcgcca ctgc
actcca gcctgggtga cagaactaga 45780
ctctgtctca aaaaaagaa aaaagaaaa aaaa
agaaat tcttataaac ttcactgtaa 45840
acaatggaaa gcagaatag atctcccga aaga
gaagta tgttatacta gaatatgcta 45900
ataatctaaa ttttaaatc acagattatt ttaa
cagaac ctggggttgg ggaataaaaa 45960
tagttttaa gcctcttaat taattttatt tctc
agtgtag aagtcaaatt tgaatgattt 46020

ttaatggtta cttaaaaatt aagcattcaa tgct

tgaatatgt catttaaat agaaatttta aaat
ataaaa cacttaggaa taaaaaatgt 47400
gaagaaaact gtaaagctac ccagaaccac taaa
gagagc atcatggcat atcctagtca 47460
agttaagat ttgtttctcc catgtcccag catt
tccata cctagaatat gtactagaga 47520
aaaaaagtac ggtaccctat agcattgttt ctga
tagctt caaactggaa accaccaac 47580
tgtctatcaa atacatgaga tcaataaatc gcag
catagt cacacatgg agtactatat 47640
aggaataaaa atgaaaaacc tgcagctctt tgca
atcaca agaacgaata ttgcaatcat 47700
aaaccaaga gtcaagacaa aagaacaca tagc
ataaaa ctactctata aagctggaaa 47760

acaggcagca ctctttttgg atgcatgtat aagt
ggtaac agtaaatatt aataagtag 47820
aatcaggtt agaggtaatt tctagaagag acag
aataga gttttacatg gggcacagga 47880
agggtttct ggtgtgata aaggtttttt tttt
ttttaa tgatgttgg aataattata 47940
tgggctttta ctctatgatt actaagtaat gtgt
atgtat atatatttg cactttttat 48000
gttgtatatt ttgtgtcagg cagatcgtct gcat
agtcct aaactcttga ttctttccac 48060
ttcttgacac aatcctttgg gaccctttca gctc
ttcatt ctgtaggctc aagtctgccc 48120
ctgcctccat ccccagacca agtccaacc tgag
ggagag ctgggtctca atcttccctt 48180
tactaggatg ggaaatgcca acattctttt tggg
taccca ttcttgagg atggttccag 48240
ctggcagggg ccatagaaga ttgatgcaca gctg
tatttt cctgtcattt tgggcacagg 48300
ggtgaggatg gaactttgcc cctttgacag tttt
agctcc agtcaactgc tgtaacttt 48360
gacctcagga cacccttcac cctacatcca tgaa
catgtt gcaacatcag gcaactacaa 48420
ggtaagtaga ggtatgcagg gccttgtgga ttca
gtttct tctcccacgt ggatgaacag 48480
cagcagcggg agagatagat agcaccttt ttcc
agctgg atagtgtgct gaaacacttc 48540
ctcagcctcc tagcagtgcc aaagacatgt aggg
tggcct tagccagaaa ggtgaggcca 48600
tcccagctc cagcatgggg ttgcggaagt agat
ataggt gaccactag agctgtgaac 48660

tcctttaact ctagcgttga agtgccatat tcaa
tgagca cagtcttgg aaggtctcca 48720
gggaccccat atcacatcat gaactaacc aaac
ctctaa atcccctaaa tctttcaaag 48780
ctgagagaga gagagagaga gtaattcacc ttta
gggatt gatatagact gggctatgat 48840
attttgagcc cactcactgg gaacatgga tagg

actttgggag gctgaggcag gtggatcact aggt
caggag attgagacca tcctggctaa 50220
cacggtgaaa ccctgtgtct actaaaaat acaa
aaaaa attcgcggg cgtggtggtg 50280
ggtgcctgta gtcccagcta cttgggaggc tgag
gcagga gaatggcatg aacctgggag 50340
gcagagcttg cagtgagcta aggtcatgcc actg
cactcc agcctgggtg acagagtgag 50400

actctgtcac aaaaaaaaaa aaaatatttc ttag
aaggac tgtcagattc atagcattct 50460
cgcttttttc tttttacta attaatacatt tadc
ttaatc tgtttcatgc tgctatgaca 50520
gaatacccaa gactgagtaa ttataaaga aaag
taattt atttctacag tgccagggtc 50580
tggaagggtg ctggtatctg gtgagggtt tctt
gctgca tcattccatg gcagaaagtg 50640
agagggtgag agagggacaa gggaggggaa ctga
actcat tcctttatca gtaaccact 50700
cctgcaataa ctaatccact cccacaataa caac
attaat ctattcatga gggcacagcc 50760
ttcatgacct agtcacttct taaaggttct acct
taactc cattgctttg gggattaaat 50820
ttcaacatat aaacccttgg aggacacatt caaa
ccacag aaacattctt cagtagaact 50880
ttaatattac tgtcttataa aattctgtca aatg
aacaaa agataacca taattacacc 50940
ctaataatgac tgcttttaac attttactgt attt
cagcct ttttgctatg tatataattt 51000
tacagagttg taatcatacc cagtatatga tttt
atcatg ttttccact taccattata 51060
ggtattttta atattgctac atagtcttca tggg
tgtcat tgtaaatagc tatgctgtaa 51120
tagttcactg aattgaagtg ctttatttac ttag
ctacc tattatcttt aaacaatttc 51180
taatttcttt ttataataaa catggacata tttc
tgacag ggggttttctt tttcacatct 51240

tgacctactt ttcacatagt gttacaatta cctg
accaaa gaatacaaac tttttgtctc 51300
ttgacgtata tttccaaaag atttttaaaa ggtg
cattaa tttactctgc agctggtgta 51360
aatgaagacc atttgtcat tgttttcttg agag
tagagc ttccaaaagt agggatatgt 51420
ggctaggagg aagaatcca gcctggggca ggca
ttctgt aaagaactcc agttctcact 51480
ggtacactgg ttttattttt ctctgtttct tgca
gactga gcaattgata actctgtggg 51540
tcctctttgt ttttaccatt gttggaaact ccgt
tgtgct tttttccaca tgaggagaa 51600
agaagaagtc aagaatgacc ttctttgtga ctca
gctggc catcacaggt aagtaactat 51660
gcaagtgaga ggcaggaagc tatatgtgaa gtcc

ttcttcgatt acagtgtggt aatgcatggt gtat
ggaact acatattctt tcagaatgaa 53040
aggatttaga ggtggcaaga atacagctt gaaa
tttaa gtttttcat aaacaataaa 53100
caaatgataa ttgaaaattc actacatatt atca
aagaca aaagtgtat gttctaattc 53160
atcatcggtg tattaatctg ggcttaattt catg
tacatc tcctggacag tgtttttatt 53220
tgttaattgt ttctagaaaa actctagggg tcag
gtcaga agcattttaa atgaagaatt 53280
cctgaaatga aaaacattgc caaaggctca agac
tgaagc tcaatggtct gagattgaat 53340
ttatatatta ttgaaatttc ctccatacac attt
tagcat gatcacagat cctttggtaa 53400
aggaggtgag aatacatacc tgagtcttga gtat
gcataat agaagttacc caggcatcaa 53460
ctgaggggcc ctgtgctttg agacatatat aaaa
atgtgg ttgaggtccc ccatcatatg 53520
tcaatgtcct ccttaagatt tcttcaaatt ctgt
ggaatt tatattttta ctctctttt 53580
gcttcttgct tcctccttcc actaaattct tgct
ctctct caccagtatc tcacttttct 53640
gagctcctct tttttgagg ttgtttcatg ctgt
ccctaa cgaggcactc aaagcacct 53700
cctttccttt attttcttta aaatcatcca caaa
agtatg actttctttg tttaaaggac 53760
ttttctgaat atttcaggta atataatgat attg
tatcac agaaaagtaa atatcttaag 53820
agcaaatatt tcattttctc agaacattca gctg
acatca gaaatgtttc attttgatca 53880

tgccactgca ctccagcctg ggcgacagag tgag
actccg tctcaaaaa aaaaaaaaaa 53940
aaaaagaaat gtctcagttt taccttgctt cagc
ctcact attctgctct ctcttctaaa 54000
tgtctagtat ctgtgcca aaaattttaa tact
ttcctc tgtttttgtt ttgctttgtt 54060
cttaccacta ccaaaccgtg atctcagaga cccc
acaact tcaaaaaaac aagtatcagg 54120
cttttttttt ttttaacaaa ggaagttgct ccct
aaaaaa gaaccctgga actagttaca 54180
atgataaaca gacaagaaa aatacacatt cata
tttata gttacatag tcatggctaa 54240
aaataaatta ttctaaattg tataaaacca taag
atatac agtgataact caatagtatg 54300
ttgtattagt ctgttctcac actgctatga agaa
attctc gagactgggt aatttataaa 54360
ggaaagaggt ttagtgtact cagagttctg catt
gctagg gagacctgag gaaacttatt 54420
aatacaatca tggcagaagg caaaggagaa gcag
gtacct tcttcaag gcagcaaggt 54480
ggagtgaggg caagcagggg gaatccaga tgct

tctccacctt gctggggcat atttccaggc attt
gacaca cctgattgtc taattagaa 55800
gcatgacctg cccctccgtg cagagatctt ggta
gagcaa agctctctgc actcgatgcc 55860
cagacatatt tccaggcatt tgaagcacca actc
ttctag attaggaatt taagcttccc 55920
ccacttcttg tgcagagaac ttgggacagt ggag
gtttcc agactctatg cctaggcaca 55980
tctccaggca ctggcagct gccaccaga ccct
gcctca gagctaatgc ttctgcctgc 56040
cattgggaga actgtaggag agcttgctta gtct
agcca cccatcttgg cccccactcc 56100
agaactaagc agggagctca gaccactgtg catt
tcacag atcagcccat tgccaagtc 56160
agcagaactt ctcccagtaa acaagaatca agta
tatatc catttgagtc agctgcagct 56220
gaactttatc cataagcttc acctactggc ctgg
aggttg aactgcacaa tacaataaga 56280
aatctggggc caggcacagt ggctcacgcc tgta
atcca gcactttggg aggccaaggc 56340
gggcagatca caaggtcagg agatcgagac catc
ctggct aatacgggta taccgggttt 56400
ctactaaaaa tgcaaaaaat tagctgggtg tgg
ggtgga cgctgtagt cacagctact 56460

cgggaggctg aggcaggaga atggcatgac ccca
ggaggt ggagcttgca gtgagccgag 56520
attgtgccac tgcactccag cctggatgac agag
ccagac tctgtctcaa aaaaaaaaaa 56580
aaaaaaaaa aaaaaaaga aaagaaaaga aaga
aagaaa tctaggcagg gcatggtggt 56640
ttatgcctgt agtcccagca cttgggatg ctaa
ggccgg caaatcactt gagcttagga 56700
attcgtacc aacctgggca acatagtgag accc
ccatct ctgcaaaaaa ttttaaaat 56760
tagccaggca tgggatgca cacctgtagt ccca
gttgc agggaggctg aggtgggaga 56820
attattggtg cccagaaggt caaggcagca gtga
gccaag atcatgccac tgcactcca 56880
tctgggtaac aaagtgggac cctgtctcta aaaa
aaatta aaaaaaaaaa aaggaaaaga 56940
aaagaaatct gatgacataa ctgcacagca ctgg
aaaatg taataagcct cctgagacct 57000
ctgccacca gccttatagg aggcagtgag cctc
ctcaca taccagtac acggctacta 57060
caaccagcat ttgggaaag caccatacaa agac
taccca ttaccaagaa acgcttatac 57120
agactcgttg cactgaaag caccagaac caaa
tccaaa ggaccttaca caacataaac 57180
tatagacatc tcctcagatg aggaaaaaag tcac
atccaa ataaaagcaa atttaaaaaa 57240
aaataagaag agatagctta tctggatgag aagg
aaccag agaataact cgaatgtat 57300

aacaataaaa aaacaagaca aagaatggca tcat
ataatg ataaaaggtt caaacgacaa 58620
gaagattgaa ctattgtaa gtatacacga ccaa
cactgg agagcccaga ttacaaaaa 58680
ttacgactac atataagaac aaagatgaat agaa
aaaaa tagtggcttt caatactcca 58740
ctgacatcag tagacagatc atcaaggcag gaaa
tcaaca aaaaatctct ggacttattc 58800
tgggtacagt aactgactct tgtaatccca gcac
tttgag gggctgaggt ggtaggattg 58860
tttgaggcca gttgttcaag accagcttgg gcaa
tatact gagacccaat tccacaaaat 58920
aaataaatga ataaataaat aaaaattaat taag
catagt agcacatgcc ttagtctaa 58980
gcaacttga aggctgagct ggaaggattg tgtg
agtga ggagtttgag gttacagtaa 59040
gcaccactgc aatccagcct gggcaaaaga gtga
gaccct gtctcctaaa aaaacaaaac 59100

aaaacgaaac aaaataaaaa gaaagaaaga aact
ctggac ttaaactata tatagaccaa 59160
atggacctaa tagacattta tagaacattt catt
taataa ctgtaaaata tacattcttc 59220
tcatctgtac atggaacatt ctcccaaatt gact
ttattc ttagccataa agcaattctc 59280
aataaattaa aaaaaactga aatcatatca agtg
ttttct taaaccacag tggataaaaa 59340
ttataaatca aaccaacggg caccttcaaa aata
cacaag aacatgaaaa ctaagcaatt 59400
tgctcctgaa tggccttttg gtaacaata aat
taagac aaaaataaaa aacatttcaa 59460
aatgaatgaa agtagagata caacatacca aaac
ctctgg gatatagtga aaacagttct 59520
aagagaaaag tttatagaat tcaatgctta cact
aaaaga tagaaagatt tcaaattaac 59580
aacctaacat tacacctcta aggaacaagg aaag
cgagaa caagccaaat ccaaagtaag 59640
cagaaaaaaaa agaaatataa taacaaagat caga
gcacaa tgacatgaga ttgagattta 59700
aaaaagata caaaaagtca acaaaacaaa atgt
tggatc ttgaaaaga taaatgaaat 59760
tggcagcctt ctagctagat gaaacaagaa acag
gagaga tgattcaatt aagtacaatc 59820
agaaatgata aagatgattg acatagtttg gatg
tgtgtc ctgacccaaa tgcgatgttg 59880
aaatacaatc cccccgtgtt ggaggtaggg cctg
gtggaa agtgattata tcatggaggc 59940

agatttctca ttaatggttt aggaccatcc ccct
tgggca ccagcctact gccctcatga 60000
tagtgaatga gcttttgtga gatctggtgt tgca
cccccc tgctctctct ctcttgattc 60060
ttctctggcc atgtgatgtg cctgctccct ctic

aaaataaaat aaaataataa aacacctagg aata
ctttta accaaggaga tgaatatct 61440
ctacaaggac aactacaaa agtgatgaaa gaaa
ttgtag ataacacaca tgactggaaa 61500
aacatcccat gctcatggat tggaaaatit aata
tcatta aaatgacat acttccaaa 61560
gcaatctaca gattcaacac aatccctatc atat
tacaaa tgccattttt cagagaatta 61620
gtaaaacaag attaaagttt atatagaatt itaa
aagacc ctgaatagcc aaagtaattc 61680

ttttctttt ttgaaatgga gtctcgctct gtca
ccaggc tggagtgcac tggcacgac 61740
ttggctcact gcaacctaca cctcctgggt tcaa
gagatt ctctgcctc agcctcctga 61800
gtagctggga ctacaggtgc gcatccat gcc
agctaa tttttgtatt tttagtagag 61860
acggggtttc accatgttg ccaggatgt ctg
atctct tgacctgtg atctgccagc 61920
ctcagcctct caaagtgtg ggattacagg tgtg
aaccac cgtgcctagc atagccaaag 61980
taattctaag caaaagaaa aatccagagg cacc
acattg cctgacttta tacaacaagg 62040
ctgtagtaac taaaacagca tgatactgtg acaa
aaatag acacacagat caatgaaaca 62100
gaatagagaa agcagttaaa atgccacata cctg
caacca acctatctt aacaaagctg 62160
acaaaaataa acaatatgga aaggacacct tatt
caataa atggtgctgg gaaaattggc 62220
tagccatag cagaagaatg aaacctacc tatg
acaata tacaacatt aactcaagat 62280
agatcaaaga cttaaatgta agatctgaaa ctaa
aatct tagggaaaa aacctgggaa 62340
aacttactg gacattagac taggcaaaga attt
atgaca aagaccccca aaacaaatgg 62400
aacagaaca aaaataggca agtggactt attt
aatta aaaagcttct gtacaacaaa 62460
agaaataatc aacaaataga cagcctatit ggag
aggaag tatttgcaga ttatttctcc 62520
aacaaatgac taatatcaa aatatacaag gaac
taagac aatcaaca gaaagaaca 62580

acaaccccat taaaactgg gaaaagaca tga
cagaca tttctcaaaa ttgaaatac 62640
tagcagccaa caaacacatg aaaaaggct caat
atcact aatcatcaga gaaattaaa 62700
gtaataccac aatgagatat catcttacac cagt
cagaat ggctattatt aaaaaatcaa 62760
aaaacaatag atgctggcaa ggctgtgaag aaaa
gggtag acttacacac ttttgagga 62820
atgtaaatta gttcaaccac tatagaaac agta
tagaga tttctcagaa gacttgaac 62880
agatcttcca tttaccaag caatctcact actg

aagagatctg ggtagttaa gatgtaaag tcct
tggatt gcctggatg agtaaaagta 64260
ctaatttcta ttagatttta atgtcaagga ggtg
tgtaa aatctctaaa gtaatcctcc 64320

caaattatga aaactgacat tactagcaag ctaa
agaagg tataaatgc agtattttaa 64380
tatgcaaata tatatgttta tatatagagt tatt
ccccag tatccatgga ggattagttc 64440
cagaatcccc tgccaatata aaaattcgag gatg
cttaag tcccttacet aaaatagata 64500
gtatttgcataaacctaca tacaccctcc tgta
tacttt aagtcacttc taaattactt 64560
ataatttcta atgcaatgta aattctatat aaaa
attttt atactatatt cttaaaattt 64620
gtatcatttt attattgtat tgtattttta tact
ttctta atatttttaa tctgcagttg 64680
atagaatcca tggatgtgga acccacagat aaaa
agggcc aattataata catacatatt 64740
atataaaatc aatctaagtt aagacaggag agaa
aaaata ttagaattat tagaacaagt 64800
aagaagaata ggccagtaca cttaacctca aatg
tatcag taattgcatt aattgtaaat 64860
ggactaaata ttcccattaa aataacaaga ttgt
cagagt agatttttaa attacctatt 64920
ttaatttgtt tataaaaggt gtacaccata aata
aatga tgcaggttaa aattaaagg 64980
aaaaggatgg taaagtaaaa tgataaaaaa taat
gaaaca aaacaaaaca caaagtaaaa 65040
gtaagccaat gcagctacat atgtgtatca aaag
tttata aatttgctgt gattcttga 65100
atcacttga gctttatctg tgtcttagaa ttg
ctttga aaggaatata aagacaggag 65160

ggcttctaaa gctagtaatg ttctatttct tgat
cttgct ttagttacg tggcgtgtt 65220
cctcttgtaa taattacca aattatatac ttat
gatfff gtatactttt ctttatgtgt 65280
tttatttcaa tacaagttt atttcaaaa tata
tcacat taatccaggg caggggtgc 65340
aatctcaaat ggctttagga atcaagcagg caat
gaatgt aaacatgtaa aagagccaag 65400
gggaagagac agaatgaaaa cagagataaa aacc
agagaa tgaatgccct gcctaaagac 65460
attaaaatca attttgtca aacctgtgc tgat
caaaca aatcacacat gcaggccaga 65520
tttgacccaa gggtgacttt cttacaaca ctga
tatata aaatttaaac atcagaattt 65580
gaaaagtgtg ccactataaa attctagccc acct
ctgaag tatgaacca cttcaattt 65640
gtgaggtaga atattaatct ttactggtgg attg
tgagaa gtgaggccaa gaagttggg 65700
aggttaacat ttacaatgtt ttagacaaat cata

aaagccacc aaggtgatg aatgagaaa acac
atactt aaattaacc atggccagg 67020
tttgctggta acttgggaac acagtaagg aagg
aaaata actttgttgt ggagaggga 67080
aaccaaggaa ggtcagaaa acatagagac agtg
gaagct caaggaaccg gaggttgcc 67140
caaagtcata aggcggatgt aacgagagca ccag
aacaac agagctggaa ggaaggaagg 67200
aaggaaggat atgtttagaa agcaagatgt tccc
agatga atactgcaga ggtagtataa 67260
ctcagtgcaa cgattgtact ggtaggcaa ggta
gggtgg cagggaaagt cactagcaaa 67320
catggccaca ataatggaaa ctaaactttg tggt
taccat gcaccaggct ctgtgctaca 67380
tgctttctgt agatcatctc atttaactct caca
cagga ttttaagcctg aagtttttt 67440
cagagaagac atacaaatcc caagtaagag catg
aaaaga tgttcattag cattagtcac 67500
tagaggaaat gcaaatccaa agatcagga gata
cgactt cacaccttca agaatggcta 67560
ttcccctata aaataatata ctaaactact cttt
gaaaca taacattttc cacaaactca 67620
cctctttgaa ttcacatttt gctttgccag tggt
ttatgt tattcagaca tgagtttgaa 67680
tctcagcatt tctacttctg agccctatga ccta
tgaaa gtgacaattt ctctgaatat 67740
caatttccca atccaaaaaa tgggaatacc tctt
ggagtt gtggtgagga ttaaataaga 67800

taatgaatat aaagtccta gtatagtaag aggc
atatta ttgttcaata aatgctagct 67860
tggaatgcta ctgctatagt tatttcattc actg
tagaaa tgattaattt aaactccttc 67920
aagtaactta ctaaagagtg aaagttctcc aaaa
ggcttg aatttactg caaaccttt 67980
tccttgtttt gctcttttat tcaggacaat acac
tttgct caggtgtgtc ttgactctc 68040
aagcattgct ttaaagaatg accagacttt gtca
tatacc attcttaag gagttcagga 68100
catgccacc caaaatagc tgctttcata tatt
gattat tttagctga tagcacttca 68160
acagcaaatg caagagagac tttttcggaa ctca
gctgcc taaaaacaga tcctccaaaa 68220
gaaattcaat tgccatata cctctccctg ggag
ttttat taatcagcaa agatacactt 68280
ttatcacaaa acaggaaact ggaagtcaac acca
cctaca gaaaaacttt ttcataaact 68340
gttatatctc ccattgattc ttctaaaaac ccat
tcatct ttcccagaa tcatttactc 68400
caccctaagt gacttacat acccctcccc atcc
cctggt aacacagat gtaagctctc 68460
aaatctcttt taggagtatt cattattttc ctgt
ggcacc ccatgaacat aatattaaaa 68520

tgtggctttt gaattggcta atgtcttttt tgg
taccca agttaaaga tgatggaaaa 69840
tgtcggggga caaatgctct agaaccgct agca
tagacc tacactaagt cttattcaaa 69900
aaggccctg taaacaaaac cctagttgac ttgc
agtagc tacagaatca taactggttt 69960
tttgagagca gagatctct cgttcctcc ctt
gtgata cttagccagc tactgtaat 70020
ttgcttatta tcaaaaggag cggccaggcg cgg
ggctca tgcctgtaat cccaccactt 70080
tgggaggcca aggcgggcg atcacgaggt cagg
agatcg agaccatcct ggctaacacg 70140
gtgaaacccc gtcttacta aaaatacaaa aaat
cagcca ggcgtggtg cgggcgcat 70200
ggcaggcgcc tgtagtcca gctactccag aggc
tgaggc gggagaatg cgtaacccg 70260
ggaagcggag ctgcagtga gccgagatcg cgcc
actgcc ctccagcctg ggtgacagag 70320
caagactccg tctcaaaata aataaataa taaa
taaata aataaataa gcatttttt 70380

