

(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2002 - 360274
(P2002 - 360274A)

(43)公開日 平成14年12月17日(2002.12.17)

(51)Int.Cl ⁷	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 15/09	ZNA		A 6 1 K 31/7088	
			39/395	D
A 6 1 K 31/7088				N
38/00			48/00	
39/395			A 6 1 P 25/00	
審査請求 未請求 請求項の数 32 O L (全 28数) 最終頁に続く				

(21)出願番号	特願2001 - 388116(P2001 - 388116)	(71)出願人	000006792 理化学研究所 埼玉県和光市広沢2番1号
(22)出願日	平成13年12月20日(2001.12.20)	(72)発明者	林崎 良英 茨城県つくば市稲荷前22 - 1 - 201
(31)優先権主張番号	60/256934	(72)発明者	鈴木 治和 神奈川県横浜市鶴見区末広町1丁目7番22号 理化学研究所横浜研究所内
(32)優先日	平成12年12月21日(2000.12.21)	(74)代理人	100098121 弁理士 間山 世津子 (外 1 名)
(33)優先権主張国	米国(US)		

(54)【発明の名称】 核酸配列、コードされたポリペプチド、および治療におけるそれらの用途

(57)【要約】 (修正有)

【課題】 神経障害に関連する遺伝子およびコードされたポリペプチドの提供。

【解決手段】 ハツカネズミの精巣組織由来の特定なアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；特定なペプチド配列を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；ハツカネズミの精巣組織由来の特定な配列を有するポリヌクレオチド；ハツカネズミの精巣組織由来の特定な配列を含むポリヌクレオチド；またはハツカネズミの精巣組織由来の特定な配列を有するペントペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む単離された核酸分子。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 a) 配列番号2、配列番号4または配列番号6のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；
b) 配列番号8のペプチド配列を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；
c) 配列番号1、配列番号3または配列番号5の配列を有するポリヌクレオチド；
d) 配列番号7の配列を含むポリヌクレオチド；
e) 配列番号7の配列を有するポリヌクレオチド；または

f) 配列番号8の配列を有するペンタペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む単離された核酸分子。

【請求項2】 請求項1に記載の核酸a)～f)のいずれか1つにハイブリダイズする核酸分子。

【請求項3】 請求項1～2のいずれか1項に記載の核酸分子をベクターに挿入することを含む、組換えベクターの作製方法。

【請求項4】 請求項1～2のいずれか1項に記載の核酸を含む組換えベクター。

【請求項5】 請求項4に記載の組換えベクターを培養宿主細胞に導入することを含む、培養組換え宿主細胞の作製方法。

【請求項6】 請求項4に記載のベクターを含む培養宿主細胞。

【請求項7】 請求項1～2のいずれか1項に記載の核酸分子によりコードされたポリペプチドの調製方法であって、該核酸で形質転換した宿主細胞を培養し、コードされたポリペプチドを回収することを含む上記方法。

【請求項8】 請求項1に記載の核酸分子a)～f)のいずれか1つによりコードされたポリペプチド、またはその断片。

【請求項9】 配列番号2、配列番号4または配列番号6のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ配列番号2、配列番号4または配列番号6のアミノ酸配列からなるポリペプチドと同じ機能を有するポリペプチドまたはその断片。

【請求項10】 請求項2に記載の核酸を適切な製薬用希釈剤、賦形剤および/または担体と組み合わせて含む、医薬組成物。

【請求項11】 請求項1に記載の核酸分子a)～f)のいずれか1つによりコードされたポリペプチドまたは該ポリペプチドの断片に対して調製した抗体。

【請求項12】 請求項2に記載の核酸分子、請求項2に記載の核酸分子を適切な製薬用希釈剤、賦形剤および/もしくは担体と組み合わせて含む医薬組成物、または請求項11に記載の抗体を含む、神経障害の治療剤。