tttacttta gccagcgcac cagagaagaa ccca
cacttg attgtcttat tttcccct 70440
acaatgcca gagcagtatt cacacattca tga
aagaaa acacatcact tagaacattc 70500
gaatagagca cgtgttttta tttgctctt ctat
gtttta cctccacttc tccacaattt 70560
tgatcccttc aaaaaaaaa cttactaat tatt
ctctat atattctatt aggaatcttg 70620
gctgtagact taatcttgag gttagaaga aaat
agatct tgaagccact atttggcac 70680
attctgtaat tcttagaatt tccattctaa caat
tttctg gatgaattta ataaccgttt 70740
atattttatg agctaaagt ccaatataa ttat
tcattt accatcttta agacttactt 70800
gtctgtttta ttcaaatgca ataaaaatgc ggaa
ctaata agagtaactc ccgatgagt 70860
ttcaacaaag aaaagaaaga aaacatattt ttg
gcgcac attcaaatca tttccttttt 70920
ctggtagggc caaatcttct catattggga aagg
aaatta gctttgcttc aaagcacttt 70980
ctgaagagca attactaat gagcttagga attc
tctgcc ctcataacc tcctatacat 71040
tacctgaacg cagagaaact tgagacgttc agca
agggag gtaaggccag gagtgttgag 71100
gcgtccaggc ccgtctgtgg agttcactgc cacc
ttcctg tgtggatttc agtccttgtt 71160
ttcctggatt ttgagttgca ttctcaatac atta
ttttta tttttattca tagtgaanaa 71220
attgaagact gaatttttc tgaattcata caat
ttatat gacatgttat tttttattt 71280

ctaaatattt tactgttgaa gtagttcctc tttc

taagtctttt catttattag ctttgcttta aact
ttgcta atgtagatatt aatattatgt 72660
ttatctatct tctttttatt gcacttgttt gcc
agcacc gaactaagca ttttaataa 72720
tatcacattt ttgtaactgt tttggcattt atct
tcttca ttgtgacttt acttgaata 72780
attatcaatg tgtatttcta tatttgagtg tttc
aatact tatcaagagt tttcttcccc 72840
attcttgggt cctgtgtttc gacacagctc tcaa
ctttct gtagtacttt gggtagtatt 72900
tttttttca agaagtcatt ggataagatt ataa
acacct ggcatttctt tatgagcctt 72960
tttcttcaact ccacaacaat aatgatttag atgg
gtatag aatccttgaa ttcataactc 73020

aaatctccat agatgttgct ccatttaatt ctgg
tatttt gtgttaccac aaaaaatct 73080
aaagtcagtc caagatttct ttcttgatag gtt
tccaat tttgtctttt gtttctgatt 73140
ttttttttt tagatttcat gctttcacca gggt
atgtct attttttgggt cgtctgttat 73200
gtgagttctc tgagctgccca tatgctcttt tgat
ctgctg attaatgtga atcgttaggt 73260
tattttcttt atgtctttga atacagatta ctta
ccattt attttaact tatcttcagg 73320
aactctaact gtctgtctat atgttagtaa tttt
ggcctt tctgtcatca tttaaatc 73380
ttggctctat tcttctacgt gggaagaata attt
atactt tattaatcaa taatttgatt 73440
ttgattcaat gattagcagt gctaattcta cttt
ttattg tttctgaagt atcttaaagg 73500
ttgctttgtc tatgaaaagt tttaaaacat tctt
cctttg tattatctgg tgccttttta 73560
tttctgtcag cttcttgggt tttcccttct caca
acctat ctaatgtctt attatctcgt 73620
ctttcacctt taattccata ctgtcaaagt gtcc
ccaaaa tgtaaaaaga atgcaaaata 73680
tgcgctaaaa tttcaggggt tcttgagcta aagt
tttttt gaatatata tctttttctg 73740
atattttgt gctcttttta actcaatgct agga
aatctc tctctgtctc atatgtttca 73800
ccatctact gaaagttttt taattggcta acat
ctgaat aatgcacat atcttttatt 73860

tggattattc ctacactagc tgcacaatgc catc
attgtt tcttccacca agaagagctg 73920
ggtagggccat gttcattgag aaaatcagtt tctc
tcaaac aggagaaaa atggcattgt 73980
cctatcgcta tgtgaataat tcaactaaaa agaa
taactg ttctcccagt aaagcttttt 74040
ctttcttaga aaaattgggt tcttttatat tcca
tgcctt tgcttcagag cacaatatgt 74100
gacctgggaa aggcaattac ccttgttaaa cctt

tggatacttc aactgaaagc caggtactt aaca
aaagca ggagaaatag atgctgggga 75480
ggtaatcca acgtccagtg caaatgctat gagg
gaaaac gacagagtcc caaacatgct 75540
ggagcttata gttagaggaa ggaaaaatta gatt
tttctc agggctttgg gattggggca 75600

cctggcagtc agcgccctaga ttccaaagca ggtc
agaaga tgcctctgcc caagtattgg 75660
aaaccttttg aatactttg agtattaata acat
tttaac actgcctgag aaaagtagta 75720
gttatgaagt tatacattta gcctatccca ttca
actcag gggattgtac acagatcaaa 75780
taaattgcaa ttgtgtttcc ctccctgata ttca
catagg aaggtgagtg gtgagcagta 75840
aacttcagga cctttaaagt tatcattgct ttca
cccttg caccagcttt ttgaggtaaa 75900
tattccatt ttctaggaga ggataatgag gctc
agagag ggtaagtggc ctccccaggg 75960
tcttctagct gaattgtaac cagcttgatc ttcc
ttttga attccacat ctgacctgtg 76020
agggaaaaag gaataaggag ccaggagtig cagg
gtcatt cttctcctca agaggcttga 76080
gagtaactaa gtatctgttc aaaacacttt tgag
aatttg gcgccctcat tacgtttctc 76140
aggagtccct gggggagggt acacttttag gatc
cccagg aatagagtga caaatacag 76200
ctaccacaac ttggtcctgt gcaactgtgc cctt
gctcag caattactga ctccattctg 76260
actgaactct gccaaaaact cttaacatta ataa
ttatta cctgttctca attttaataa 76320
ttaagagttt tacaacttcc agtgactctt aatt
caggtt tctttggctt actgttcttg 76380
gacaataaca gtatggtcac tgttgacag acag
aagcta gacatagtct gtatagctaa 76440
ctccctcatg tccttcaaat ctttcttcaa atgt
cagttt cttttggggc ctctgtgac 76500

caacctgatg aatagagccc accagcccca gacc
acagcg ttctgactt ctttactct 76560
gcttacttt tcccttttc acagcaatig tcac
attcta ttctactata acttacttat 76620
ttattgaatt taccactgat tgtttgccta acct
cactat aagacagga tctttgttt 76680
attctccaag aacttagaac agtagttatt caat
taatat ttgttgaagc aatgaatgaa 76740
ccaaatgaat gaatgaaaga tgaatataaa aata
ttata tgtcctaaca ctctactaag 76800
cattatgaca gaatatccac caaaaaaaaa agat
gagaag gagaacatcatttctctg 76860
tagcagggt aacagaacat gagcagatgg caaa
cgtgag attatcagca ccttctgggc 76920
tagttcctgg aatcagctg atttctgct gctt

ttgatctggc ttcactctgcg tggaggatct gatt
 catgaa attgtactg ctggaacac 78300
 ttcaaagaag caaataactt cctgtacccc ttca
 aattat cctctctatg agatggaatg 78360
 aagagaaaa ccactcattt tatagaggtg gaga
 tgttgg caacagggaa gaccagatta 78420
 atgggctcat tagaaggata aaataaggtg tctg
 ccatga ttatTTTTgt aatcttGtca 78480
 gttataaac agtgactgct ttcgatttga aaaa
 aaaata catagttaa atacacctac 78540
 acattcacac caaagattct gatttaattg gtat
 gaagcc aaaccaagac attagtactt 78600
 ttccagagct tcccaggatga ttttaatttg cagc
 cagtgc tgagaaacac tgagacgatg 78660
 cacataaaat gcctagccca gagcctgctc aaga
 aatgtt agctgttgc tctactgtc 78720
 actgtttggg tggttgagac ttgtgccag gctt
 cctagg ggagtgttcc tcccattgcc 78780
 ccacagtcc ctgtaagtgg tggaaaagga gacc
 ctatag cagcacttct caacaccggc 78840
 tacacatttg aatcaataga ggagccttgc caag
 gtttgc aaaagatggc tgggtctgtc 78900
 tctaaccaat tagaatctct gaaggtggga ccca
 ggtatc cccattattt actttccca 78960
 ttaactattc cacaataatc ctcatatgat ctga
 tctcta tttcccata atgattgact 79020
 ggtatttctc tttgccattt cagtattcac aatc
 tgcttt gtattaaagc tgcttattta 79080

cgttatctct cccactgtga accactgcag atca
 gggact ggatttgttt tgttttgttt 79140
 tagttttat acaattgctt tccccttgc ctca
 gcatac agcaaagctc taacacatga 79200
 tatatactta cataatatta atttaattaa ttgt
 cagaaa ccatagatac tcaactataa 79260
 gactttctg ctttctccac tctactttc catt
 ttatcat gttttctttg ttgtttgtct 79320
 tttctatgcc ttcttcacac ttagccaaa gttt
 ttttat tcaaaattca aattaattta 79380
 attatggaag ctgggtaatg agcctaataa tata
 aacaca gtgtgacagt gagcatgcag 79440
 ttagttacaa tgttccatct atttttctgt tgtg
 tgaagg catccacaat ttataaagta 79500
 e210gt06tt caaaaattaa gaaccactat tcta
 a210t1a102100aggcc agactatgga 79560
 a2021cDNAc aaccaggagc aggagtgtga atgg
 a21aaH0teagap1emsggatcatccc 79620
 t22aa1ccct gagcagagga acaaccgaaa caga
 g2201aex0naagctta taagtctaaa 79680
 taaaagtgg gggtttaaaa aggctactta atta
 ctctct agaaaaata ttttattcat 79740
 ttctactgg gcttctataa tcacctcagc tctg

<222> (31560)..(31663)
 <220>
 <221> exon
 <222> (64868)..(64961)
 <220>
 <221> exon
 <222> (80499)..(80700)
 <220>
 <221> exon
 <222> (87482)..(87558)
 <220>
 <221> exon
 <222> (97994)..(98080)
 <220>
 <221> exon
 <222> (101581)..(101761)
 <220>
 <221> exon
 <222> (102663)..(103161)
 <400> 16
 gatcacgagg tcaagagatc gagaccattc tggc
 caacgt ggtgaaaccc cgtgtctatt 60

aaaaatacaa aaattagctg tgcattggtg aacg
 cacctg cagtcctagc tactcaggag 120
 actgaggcag gggagtcact tgaacctggg aggt
 ggaggt tgcagtgagc cgagactgcg 180
 ccaactgcact ccagcctggc gacagagcaa gact
 ccacca aaaaaacaaa aaaaaaaaaa 240
 aaaaagaggc atttctaaga gagagacctt aacc
 ctaagg cagacactga agaggatttg 300
 gggcatgaaa taggagctgc aggttggaga acat
 cacaag caagggcatc tgaaccacac 360
 cctaccact ttctcaagag acagtccaga gagg
 gagtaa ggcacagggg ccctctctg 420
 catattgaaa gtgagaagaa atgcctatgc gagg
 gtctag gcagagagct tgaacagcc 480
 acttgtgggt ctctgcacct gcagcctggt gcag
 ggatca gaagaatgta ctattctgt 540
 gcaacaagag ccatgccttt gtgacaaagc ccgt
 ggccca agaaggccct gcatttggaa 600
 caaggaggca ccactttgat ctgctgacag ctaa
 gtgcaa ggtggaatca gagatatctt 660
 aatagatgtc aatgataaca gatgatacca agaa
 ccaggc atcttagaca cacacacaca 720
 tacacacaca cacacacgtg cacgagcacc cacg
 cagca tgtgactgga taccgcatga 780
 gttttctaaa gcttaaagat gactacaagg acaa
 agagta aacacttaat tgactgcaat 840
 taagtttttg atatccagca gagtaggagt tttt
 actagc aattaacttc agtttttagaa 900
 cacgacaaat cttatittta ttatacaact acaa
 acaaat atataatgaa tgctcagatt 960

agtcactcct gggccaaggt ttgatgtccc tatt
aaaatg ctgttgagag agtaagtggc 1740
ttcagtcact agccctggag aatgagtcca ccag
tttgat ttgtttacaa ctgagaactc 1800

tttcagtttg tgtgcgtgag gtgctggggg agca
ggtgga agaggctttg ctggagtggg 1860
ggaaatatcc tgcctgggag tgggattggc ggaa
gggggc atatttgtca atcacaatag 1920
aatcctagac acttatgtct gggaggcata gcat
aggcca ttgcattcat ctccccca 1980
gtacctgaat ctgtgaccaa tggactgag gatc
tttact taacaacctc tagtgatggg 2040
ataatcacct ccttctaagg caagctactt ggaa
actcta agatattact gagaaaagac 2100
cctgagccca gccttgaatt agtccaaagt ctaa
tgcttc tcccaggtga cagcccttga 2160
aagagtgtgt gacaggcgcc atgccccctg aatg
gtctct tctcccaat aaataatacc 2220
tgattctccc tctgcaatgt tcatgaccca aaca
aagctg agcctctgtg tggccactct 2280
cagtttgatg ttgtaccca aaccttcaac ctca
gtctta atgcctggga atgggggaat 2340
gtgtggaaaa aggcatgaaa cacagtacac agca
aaatgt cttaacattt ctcttgattc 2400
tctagctcct tatccctttt ctaaaaaatc tctt
tctaaa tctttcaagg ataaaggga 2460
gggggtagaa aggggaagtg aggagaggta aagg
aagatg ttcatatttg ggagcctata 2520
atgttccaaa cacgtgggac atttaacttt caca
aagtaa gtataccac cctaatttta 2580
taaggtagaa actaagacc aagatatcta agta
agttgc ccaaagtcac aaagcaatta 2640
cctggcaaac aatggattca gataatgact atat
catagg ccaagcccaa ttacactcaa 2700

aataattcac atcttctaa gaggcaagcc ctgg
gggccc aagagggggt tgttgagtaa 2760
gggcagaaag tacaaggag acaagttgcc aatc
acagct tggccctgat tattgtaata 2820
actgacacaa ttaaagttca atttcgtatc ctta
gaaggt ttccgtcata ttccaaggct 2880
gatgagaaat ttccattcta agaatgggga tctg
ttgaat gttttaaatt caggcactta 2940
attaaatctt ttaagatgac tctttctgtg ttg
ccctta gtcttttatt tctatccaat 3000
attgttcttg gaccaaatag ggtcgggctg ctgt
ttcttg tagcccaata atgagatgca 3060
gatgaactgg ggaggaagag agttttttt ttaa
gtatat aaaaacattt attcattaga 3120
aaacaaggag actggcaaac atatattcca aagt
gaaagc agctcaatgc agttcagtta 3180
ggctaattta agagaaaggc ctgcatittt aaag

gtgaagcagc tgcagagagg tctgggttgc tata
gaggcc tgagtgttg tagacttaa 4500
gcaagagtgg aacaaggca gccagtgtct gttt
gccatc caacagttcc atcttgacaga 4560
agccgcggat tagttctgcc tccgtgcat ctgc
tgcccc aaccagcccc agctcctct 4620
ccatagtgtg ctcgaaactt gtattcttct cctt
gggatc tttggtcttg tgctcctggt 4680
cttcccggag aactcggcgc tgacagagct ctcc
actcac tgcctgtctcc aagtggacca 4740
gctgctgcag agccacatcc ccagccaggg acaa
gaggtt catcaacagg aaagtgggga 4800
gcattgtggg agactccttc gggccccct gact
ggttct cttctcttct agcttctcca 4860
gggcctgttt tgcacagccc tgccatatct gggc
acagat cactgtggga ctctctgcca 4920
gttggtaaat gagggctact gccacctctt tga
tgggat ccagagtggg tctggtggac 4980
aaagcctttc gggaccgtct cccgcagtca ctca
aacaac ttgtgttctt gaggcaactg 5040
gaagtggggg tgacgtttgc ccagagaagt cttt
ctactg tcagagatgt tggcgatggc 5100
atggcacacc tgctgggcca gccggtagtc ctgt
ggaaac ttcggaagag agttttatit 5160
tctgcaaccg gtgacgggga gaaggcctgg aaat
tattgc cagaccaact taaaattaca 5220
aagttttcca gagcttata accttccaaa ctat
atgtct acgtgtaagg tatgcattca 5280

tctaaagatg taaatggtta acttctttta atct
ataacc aaggtctgag tctaaatac 5340
cttctcttgg agcctcagta aatttactta atct
aaatgg gtccaggtgc tggggggatt 5400
acccttatct tgtctcctgc taaattacag aggt
tttggg agttccttca gacctcaat 5460
aaacttgttt gtggaggcct aaggagtttc ctta
gacccc cagtgaaact tgtttaatcc 5520
taaattgggtc ctgttaagaa ttcctttggt attt
tgtcat gccttaagtc ccagaaagg 5580
cctaggtaaa actcttgatg ggcttttggt acat
tccagc cttcgtacag gggcactggc 5640
ttttaatatt taacttaacc actcagtcag tact
gaaaga gttgtcagtg acacctggcc 5700
tgccacaatt atgagtgtcc agaattttac taga
tgtttg ggggaagggg aatgagaagc 5760
ctgaattagg aatattctcc acgagtctct caca
atctag ttggaagac tagtaaactc 5820
aatgacatat taaatgataa gtaaatgaca acct
gtggtc cttacttcat gcctttgcac 5880
aactgctct ctctacctgg atgcccttct ctca
cctgat ctctccagca aagcactact 5940
cattcctcaa gacacaaagc tgaacaggca ctct
gtgaag cctgcctagt ccgcttgctt 6000

ttagtagtag gtagtcaact ggacacagga ctag
gtttat caaaacttgc tctcgggaaa 7320
taaaaataag acaagaaata caatatacac aaga
acacat gttctgttac ctcagtctct 7380
gaatagcctg tctctagact ctgtttgatg taag
agtggg tgcttctgaa aaaagaactg 7440
agtgactaac aatggttgga gaagggtgcc ttic
ttaatt ttagttttta ttattttat 7500
tgaagtatga agttcaatcc ggtgcacgca agta
tcagct gatgaatttt cacaaacaga 7560
agataccagt gtaactagca ccaaatcaa gaaa
tgttac catctgcctc tatgccccct 7620
cctaccaatt cccagtacca cctcttcccc ccac
caagag taagccctga ggcccagaca 7680
ggcttcacct aattttatat tttatttttt cttt
ttatga acagctttat taaaatattc 7740
acataacaat acagttcacc cattaaaagt ataa
aactga gtggctttta atatattcac 7800
agatatgtat aaccatcacc aaagtcaatt ttaa
aatatt ttcatcacct caaaaagaag 7860
gcaaatacct ttagctata actccacct caca
tcctcc gtaaccctag ccaactgcca 7920

atctacttcc tatgtctatg aaattgccag ttct
ccacat ttcatataaa tggatcatg 7980
taatatatta tctttgtga ctggtttatt tcac
ttaaca ctttcaaggt tcatttttgt 8040
ttagcacgt atccatattt cattttttat ggct
aaataa tattctatca tatggatata 8100
gcacattttg tttatccgtt catcagtga tgat
tatttc agtggttttt accttttggc 8160
tcttaggaat aaaatgctgc tataaacatt catg
tacaac tttctgtgtg gacagttttt 8220
tctcttgggt atgtaactag aagcagaatt gctg
ggatcat atggtaacac tgtggttagc 8280
attctaagca actacagttt tatattccca ccag
cagtgt acaaaggttt caattcctcc 8340
tcatcctcac caacatttgt tgtttgggga ttgt
tcatta caaatacatg aacagtggt 8400
taccagagtc agtcagggtg ggaggaggga atgc
agagat ttaggtcaag gatacaaagt 8460
agcaaatagc tagaatgatt taattcttta cata
aataga accttacagt atgtgtgctt 8520
ttgtttctga cttcttttgc tcagcattag attc
aggaga ttcatcaaca ttgctgcgta 8580
tagttgcaga cagtttacta tccttattga atgg
tgttct actgtgtgaa catactacag 8640
ttgctttttt cattccacta gtggtgggca ttg
ggatcat ttccagttta gggctactat 8700
gaatactgct gccttgaaca gtccaggata catc
attttg tgagctgctt atttttatta 8760

tttgtagtag ctgaattttg tattatgtgc aggt

tgattaagaa attatgtcta taattgtgcc tgag
ctggcc tccatagttc attgagtttg 10140
atgcttctctg ttgtacgcaa aaattgccat gttg
gttcga tgagagcatg cctgcttttt 10200
ctactacctg tgggtttttg agtacctata ttg
tattgc acttacagtg aaaattatct 10260
aattatatta ttctatttaa ttacaattgc atca
agctcc aataaacaat ccaaatttca 10320
ctgaactgaa agttgagtgc aactttgaa tagt
cactcc ttctgttagg ttgggtgcaaa 10380
agtaattgcc attactttta gtagcaaaaa cagc
aattac tttcgacca acctaata 10440
tatgtgcaca gtaggcagtt tggctcaggt acac
ttattc aaaacattgc attaagtaag 10500

ataatacatg ttaaataacct agcacacagc ctgg
gatgca ggtgtcggcc agtgtttgtt 10560
ccccacttcc ttagtgacaa agattaggct tagc
tacttt ttgggaaagg tgagtgccac 10620
cagaaagatg aggccaaggc cttatcagac acac
tggac acagccttcc caaggaataa 10680
atccagaata tttgtgtat gaggttctggc tctg
aagccc agcctgttct tacactgacc 10740
ccccagtttc tgccttgatc agccaccac tagg
ctgggc attgcttctc ctactctgc 10800
tatctagtga cccaacctcg gcccaaccct ccag
ctttct tctggccatg cgactgttct 10860
gctagtctgc tccgataatc tgctcctacc ttcc
gatgcc tcctctgagc ttggctcca 10920
ctccccactc agcacaaca acttactttg cccc
agtatg ggttacaaca gctcagactc 10980
ttctagaggt ctaatcctgg acacctcgtt tgct
ttataa gcacaatctg gaaagaagag 11040
tttcattgct cagagcccct caggaagcag aaga
ggagag tggatgaagag agcattcctc 11100
ctctggaatg accataactg gtgtttcaat ccca
gctccc ctccatacta atacttgggt 11160
gagttactca ccaggctctat gcttcagttt ctic
atctgt aaaatggagg ttgtaaaaat 11220
atcatctacc ccataggggt atgggatga ttaa
attagt tcttctatag aaagtgcctg 11280
cagcagtggt tagcatgtgg taggcacttt gtat
gtgta tctgttatgt ctgtttgctc 11340
ttactaacat ctatatttct gagtcttaga cctc
cccaga gagtgtgaag ttcattgtgt 11400

ttcatgggaa cagatgtaag cccacttgct gaat
ctctct ctgagctaat aattaacaaa 11460
tacattgcac agtagcttac caggaaagcc tata
ctggtc tgaacaagaa gaaacttgct 11520
gaacaattct aaagctcact tctcaatata acag
cagccc ttgctcaaca tgttgccat 11580
atcttcagta ccggtcagag gtcacagcca tcat

agactggggc agcaggggtt acttctggca tttt
gtaagc acagcccagg catgccaat 12960
ttcctgcaca ggaccatcta tcctaacaca gaat
tgcccc ataagtagca atcctgttaa 13020
taaatagtgg cccaatccct gaactaatct atct
tgtgtt ctagtctctc aaggattggc 13080
ttagttcttt tcaccttacc cgccatcagt taat
ttaatc accactgttt ccatagtgg 13140

aatctaataat attagactga tcaagtgtgt taat
caaata tattggatta gctggcatgc 13200
attatagcaa ataaaatagc cagtcttcat tttt
gatcta gtttaaagaa agcctctact 13260
tcttatgtgt caatttttgc agaaaacatt attc
tagcaa gttggcaagg agtctaggac 13320
ttatgttaag acacaccatc tcatcccag ttct
tgcagc tctctgtcta gtattggcc 13380
ctattcattg catcagcacc aacaacagct accc
aggttt tatagggcaa gcattttact 13440
aaacatttta cataaactat ctcatthaac ctic
acagta gccctataaa tcaggcattc 13500
ttattacaat ttacaaaga gccctggatt ccgt
gtggtc agtagcaagc ccaagatagc 13560
acagctgtca tgtagcagag ccaacattca aaat
cccaca gtcgggctcc agtagccatg 13620
ctgtgtactg cccatgcatg taagaacata ccca
acacaa tgaaaaataa gaaatgaaat 13680
agaaagggca tgaaaaatat caaatcataa ctgc
agagga aaaaagtcaa atttaagctt 13740
agagttactg caaagttact gcaaccatc atat
tttatt ttgtgcttcc tagttagtgg 13800
ctaaaactaa gggcaaaact gactaaatat aatt
tgttgt aatcttgagg gaaatgcaca 13860
gcaagatggt tcttgatcaa gaaaactgat acta
cggagc tttatattca gtactttgat 13920
gaaacagcac taaaatgtcc tcaatacat ctct
acaag aatcagtgat tcttagacct 13980

ctaagaggag ccagtgtgat gcctaacat aggc
atgtag gctacttgac agacagactc 14040
agcatagcag tcatcatcac gtagtaattt ctag
catcct agtagctttc tctaggctt 14100
tagttttgaa taaatgggat ttttgctaag atct
tacatt atgcaacaga ggcaaccaca 14160
aagaccacc ctagaaaatg aatgatctt gggc
cccttc ctcccttacc tcctgcttca 14220
cactgcattc tttgggaagc ggatgctgaa acag
agtcag gtatacaaaa atctggggag 14280
aagtcactcc tgtgaaagca aaggaagaa gtaa
gattgg gctggaggac ccatcagagc 14340
ctgacattaa cctgacagtc tctggcagct cagg
aatcct ttaggatttc catgttgggt 14400
ataaatgatt agactcttct actataactt agtc

ttatatatac acactcgctt taaaaacaac acta
aagaca ttgagttgag ctggaagcat 15780
tgcatactct gagatacaca gttgatattg ttac
ccacag tgtcccttca ggaaagccag 15840
aggatcatctg caacaccaca attaaggata aaag
gacctt atattatcag aaatttcaat 15900
gtcttcataa aaattgtgtt tatattcaat atct
ccctta tttagtgtga caaatgttca 15960
tgtacgagtc atctcaagaa aaagagttac tcag
cttgct acgtattcat tattctatgg 16020
ctctgctatg caggggaaag tgcaaacagc aact
gagaga aagcaggaat ctaagacatg 16080
ggactcaact tgccctttac acagggtgaa tcct
acacta gtgacctttg tgttttaagg 16140
aagtttgcaa atatgtttaa ttggacaaca ttic
ttcctt tatctagcaa gcaactgagta 16200
tcttgccagg cactatgaaa aaagataaaa ctat
aaacat gagcaaggca cagccactgc 16260
caatcagaag cttacaatct agcagagatc ttaa
aatgca gggagctctt ttagaaatct 16320
gcttagggat caaaatttcc aatcacactt ttcc
ttccag catctttatt ctgtaatcat 16380
tattttaatc ttcatitgaac gagatgatta atgt
ggttcc atctgctgta tgaatcacc 16440
catgctacag tcagccaatc aagcaacagc agta
ataatg tactacttca tttaatggaa 16500
atttaccaag ctgttactat gtaatatcac agtt
ttaggg cctggagagg tagagctgaa 16560
ctaaaaataa taatctctgt tatcccatag tata
gtggaa taggaaagaa atacaaaaaa 16620

aaataatgtg ttcatgtatt ataggacta taat
agtagg gtaggaagat acacagaagt 16680
gggaataacc aagccaatct cagtactcag aaaa
ggtgtt ataaaggagg taaccttgaa 16740
ttaaaccctg aggaaatgga tattcttcag gtag
aggtgt ataaagagct tcccacacca 16800
atggagcagc ataaagaaat ggcatggcag agtg
aacagt tgggtatggc caaggaaact 16860
ctcaactgca tcttcttcac tgccitcaact gatc
actcaa cgctctccat tctctcagca 16920
aacaccctga ctaactaaac tcccatgact agca
ggatat tattagactt aacaaacctg 16980
tcaatttata tgctttccct ttagaaagac ttga
cttttt tttagtgaac tgcaatagaa 17040
ctaagctcag gagatgcaac tatgaaagat gaag
gaacat tataaaaatc tctgcaatga 17100
gattctgcct tagatigctt tgctggtatg tcaa
ctgatt actccaattt aaagaaaccc 17160
aaactggaaa ttataaaaga taaattgtga gtgt
atttta tgcaaaaaag aatcaaatca 17220
aatcaaagtc ttgctctac attaaacaaa cgac

agaaaaatac attaaaaata cttcatgaaa gagg
atatat ggatggcaaa gaagcacctt 18540
taaaagtgtt caacagttta tacactattg atgg
aaatgt aaattagttc ttccactgtt 18600
ggaagcagtc tggagagttc tcaaaaaact taac
taccat ttgaattagc aatcccatta 18660
ctgggcatat acccaaacag aagaaaaactg ttct
cccaaa aggacgcatg cactcatata 18720
ttcatcatag cactatgtat attcacaata ccaa
agacat ggaatcaacc tgaatgcca 18780
tcaatggatt ggattaaaaa atggaatact atgc
agtcgt agaaaagaat gaaatcatgt 18840
ctttacagca acttggatgc atctggaggc catt
atccta agtgaattaa tgcagaaaca 18900
gaaaacaaaa tgccacatgt tctcattat aagt
gggagt taaaccttgg atacacatgg 18960
acataaagat ggcaacagta gaggggaaaa ggaa
gaacta gagcaagggg tgaaaatcca 19020
gctattgggc attatgctca gtacctgtgt aatg
ggatca atcgtacccc aatctcagc 19080
accacacaat atacccatgt aataagcctg caca
tgtacc ccctgaatct aaattaaagt 19140
tgaaatcatt tctaaaaaaaa gaaaagaaaa atga
acaaat tgaaaataaa aagatgttca 19200

acatgattag tcattagaga aatgaaaaat aaag
ccatga tgaaatatca ctacatatct 19260
agtagaacia ctaaagaaa acacactgac agtc
ctgagt gctagaaagt gtgtgcaacc 19320
acagtctctc tcatacattg ttggtgggag taca
cagtgg tgcagcaaca ttgaaaaact 19380
gctgggcagt tttttatgaa gttaacata tatt
tactta ctctgtggcc caacaattcc 19440
acttctgagt atttgtccta gagaaatgaa aatt
tatatt cacacaaaa cctgtacatg 19500
aatgtttata tcagccttgt ttgaaataac aaaa
aactga aaataacca aacatatctc 19560
agtgagtgaa taaacatatt gtaatacatt tata
caattt aaaactattc ggcaataaga 19620
acaaacaaat gatacacaca ccttagaaga attt
caaagg cattatgatg aattattttt 19680
tttttttga gatggagtct cactctgttt ccca
ggctgg agtgcagtgg cgcaacctca 19740
gctcactgca agctccgcct cctgggttca cgcc
attctc ctgcctcagc ctcccagta 19800
gctgggatta caggcgccag ccaccacgcc cggc
taattt tttgtattt ttagtagaga 19860
cggggtttca ctgttttagc caggatggtc tcga
tctccc gacctgtga tccaccgcc 19920
tcggcctccc aaagtgtggt gattacaggt gtga
gccacc gtgcccggcc tatgatgaat 19980
tttttaagc taatttttaa aggttgcata tttt
gtaatt ccatttactg aagattctta 20040

gccagatgat aaaacatatac ttcaaagcca gctg
ggggga caactatcac ccagaattct 21360
acatctagca aaaatacctg tttaaaatga agat
acaata aggactattc aaaatttttg 21420
taatgggaga attccttacc agcagacctg tact
ttaaga aacattaaag aaagttcttc 21480
tgacagagga atgtgaaacc agaccggaaa tttt
atctac agagagatgt gaagaactct 21540
gaaaatagta aaaataaaga ttaatatata aagc
cacatt tttcttaatg ttaaatgact 21600
ctaaaatgta attgactact tgaagaaaaa ttgt
agcagt gagatttata acccatgtaa 21660
aatttaaatg tctgataaca atagcacaaa gttt
atgagg aatttgaatg tctaagcttt 21720
cacaatatgt aagaatttgt ataatatata ataa
aacatc taataactcag tctttacttg 21780
ctgcagggaa gatcaatttg gcaggtccag cact
ggaatt accatttaga ttagtttaga 21840

aactgcggaa gttcaagaaa gaaatcatca gtac
ctagag tatgccaat aatagtaaga 21900
atacagagag gattcaaatt tgagatctac ttaa
taaggt aaaataagga ggatgcggtg 21960
actgagtatt gagatgttct gaatgtgagg taga
gggaag agtctactat gtattatggg 22020
ttcctggctt ggggtgccct agcagacagt ggtg
ctatca agtgagtctg aggagagagg 22080
aggataggat cattaatatg aaaagttaat gagt
ttggat tttactggg gtttcaggca 22140
atttaccatgt aatgttatta ttgatgtgtt tgga
ttgaaa tctaccactg gtttcttct 22200
tttatttgtt ccatctatat ttttcttct tttt
tccttc tatttcagcc tggattaatt 22260
gagcttttta tgatttcatt ttgtctccac tatt
ggctta ttaattatgc ctcttttct 22320
atttctttta atgttgcct aggcctcaca atgt
acatcc tctctacatt cctacagtta 22380
tttaacatac gtttcttct tgaacttctg cata
gtttcc taattaaatg gtaattccag 22440
tattggacct aacaattga tctcaccac agca
actaaa gaaatctatt tataatacat 22500
gtttgagac ataacattc acaactctc acag
tataaa aaaatacatc ctctttta 22560
tggcatgtga gaccagaag tctggattct tctt
gtttct gcagacccat tttgccaact 22620
tcctagctcc tatttaggct tcagcaataa caaa
cagatg cttaatatac acaagccaag 22680

tagtttctca tctccataac ttgttcatg ctgt
tatatg tgcctagaat caatattctg 22740
cattcctttc tcacctgacc aatcctcact gaaa
agctca gctattgccc cattcttgac 22800
ttcttcttg tccaccgct tttgtctcc aact

taagtttcca acacaccaat tcttgggcac acat
tcaaac tgtagcagta ggcaaagcca 24180
aatagtggaa ggcttttatt ctaagctgtg ggac
tcagct ttattctgtt aacagtgaag 24240
atgcagaaaag ggcgagatgc agtggctcat acct
gtaatc ctgacacttt gagaggtga 24300
agtgagtga tcaactgagc ccgggagttc aaga
ccagcc tgggcaacat agtgagatcc 24360
cgtctctatg aaaatttta aaaagtaaaa gtta
gctagg tgtggtgtca cgtactgttc 24420

ccaactactc aggaggctga ggcaagagga tcac
ttgatc ctgggaagt ggagctgcaa 24480
taagccatga tcacaccact gcaactccagc ctga
gtgaca gcaataccct gtaccacttc 24540
cccacaaaa aagatgcaca aaaggagat ttat
ctccct agttttctaa aggagcaaaa 24600
gcaacttctg tgggtggaat agccctataa gtag
aagggg ccaaaagata aaaaggcaa 24660
ccaagaagg gaatgagggg atgagaagaa gaca
gggact catactgtca cattagtcta 24720
gggaataaag aagaaaagac acaacatcaa tcta
aaaaga aataaatgaa aacaataaaa 24780
ggcagtggtg aaggcagtcg agcactgact tcta
tagtat gggtaaagc ccagcttcac 24840
ctctaacttt ctctgaaatc ttaaatgtt ctaa
cctttc ttattttgtt catctataaa 24900
atggagattt tatctcagtt tgttgtgaga ttaa
acaagt taatgattct aactacttag 24960
aaccttgcca aggatataat aactgcttaa taac
ccctca caatcatgtt ctgtgttcta 25020
gagaagtcag gtaagggtg gtaattctct tita
aaccat gaagtctacc tagagttatg 25080
taggatgtca ccattggggg atgctttgcg gtag
gcacat gaaaccttc tgtaccattt 25140
attgtaacat cttgtgagtc tctaattatt tcaa
aataaa agttttatft tgttttgttt 25200
ttcttaaagc cttttcaaac cacaatggca attc
attcaa gcatgttctc agcacttgct 25260
gcatgccata ccctgagctc ctctgttct aaca
ttagta aacctcattt tccaatattc 25320

agaaagcaat taaccaaag acagtgtgac tttc
catttt tactattgct ctttagcaga 25380
aacatagcaa taaaataaa ctattggaaa tga
attatg agtatcctag attaattccc 25440
aaagttgcag tttctttgt tgttcagctg ttg
attttc taagagcctg aaccagcca 25500
agtgcatact ctatttctga gcagagtct gcc
agttct ctgtctgact agaattgcac 25560
agaaaccaca aatctctcat aaagcctaag ggtg
tttctc aacagaggca tgattggaat 25620
tctgagctgg ataatttaact actaggttac agcc

ttgttttt cagtgttct tgttacttg atgc
ttcca attagtgtta aacgcatgac 27000
acaaaaatct tcacacattg tgcccactcc cata
gtocca accacatgic tctgtctcag 27060

actcttgttt ccaatctcca agtccctttc attc
aggcc ctgtccacac agctagacta 27120
ttggctactg tgcagaaacc tatacatata ttca
cacctt aggccaattt ttcttccaca 27180
cgaatagata accatattca ttgcttgacg ctic
attcat tgggaagacc ttcttctcc 27240
actgtcttcc aaggctacc cataattcag ctgt
acttca gtgatcatct atttttgctt 27300
tacagctact taaggaacta acccattgic agcc
aggatt ggccttttac ctccctttca 27360
gctagtcata gagaaccccc atatagccat aagt
gtgagc tatgcaaggg cactgtgaca 27420
accctgggtg gtgacatgga ggcatctgtg ctac
ttgctc atgcagcctc ttcattgcccag 27480
tctagtcca tatgggtttg atcccagatg tgcc
atttcc attttccaat agaaggctgt 27540
gggacacgic tgagtgtatg acttagtgca ttgg
caataa tctagctcat aatggtcagt 27600
tccaaataca ttgggtgccc cattatcagc tght
ccatct tgaccaaggc tcagcaacat 27660
tctaggaagg gtttctcaa agggtataa cttt
gtactg aaaatggatg gcattgcttc 27720
agagccctag gggcctgcat tctgattctt tcgc
ttgggc atccatcaac tccaaactgt 27780
atctttcccc actaacacat tcagccat gggg
tccacc agatcatatg cctcaagtag 27840
tagggttgct tatactgacg ccatacatg ctgc
agagcc ctttcttgct ttcttgctcc 27900

aggcccactc aaagctgtga gacttctatg tagt
tcagta tatgggacca aaaatattcc 27960
tagatgtgga atgtgttgc tccaaaacac aaag
aggcct accaggtatc ttgctctatt 28020
tattgagatt gagaatgtaa gatacagcaa tttt
actttt acttgaaaat gcagtgggtg 28080
gagtgttatt ctacagact ttactactg aacc
actaaa aactttaccg atgtggcatg 28140
ttctgaatt ttacagggg ttgtctctca ccct
ccagag tgtatgtgic ctaccaatgc 28200
ctctaatagta ttacacactt cttgttgact ctta
atgaca tctttgatgt aatggatca 28260
atgtgatatt ctacagaatg ttcagatggg ccat
gtctct tcagacctta ttatgacaga 28320
tgtttgaaga ggtaacatag ccatgggcaa agca
gaaaac gaatattatt gtctgtttca 28380
tgtgaataca gactctgatt ttttgatgt gtct
ttgtct ggttttgga tcaggataat 28440
attggcctcg tagaatgagt ttggaagtat tccc

tgggaagtg tgtttctgt aagcaacaga tcat
tgaatc ccttttgttt tttcaatccg 29760
ttcagccact tggtgacttt tgattggcaa gtct
cagagt ctcatccaaa gtcttcaatg 29820
tacctgggta ttgctgctgg ttattctgag ccca
gggact ctttagttag caggtgatga 29880
atgttgccag gactatgtcc ttccttcaa ggca
gtagtt tcccttctgg ctagggcat 29940
gtctagaaat gccatccagg agctagagct tgga
aaggcg gcctctcaga gctgactagt 30000
gccctctcct gtttgactg tgctggatc caag
atgtaa gacaaaatcc ttcctactcc 30060
ttccttctcc ttcttctcct ttccttaagt ggaa
gaaaga gacctctttt ggagctgtga 30120
gaattgcagc ctggggttag gggaggggta gtgc
cagaac tcccttagcc acccaagctg 30180
gtatctcagt agtccatgtg cctccccagt gtac
tggctc tgggccagct tcagaactag 30240
aacttgcttg aaagtgcac tccttgggc ctag
actgac tttcaagtgt atttagagcc 30300
ctagagcact ttagcttgca gtgtaaggc ttgt
gggaac tcaagtctg accaccagga 30360
ttggtgattt ccttttgct agagctaata taaa
tgctgt ctccatgggg tggggcatca 30420
gctgagtttg gccagtttt cttttatgct ataa
taggac agcactaagt tcaatgcctc 30480
acaattgctg tgcttttctc ccctggcacc tagg
aatgct ctccacacc tgctgccatt 30540

ggtgggggat gggagagggg tggcgtcaga gatt
taaac tgttttttt tttttctac 30600
ttcttcagt cctctttcag caatatgaag ttaa
aaccaa gcactatgag agctcacctg 30660
atttttggtg cttacaaagc tactttttt gtgt
gtagat agttgctaaa ttagtgcct 30720
tgctgagggg ggaagagggg acgatcagt gaac
cttcta ttctgcaacc ttgctgcag 30780
cactctttt agaaagattc tggattacgt gata
aattag tgatgtctgt catggagggg 30840
tgaggggcag ttttagaca tatagcctat ctg
ccattt ctgctataaa catctgcaca 30900
gcttgtaaa tctgtaacta tagaattgag taca
gatgac ctgcccaca gaggaaaaat 30960
gtcctgatct tggccttagt gcctctgtaa ttca
accaag tatattaatt aatggatag 31020
atcatacact tgctgtttcc caagtgtaga gggt
gaaagt ggaaggaga agaaagcaaa 31080
gaaaactggg aggaggggca ctaagactgg gcat
aaggag aaacaagagg tccaatttgc 31140
aaaataatgg gtgtagtaag ggaattttg aagt
attctc caagataac gattttgctt 31200
ttctcaattt tgcctcttg attctcacac agtg
ctttct ttagtacaga cctacatacc 31260

atgcatttct agaaagcttt atcctgctag attc
catttg ttagtagact cttttaggat 32580
ctttgtatat atattcataa gtaaaatfff aatt
tttttc attggtttta ttattttcag 32640
gtcatggtaa tgaagttatt ccatattcag aaaa
tgaata tggaatagtt acaatcttct 32700
tttgtgctct gaatataacc ttgaaagttt ggta
tgtctg aaagagcctt ttctattatg 32760
tacggctagt attttctcag gggaaatfff taaa
aacata tttcaatttc ttctgagga 32820
tatttgcttc cttgtaaata aatgctttca attg
cttatt atattagcaa tcaattgctg 32880
atacacaat tatgacaaaa catgggtggct taaa
acaata aacattttatt atctcacagt 32940
ttctattagt caagaattca ggaacagctt ggct
aggcag atctggataa aggcttatca 33000
aaaggttcgg tcagatgctt tgtggtactg tagt
catcag aacgcttggc tgggactgga 33060
caagatggat cactcacata ggtggtaaat tagt
actggc tttagtggaa tactcagttc 33120

tccacatggg cctctctata ggtacatfff agtg
tcctca caacatagta gctggctfff 33180
ccaagaataa cctattcaag tgactgaggt ggaa
gtggca acatatttat gaactagtct 33240
caaaggctat acaccatcac ttcatatga ttat
tttggg tgtacaaaac aacttggatt 33300
cagtatggga aaagaagaac cacaaaacta ggaa
gtaagg attatfffctg acatgttggga 33360
ggttggcaac cacactatct tcatatfff ccaa
agcatt tgataaccta tggtttctcc 33420
caattgttaa ctttaaaatg tcttcttgat ttag
aaatat tcatgtcagt aaaatfff 33480
ctaactgtat ctacaataa tgtaagact atat
ataaaa tatactfff gacatagga 33540
aaacgataga gaaagaaatt ctgataattc tctc
ttctat aaaggaagca agaaaattgg 33600
caaaaaatat cagaatcaaa ttgtaaaac tctg
gaaatt aaccaaacac ttgcaattac 33660
tcaggagca ttattcagg aaaatggctg aatc
tcagtg agaaaaatga gctttgcgg 33720
gctttggctt gcattattct cagccccag tatc
caactc tgtaacagcc ttaaaaagta 33780
atagctctca ttcatagtga aaacaaattg tctg
gcagcc actgtagaaa gaaaacagg 33840
gacagagccc ttcaaatc ccaagaaatt gcca
ttattt gacatgtctg gcagttctct 33900
ggaagactcc acttgcaagg ctgtctttat tta
cttaaa tcagaactca cccactgtga 33960
aaaacgtttc tcctctgggc attcgtcaaa acag
ttacag gcaattgatt aactttgctt 34020

atgacaaagg tattggataa tagtcagga aaac

atgcatcaga cctcagtttc atggctactc catg
agtgtc acctatcaga cactggtgat 35400
actgccacta agagaggccc tacaagccag atct
agtacc aagagaaatc ttctcagctc 35460
cagcttccct ggtgggggga aagatcagaa gaac
cttagc agccatcacc actgaagacc 35520
ctatcaattc ttgctgtac tgccaatatic cact
gctttg gccactgagg atccttatga 35580
tctttatcaa ctctgacctg agctgaaaa gcta
cacaga gactacaaat ctgcaccatc 35640
actgatgcta cccacccaa caaacctcc ctca
tagggc atggtctttc catagtgaac 35700
tagttcataa aatctggaag gtgattcttt ttgg
ttttgt tgatgtttat ctttccctta 35760

tattgatgtg tgtgcatttg actgctttac caaa
cgcaca cacatcaaca taaggcaaaa 35820
ataaacataa aaaaacagac ataacatcat caaa
agaaca cagtaatfff acagtaactg 35880
gccccaatga aatagagata tatgcaatgc ttga
ccaaaa aatcaaaaat aatffffffa 35940
gaaaagctta gtgaacttaa agtacagaga agca
attcaa tgaatcagt aaaacagtac 36000
aaccaaaaca aagaattaaa gagagagact gaaa
ttattt ttaattaaa tagaattct 36060
ggagctaaaa aacattataa atgaataat aat
gcacta gacagcatcc agcagaaatt 36120
atcaagtaga caaagaatff gtgaagtga aaac
aggta tttgaaaata tacaactaaa 36180
gaaaaagaaa gaaaaagaa tgagaaaaga tgaa
gaaagc ttaagagatt tatgaggcag 36240
catcaaaaga gaaaatgtgc aatgcattag tcca
ttctca tactgtata agaattgatt 36300
caagactggg taatttataa gggaaagagc ttta
gttgac tcacagttct acagggittg 36360
ggaggcctca ggaacttat aatcatggtg gaag
ggaaag caaacatgtc cttcacaagg 36420
tggcaggaga gagaagaatg agaactgagc aaaa
ggggaa gcccttata aaacctcag 36480
atctcatgag aacttactat catgagaata ccat
ggggga aaccacctcc atgatttaat 36540
tacctccac tgaattcctc ccatgacatg tagg
gattat ggcaactaaa attcaagatg 36600