【請求項13】 前記障害が神経細胞におけるナトリウムチャンネルの機能障害に関連するものである、請求項12に記載の治療剤。

【請求項14】 前記障害が、多発性硬化症(MS)、ギラン-バレー症候群(GBS)または慢性炎症性脱髄性多発神経炎である、請求項12に記載の治療剤。

【請求項15】 不溶性支持体に固定した請求項1～2のいずれか1項に記載の核酸分子またはその断片を含む製品。

【請求項16】 前記支持体が膜、フィルター、チップ、紙またはスライドガラスである、請求項15に記載の製品。

10 【請求項17】 神経障害を検出するための診断キットであって、容器に入れた請求項2に記載の核酸分子または請求項11に記載の抗体を含む上記診断キット。

【請求項18】 更に、請求項15に記載の支持体を含む、請求項17に記載の診断キット。

【請求項19】 核酸を含むサンプル中で、配列番号8のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする核酸分子またはポリヌクレオチドを検出する方法であって、
(A) 少なくとも1種の請求項2に記載の核酸分子またはその断片を、配列番号8のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードするサンプル中の核酸分子とハイブリダイズさせて、ハイブリダイゼーション複合体を形成し；
(B) 該ハイブリダイゼーション複合体を検出し、但しここで、該ハイブリダイゼーション複合体の存在は、サンプル中での配列番号8のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする核酸分子の存在と相互に関連している工程を含む上記方法。

【請求項20】 ハイブリダイゼーション工程を行う前に、サンプル中の核酸を増幅する、請求項19に記載の方法。

【請求項21】 前記少なくとも1種の請求項2に記載の核酸分子またはその断片を不溶性支持体に固定する、請求項19～20のいずれか1項に記載の方法。

【請求項22】 請求項1～2のいずれか1項に記載の核酸分子の、分子もしくは化合物のライブラリーをスクリーニングしてこの核酸分子に特異的に結合する少なくとも1種の分子もしくは化合物を同定するための使用方法であって、

(A) 請求項1～2のいずれか1項に記載の核酸分子を、特異的結合を可能にする条件下で、分子もしくは化合物のライブラリーと混ぜ；

(B) 特異的結合を検出して、該核酸分子と特異的に結合する分子もしくは化合物を同定する工程を含む上記方法。

【請求項23】 哺乳動物のライブラリーから選ばれる、請求項22に記載のライブラリー。

【請求項24】 配列番号8のアミノ酸配列を含むポリペプチドの、分子もしくは化合物のライブラリーをスクリーニングしてこのポリペプチドに特異的に結合する少なくとも1種の分子もしくは化合物を同定するための使用方法であって、

(A) 配列番号8のアミノ酸配列を含むポリペプチドを、特異的結合を可能にする条件下で、分子もしくは化合物のライブラリーと混ぜ；

(B) 特異的結合を検出して、該ポリペプチドと特異的に結合する分子もしくは化合物を同定する工程を含む上記方法。

【請求項25】 前記ライブラリーが、ペプチド、薬剤、免疫グロブリン、結合試薬、Fab発現分子、抗体および試験化合物から選ばれる、請求項24に記載の方法。

【請求項26】 容器に請求項2に記載の核酸分子と請求項11に記載の抗体とを含んでなる、神経障害を検出するための診断キット。

【請求項27】 請求項2に記載の核酸分子またはその断片を含む、神経障害の診断剤。

【請求項28】 不溶性支持体に固定した請求項11に記載の抗体を含む製品。

【請求項29】 請求項11に記載の抗体または請求項28に記載の製品を含む、神経障害の診断剤。

【請求項30】 前記神経障害が、多発性硬化症、ギラン-バレー症候群または慢性炎症性脱髄性多発神経炎である、請求項29に記載の診断剤。

【請求項31】 配列番号2、配列番号4または配列番号6のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む、単離された核酸。

【請求項32】 請求項1に記載の核酸a)～f)のいずれか1つに完全に相補的である、単離された核酸。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、核酸配列およびポリペプチド、ならびに障害、特にイオンチャンネルの機能に関連する障害、例えば多発性硬化症(MS)やギラン-バレー症候群(GBS)などの神経障害の治療におけるそれらの用途に関する。

【0002】また本発明は、上記の核酸配列を含むベクター、このベクターで形質転換した宿主細胞、およびポリペプチドの発現方法に関する。

【0003】

【従来の技術及び発明が解決しようとする課題】従来、多発性硬化症(MS)、ギラン-バレー症候群(GBS)および慢性炎症性脱髄性多発神経炎などの神経障害は、それぞれ中枢神経系および末梢神経系のプロタイプの炎症性「脱髄性」障害と考えられており、事実、両者においてミエリンが破壊されている。これまで、これらの障害における臨床的欠陥は、軸索伝導の遮断や、(わずかな程度ではあるが)脱髄後の軸索伝導の鈍化が原因であるとされている。脱髄を起こした軸索における伝導の回復は、軸索膜の慢性的に露出している部分の内部における髄鞘再生または分子リモデリングのいずれか(正常数よりも多いナトリウムチャンネルの獲得)により起こるものであるが、これは、実験室モデルにおいて十分に報告