agatttgggt aggaacatag ccaaactata ttat
acaagt tataggagt atagaaggag 36660
atgagagaga caaaaaaat atagattatt taaa
gaaata atagcagaat agtttgcaa 36720
tctggggaaa gatacaata tccaggtgta caag
aaggtc agaagtttct aatcagattt 36780
aatgaaaata agactacacc aagacatatt ataa
tcaaac tgtcaaaaat caaaaacaga 36840
gaaaatcctg ataacagcaa gagagaagag gcaa

tataaagaca catgcacacg tatgtttatt gtgg
cactat tcacaatagc aaagacttgg 38220
aaccaacca aatgtccaac aatgatagac ggga
ttaaga aaatgtggca catatacacc 38280
acggaatact atgcagccat aaaaaggat gagt
tcatgt cctttgtagg gacacggatg 38340

aaattggaaa tcatcattct cagtaaacta ttgc
aaggac aaaaagccaa acatcgcatg 38400
ttatcacact tagatgggaa ctgaacaatg agaa
cacatg gacacaggaa ggggaacatc 38460
acactctggg cactgttgtg ggggtggggg aggg
gggagg gatagcatta ggagatatac 38520
ctaatacctaa ttgatgagtt aatgggtgca gcac
accagc atggcacatg tatacatatg 38580
taactaacct gcacatttg cacacgtacc ctaa
aactta aagtataata aaaaagaaa 38640
gaaaatataat aaaagtataat atcactcact gtta
aaagta agtacattta caatactcta 38700
ataatgtaat ggtggtgtgt aaactactga tadc
attagg ataaaggcta aaagacaaaa 38760
ctattaataaa taataatagc tacaatagag gtat
acctca gagatattgt gggttcaatt 38820
ccagaatgcc taaataaagc aaatttcaca ataa
agctaa tcacaatatt ttgtttccc 38880
agtacatata aaagtatgt ttacatttta ctgt
agcctt ttaaatgtgt gataatatgt 38940
ctaaaaagta tacatgtaa tttaaaaata ctta
atggct aaaataaaaa gattaacagt 39000
catctgagcc ttcacaaat attggccttt ttac
tggttg aaggctctgc ttgatgttg 39060
atgactgctg acttatcagg gtggtggttg ccaa
aggttg tgggtgctgt ggcaatttct 39120
taaaatcaga caacaataaa gttgttgca tcaa
ttgact tttccttaca tataaaaaat 39180
tatctgtagt atgcaatact gttgatagc attt
tacca gagtagaact tctttcaaaa 39240

ttggagtcaa ttctctcaaa tcttgccact gttt
tatcaa atatgtttat gtactagttt 39300
aaattatttg ttatcatttc agcaatgttc acag
cattat caccaagagt agattccatt 39360
tcaaggaatc actttctttg ctcatccata ataa
gcaatt cctcatccat tctagtttta 39420
ttaagaaagt gaagcaattc agtcacatgt acac
actcca ctctaatc tatttctctt 39480
gctatttcca ccactttcgc agtaccttcc tcca
gtgaaa tcttgaacct atcaaagtca 39540
ttcataagag ttggaatcaa ccttctacac tctt
gtaaat gttgatacat tcaccttctc 39600
ccataaatca tgaatgttct taatgacatc taag
tagtga gtccttctgg aaggttttca 39660
atttcccttg tctgatcca gcagaggaat tact

aatggacgta ataataacaa taatgaaaaa gctc
aaaata accaaaatat gacacagaca 41040
tgaataaac acatagtgtc ggaaaaatga caga
cttgct caacacaggg ttgccacaaa 41100
ccttcaattt gtaaaaaaaaa tgactatct gtga
agaaca ataaagtaa tcatgacaaa 41160
atgaggata tttgtagtgt gttaggat atac
tatata aaaaatttaa atgtgacat 41220
caaaaactaa aatgggggtg gtagagtaa agtg
tagagt tttgtgtgt aatcagagt 41280
aagttatcat tttaaatcg ctggtataa gaca
ttcctt tgtaagtctc aagtaacca 41340
caaagcaaaa cctgtagtag atacatgaa gata
aaaagt aaggaatcaa agcataccat 41400
tagagaaaag catcaaccac agaagaagac agga
aaaata gaagaaagga aaaaaaacac 41460
acaaagcaga aagagtggaa gacagaaaaa aat
atatga tagccagaat ataattatta 41520
aatggcaat ttagggcaca tataactgaa agta
aaaatg gaaaaagat attccatgca 41580
agtggaaacc aaaatagatg aggggttgct acat
ttacat cacatagaat agactttaag 41640
tcaataacag taaaacaggg caataaggt catt
gcataa taataaacgg attatttcat 41700
caggaagaaa taacagttat aaatatatat ggac
cctaca ctggatcacc taaatatata 41760
aagcaaatat taatagacct gaagagagaa atag
actgca ataaatcat aggtcttcaa 41820

aatcccactt ttaataaaca gattatctag acag
ataatc agtaaagaac gattggattt 41880
aaactacact ttagaccaa tggacctaat agac
acatat agaacatttc acctagtgc 41940
agcagaatat ataatctttt gaagcaccca agga
acattc tccaggataa tcatagagta 42000
agccacaaaa caagtcacaa caaaattaag attg
aaatat ataaattatt tttcaaaaa 42060
caatgacatg aaactagtaa tcaataatat aagg
aatttc aaaaatgta caaacgtgaa 42120
aattaacaa gagactcctc aacaatcaat aggt
caaaga agaaattaa agcaaaaatt 42180
taaaatatct taagataaat gaaaatgaa acac
atcata acaaagctta tgggatgcaa 42240
caaaagcagg tctaagaggg gagtttatac caat
aaatac ctacatcaa caaaagattt 42300
aaaataaata acctaatatt acaacttaag taac
tagaag aagaagaaga gtcagggttt 42360
ccctttcata aaaagggaga aataataaaa atta
gagaag aaagaaaaca aatggagaat 42420
agaaaaacaa tagaaaagat caatgaagag ttag
ttcttt gaaaagataa aattgacaaa 42480
cctttagcta gaataactag gaaaagaag aaaa

ataaatgta ttatgttata aatatatggt atat
gttcta tgttataat aatatatggt 43800
ctatgttata tataatata gttatatggt atat
gttata tataatata gttatatggt 43860
atatataata tatgttata gttatatata tgmt
ataggt tatatgttat atagttata 43920
ggttatatgt tatgttata atagttata tgmt
atgta tatatgttat atgttatatt 43980
atatacata tatgttata gttatatat atat
catata tgttatatgt tatattata 44040
atcatatag ttatatgta tattatata gta
tatgtt atattatata tgttatatgt 44100
tatatgttat attatatag ttatatgta tata
ttata tatatatggt atagttata 44160
tattatatta tatatgttat atgttatata tatt
atata aatatgttat ataataat 44220
atatatgta tatattata ataataatggt atat
attata tatgttatat attatattat 44280
atatgttata tgttatata tatattata atgt
tatatg ttatatatta tattatata 44340
gttatatggt atatattata tgttataagt tata
tataat atagataata tataaatat 44400
ataatatata tacacaaaac acaaacacc acca
aaaact gttaaaacta acaaatgaat 44460

ttactatagt tgcaggatac aaaatcaaca tgca
aagtca gtaatgtttc tatacactaa 44520
caatgaacta tccaaaaaa aatagaatct attt
acaata actcaaaaa gaataaata 44580
cgtagaaatg aagttaatca agtaggtgat agac
ttatac aaaaaacta taatatattg 44640
atgaaagaaa ttaaactagg caaaaattgg aaag
gcatcc tgtttcata aatatacaga 44700
cttaacttt taaagtgtct ataaatcaa gcta
tctaca gattcaatgc attccctatc 44760
aaaatcccaa cagcatgttt tacagaaatt aaaa
aaaatc aaaaattcaa attaaatcac 44820
aaaagtccca gaattgccag tgttaacttg agaa
agaaca aagctcaagg catcacactt 44880
cctgcttaca aaaatatatt atgaagctac agta
atcgaa acagtgttgt actggcatga 44940
aggcagacat atagacagat gaaacagaat aaag
aagcca gaaataaatc catgtatgta 45000
tggccactg atcttcaaca gtgatgcaa aaat
aaacag tggcgccaaa aataaacaat 45060
gggaaagga cagtctcctc aacaagggtg tgga
aaactg gacatctaca tgagaagagt 45120
gcaatttaac ctttaactta tacaatacag aaaa
aatca actcaaaaaca gattaaagac 45180
ttaaagttaa gaccttaac tataaaattc ctag
ataaaa acaggggaaa tgttccttga 45240
catttctctt ggcagtgatt ttttggata agac
accaa aactcaagaa acaaacaccac 45300

acgaaaatat gcttaacatc cctagtcac aggg
aaatac aaatccaaac cacagtaaga 46620
taccacctca gtctagttag aatggctact acag
aaagac aaatgataac aagtgttggc 46680
aaggatgtgg agaaaggaaa ctcttacata ttgt
tgggtg gaatgtaaat tagaacagtc 46740
actataaaaa cagtatggaa gttccttgaa aaat
taaaaa ttgaactgcc atatgatcca 46800
gcaatcccac taatgggtat aaacccaaaa gtaa
tgaaat cagtatgtca aagagacatc 46860
tgctgtcctg tgtttattac agcactattc ataa
tagcca agatattggca acaatctatg 46920
tccatcaatg gatgaatgaa tttaaaaatc ttgg
tatata cataatatgc aatactattc 46980
attcataaaa aagaagaaa ttgtttcatc tgtg
acaaca tagatgaacc tggagaacat 47040

tgtgtcaagt gaaataagct acacacagaa agaa
aactac tgcatgattt cactgatatg 47100
tggaatctta aaaagttgat ctcatagaag ctga
gagtag aatgggtggtt agcagaagct 47160
ggtgagggta agtgaaagag ggtatgggag aaca
ctggtc aatgagtaca atgttaaagt 47220
taaatagagg aacgggttct agtgttctat tgca
catcag ggtgaatata aaaaacaata 47280
gtgtattata tatttcaaaa taacttgaag aaag
gatttt aaatgttctc accataaaga 47340
aatgataaat gtttaagatg atggatattc taat
taccct gatttgagca ttacacaata 47400
tatacacata tcaaaacatc atatcgtacc acat
aaatat gtacgattat tctggctcaa 47460
ttgaaaataa aataaaattt tagaaacggt aaga
aaggaa tattatgaac aatcttatct 47520
cacagatttt ataacctagt taagatggac caat
tccttg aaagatacag tctattataa 47580
ctacatacagg gagaatagg caatctaaat actg
ttaatt gtattaaagg aattaattat 47640
tgaataaact tccaaaacag aaagcatcaa gcc
agatgg gttcactgga gtattccacc 47700
aaacatttag gaaagaaaac tacaccaagt ctct
acagtt gcattgaaaa tatagaagca 47760
gaggcaatat tttctaactc attgtataag gtca
gcatta cactaatacc aaaagcagac 47820
aaaaatattg caaggaaaa aacacatcaa tata
tctgat gaatatagat gcaatatttc 47880
tcaagaata ttagcaagtc aatccaaca attt
ataaaa ataattctac acttgagata 47940

agcctgggca acatagcaag aactgtacc taca
ataaat acaaaaatta gccaagcatg 48000
gtggtgcata cctgtactcc tagctacttg ggag
gittgag gcaggaggat tatttgagcc 48060
caggggttag aggctacagt gagctatgat tgtg

ttttagatac aacaccaaag gcatgatcca tga
aaaaag aactgataag ctggcattta 49440
ttaaattaa aattaaatt tctgctctgc aaaa
ggcaaa tgagaagcaa accacagact 49500
aaagagaata tatttgcaa aggcatacct gata
aaagat tgttattcaa aatatgcaga 49560
agagctctta aagcacaata ggtaaatgaa caat
ctgatt ttaaatggt caaaaaaca 49620
gacacctcac caaaaaatta cacagaaggc aat
aagtaa atgaaaagat gctcatatac 49680

ttatgaatat cttgttatt aggaattgc aat
taaac aatgatatag cactgcatat 49740
ttattagaat aatcaaac taaacatta acaa
cacaaa atgctattga gaatgtgaag 49800
caacaggaac gttactcat tgctagtggg aata
caaat agcacagcca ctccagcgac 49860
agtttagtgg tttattcaa aattacattc ttac
catgca ttccagcaat tggctcctg 49920
ggtatttacc caaataagt gaaacatat attc
ccaca acacctgcat acaaacgttt 49980
atatcatggt tattcctatt ttccaaactt ggaa
gcaacc aagatgtcct ttgtaggta 50040
aatggagaaa taagctgtgg tacatccata caat
gaaata ttattcagt ctaaaaagaa 50100
atgagctgtc aagcttatt aaaggttacg tgtc
tcatgc aaagacatgg aagaaatta 50160
tgcatttag taagcaaaag tgacagtctg agaa
gctaca tactgtagat tccaacttta 50220
tgacattctg gaaaaggcaa aactctggag aaag
tgaaaa cattagtgtg tggcagggt 50280
tggggagagg gaggcagagc acagaggggg aaca
aagggc agtagaacta ctctgtacta 50340
tactataaca gtggacacat gtctatactt ttgt
caaat acaatgtata acaccaagag 50400
tgaatcctaa tgtaactat gaactttggg tgat
aatgat gtgtcaatgt aggttcatcc 50460
actgtaacaa atataccact ctgcatgga agcg
tgatgg tgagtgaggc tctgtgtatg 50520

ggggacaggg ggtttatggg aaatctgtaa ctic
tgctca attatgttat taatctaaaa 50580
ctgctctaat aataaatct acttttaac atgt
aataga attccaaga actgtgggac 50640
aattacacaa agttagcac acacataaa caga
aatacc aaaaaagaa aagagcagaa 50700
gaagtatttg aagaaataa agatgaaaa tttt
ctaat taatggcaa caccaatcca 50760
gagatccagg aagctcagag aacaccaaag caaa
ataaat gtcagaaaa atgtacctct 50820
aggcatatca tattcaact gcagaaaacc aaag
acaaag ataaatcct gatagaagtt 50880
gagggggaaa cttacagata aataacaat aata

attggagcat aaattattaa attgaagtag aatt
taaatt ttctctgcag agtaagtatg 52260

tgaggtaatg aatatgttaa ttagctttac ttag
ccattc cacatgtata cataaacacg 52320
ttatacagca taaacgtata ttattttggt tttc
aattaa aaatttaatt aaaatcagaa 52380
aaaattaata attaaattta aaacaggaat tcaa
tactga aaaatcaatg aaaccaaag 52440
ctgtttcttt aaaaagataa taaaattgat aaat
ttctag ccaggctaata caagaaaaga 52500
agaggattca acattcttaa agaaaacaat tttc
aaccca gaatttcata tccagccaaa 52560
ctaagcatca taagtgaagg agaaataaaa tatt
ttacag acaagcaaat gctgagagac 52620
ttttgtcacc accaggcctg ccctaaaaga gctc
ctgaag gaagcactaa acatgcaaag 52680
gaacaaccgg taccagccac tgcaaaacca tgac
aaaatg taaagacat cgagagtagg 52740
aagaaactgc atcaactaac gagcaaaata acca
gctaac atcataatga caggatcaaa 52800
tttacacata acaatattaa ccttaaatgt aaat
gggcta aatgctcaa ttaaaagaca 52860
cacactggca aattggataa agagtcagga ccca
tcagtg tgctgtattc aggagactca 52920
tctcatgtgc agagatacac ataggctcaa aata
aagga tggaggaaga tctaccaaga 52980
aatggaaag caaaaaaag caggggttgc aatc
ctagtg tctgataaaa tagactttaa 53040
accaacaaag atcaaaagag tcaaagaagg ccac
tgcata atggtaaagg gatcaattca 53100
acaagaagag ccaactatcc taaatatata tgca
cccaac acaggagcac ccagattcat 53160

aaagcaagtc cttagagacc tacagagaga ctt
gactcc aacacaataa taatgggaga 53220
ctttaacacc cactgtcaa tattagacag atca
acgaga cagaaggtta acaaggatat 53280
tcaggacttg aactcagctc agcaccaagc agac
ttaata gacatctaca gaactctca 53340
ccccaaaaca acagaatata cattctttc agca
ccgcat tgcacttatt caaaattga 53400
ctacataatt ggaagtaaag cactcctcag caag
tgtaaa agaacagcaa tcacaacaaa 53460
ctgtctctca gaccacagtg ctatcaaatt agac
ctcagg attaagaac tcaactcaaaa 53520
ccgcacaact acatggaaac tgaataacct gctc
ctgaat gactactggg tacatagtga 53580
aatgaaggca gaaataaaga tgttctttga aacc
aataag aacaaagaca ctatgtacca 53640
gattctctgg gacacattta aagtagtgtag taga
gggaaa tttatagcac taaatgcccc 53700
caagagaaag caggagagat ctaaaattga cacc

aaagtctcag gatacaaaat caatgtacaa aaat
cacaag cattcttata caccaataac 55020
agacaatcag agagccaaat catgaggaa cacc
cattca caattgcttc aaagagaata 55080
aaatacctag gaatccaact tacaagtgac gtga
aggacc tcttcaagga gaactacaaa 55140
cactgctca atgaataaa agaggatata aaga
aatgga agaacattcc atgctcatgg 55200
gtaggaagaa tcaatatcgt gaaaatgcc atac
tgccca aggtatttta tagattcaat 55260
gcatcccca tcaagctaca aatgactttc ttca
cagaat tggaaaaaac tactttaaac 55320
ttcatatgga accaaaaaag agctcacatc gcga
agtcaa tcctaagcca aaagaacaaa 55380
gctggaggca tcacactacc tgacttcaaa ctat
actaca aggctacaat aacaaaaaca 55440
gcatgttact ggtacaaaa cagagatata gatc
aatgga acagaacaga gccctcagaa 55500
ataacgccgc atatctacaa ctatctgatc ttg
acaaac ctgagaaaa caagcaatgg 55560
ggaaaggatt ccctatttaa taaacgggac tggg
aaaact ggatagccat atgtagaaag 55620
ctgaaactgg atcccttct tacacctcat acaa
aatca attcaagatg gattaaagac 55680
taaattgtta gacctaaac cataaaaacc ctag
aagaaa acctaagcat taccattcag 55740

gacataggca tgggcaagga ctcatgtct aaaa
caccaa aagcaatggc aacaaaagcc 55800
ataattgaca aatgggatct aattaaacta aaga
gcttct gcacagcaa ggaaactacc 55860
atcagagtga acaggcaacc tacaaaatgg gaga
caattt ttgcaacctc ctcatctgac 55920
aaagggctaa tatccagaat ctacaatgaa ctca
aacaaa tttaacagaa aaaaacaaac 55980
aaccccatca aaaagtgggc gaaggacaag aaca
gacact tctcaaaaga agtcatttat 56040
gcaggcaaaa aacacatgaa aaaatgctca ccac
cactgg ccatcagaga aatgcaaatc 56100
aaaaccacaa tgagctacca tctcacacca gtta
gaatgg caatcattaa aaagtcagga 56160
aacaacaggt gctggagagg atgtggagaa atag
gaacac ttttactg ttggtgggac 56220
tgtaaactag ttcaaccctt gtggaagtca gtgt
ggcgt tcctcagga tctagaacta 56280
gaaataccat ttgaccagc catccattta ctgg
gtattt acccaaagga ctataaatca 56340
tgctgtata aagacacatg cacacgtatg ttta
ttgagg cactattcac aatagcaaag 56400
acttgaacc aaccctaatg tccaacagtg atag
actgga ttaagaaaat gtggcacata 56460
tacaccatgg aatactatgc aaccataaaa aagg
atgagt tcatgtcctt ttagggaca 56520

gacaagaaaa gtaaataaaa agtttataca ttgg
aaaaga tgaataaaa atgtctttgt 57840
taataaat ttaattttct atattaaaat ctga
aagaat agacaagaaa aataaaaaca 57900
aacaaaaag aaacttccag acctagtagg caaa
aaaatg gcaacactga agaataagaag 57960
gttaatatatac aaaagtcagt tgttttttc cagc
aattac caagttgaga ttgaaattaa 58020
aaacacaata ccatttatgt gaacaccaa aaat
gaaact taggtgtaaa tctaacaaaa 58080
tatatacaag atctattgaa gacgactaca aaac
tgatgg aaaaaaagc aaatatctaa 58140
ataaatgaag agatgttcca tgttcatgaa tagg
aagact taatattgtt aagatgtcta 58200
ttctgcccaa cgtgatctat aaattcaata caat
tccaat caaagtcca acgagatatt 58260
ttatcaatat aaacaaactc taaatcata tgga
aaggca agagacacag aataaccaat 58320
gcaatattaa agaaaaagag caagtttgaa caac
caacac tacctgattt taagacttac 58380

tataaagc ttaatacaag acagcatggg attg
gtaaaa gaatcaaca gtagattgat 58440
gaaacagaac agagagccca gaaatagaca taca
aaaaga tagtcaacta gtctttgaca 58500
aatgagcaaaa ggcatgaga gatagccttt tcaa
gaatgg ctgtcttagt tgaagagtg 58560
gttgaatatac cacatgcaaa aaaaaaaaaaaaa
aaaaac ttaatgtaga ccttatgcct 58620
ttcacaaaa ccaactcagt ttgatcata gata
taacat aatgctcaat actattatat 58680
aaaacgacta gaagataaca taggagaaga tita
aggac ctactctttg tctatgagtt 58740
tttagatatac acaccagaag cataatccat gaaa
aatgat tgaatgttg gacattatga 58800
aaatttaca ctttgcaaag gacactgttt aaga
gaatga aaagacagcc ctgagaatgg 58860
gagaaaaat ctgcagaata tatatttcat aaag
gatttg tatccaaata gtacaaaga 58920
actcttaaaa ctcaacaata agaaaacaac tcat
ttcaaa aacggccaaa agatctgaat 58980
aaacccttca ccaagaagat ggcaagtaaa caga
tagaaa gaagctcaaa atcatatgcc 59040
attaggaat tgcaaataa aacaacagtg agac
aacact acacatctat tagataatca 59100
ctaaaattca aaaaaactg aaaataccea tggc
tgatga ggatgaatat taacaggaac 59160
tttcatctat tgctgctggg aattcaaat agta
cagtca ctttgaaga taatttagca 59220

gtttcttaca aaactaagca tggcttacc atac
aaccca gcaattgtaa ggctatgtat 59280
ttactcagtt gagttgacaa cttatatcca caga

atgaaatgct gtttgctttg aatttaattt gtct
aatagc aatgttgtaa tgaatgcctt 60660
ctttaatttt tactttcttg atataccttt ggcc
atccct ctatttccac acttagatat 60720
ctaagtgatg tggtttaaaa tttttctctt ttaa
acagca tagaattaga ttttagggaa 60780
gttttaaaat aagttatttt cttaatgaaa gacc
ttaagt cattcacatg tattgcgaca 60840
aatagtgttt tggtttggtg taatttcagt tcct
tatttt agtctttcta tattaaggtt 60900
ttttgtttg tttgttgcta tttacttgtt tttt
cttttt attgattat caattgtgtt 60960

aggcttgaaa aaagctcccc gccctaccc ccca
ccacca ccaccaccac aaaatccgta 61020
tcctaattccc tggaaacctgt gatgttacct tata
taagaa aagggaaactt cacaaatgta 61080
atcaaattaa agatcttaaa actgggagat tatt
ctgggt tatcccagtg attcccacat 61140
gtaatcataa cagggtggtg gaaggagtg tgac
acacag acagaagagg aaaaggcaga 61200
gcttgggccg atatggtcac acgccaagga ctgc
tggcag tcacccgaag ccagaagagg 61260
caaggggcag attctcccct agagtctctg gagg
actcat gggcttgcca aacttttatt 61320
ttgcccagt agaactaatt ttggacttct ggtc
tccaga gctgtgagag aataaattta 61380
tgttgtttta agccataaag tttgtagtag tttg
ttacag ccaccatagg aaactaatta 61440
aaatttctcc atttttattt tactctatca tagc
ttatct ttaactttta gctttaatat 61500
atctctatca aggttaaaaa acaaaagaga gacc
caaaat acataacaaa attgaacatg 61560
atgtctttct ttgtactctg tcccttact caac
tccctt aagtttttcc tgaatgttc 61620
catagtcata tttataatta ttttgaagc attt
catgtg tttctaactt cattgcttac 61680
catagtgttt attattctat gctcttccct ctic
ttgaat tcttaatttt aattcaattc 61740
tcaattagct gaagtatgcc aggaagacta taaa
atatta tattttcttc ctctttatat 61800
atctgagaaa actgttctgt gccttggcac agaa
atcata tttacaaagt tcttgaatca 61860

caattttttt tcaaaactct gaacatgttg ttat
agtggt ttctggcatt actttttgtg 61920
ggaaagaggt atgataattt aagatgcatt tctt
ttaggt aacttttaaa tttttttacc 61980
ctgccttaaa tgccgaaga tggtaatct ctga
aattaa atactctttt gattgtatct 62040
caaagtcagc atctttttat caacattgac tgct
cttctg gacactctta tttatggctc 62100
ttcctcctgc tccagattct gaactgtgcc tgct

tcaaatatat ttcatttaac cacattctaa atat
gctctt cacataagag aaattaactt 63480
cttaaatccc aatttccctt tctgctaatt atgc
aaaaaa agattgtaca cagataatta 63540
aaagggtgg gtaaagttaa taaaagagac agtg
ggaagg aagaggagac ccagatcctg 63600

agcctaataga agtggatgaa aaaggggagc tctc
tgatgg tgtcagtgtc gatgatgata 63660
aatgattcaa caccgcacat aggctcccta aaac
cggaac ccttctatca tctcttgact 63720
cccactgata aaaagcaaat gaactttgt ttct
aattat tctggaatgt caattgtggc 63780
agaaaaaatt agtttagctt taaaagtcaa ttcc
aaacaa atgtaccatg caaatgtcaa 63840
ggactgatcc tgaatatg agttccaag aggc
caaggg aataagttag caagaaagaa 63900
ctgaagcatt gtcactcacc atggccagca gtac
aaattc tagcaccagg aaccaaacctc 63960
tgcttctgg tgtggagatg aaaagggaga gtic
cctggt ccatccatca caggacatgg 64020
gacaggggta tggctctctg ttcagcttcc tcaa
gctcaa actccttata ggagggggag 64080
catgcagaag ggtaggtgca ggagccaggg caag
tgatt gaactccggc cccacagtag 64140
tgtctggggg ggggtcctgt gactcctgaa gcc
cagtg tatagtgtg ttttaactct 64200
gcatctgca gatggcttaa gtgtaacca gctc
agtgcc ctcttgggtg ccatgtcctc 64260
gtccataggc caggaagagt caggtcacac acag
actga aggatgaatg caggagtttt 64320
attgagtgtt ggaggtggtt ctcagtggga tgga
tgggga actggaaggg ggatggagtg 64380
ggaagatgat ctcccctgg agtttggctg tcca
gggcca ttctcctgtc tgattgtccc 64440

cagctgaact ctcttagtg ttcagaccct cctt
ctcttc tctccttctc tgccatgctg 64500
ttctgccatt cgtctgctca tctcctcctg gagg
ctggga tttggggttt atatgggtac 64560
aggatagggg catgtagctg gccaaaaggc aact
ttttgg gcacaaaaac aggaatacct 64620
gttctcattt aagaccactg gttccaggc ttga
gggtgg ggtctttgct gggaaactgc 64680
cctctttcac ccagtattc cttttctctt gtcc
atgtaa gagagttatt tcccttcta 64740
atccaacact cacccttct ttggttacc tctc
agattt ctaataaca caagtgcta 64800
ttctttccat tatgtcctt ccctcacctc tctg
aagtca taagcttctt ctattttctg 64860
tctttagggt gtgctgctct acgcctctac ctac
gtcctg gtgtccctca gcatagacag 64920
ataccatgcc atcgtctacc ccatgaagtt cctt

gctctggaga aacaccaca cgtgtgatg tata
catatg tgatgtatat tgtggcactg 66240
cctacaatag caggaattca tcgctaacct tgg
gtgtct cagtggagga atggctaact 66300
agtctatgga agaagtttca gtaccttctg tta
ttgatt gcatactagg tgcattcat 66360
gattctaact gattcataca tattaatat tta
atattc ataatatctc tgtgaggtgg 66420
gctctattat tatctgcat ttacaggtaa ggca
atcgtt gttccaagag tgaagtaat 66480
ttgcccaagg tcacagctag taagtgcagg aaca
ggattt gaaccacac agtctgggtc 66540
tagctccagc gccctcaaat gctatatagc ctgc
ctctca atgtggaagt gtagagcca 66600
tgggcagtaa tatgcatcaa catgaacata tcca
tattgt atgctgagtg acaaaaacaa 66660
tatgcacaaa aatccatgtg aacgataaca ttaa
agtcaa aaactcaaaa caatgctaga 66720
tattgtgtac agaaagacag agaggagcag aaag
agagaa cacacaaaag aaaactccag 66780
gaaaaataaa aaactatttg caaaaacaca caaa
acttga catttgacct cacttctagt 66840
tatgggagtt agaccagtgg tgtgaccacc acag
gaactt atatgcaagg tggtaatttt 66900
tacatgaaga acatatcaat gtgttgtgtg caat
taaaat gaatttattt tgatcatgct 66960
tgttatgcct actgtacagc ataagacata tgag
taaaaa tactaaattg tatacttaag 67020
aatttgctgg ggatctgttc caagatggcc aaat
aggaac agctctggtc tgcagctccc 67080

agcatgatcg atgcagaaga caggtgattt ctgc
atttcc aactgaggtg cctggttcat 67140
ctcactggga ctggttgac agtgggtgca gccc
atggag ggtgagccaa agcagggcag 67200
ggcatcgctt cacctgggga gcacaaaggg ttgg
gggatg tccctttcct agccaaggga 67260
agctggggca cactgtacct gggacactcc tgcc
aaatac tgcacttttc ccaaggattt 67320
agaaacgagc agacaaggag attctctccc atgc
ctggct caggaggtct ggagccttgc 67380
tcaactgctag cacagcagtc tgaattgaa ctgt
gaggca gcagcctggc taggggagga 67440
gcgtccacca ttgctgaggc atgagtaggt aaac
aaagtg gcccggcagc tcaactggg 67500
tggagcccac tgcagctcag caaggcctac tgcc
tctata ggctccacct ctgtgggcag 67560
gacatagctg aacaaaaggc agcagacagc ttct
gcagac ttaaacttcc ctgttcgaca 67620
gctctgaaga gcacagtgt tcttccagca tggc
gtttga gctctgagaa tggacagact 67680
gcctcctcaa gtgggtccct gacacctgtg tatg
ctaact gggagacatc tcccagtagg 67740

gctcctgaag gaagcactaa atatggaag gaac
aaccag taccagccac tacaaaaaca 69060
tgccaaattg taaagacat tgatgctagg aaga
aactgc atcaactaac gggcaaaata 69120
accagctaac atcataatga taggatcaaa ttca
catata acaatattaa ccttaaatgt 69180
aaatgggcta aatgctccaa ttaaagaca caca
ctggca aattggataa agagtcagga 69240
cccatcagtg tgctgtattc aggagactca tctc
atgtgc agagatacac ataggctcaa 69300
aataaagga tggaggaaga tctaccaaga aaat
ggaaag caaaaaaag caggggtgc 69360
aatcctagtg tctgataaaa tagactttaa acca
acaaag atcaaaagag tcaaagaagg 69420
cactgcata atggtaaagg gatcaattca acaa
gaagag ccaactatcc taaatatata 69480
tgcaccaac acaggagcac ccagattcat aaag
caagtc cttagagacc tacagagaga 69540
cttagactcc aacacaataa taatgggaga cttt
aacacc cactgtcaa tattagacag 69600
atcaacgaga cagaaggta acaaggatat tcag
gacttg aactcagctc agcaccaagc 69660

agacttaata gacatctaca gaactcttca cccc
aaaaca acagaatata cattctttc 69720
agcaccgcat tgcacttatt ccaaattga ctac
ataatt ggaagtaaag cactcctcag 69780
caagtgtaaa agaacagcaa tcacaacaaa ctgt
ctctca gaccacagtg ctatcaaatt 69840
agacctcagg attaagaaac tcaactcaaaa ccgc
acaact acatggaac tgaataacct 69900
gctcctgaat gactactggg tacatagtga aatg
aaggca gaaataaaga tgttctttga 69960
aaccaataag aacaagaca ctatgtacca gatt
ctctgg gacacattta aagtagtgg 70020
tagagggaaa tttatagcac taaatgccc caag
agaaag caggagagat ctaaaattga 70080
caccctaaca tcacaattaa aagaactaga gaag
caagag caaacaatt caaagctag 70140
cagaaggcaa gaaataacta agatcagagc agaa
ctgaag gagatagaga cacaaaaacc 70200
cttcgaaaag tcaatgaatc caggagctgg tttt
ctgaaa agatcaaca aattgataga 70260
ctgctagcaa gactaataaa gaagaaaaga ggga
agaatc aatagatgc aataaaaaat 70320
aataatgtgg atatcactac caatcccga gaaa
tacaaa ctaccatcag agaatactat 70380
aaacacctcc atgcaataa actagaaaat ctag
aagaaa tggataaatt cctggacaca 70440
tacacctcc caagactaaa ccaggaagaa gttg
aatctc tgaatagacc attaacaggc 70500
tccaaaattg aggcaataa taataggcta ccaa
ccaaaa aaagtccagg accagaccaa 70560

atagaccaat ggaacagaac agagccctca gaca
taacac cacacttcta caacatctg 71880
atctttgaca aacctgacaa aaacaagaaa tggg
gaaacg attccctatt taataaatgg 71940
tgctgggaaa cctggctagc catatggaga aagc
tgacac tggatccctt ccttacacct 72000
tatacgaaaa ttaactcaag atggattaaa gact
taaag ttaaacctaa aaccataaaa 72060
accctagaag aaaacctagg caataccatt cagg
acatag gcatgggcaa agacttcatg 72120
actaaaacac caaaagcaat ggcaacaaaa gcc
aaattg acaaatggga tctaattaaa 72180
ctaaagagct tctgcacagc aaaagaaact acca
tcagag tgaatgggca gcctacagaa 72240
tgggagaaaa tttttgcaat ctacccatct gaaa
agggct aatatccaga atctacaaag 72300

aactcaaca aatttacaag agaaaaaaca accc
catcaa aaagtgggca aaggatatga 72360
acagacactt ctgaaaagaa gacatctatg cagc
caacag acacatgaaa aaatgctcat 72420
catcactgat catcagagaa atgcaaatca aaac
cacaat gaaaaacct ctcatgccag 72480
ttagaatagt gaccattaaa aagtcaggaa acaa
cagggtg ctggagagga tgtggagaaa 72540
taggaacact tttactgtg tgggggagt gtac
attagt tcaaccattg tggaaacacag 72600
tgtggcgatt cctcaaggat ctagaactag aaat
actatt tgaccagca atcttattac 72660
tggtatatac ccaaaggatt ataatcatg ctac
tataaa gacacatgca cacgtatgtt 72720
tattgctatt gcagcactat tcacaatagc aaag
acttg aaccaacca aatgtccatc 72780
aatgatagac tggattaaga aaatatggca cata
tacacc atggaatact atgcagccat 72840
aaaaaaggat gagtttgtgt cctttgcagg gaca
tggatg aagctagaaa ccatcttct 72900
cagcaaaactg tcacaaagac agaaaaccaa acac
tgcattg ttctactca taggtgggaa 72960
ctgaacaacg aaaacacttg gacgcagggt gggg
aacatc agacaccggg gcctgtcagg 73020
gagtgagggg ctgggggagg gatagcgtta gcag
aaatag ctaatgtaa tgacaagttg 73080
atgggtgcag caaaccaaca tggcacatgt atac
ctatgt atccaacctg cacattgttc 73140

acatgtacaa tgataattta aaaaaagaa ttg
ctaaca agataaacct tatgttaagt 73200
gctcttgcca caaaaggaaa aactaaaca aaac
aatact aaagggggac aggaagaagc 73260
ctttggaggat gatggataca tttatggcat tgct
tgtaat gatggttaca ggaatgtata 73320
catatctcca gacacattaa gtggtatgca ttgg

gaaggaaaa taagtatagg aaattgcagg aggg
aagtcc caggaaactt gttagaggta 74700
cagacttgag acccatagcc agagggtgac atga
tgaatt acatgtttca ccatattcac 74760
taggttaaaa aattagctgt ttgctcgtgg aaaa
tatgtc tagttctggg agacactgtg 74820
taatatcatc aagagtgcc taaattatca gaaa
ggcagc aattaatatt atagtgcttt 74880

tctaaagatg taaaacaact tattccctca ctac
aaaatt aagagaggct caacataagg 74940
tgcttgaaa atcctcatca tcagtagctt ctgg
gaaaga tgaagctta gaaacacatt 75000
agccagctgc cttcctctgc ccaggcccaa cgaa
agtcac tgaagaaatc taaaaacagg 75060
gggagacctg catctggaat gagagccaag gaaa
gaagcc atcacaatc cagaaacttc 75120
taagaattcc cagcacacga gggagcagat gaaa
cacgga agccaagtgt ataattgata 75180
attcagcccc cgggagaact ccctggcctt gtag
aggatg aactgatact cacaagtta 75240
tagggtgagg gcagccggg agaacgcgac acga
gaggtt ccaggaagcc caacgcggga 75300
gtcattttag taccgcagct tgcagaatt taag
ggcagc tgagaggcag gttcggagt 75360
ttatgcggct cagctgagag aaagccgtag aaag
aagaga ttccccgaga gtggcagggc 75420
tctctgggag agtcatggag caggagaaa ccag
gagga gtcaaatgta gctgtgcagg 75480
cacaaggcaa tggccgctta actgagggga ggcc
atattt tattttttt ttactgctat 75540
ttactgaagc agtatitttc ttagccagca actc
cagaaa agttgacaat tttaaaggtc 75600
ttcaccaaaa atgaatatga gaataattag aaaa
atatca aaataataa gagaaatag 75660
cagtgtata ttaaatgta atataaact ttga
taatta aaacaatgct ggaaccagaa 75720
taacacatat aatcataca aaatttcaaa tcag
ttggca aaaaatgaat tagtatacgg 75780

tgttgaata gctgtctggc ctttttcag aata
ttagat caccaccac catagctaat 75840
aaciaagtaa attttagtt gattgaaaa atta
acactt caaacataaa aggagtaaaa 75900
gaatatttg gtaacacctt cataattca gtga
aggaaa ggcctttcca ggaaccatat 75960
caaaagcaga agcaagaag aaaatatagt tttt
tactac ataaaaattt aaattattta 76020
tgtaaataat aaatatccat aaacaaactt aaaa
agcaaa attataatg gaaaatattt 76080
ttatgtaaca ggcaaagaaa aatatccttt ttat
aaagaa gtctggcaa gaataaaaa 76140
cattctaatt gagtaaatg gcaaagggca tgaa

gtgagaaca tgagacagtc taccttatat gcaa
acctgc attcatctg ttcgatcctg 77520

gatccttcag ccctgagaag tcactcttca tggc
aaatgg gctcagctgc ctggaaggcc 77580
atcagtctcc ctgctgtggc agctgctca cagc
ctaaga gagtggggct ttcacagtgt 77640
agccccagca ccagtaagag aaaaacagct ccaa
gcctat accctgctgg gcctttgggg 77700
aaacatcttc ggagaccttg gtagaattga ttct
aaagta tgattctata ctctcttccc 77760
tgtccatccc tctcaaaagt gaatgcactg ttca
tccatc aagtggaaac tttgtggggc 77820
ccaggagtca cacgttgccc ttaagagtgc cctg
gaacct atagaagaag atgacattag 77880
aattctaacc attgaaagaa caagagcaca gggg
gcagct actaatgtca cccaggacca 77940
tagaaacca tcaggcttca cacccccacc atca
agaaga acccctcca gtcctattac 78000
ctgccctctt catcccacc tgcttcttc ttaa
tctgaa ctcccactgc ttctctccac 78060
gcctggtttt tctctgttcc tttaggacc agct
ccccta tgccatcaa ctctaattg 78120
gaggctccct ccacctcctg cctcctgagg tggc
tgattc ccttaagaca tctcaagagg 78180
atgctcctca accttcttt ttaggtacct catg
gcctgg tgggtgtgaa gacattttcc 78240
taccgttcta gaccacctcc aggccttttc tctt
tcagta ttgcatacgc atgccctctc 78300
tgtttctctg atgctcatgc ttcagtcta gact
accttc tacaacacct ccccatatgt 78360

ctgtgcccc atggccatgg ccctcatcca gtga
agatgt tgacactatt ctcagtctct 78420
cacctttcat actgtcctaa tcacagggtga ctcg
atgtct acataaacta agtctagtga 78480
gagggttca catgatgact cacagagctt gaca
tgttcc ctgcatttga aagcattgtg 78540
gaccaatgac tacatcacac ctgagaatgt tgaa
gagaag ctggctggcg ctgtggtcct 78600
agcccagggg gctgatgtaa aacctgcatc atga
agtttg cctgaggctg tgttaaaaa 78660
gatcctgccc cagacatttc tgccagagaa agag
gcctcc ctgaagggtca ccaggagagg 78720
tggaagggtca ctgccaagt caaggaagtg gcca
ccagca agaccacaca ggataatttc 78780
caaaggacct agaaaagttc ctgaggggac caag
aatcag ctttgatgc agccaggcac 78840
agagagcaca aagccctctg atgacagcag cagt
caagca agaactctgt ctcttctc 78900
ctcctggttc cctgtacccc agctccagag agac
cccaat gtggatagca acctggggga 78960
ggaggaggaa tagcagacaa ggatagaag caga

cagcatctca agtcagatgg gtaaatcagg aaag
aaaaag caccaacctt aggccaggca 80280
atgtgctggc ttctgttcaa gcttcccttt gtaa
tcttca cattgacaat gtatggagat 80340
actgtatccc tgtttacaga gaaggaaact gagg
ctctgg gaggttcttt gaggtccagg 80400
gtggctgccc cacagtgatc cttttctata gcag
actcca ttgtgctccc aaaaatggtt 80460
gccacatacc cagacattcc tctcttttct ttgg
gcagaa aagcaagcca gggctctcat 80520
tgtgatcgcc tggagcctgt cttttctggt ctcc
attccc acctgatca tatttgggaa 80580
gaggacactg tccaacgggt aagtgcagt ctgg
gccctg tggcctgacg actcctactg 80640
gacccatac atgaccatcg tggccttctt ggtg
tacttc atccctctga caatcatcag 80700
gtaagaagcc gtcaggacag gaccacacgg gggg
gtgggg cggggggggc tttcctgttt 80760
ctccagctgt tgctctcctc cccaacagac ccat
ttttcc tagtgcctt gaggaactg 80820
accaggccac aagattttat gtgtagctac cata
ggctaa gcccaatttc ttcaaagtag 80880
agtaaggaga aggaattaa caattactgg gtat
ataggg caggcattgt gctaaatagc 80940
taacaattat cacattagcc acagtataac cctg
tgaaat aatttcatt gccccaattt 81000

aatgaatgat gaaactcaag ctgagatga ttaa
gtaact tattcaacat caaacaggat 81060
tgataatccag gtttttctga aatcatacca tatt
atttct tttatatctc gcagccttcc 81120
aaatataagg caaattacca gtttcagga tttt
gtaaat gaaaagatag acatacttga 81180
aacaaactga acacaaaact cagtatgcac taat
atgcta aactgtctat gcagtggagt 81240
cagataatgg caggaatat attttggag ccac
cattga aggaggaaat gattcagga 81300
ggataagga gaagtggga ggaagcagag tctg
tgatga ccagaaatca gagtgagtgt 81360
agaggcagag tggacaggta cacagtgcca gtgg
gacaga agttggcagt gagctcctcc 81420
cagtactgg gggaggctca gttgtgaatg acct
tggcaa aaaagtcata ggaagtcctt 81480
tgtcctgcag ccaatggtga gctgtagagg gtct
ttcaac agagattagc acaacaacct 81540
ggtcaaggta gggctcact tggccatgcc atgt
ggcagg atcacctct gaaatgggt 81600
ctgcatgtgt agatggggtg ggagactaca ggaa
gagacc tggcacattg tgtgtatcct 81660
tgagccatga tgatgctgca ccttttgggt aggt
ctaagc ctgcatagt gtgtcatata 81720
acacattgta agcaaaggaa gattatcagc cttt
gttttt gatagtgtaa agagagctgt 81780

aagcatttcc tacctgacaa gaggtcctc ttcc
atcacc ttccctcttt cgtggctccc 83100
tgctgctgaa gaaacaactt ctctcttggg gact
aacatc ctctacctcc ttcagcaaca 83160
actatcttct caaacaagac caggccctgg gggg
gcgagt tttgtgagga acttgtttcc 83220
aactagtacc tggcataggt gctacaattt catc
tcagat ataaggttca actcttattc 83280
tgtctttatt acctatattc tggccccctg ggct
caattc tctgagtaag gttaaattct 83340
tcatttcaag cttaaataga caaggaaaac agct
caagga aagtgttcac tcgtgttcac 83400
catgcctcat tctccttcat gcatgctata tatg
ctacat ttaccaaatt gacagaaaaa 83460
aaaacatata ttagttgttt tattttgcat ttct
ttcatt acaaatgaga ttgaatatat 83520
tttatatgct ttttgccatt tttgttttt ttaa
agtact tattaggttg gtgcaaaagt 83580

aattgaggac tttgccattg aaagtaatgc cact
tttctt gtttaaatgt ttttattttc 83640
tctattctct atctttagaa attattcata caat
aacctt tttctttttg catatgttgc 83700
aaatatttct cctaatttgt catttgcctc tcta
ttgagt atggttttat tttgtttttg 83760
attattaaaa gtagtgattg acgtaattaa gaaa
aaaaga aaaagcacia ataactaact 83820
cagtggcttt tctgccacia atacctcatt gttt
tactta ttgccagct tcgtatgcat 83880
ttaagtatct gctaggacia gatctacttg tttt
ttttca aagattccct ggctgcttca 83940
tggtgagctg ctgatgcctc acctgcactc ccag
ctccag ccatggaaca aacaccctc 84000
tggccatgt gcatcactcc catgcctgaa cact
ctgcca agctcacctt gccttgtttc 84060
accaactag ttcacatccc ttgtgtctca tttc
caatac caactccaca gtagagcttc 84120
ccttgccaac cctggaccaa gaggcacctc aggt
cctcac tccctaacct ccaacctcac 84180
tttgtccatg tcgtcatcta gacttcatgg cagt
ttgact gtatctcatg agtgcagggg 84240
ctgtggcctc ttcatttctg gatttcacat ccag
cacaca ctaaacagt ggtgaatatt 84300
agattgaatg aataacgcaa taaattgcac cgaa
caacag atgtgcatg tcaactctc 84360
tactcttct ctccctctct cattctctct ctct
ctgtct ctacacaca tcacacacac 84420
acacacacac acacacacia acacacgtgt acac
atactg ctaatataga aatttctggc 84480

tatctaatgc ctgatcagt ttttggcata tgat
agctcc tccataaata tatgtgagag 84540
gaaagaagaa agggagaaaa gaaaggaggg ggga

tatttgaatt attggtcaat taataactgg gggt
gcaatt gacataacca ttaactttcc 85920
atggtgagtg taaccttacc ttgcacagta ttic
actttc tggggaagaa gtttcctgt 85980
tctagcaaat agtcaactta gggttgaact cact
aataac atttttctca ttttttcttt 86040
actgcaggca tacaattgc aaaaatagtc cctg
ggcaat tatataagaa agaattggaga 86100
tgctccaaaa aagtcctga gctttcctgg agca
cttga ggggttact cagcaagaat 86160
gggaaaaggc agtaagaagc agagatttta acat
tgccat taattaagtt atattctaaa 86220

gatcattaaa agcaattagt gctttgtcgg ctac
tgcaaa ctgaagctct gatTTTTTaa 86280
aataattctc aagaggaag atacacagtt ttaa
aataaa gcattgcttt gtcccaaagt 86340
ttttagtcaa gatgcttaat gtagtcaaaa tatic
aagtaa tattaagaa gtagtatttt 86400
tatatttatic aaaggtacc taggatagaa aact
tgctga cacttttgaa tccttaacac 86460
ttgttttcc tgttaggcac agattaaatc atgt
aagaat tgggtgata tagtataaaa 86520
aataggcaaa aaagaggaga aaggaaatta gtct
ctacta atttccagc accgtacttg 86580
gcactttaaa tattgtcaca tctgatactc aaaa
agttcg agaggtctgt attgttaaca 86640
ccattttgta gaacctcaac ttaggctcag tgta
gtagtt atctattact gcattacaaa 86700
tcaccacaaa cctagtgact taaatcaaga taca
tttgtt atctcacagt ttctgtgggt 86760
caagaatttg gccgtggctt aaccgggtcc tctg
ctcatg caaggcagcc attcaagttg 86820
tttatccagg gcaggggtca tcagaggctg gact
gggaga ggctctttc caagctccct 86880
caggtcctta gcagaattca tttcttgca gctg
tgggat tcatggcacc ttgcttctc 86940
aaagccagca atgcatagag acaccaacaa gaca
ggcact acattctatg taatcagtcc 87000
catccccttt gccacattgc attgattaga ggca
agtcac ctgctcttcc cactactaaag 87060

gggtgaggat caacaaagcc atgaatgcca gaat
cagga tcatagatgt catttaaaag 87120
actgtctaaa gtcaggactg tacaacagac aagt
agagga gaccaagtt tttctgactc 87180
taaggcctgt ttttgattc taatcacagc tctc
cctcaa accatttggg ctaccttgag 87240
gaaactgcat aactttacca ggtcttagcc tctt
cactta agaaagaagt aactccatcc 87300
agtggatcct catggtcact ttcagttgca attc
tatgaa cagcaagtat aagggggcag 87360
gcatggttaa aagatctgic ccttcacacc ttgc

taagactgtg aggccaccaa gaggatgcac aagt
attatc gggcactgat aacttgtgtc 88740
tctttcccta gaagtatgag tggagataca taag
tctggg ttcttcacct gaattcagtt 88800

caattcttct gtactcttct gcatgtcagg agtg
gtacag ggactggaaa tgacaaagaa 88860
tgaatagcat ggttcctgac tataggcagc ttac
agtcta gggccttggg tcttggccct 88920
ggctacacag tagaatcgcc tggggagggt ttac
aatgca ccgaaacca gacaccattc 88980
cctgagagat tctgattcac tccatctgga gtgg
ggcatg gatthtatta tttcggaaaa 89040
gctcttcagg catthttaat gttcaaccag gttt
gacaat ctggtccagt gagacacaga 89100
gtcatagggt gctgaccttc aactgactg acca
gtgtaa ccaagagatg tgcttaggct 89160
gcttggaaat tttcaacca cgaagacca gtca
ttcagc ttggggctaa ttccagcccc 89220
catgcagatc ctagtgttc ccttccactg gtgc
agtctc cacaccctgg tttttctgga 89280
agagcaaaag caatcagaga gaataaacac aagt
gaattc attctattca gtgcagttgg 89340
ctttggttaa aagttagaat atttgtccaa aaaa
aaaatt ggatgaagac atccttcctc 89400
tatcagatat caaataaatg cagtaagtac tata
attata atactaaaat cattgaaaga 89460
gaattatatg gacagggaaa tccaacagaa caga
aatgcc aaaggaaacc tcaggaattt 89520
agaatgtgat gaagtatttt aaactgatag agaa
atagaa actgtttaat tactaatggt 89580
gagacaactg cccatatgga aacaatcata tatt
agattg ttgtatcata tgctacaagg 89640
aaatacactc cttatgaaac gaagaacaaa agat
agaatg agggagaaaag aaagagtgg 89700

agagaaagag tgaggaaaga aaagaagaaa gaaa
gaaaga aagagaaaga aagacagaaa 89760
gaagaaagaa agagagagag ggagggaggg agaa
aggaag gaaggaagga aaagaaagaa 89820
aggaaaggaa agatgggtag aagaagagag gcgg
ggggga agaaagagaa agaaaaaat 89880
ataggaata ttgtttatat tcatgaaaa ctga
aaagat ctgaatatcc tacaatgagg 89940
gaactgagca taataattat atagccatac aatt
aatgc tacagctcta aaaattatta 90000
tagagagtgt acttattgcc atagaaatat ttct
ccaata tagtacatta agaaaaagaa 90060
agcagtatgg tatccctttt atagatatgt gcac
atattt ttacttagcg gaatatatat 90120
gtgcctgtat agacagatga tagctagaga gaga
gggaga tggaaaatat caagaagcta 90180
aatgttatca atgttattgc agttatctct gagt

atatagtttt atatctccat tatactatt ttic
agttac cattagtgac ctcacccga 91500
aatgagggca gctggtattc tcagaagctt atat
gctctc tatactttat tcgtaaaagg 91560
aacacagttg atttccatc tgcattaca gcc
agcagc tctggagtgt gcaggtaaat 91620
cggatctcca gctgggtccg catgccagga ttat
tgctca tcaacaaggg gacattagcc 91680
atgattagt tgaacagaag ctcactttgt aac
actggc taaaaagctc aagccatcct 91740
tagtgcgaga accactctc ttactggcaa atat
gtctat tttctcccag tcaaggctg 91800
acagaaaagga aaagaaaaag aactgtatca taaa
ttatct aaagactttc ccataaaca 91860
gcatggaggg caagacgtgg aggagatggg gttt
ccaatc ctgtatgta tctttcataa 91920
atgagcatat tattgatgtc caggaggatt tact
tgtaca aactagaaca ttactgcat 91980
gggcaagtgt acccatggaa cagacaaatt tctc
gttata actatgtcta gctatcatgg 92040
cttgggtggat atgatcatg ctatatccaa attc
catgtt ttttaattaaa tgaggcatac 92100
tagagtgaag aaaaaagct atggattagg aatt
gggta gagccctatt cactttctag 92160
cttaaaaaat ttaagagaag cccattaact gctg
tccata tcagcttctt catcagtaac 92220
tgtgaataaa atggcttctc tacaattaac taca
tttaat aaaagatgtg acagaaaaac 92280

ataaagatac aaataaatga agattatgac atgt
tcgtgg atagtaagg tcaatatcat 92340
aaagacgttg aatctccca gctgatctac aagt
taataa atttccaatc aaaattgaat 92400
tgaacattt tattgagctt cacaagccta tttt
aaaata gacaaggaaa attcaagaga 92460
catgagtagc ctgacattc ctgagatgc agaa
caagg agagaaagt cggtttacca 92520
aatattgaaa tgcatgtaa agtcagagt cggt
attggc acaatagaca aatgaaacc 92580
tcagtttctt tgctacctgc tgctgcca caaa
tccaat gctacatgtt tcaggttttc 92640
attaagacag cactgcatat gaggtacca tctc
tacttt agaagggaaa cactagcagc 92700
tgtgtaaacc caaaatatca gtagccttaa ccac
atagaa gtttatgtct taattaaat 92760
ccagttggca ataaagacca gagggaaagg catt
gttcca cacagtcatt cagaaattca 92820
agcaggtgga gattctgcca cgcttaacag aggg
ctgcta aggtactcct cagcacctcc 92880
ctccagcaag caggggcagg ggaagagaga gagt
ggagga ctgctcagga gaggtatctg 92940
agcaaggttt ggggtgtag acattgactc ttcc
cagcgt cccttaggca gatcttagtc 93000

tccatgtttc taaacaaatc acctgcactc tttat
taggtc cacagatgaa ttccccccac 94320
tacctcccag gaaacaattc tgcttccatt tga
atocca aggtaccaat tgctcccact 94380
tcaggtgctc agcctgcatg aagaatgggt tccc
agtggc tctgtaagag gcctgtggc 94440
ttgggaagggt gaagagccag aatggccat ttgg
agacta aattttcagc atgtgtcccc 94500
attagggata tactgtggaa ctaaacagt ccac
atcagt gtgcttctcc cagtcccaaa 94560
tcgaatggac gtgccacttt caggctaccc aagc
ccgatt aatgcacagt gacagctgaa 94620
tttaactgct tttcactgca gctcagcacc aagg
cctgag tagaataat cttttatct 94680
cccaataaag gagaattacc agcatttcgt agct
cagctc tctctgaagg gccatcttta 94740
gaagctagag gctttgcatt tcctggaatg gtca
gattaa agatgctttt cactgatctc 94800
tgggcaggta gatgattata ctgtcaccca gttg
ccctgt ggggaagcact gcgggtttcc 94860
attttaaagg gatttcagag cacaaatgic attc
tcgaaa acttttctga aagaccaact 94920

tagtcttcag agccatactg tttaggggcc agct
gttgcc taggaacagc cagtggggac 94980
actttgaaag aatataattt ggtctgctgt ctic
tttact tgcagcccat gggataatc 95040
tcaccagat cttttctgc tgtacataat tctt
acacag ataacaacct tgtataatag 95100
acaatcaaac gtaataatac cttctgttca cttt
cataaa gatggctcac ctccacctg 95160
aaatactgtt aaaactgcat tcatctcaac tgat
aagata tccaacatcc aagcttgggg 95220
cttggttcct tgaatatatt atttatggt aatc
ttcaaa gtaactctgt gagttagggt 95280
ttctacacct caatttttaa atgggagaac tga
gccggg aactttagac gatttgccta 95340
agtttcaaaa gttttagtaa ttggtagaga cgga
ggatgc attccagtct gatcttaaag 95400
cctgtgtcct tccaagatc ccatcctaga aatc
aaggtt tctcaccttt gacacctttg 95460
gcattttgga ctggataatt cttgtttgtg gagg
ctgcc tgtgattga aggatgttta 95520
gcaacattcc tggctctac cacttagacg ccag
tagcac acatgcacac acaattgtga 95580
caattaaaaa tgtgtccagg ctttgccaaa agtt
ccctgt aaagcaagat caccaccaat 95640
ggagaatcac tgctctaat gttctgaagc attt
gctttc ttacaaggcg gaggttcgtg 95700
gtcccatgaa acgcacagaa taatttgaag accc
taatag tagttaggag tggccttaca 95760

gggtatgctt taagaactat gaattaatta taat

gcaggcctgt gcttatcaga gcaagggcc cttt
tccaaa acttcacaaa ggtggcatat 97140
gggctggg aagccctgac agtagaaact cttc
catgag gaaagggaca ccacatctga 97200
cattttatc cccaaattta taggtaatca ctac
tttaac taagacctat tgactggat 97260
cctgcctagc ctaatcttat ctctttgttt tacc
actgct cgactaatga gacgtggta 97320
ttgattcatt caacatattt gtgttagtca ttga
atatgt gtttaggcta caggagtgcg 97380
aaaaacaaag cccctgtcct catcaatcta gtag
attctt atatttacc ctcagtgttc 97440
accatcagac aacagtctac atgaaaaaa tgta
tatcca agctcctatt ttggagagtt 97500

ctgatacccc tggcttgagc ttttcttgag agcg
tttttt tgtttttgtt tttttgttt 97560
ttttttgatg aatgtatttg tctggggcaa ccat
tttaga aagtaacttt gcctaggttg 97620
ctaaagtggc cacatgggtg tctcagcata gcc
gggctt agagagtagc actcctcagg 97680
gaagccctca gctcctgcat ggtcacatag tcta
atttca gctgcagctg ttcaggccat 97740
ctgaccaagt ctcttgagag agtctgagca ttcc
atacca tttcatata atattaaggt 97800
gtaaactgag cattctccag aaaccagccc agaa
ccaact ttaatctaaa aatttccaag 97860
gaaggccatc tgggcataaa tgcacaggat ataa
tgaaa actggagtct aacctttaat 97920
gttcctattg gctgaaacag aaactgtcac atct
tgaaca cttcatctta ctattcccct 97980
cttgtatcta cagatgggaa actgtgcagc agct
ataacc gaggactcat ctcaaaggca 98040
aaaatcaagg ctatcaagta tagcatcatc atca
ttcttg gtaagcaatg tccctccttg 98100
agctgtaaag tggatgaac gtcccaaaag caag
tttgct cctgggacct ggtgacagaa 98160
aggaattgc cagcaggcac ttctacatcg gtct
gcttag aaaggaatgt gtaaaactca 98220
tcagcccatt catggttcct tcaagggctg acat
ttggtt cctaattccct ctctttatga 98280
atacagctgc ctgccaaggc tatgggttga ataa
tttga gaaaatctga ttaggacctt 98340
actagctgaa gtggatgctc acatcaccag ctaa
ctcagt cacttccttt aagacacact 98400

gttcccagg gctggggttc acaaggaaaa agaa
gataga agtgactttc caccttatct 98460
gaatatttga tgttaggttc actacaaatt tccc
ccttat ggcaccttac ctgtccttcc 98520
accctcctgt cttctgccct ttcttttcc ttcc
tctcta ctcttaagac tcataaagtc 98580
acctgtact atttctgtc tgaatgctc tgct

atttaaata cctgtgttta tgtgtaaac aaag
tcaggg ataactatat agagggttct 99960
cctctacatg aatggacatt caaagtagat acaa
atcttt gctggctggg ctgcgtgtac 100020
catgccagag gactggatc cctgtgaaaa ctg
aatcct ccaaccaac ttacacacac 100080
atggaaacac ccaagcacac aaggccattt gcc
ccttag tgcccaaat actgttcagc 100140

gccagtgttt gggtaatta atcaggatcc agaa
cactta gtgggtttg tgttgaatt 100200
gctcctcttt aatacattgc caaggtctgg ggtc
gagagg ggaacatga gtcagttat 100260
cattcaaaa ttccaacaa gttacagaat ccac
attaca cagttatgac ggaagcttg 100320
tccctgcatg cagacagcca aggaagccaa actt
ctactc cgagaaaaa ttctatgat 100380
gagaaagtgg gagaaggaga gtggagaatt tatg
gtgaga aaatgagaga tgcgtgtatt 100440
tccagtcaac ttaggagtgt ttagctctgt gtcg
tagtct gtgctttcca gaggaaaatg 100500
agagagagag agagagaggt ttattagaag gaat
tggctc aggtgattac tgaggctgag 100560
aatccaag ctgcagttgg aagctggaga ccca
ggaaag ccaatggtgt aggttctagt 100620
ccaagtctga gtccaaggc ctgaaaacca ggag
aatgga tgggtacat ttcagttga 100680
ttccaagtgt gaaggcagga gaagaccaac gtcc
tagctc gaagacaggc aagcagagtg 100740
aatcttctct tacttaacct tttctatga ctca
ggcctt caacagattg gatcgggccc 100800
acaacaggg gagggcaatc tgctttctt actc
taccag atcaaatgtt actctcctcc 100860
agaaacgtct tcatacacag ccagaatagc gttt
aaccga atatctgagc actccgcagc 100920
ccagtcaagt agtctcaaaa ttaaccatca cacc
tgaatc cccaccttc atccatttct 100980

tttgagaatt tggggccaaa taaactggtg tctc
acacat actaatggat ttagagaagg 101040
gcatagtgtg ggtgttttct ggagaggcca actt
aggggt gaaagagaac actgtcatta 101100
aactgggtg tgcttagaaa atattgtgat cacc
ccttct ccctgacata acctaaaacc 101160
agtagtcact acgtggtcaa aatgcttctt gttc
ttctgt cttttcctag agagtcttca 101220
aagtattttg ctgtttttc ctgatccctg tggt
tgatga gaggctatgg ccatagtcac 101280
ttgttcctgg ggtttctata aagaatccac agca
gtagaa atttgaccct tctttacaga 101340
tagagaagct ctacaacct tgctcagttt tagg
aacatg tctgtaagat gtgtccat 101400
atatgtgtgt atgtgtttaa gtgaatatga catc

atgcagattc tgtccaagcc agaattcatc taga
ccctag ggcagtgcca gtgctaggct 102780
gagcaccatc agctctccca ggtccttgtc acct
gcttgg gcacgtgcat ggaacccgag 102840
ccaacttcac cccaccctcg tcattacctg ggag
atgcac aagacaaatg ttctaatagac 102900
tgcattgact gcttaagtat tggccaacac gaac
tccca gttattcatg ccagccagga 102960
aggaaacgcc ttccttcccc accattccca gcc
tccttc ccaactggcca gcacctgaac 103020
ccagtgaaca caggcattag tggccaggg tcct
ggcttg gagccagtga gtagacaggc 103080
aagcagaggg gacaaggta gctgggttat acat
gaatat tctcattaca atagaagaaa 103140
ataaaagact taattaagcc catatcttc cccc
agtttt ggattggagg ttcagtgtt 103200
gtagccaaga aagtgtttgt cctgaaatg ccaa
caaatt cattccagg cattggtgct 103260
ttgcacctct tctgcagata gcctcggttt gcag
atgggt gtgctggcag cagccaagt 103320
catctcctat tccatcaaca aatgattgt ggaa
aggga tgctgttggc cctccaaaac 103380
aagggtgaaat gaagggatac tggttctgat agaa
aacaag ttgtgttaa aagccatggg 103440
cccctgactt ccagcctctg agagctggc ccta
gaacac acatgtcctt gaggcctttt 103500
ttttttttt tttttttga cagagtctcg ctct
gtcgcc caggctggag tgcagtggca 103560
cgatctggc tcaactggag ctccacctcc cggg
ttcatg ccattctct gcctcagcct 103620

cccagtagc tgcgaccaca ggtgcccgcc acca
cgctg gctaattttt tgtatctta 103680
gtagagacgg agtttcaccg ttttagccag gatg
gtctca atctcctgac ctctgtatct 103740
gcctgccttg gcctccaaa gtgctgggat taca
ggcatg agccaccgag cccggcctgt 103800
ccttgaggct ttctgagacc ttcactctg tatt
taacac ttgggacct ctgggtcca 103860
ttcctcacac ctcaaggaca agtcttccc tttt
taaata cctgaacct ctcttagtt 103920
aggagctagg ttctgaggc tttccaggc ttaa
tgtttc tctaagatct ttatcgtttt 103980
tgctgtcac agcctttgtc tagcacctcg gcca
ggaagt gctgggtggg ctatcttga 104040
cagatctgga gtttggfact tatgagcata atcc
aagtga aatatgacta aatgtttct 104100
agtcaattc tcctatcaga ttttccaca agtg
gaagtg aaataattc atttgatcat 104160
atatacatcc caccacggc tccggtatgc acgt
gaacac cttatcttag cttcacgtat 104220
attcttgaca ttaaatactc cttggcaaaa tcct

gtcttgtgac cttgaacaaa tcatttcaca cctc
tgggca ttgatggtct catctgcaag 105540
atggggacaa aatcaggctg gagcagagga tctt
ggtggt tcctcccaga cacagggagg 105600
aatctctgag atttgttcca gagactgaga gctt
ctggaa ttctttccc aggggaccaa 105660
tgactcagtg acttaatgct gagtcatttg ccct
ttagag gtgtgacttc cctatctatc 105720
actatgaatg cagagaaata tcatttcca actg
agaaat gcagtttgag ctcttggaga 105780
aaattagaag cttagtgtg tgacgttact gttt
gtagcc tttgatgccc atgtggaatc 105840
agagaagcca gcaggacgat acctaaaata aagg
tgctta ctctctgcac caagatgtca 105900
aaaagtctac ggttacatta ttgcatggca tcag
ggacag gagaaaattt aggagagcca 105960
gagtaggtgt gcttactata ttcagccata ctat
agaaaa taagtgactc tactttactg 106020
aactaaatta aatatgaatg gtaaaaactt ctct
acttgc agggtgcatg tggacataa 106080
tttagttgaa gtttactttc actaagcaac atct
cccacc tttccccca gaaaatgata 106140
acacctttt aatgactttc atttgtggat aatc
atgaga aaaaagtggc ccttttaaat 106200

cagcccaaca cgcagcttaa acttcttagc ttca
tttggg aaattctgta tactcatata 106260
cagaaatgac cttgcctctt ccaactgcat tcac
aggtc aatcagaaaa ggccacaagc 106320
ctgagctga gagaaaaag gaaaacaaa atat
ctttag caggaaataa agtgattctg 106380
ctcttctaga attatcttag gtgagctaca gacc
tgctgg caactccaat tttctctgca 106440
tcatttgaat gtacctatc ttatatgag atcg
actagt gtcccctgaa gctttccaat 106500
tgcatthaat tgaagggaga aggccgtaac tggt
taggtg ccaatctctg tgtttttgga 106560
aacatgaaaa acctatgctt catttctctg caat
tgcat ttaagaatac attatccgca 106620
acaggctggt tcagttaaca ttttaaaagt gcaa
ttccag gcttacagaa tgttaaagtg 106680
gatggagtct tatacagct ggtctcatgg tttt
cagatt gctcggagac tccaaagctg 106740
ttccaaggag gtgactcaat attaataatt ttac
acggcc gggcatggtg gctcacgct 106800
gtaatcccag cactttggga ggccgaggag ggcg
gatcac ctgagttcga acaggagtgc 106860
gagaccatcc cagtcaatat ggtgaaaacc cgtc
tgtact aaaaatacaa aaattagccg 106920
ggtatggtgg cgggccgctt gtaatctcag ctac
ttggga ggctgaggca ggagaatcac 106980
ttaaacctgg gaggaggagg ttgcagtgag ccga
gatcgc accttgacac tctggcctgg 107040

acatttacca aattaaactc aaggaagta gaaa
gaataa aataataaga ataggagtaa 108360
aattaatgaa ataagaaaca aacataataa aaag
cctcaa caaagatcaa attctgttct 108420
tgaaaaaat taaattaata aacctctggg gaga
ctgac aaaggaagaa aaagagagaa 108480
ggcacaata aacagtattc tttaatgat atca
ctatag atcctagagt caatcaaaag 108540
ataataaaag gatattatga tcaagcttat gtca
aaaca attgaaaata tagatgaatg 108600
ggaaaacata taattgacct aagaagaac aaaa
tcagaa tagtagcata actgctaaag 108660
aaagagaatg tcttcattgg tgagctgtac taaa
atitaa ggacaaagca acaccaatit 108720
tatagtcttc agtaaaatag aaaaagtgtg actt
ttcaga ttatttatga ggctaaaaaa 108780
acctcaatat caaatgctac aaaggcatta caag
aaaaaa attgcaagtc aatitgccc 108840

cagaaataca tgcaaaaatt ccaaaaaaa atta
ccaatc aagtccagca aatataaca 108900
aggctaacat atgtgacaaa actggtttca ttcc
aggaat gcaatgttgg ctactatta 108960
gaaaatcact caactcgta cattaataga ttac
aggata aaacaatata taaactcaac 109020
agatgcagaa aaaaatgttt gataaaaatt ttg
agctcc aattataaga tattcacaaa 109080
cttgggatag aagacaatit cttaacctt aaag
tttacc tgcaagaaag ctacaggaaa 109140
cctatactta atggtgaagc tttgaagatg ttcc
ttttga aataaagaat gagtgaagaa 109200
tgccagcatc aacacttctg ttcaacatg taag
aatcc tagtcaatgt agtaaaacaa 109260
gaaaaaaaa taagataaaa ggtatatgga ttca
taataa ataataaaa ctgacaatat 109320
agatataaat atatagctga atatccaaa taat
atacag ataattatt agaattaatc 109380
acaaggttta ataaggttgc aggatacaaa aatc
aatatt attccacat agcagcaata 109440
aataaaaaat ttaattttta aagttttgta gcaa
tgaagg gaaagcttcc tttttgccct 109500
tggaggcttc actgaaaaat caagtcataa aaag
gcagaa aaataagaga aaaagcataa 109560
aattttattc tcctatgcac acggggaaaa tcgg
agtgat tggccaatac ttcaatgggt 109620
acagatgctt gtagagcctt ctcttaggg gaaa
gagaga tggggaagcg tggatgattt 109680

taggggaata ataatgatt tttaggaatt tgg
gtgctt gaagaaaaca atggtccagg 109740
acagagtctg ttgactcac agagcagact ttg
tttgtg acaaaagtct gtccaggttt 109800
gttgatagac tttagtcttc ctcttgtga tatg


```

cca gcc aac ttc aca gag ggc agc ttc gat
tcc agt ggg acc ggg cag      225
Pro Ala Asn Phe Thr Glu Gly Ser Phe Asp
Ser Ser Gly Thr Gly Gln
                    5                10                15
acg ctg gat tct tcc cca gtg gct tgc act
gaa aca gtg act ttt act      273
Thr Leu Asp Ser Ser Pro Val Ala Cys Thr
Glu Thr Val Thr Phe Thr
                    20                25                30
gaa gtg gtg gaa gga aag gaa tgg ggt tcc
ttc tac tac tcc ttt aag      321
Glu Val Val Glu Gly Lys Glu Trp Gly Ser
Phe Tyr Tyr Ser Phe Lys
                    35                40                45
act gag caa ttg ata act ctg tgg gtc ctc
ttt gtt ttt acc att gtt      369
Thr Glu Gln Leu Ile Thr Leu Trp Val Leu
Phe Val Phe Thr Ile Val
                    50                55                60                65
gga aac tcc gtt gtg ctt ttt tcc aca tgg
agg aga aag aag aag tca      417
Gly Asn Ser Val Val Leu Phe Ser Thr Trp
Arg Arg Lys Lys Lys Ser
                    70                75                80
aga atg acc ttc ttt gtg act cag ctg gcc
atc aca gat tct ttc aca      465
Arg Met Thr Phe Phe Val Thr Gln Leu Ala
Ile Thr Asp Ser Phe Thr
                    85                90                95
gga ctg gtc aac atc ttg aca gat att att
tgg cga acc act gga gac      513
Gly Leu Val Asn Ile Leu Thr Asp Ile

```

【図面の簡単な説明】
 【図1】 KAT06734 Lポリペプチドのハイ100図
 パシープロットを示す図である。この図は解析ソフト(MacMolly)を用いて作成した。予想される7つの膜貫通領域(TM1~TM7)を图中に示す。既知GPCRとしては、ヒトバソプレッシン2受容体(V1aR)、マウスバソプレッシン2受容体(MuSE)、ヒトバソプレッシン1受容体(HuSE)、ヒト黄体形成ホルモン放出ホルモン受容体(GnRHR)、ホワイトオトシン(Whosin)を用いた。Protein Data Bank (PDB)の1M6U (Whosin)を用いた。Sequence Alignment Software (SAS)を用いて作成した。KAT06734 Lポリペプチド中の予想される7つの膜貫通領域(TM10~TM7)を下線で示した。全てのGPCRで保存されたアミノ酸を*で、よく保存されたアミノ酸を:または・で示した。

【図2】 KAT06734 Lポリペプチドのハイ100図と既知GPCRのアミノ酸配列をアラインメントした図である。既知GPCRとしては、ヒトバソプレッシン2受容体(V1aR)、マウスバソプレッシン2受容体(MuSE)、ヒトバソプレッシン1受容体(HuSE)、ヒト黄体形成ホルモン放出ホルモン受容体(GnRHR)、ホワイトオトシン(Whosin)を用いた。Protein Data Bank (PDB)の1M6U (Whosin)を用いた。Sequence Alignment Software (SAS)を用いて作成した。KAT06734 Lポリペプチド中の予想される7つの膜貫通領域(TM10~TM7)を下線で示した。全てのGPCRで保存されたアミノ酸を*で、よく保存されたアミノ酸を:または・で示した。

【図3】 図2と同様な図であり、図2の続葉である。
 【図4】 図2と同様な図であり、図3の続葉である。
 【図5】 図2と同様な図であり、図4の続葉である。
 【図6】 図2と同様な図であり、図5の続葉である。
 【図7】 KAT06734 L cDNAの塩基配列と該cDNAのコードするポリペプチドのアミノ酸配列を示した図である。実施例で使用したプライマーの位置とイントロンの位置を合せて示してある。
 【図8】 図7と同様な図であり、図7の続葉である。
 【図9】 図7と同様な図であり、図8の続葉である。
 【図10】 図7と同様な図であり、図9の続葉である。

る。

【図11】 KAT0673-3'の塩基配列と該配列から予想されるアミノ酸配列を示した図である。図8で示したイントロン3の位置を図中に示してある。

【図12】 図11と同様の図であり、図11の続葉である。

【図13】 図11と同様の図であり、図12の続葉である。

【図14】 KAT06734Lポリペプチドと既知GPCRのアミノ酸配列を用いて作成したデンドログラムを示した図である。既知GPCRとしては、ヒトバソプレッシン1A受容体、マウスバソプレッシン1A受容体、ヒトバソプレッシン1B受容体、ヒトバソプレッシン2受容体、ヒトオキシトシン受容体、ヒト黄体形成ホルモン放出ホルモン受容体、ホワイトサッカークのバソトシン受容体を用いた。デンドログラムは、CLUSTAL X Multiple Sequence Alignment Program (ftp://ftp-igbmc.u-strasbg.fr/pub/ClustalX/)を用いて作成した。

【図15】 PCR法を用いて、35種のヒト臓器におけるKAT06734L転写産物の発現量を調べた結果を示した電気泳動の図である。PCRのサイクル数は35である。矢印は目的の増幅断片(318bp)の位置を示している。電気泳動図の各レーンのサンプルは以下の通りである。

n.c.: ネガティブコントロール、1: Adrenal Grand (副腎)、2: Brain (脳)、3: Brain, caudate nucleus (脳、尾状核)、4: Brain, hippocampus (脳、海馬)、5: Brain, substantia nigra (脳、黒質)、6: Brain, thalamus (脳、視床)、7: Kidney (腎臓)、8: Pancreas (膵臓)、9: Pituitary gland (脳下垂体)、10: Small intestine (小腸)、11: Bone marrow (骨髄)、12: Brain, amygdala (脳、扁桃核)、13: Brain, cerebellum (脳、小脳)、14: Brain, corpus callosum (脳、脳梁)、15: Fetal brain (胎児脳)、16: Fetal kidney (胎児腎臓)、17: Fetal liver (胎児肝臓) 18: Fetal lung (胎児肺)、19: Heart (心臓)、20: Liver (肝臓)、21: Lung*

* (肺)、22: Lymph node (リンパ節)、23: Mammary gland (乳腺)、24: Placenta (胎盤)、25: Prostate (前立腺)、26: Salivary gland (唾液腺)、27: Skeletal muscle (骨格筋)、28: Spinal cord (脊髄)、29: Spleen (脾臓)、30: Stomach (胃)、31: Testis (精巣)、32: Thymus (胸腺)、33: Thyroid (甲状腺)、34: Trachea (気管)、35: Uterus (子宮)、36: Standard 0.01 fg (標準試料 0.01 fg)、37: Standard 0.1 fg、38: Standard 1 fg、M.: サイズマーカー

【図16】 PCR法を用いて、各種ヒト細胞株、末梢T細胞、および活性化末梢T細胞におけるKAT06734L転写産物の発現量を調べた結果を示した電気泳動の図である。PCRのサイクル数は25である。矢印は目的の増幅断片(318bp)の位置を示している。電気泳動図の各レーンのサンプルは以下の通りである。

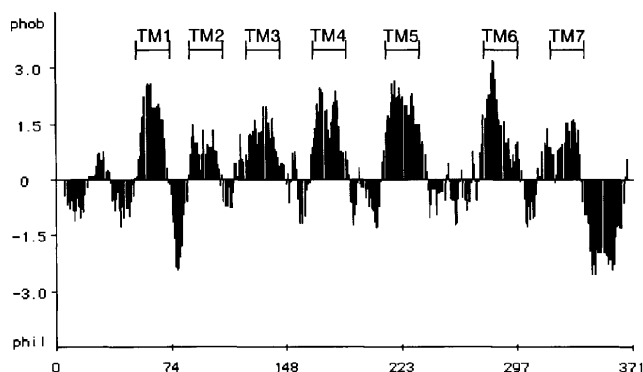
n.c.: ネガティブコントロール、1: Jurkat、2: Molt-3、3: Molt-4、4: Hut78、5: Namalwa KJM-1、6: Daudi、7: Raji、8: HL-60、9: U937、10: THP-1、11: IVEC、12: HUVEC、13: WM266-4、14: WM115、15: SK-N-MC、16: PC-9、17: HLC-1、18: QG-90、19: PC-3、20: KAT0-III、21: Capan-1、22: Capan-2、23: Colo205、24: SW1116、25: LS180、26: T cell (無刺激)、27: T cell IL-2 (インターロイキン-2) + PHA (Phytohemagglutinin) + TGF- β (トランスフォーミング・グロース・ファクター- β) 2日間(2日間培養)、28: T cell IL-2+PHA+TGF- β 4日間、29: T cell IL-2+PHA+TGF- β 6日間、30: T cell IL-2+PHA+TGF- β 8日間、31: T cell IL-2+PHA 4日間、32: T cell IL-2+PHA 6日間、33: T cell IL-2+PHA 8日間、34: T cell IL-2+抗CD3抗体 2日間、35: T cell IL-2+抗CD3抗体 4日間、36: T cell IL-2+抗CD3抗体 6日間、37: T cell IL-2+抗CD3抗体 8日間、38: Standard 1 fg (標準試料 1 fg)、39: Standard 10 fg、40: Standard 50 fg、41: Standard 125 fg、M.: サイズマーカー

【図6】

V1aR	-----	
V1aR-MOUSE	-----	
vasotocin	CIPLDCSRKSSQCIPLDCSRKSSQCMSKES-----	434
OXTR	-----	
V1bR	-----	
V2R	-----	
KAT06734	-----	
GnRHR	-----	

【図1】

Hydropathy for KAT06734L



【図2】

V1aR	-----MR-LSAGPDAGP SGNSSPWWPLATGAGNTSREAEALGEGNGPPRDV--	45
V1aR-MOUSE	-----MS-FPRGSHDLPAGNSSPWWPLTTEGANS SREAAGLGE GGSPPGDV--	45
vasotocin	-----MGRIANQT-----TASN DTPFG-----	18
OXTR	-----MEGALAA NWSAEAA NASAAPP----GAEGNR TAGPPR-----	33
V1bR	-----MD-----SGPLWDANPTPRG----T L SAPNATTPWLG-----	28
V2R	-----MLMAS TTSAVPGHPSLP SLP SNSSQERPLDT-----	31
GnRHR	-----MANSASPEQNQHCS-----A INNSIPLMQGNLP-----	29
KAT06734L	-----MPANFTEGSFDS SGTGQTL DSSPVACTETVTFTEVVEGKEWGS-----	43

V1aR	RNEELAKLEIAVLAVTFVA VAVLGNSSVLLALHRTPRK-----TSRMHLFIRHLSLADLA	99
V1aR-MOUSE	RNEELAKLEVTVLAVIFV VAVLGNSSVLLALHRTPRK-----TSRMHLFIRHLSLADLA	99
vasotocin	RNEEVAKMEITVLSVTFV VAVIGNLSVLLAMHNTKKK-----SSRMHLFIKHLSLADMV	72
OXTR	RNEALARVEVAVLCLILL LALSGNACVLLALRTTRQK-----HSRLFFFMKHL SIADLV	87
V1bR	RDEELAKVEIGV L ATVLV L ATGGNLAVLLTLGQLGRK-----RSRMHLFVLHLALTDLA	82
V2R	RDPLLARAELALLSIVF VAVALS NGLVLAALARRGRGH----WAP I HVF IGHLC LADLA	87
GnRHR	TLTLSGKIRVTVTF FL L SATFNASFL LK L QKWTQKKEGK KLSRMK L L L KHLTLANLL	89
KAT06734L	FYYSFKTEQLITLWVLFV ETIVGNSV VLFSTWRKKK-----SRMFFVTQLAITDSF	96

.: : * . * : : : : * : :
 TM1 TM2

【図4】

V1aR	RAYVTWMTG-GIFVAPVVILGTCYGFICYNIWCNVRGKTASRQSKGAEQA----GVA---	265
V1aR-MOUSE	RAYVTWMTS-GVFVVPVILGTCYGFICYHIWRNVRGKTASRQSKGGKGS----GEAAGP	270
vasotocin	RAYITWITV-GIFLIPVILMICYGFICHSIWKNIKCKTMR----GTRN-----TK---	232
OXTR	KAYITWITL-AVYIVPVIVLATCYGLISFKIWQNLRLKTAATAAAEAPEG----AAAG--	250
V1bR	RAYLTWTTL-AIFVLPVMTLACYSLICHELCKNLKVKTAQAWRVGGGGWRTWDRPSPSTL	255
V2R	RTYVTWIAL-MVAVVAPTLGIAACQVLIFREIHASLVPGPSERP--GGRR-----	248
GnRHR	QAFYNFFTFSCFLIIPLFIMLICNAKIIIFTLTRVLHQDPHELQ-----	250
KAT06734L	TPYMTIVAF-LVYFIPLTIIISIMYGIVIRTIWIKSKTYETVISN-----	250

. : . : : : * : : :
TM5

V1aR	FQKGFLLAPCVSSVKSISRAKIRTVKMTFVIIVTAYIVCWAPFFIIQMWSVWDPM---SVW	322
V1aR-MOUSE	FHKGLLVTPCPCVSSVKSISRAKIRTVKMTFVIIVSAYILCWTPFFIVQMWSVWDTN---FVW	327
vasotocin	--DGMIGKVS SVS VTIISRAKLRTVKMTLVIIVLAYIVCWAPFFIVQMWSVWDEN---FSW	287
OXTR	--DGRVALARVSSVKLISKAKIRTVKMTFIIIVLAFIVCWTPFFVQMWSVWDAN---AP-	305
V1bR	AATTRGLPSRVSSINTISRAKIRTVKMTFVIIVLAYIACWAPFFSVQMWSVWDKN---APD	312
V2R	--RGRRTGSPGEGAH-VSAAVAKTVRMTLVIIVVYVLCWAPFFLVQLWAAWDPE---AP-	301
GnRHR	-----LNQSKNNIPRARLKTLMKMTVAFATSFVWCWTPYYVLGIWYFDPPEMLNR--	299
KAT06734L	--CSDGKLCSSYNRGLISKAKIKAIKYSIIIIILAFICCWSPYFLFDILDNFNLLP----D	304

. : . * : : : : : : * : * : : : : : :
TM6

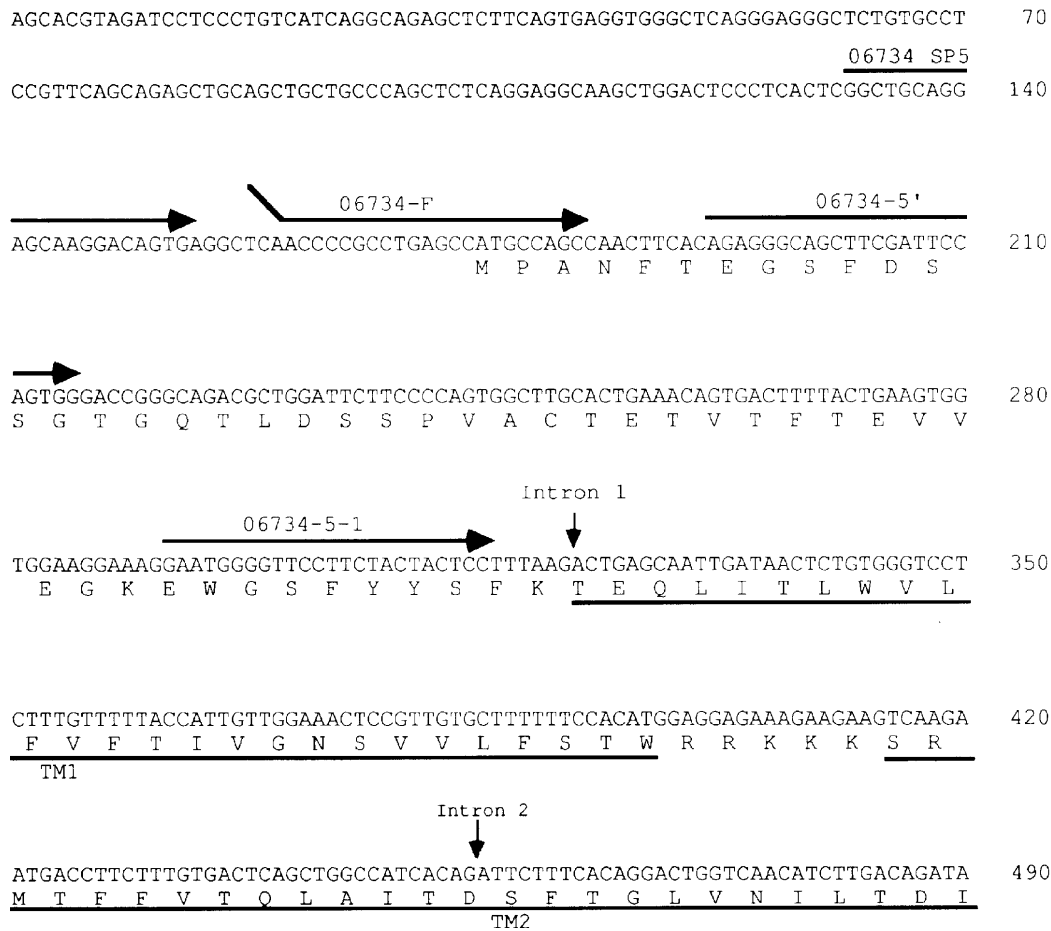
【図5】

V1aR	TESENPTITITALLGSLNSCCNPWIYMFSGHLLQDCVQSFPCQNMKEKFNKEDTDS--	380
V1aR-MOUSE	TDSENPSTTITALLASLNSCCNPWIYMFSGHLLQDCVQSFPCQSIQKFAKDDSDS--	385
vasotocin	DDSENAAVTSLALLASLNSCCNPWIYMLFSGHLLYDFLRCFPCCCKPRNMLQKEDSDS--	345
OXTR	--KEASAFIIVMLLASLNSCCNPWIYMLFTGHLFHELQVRFLLCCSASYLKG--RRLGETS-	361
V1bR	EDSTNVAFTISMLLGNLNSCCNPWIYMGFNHLLPRPLRHLACCGGQPFRMRRLSDGSL	372
V2R	--LEGAPFVLLMLLASLNSCTNPWIYASFSS--VSSELRSLCCARGRTPPSLGPQDE--	356
GnRHR	--LSDPVNHFFFLFAFLNPFCDPLIYGYSFSL-----	328
KAT06734L	TQERFYASVIIQNLPALNSAINPLIYCVFSS-----ISFPCREQRSQDSRMTFRER--	356

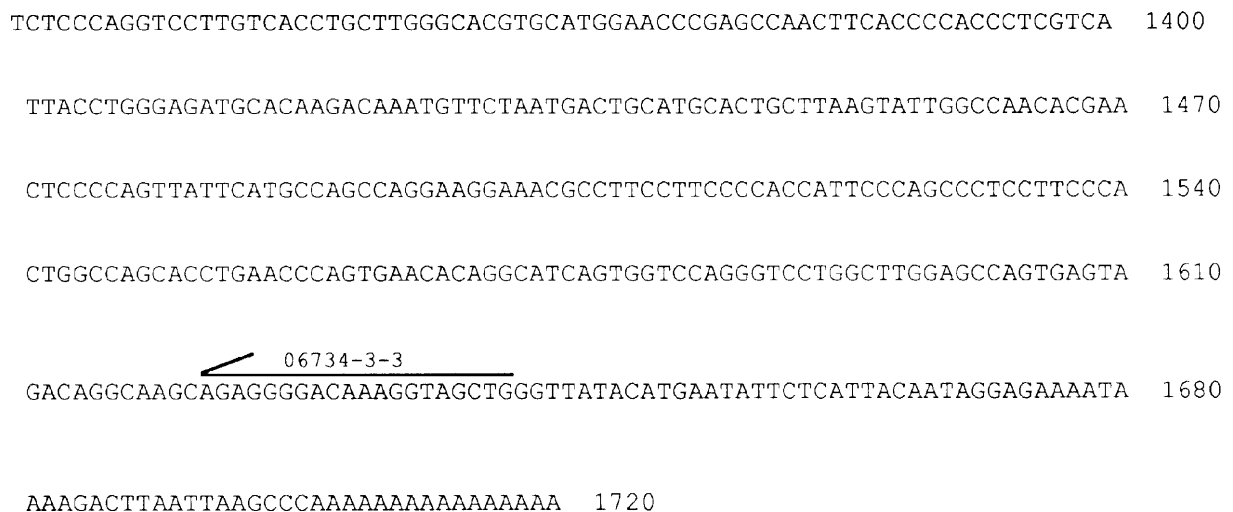
: : * : * : *
TM7

V1aR	MSRRQTFYS---NNSRPTNSTGMWKDS-PKSSKSIKFIIPVST-----	418
V1aR-MOUSE	MSRRQTSYS---NNSRPTNSTGTWKDS-PKSSKSIKFIIPVST-----	423
vasotocin	SIRRNTHLLTKLAAGRMTNDGFGSWRDP-CNSRKSSQSIGLDCFCCKSSQCLEHDCSRKSSQ	404
OXTR	-----ASKKSNSSS-----FVLSHRSSSQRSQ-----SQPSTA-----	389
V1bR	SSRHHTLLTRSSCPATLSLSLSLTLSSGRPRPEESPRDLELADGEGTAETIIF-----	424
V2R	-----SCTTAS--S-----SLAKDTSS-----	371
GnRHR	-----	
KAT06734L	-----TERHEMQ-----ILSKPEFI-----	371

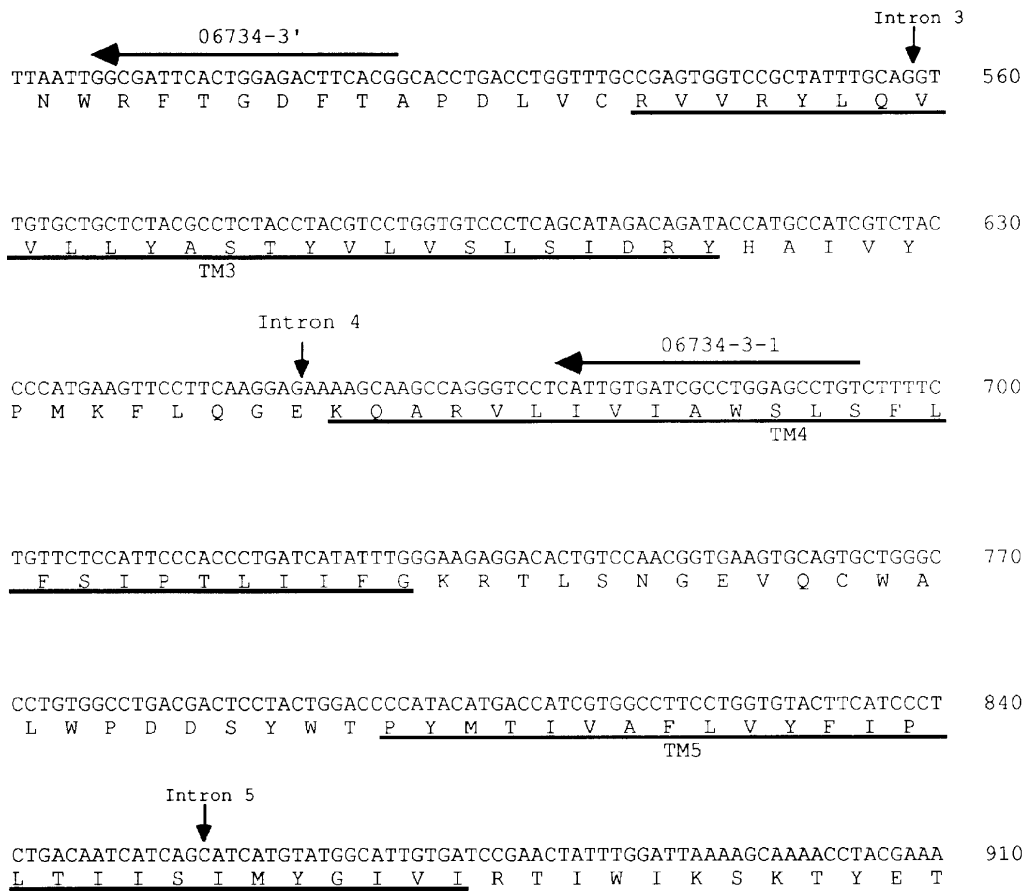
【図7】



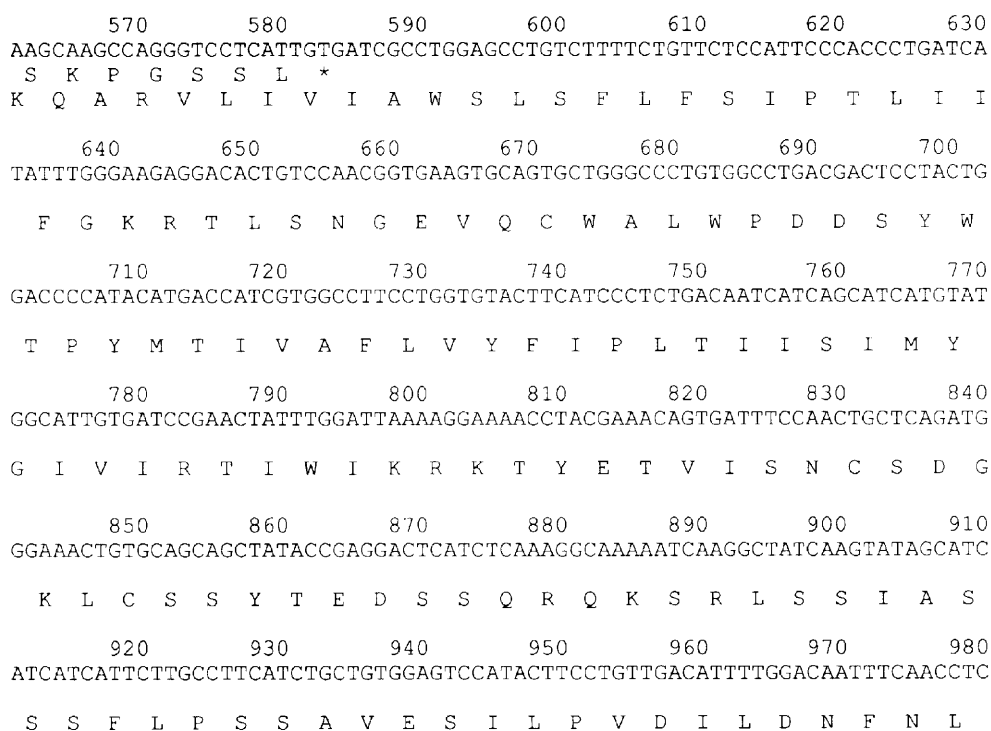
【図10】



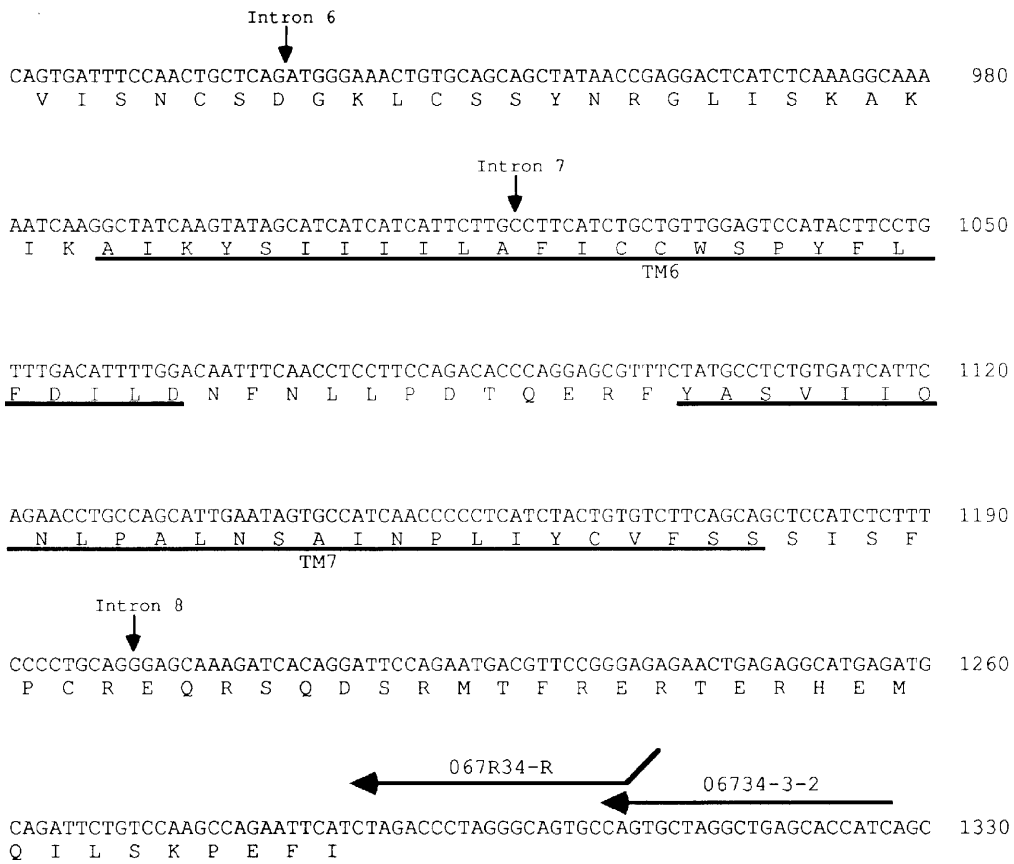
【図8】



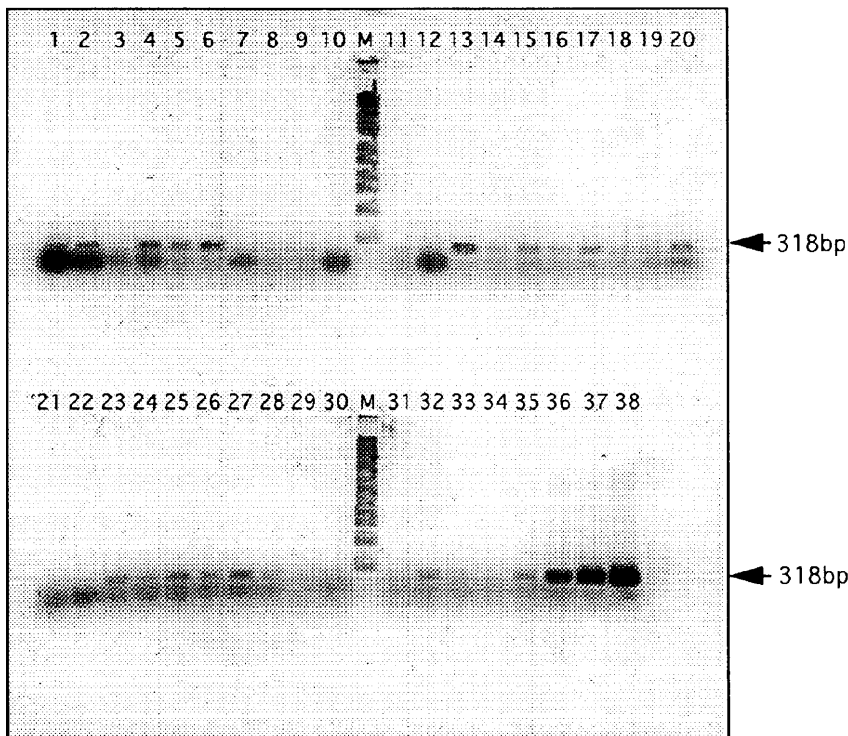
【図12】



【図9】



【図15】

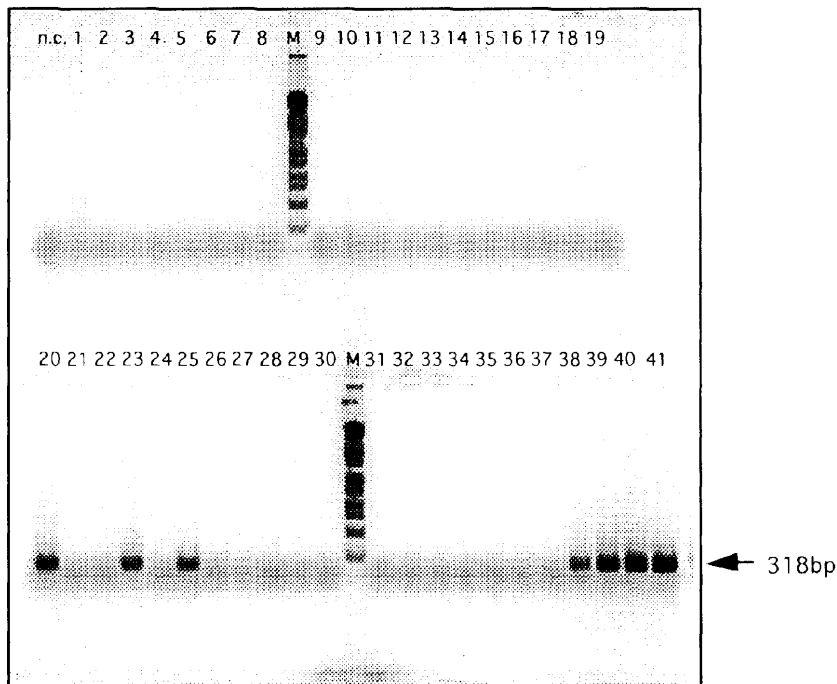


【図11】

10 20 30 40 50 60 70
 AGCACGTAGATCCTCCCTGTCATCAGGCAGAGCTCTTCAGTGAGGTGGGCTCAGGGAGGGCTCTGTGCCT
 80 90 100 110 120 130 140
 CCGTTCAGCAGAGCTGCAGCTGCTGCCAGCTCTCAGGAGGCAAGCTGGACTCCCTCACTCGGCTGCAGG
 150 160 170 180 190 200 210
 AGCAAGGACAGTGAGGCTCAACCCCGCTGAGCCATGCCAGCCAACCTTCACAGAGGGCAGCTTCGATTCC
 M P A N F T E G S F D S
 220 230 240 250 260 270 280
 AGTGGGACCGGGCAGACGCTGGATTCTTCCCCAGTGGCTTGCCTGAAACAGTGACTTTTACTGAAGTGG
 S G T G Q T L D S S P V A C T E T V T F T E V V
 290 300 310 320 330 340 350
 TGAAGGAAAGGAATGGGGTTCCTTCTACTACTCCTTAAAGACTGAGCAATTGATAACTCTGTGGGTCTT
 E G K E W G S F Y Y S F K T E Q L I T L W V L
 360 370 380 390 400 410 420
 CTTTGTTCCTTACCATTGTTGGAACTCCGTTGTGCTTTTTTCCACATGGAGGAGAAAAGAAGAAGTCAAGA
 F V F T I V G N S V V L F S T W R R K K K S R
 430 440 450 460 470 480 490
 ATGACCTTCTTGTGACTCAGCTGGCCATCACAGATTCTTTCACAGGACTGGTCAACATCTTGACAGATA
 M T F F V T Q L A I T D S F T G L V N I L T D I
 500 510 520 530 540 550 560
 TTAATTGGCGATTCACTGGAGACTTCACGGCACCTGACCTGGTTTGCCGAGTGGTCCGCTATTGCAGAA
 N W R F T G D F T A P D L V C R V V R Y L Q K
 P G L P S G P L F A E

Intron 3
↓

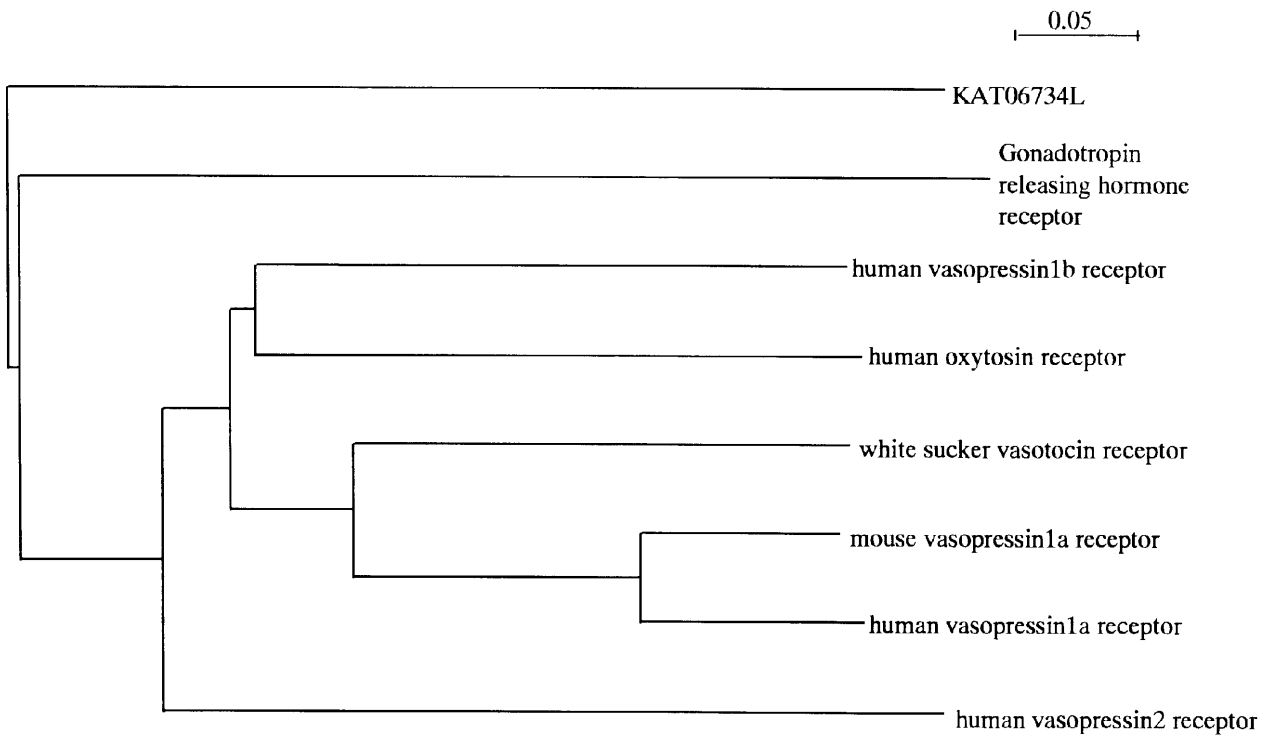
【図16】



【図13】

990 1000 1010 1020 1030 1040 1050
 TTCCAGACACCCAGGAAGCGTTTCTATGCCTCTGTGATCATTTCAGAACCTGCCAGCATTGAATAGTGCCA
 F Q T P R K R F Y A S V I I Q N L P A L N S A I
 1060 1070 1080 1090 1100 1110 1120
 TCAACCCCTCATCTACTGTGTCTTCAGCAGCTCCATCTCTTCCCCTGCAGGGAGCAAAGATCACAGGA
 N P L I Y C V F S S S I S F P C R E Q R S Q D
 1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190
 TTCCAGAATGACGTTCCGGGAGAGAAGTGCAGGGCATGAGATGCAGATTCTGTCCAAGCCAGAATTCATC
 S R M T F R E R T E R H E M Q I L S K P E F I
 1200 1210 1220 1230 1240 1250 1260
 TAGACCCCTAGGGCAGTGCCAGTGCTAGGCTGAGCGCCATCAGCTCTCCCAGGTCCTTGTCACCTGCTTGG
 1270 1280 1290 1300 1310 1320 1330
 GCACGTGCATGGAACCCGAGCCAACCTCACCCACCCCTCGTCATTACCTGGGAGATGCACAAGACAATG
 1340 1350 1360 1370 1380 1390 1400
 TTCTAATGACTGCATGCACTGCTTAAGTATTGGCCAACACGAAGTCCCAGTTATTCATGCCAGCCAGGA
 1410 1420 1430 1440 1450 1460 1470
 AGGAAACGCCTTCCTTCCCCACCATTCAGCCCTCCTTCCCCTGGCCAGCACCTGAACCCAGTGAACA
 1480 1490 1500 1510 1520 1530 1540
 CAGGCATTAGTGGTCCAGGGTTCTGGCTTGGAGCCAGTGAGTAGACAGGCAAGCAGAGGGGACAAAGGTA
 1550 1560 1570 1580 1590 1600 1610
 GCTGGGTTATACATGAATATTCTCATTACAATAGGAGAAAATAAAAGACTTAATTAAGCCCAAAAAAAAA
 1620
 AAAAAA

【図 1 4】



フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マコード (参考)
A 6 1 K 45/00	1 0 1	A 6 1 P 25/00	4 B 0 6 5
A 6 1 P 25/00		35/00	4 C 0 8 4
35/00		C 0 7 K 14/705	4 C 0 8 5
C 0 7 K 14/705		16/28	4 H 0 4 5
16/28		C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/15		1/19	
1/19		1/21	
1/21		C 1 2 P 21/02	C
5/10		C 1 2 Q 1/68	A
C 1 2 P 21/02			Z
C 1 2 Q 1/68		G 0 1 N 33/15	Z
		33/50	Z
G 0 1 N 33/15		33/53	D
33/50			M
33/53		33/566	
		C 1 2 P 21/08	
33/566		(C 1 2 P 21/02	C

// C 1 2 P 21/08
 (C 1 2 P 21/02
 C 1 2 R 1:91)

C 1 2 R 1:91)
 C 1 2 N 15/00
 5/00

Z N A A
 A

(72)発明者 河合 宏紀
 東京都町田市旭町 3 丁目 6 番 6 号 協和醗
 酵工業株式会社東京研究所内

(72)発明者 西 達也
 東京都町田市旭町 3 丁目 6 番 6 号 協和醗
 酵工業株式会社東京研究所内

(72)発明者 中村 祐輔
 神奈川県横浜市青葉区あざみ野 1 - 17 - 33

(72)発明者 菅野 純夫
 東京都杉並区南荻窪 4 - 8 - 13

F ターム(参考) 2B030 AB04 AD08 CA06 CA17 CA19
 CB03
 2G045 AA26 AA34 AA35 AA40 BB20
 CB01 CB17 CB20 CB21 DA12
 DA13 DA14 DA36
 4B024 AA11 AA12 BA53 BA63 CA04
 CA12 DA01 DA02 DA05 DA11
 EA04 GA03 GA14 HA01 HA12
 HA15
 4B063 QA01 QA05 QA12 QA19 QQ08
 QQ21 QQ33 QQ61 QQ62 QQ73
 QQ79 QQ89 QQ91 QQ94 QR32
 QR42 QR50 QR62 QR75 QR76
 QR77 QR78 QR80 QS03 QS05
 QS24 QS25 QS34 QX07
 4B064 AG01 AG26 AG27 BA14 CA02
 CA05 CA10 CA11 CA19 CA20
 CC24 DA01 DA13 DA14
 4B065 AA15X AA22X AA24X AA26X
 AA32X AA41X AA48X AA72X
 AA79X AA87X AA88X AA90X
 AA92X AA93X AA93Y AB01
 AB05 AC14 BA02 BA03 CA24
 CA25 CA44 CA46
 4C084 AA17 ZA022 ZB262
 4C085 AA13 AA14 BB50 CC03
 4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10
 CA40 DA50 EA20 EA50 EA51
 FA72 FA73 FA74 HA05

专利名称(译)	新型多肽		
公开(公告)号	JP2001245666A	公开(公告)日	2001-09-11
申请号	JP2000060548	申请日	2000-03-06
申请(专利权)人(译)	协和醱酵工业株式会社		
[标]发明人	佐々木克敏 中谷幸江 佐伯智 河合宏紀 西達也 中村祐輔 菅野純夫		
发明人	佐々木 克敏 中谷 幸江 佐伯 智 河合 宏紀 西 達也 中村 祐輔 菅野 純夫		
IPC分类号	A01H5/00 A01K67/027 A61K39/395 A61K45/00 A61P25/00 A61P35/00 C07K14/705 C07K16/28 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12P21/02 C12P21/08 C12Q1/68 C12R1/91 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/566		
FI分类号	A01H5/00.A A01K67/027 A61K39/395.D A61K39/395.N A61K45/00.101 A61P25/00 A61P35/00 C07K14/705 C07K16/28 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02.C C12Q1/68.A C12Q1/68.Z G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566 C12P21/08 C12R1/91 C12N15/00.ZNA.A C12N5/00.A A01H6/62 C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A C12N5/00.101 C12N5/20		
F-TERM分类号	2B030/AB04 2B030/AD08 2B030/CA06 2B030/CA17 2B030/CA19 2B030/CB03 2G045/AA26 2G045/AA34 2G045/AA35 2G045/AA40 2G045/BB20 2G045/CB01 2G045/CB17 2G045/CB20 2G045/CB21 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA36 4B024/AA11 4B024/AA12 4B024/BA53 4B024/BA63 4B024/CA04 4B024/CA12 4B024/DA01 4B024/DA02 4B024/DA05 4B024/DA11 4B024/EA04 4B024/GA03 4B024/GA14 4B024/HA01 4B024/HA12 4B024/HA15 4B063/QA01 4B063/QA05 4B063/QA12 4B063/QA19 4B063/QQ08 4B063/QQ21 4B063/QQ33 4B063/QQ61 4B063/QQ62 4B063/QQ73 4B063/QQ79 4B063/QQ89 4B063/QQ91 4B063/QQ94 4B063/QR32 4B063/QR42 4B063/QR50 4B063/QR62 4B063/QR75 4B063/QR76 4B063/QR77 4B063/QR78 4B063/QR80 4B063/QS03 4B063/QS05 4B063/QS24 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QX07 4B064/AG01 4B064/AG26 4B064/AG27 4B064/BA14 4B064/CA02 4B064/CA05 4B064/CA10 4B064/CA11 4B064/CA19 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B064/DA14 4B065/AA15X 4B065/AA22X 4B065/AA24X 4B065/AA26X 4B065/AA32X 4B065/AA41X 4B065/AA48X 4B065/AA72X 4B065/AA79X 4B065/AA87X 4B065/AA88X 4B065/AA90X 4B065/AA92X 4B065/AA93X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AB05 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/BA03 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA17 4C084/ZA022 4C084/ZB262 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BB50 4C085/CC03 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA50 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/EA51 4H045/FA72 4H045/FA73 4H045/FA74 4H045/HA05		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

解决的问题：获得新的G蛋白偶联受体多肽并提供寻找该多肽的配体，激动剂，拮抗剂或功能修饰剂的方法。根据本发明，选自人胃癌细胞来源的cDNA文库的cDNA克隆可以被随机测序以获得编码新型G蛋白偶联受体多肽的DNA。使用由DNA或其部分多肽编

码的多肽，该多肽的配体，激动剂，拮抗剂或功能修饰剂的搜索系统或筛选试剂盒，使用该搜索系统或试剂盒获得的化合物，可以提供针对多肽的抗体。另外，DNA可用于提供DNA不足的非人类哺乳动物。