されており、臨床的回復の基礎となり得る。しかし、臨床的所見からは、MS、GBSおよび他の「脱髄性」障害の症状の漸増および漸減には、他の要因も関与する可能性があることが示されている。これらの障害において長期にわたる神経機能障害を引き起こす可能性のある軸索変性に関する証拠事実がある。MS患者では、一般に、急速な臨床的変動(軸索伝導に干渉するのに十分な代謝状態や温度の変化を伴わない場合もある)も起こる。GBS患者では、血漿交換の間に、臨床的回復が経時的に起こることがあるが、経時的経過は髄鞘再生では説明できない。これらの急速な神経状態における変化の根拠は、依然として不明なままである(Waxman S.G., 2000年7月, Nature Medicine, 第6巻, 第7号, 738-739)。

【0004】Brinkmeierら(2000年7月, Nature Medicine, 第6巻, 第7号, 808-811)は、NH15-CA2神経芽細胞腫×神経膠腫細胞において、ナトリウムチャンネルを、それらの定常状態不活性化を更に負の電位にシフトすることにより遮断する、特定のペントペプチド(QYNAD)の正体を記載している。Brinkmeierらは、MS患者およびGBS患者の脳脊髄液中でQYNADを10～45μMの濃度で検出した。彼らはまた、炎症性脱髄性疾患の徴候がない健康個体の脳脊髄液中でも低濃度(約3μM)のQYNADを検出した。彼らは、QYNADにより生じる定常状態不活性化とリドカインなどの局所麻酔薬により生じる定常状態不活性化との過分極シフトに類似性があると考えて、QYNADが内因性のリドカインまたはエンドカイン(endocaine)である可能性があると報告した。

【0005】Brinkmeierらは、「エンドカイン」が脱髄性疾患の症状発症に関与する可能性があることを報告しており、このことは、リドカインが、おそらくナトリウムチャンネルの遮断(blockade)により脱髄軸索(ここでは「安全因子」が低減している)において伝導不全を引き起こすことによって、MSのサイレントな病変を顕在化できるという知見により、ある程度支持されている。彼らの示唆が正しいとすれば、MSおよびGBSの実験動物モデルにおいて外因性QYNADを投与することにより、臨床的悪化が起こるはずである。

【0006】Brinkmeierらは、また、QYNADが未知のプロテアーゼにより分解される前駆体タンパク質の一部であること、および入手可能なヒトおよびマウスのタンパク質を探したが、うまく行かなかったことも報告している。

【0007】したがって、この技術分野では更なる研究が必要であり、これらの神経障害に関連する遺伝子およびコードされたポリペプチドが利用できるようなれば、これらの障害の治療のための新規な薬剤や新規な治療法の開発に非常に役立つ。

【0008】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、驚くべきことに、神経障害と相互に関連する遺伝子およびペンタ

ペプチドQYNADを含む前駆体タンパク質を見出した。したがって、本発明は、神経障害の治療に有用な核酸およびアミノ酸配列、薬剤、方法ならびにキットを提供する。

【0009】第1の態様によれば、本発明は、

(a) 配列番号2、配列番号4または配列番号6のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列；

(b) 配列番号8のペプチド配列を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列；

(c) 配列番号1、配列番号3または配列番号5の配列を有するポリヌクレオチド；または

(d) 配列番号7のオリゴヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド配列を含む、単離された核酸分子に関する。

【0010】本発明はまた、e) 配列番号7の配列のセンス核酸分子；f) ペンタペプチドQYNAD (配列番号8) をコードするセンス核酸分子；およびg) 配列番号2、配列番号4または配列番号6の配列のポリペプチドをコードするセンス核酸分子に関する。

【0011】本発明はまた、a) ~ g) の核酸に相補的なアンチセンス核酸、またはa) ~ g) の核酸にハイブリダイズする任意の核酸も包含する。

【0012】本発明はまた、本発明によるセンスまたはアンチセンス核酸によりコードされたポリペプチドの調製方法であって、本発明のセンスまたはアンチセンス核酸分子をベクターに挿入することにより組換えベクターを作製し、該組換えベクターを培養宿主細胞に導入し、該宿主細胞を培養し、コードされたポリペプチドを回収することを含む該方法を提供する。本発明は、そのようなベクターおよびその作製方法、組換え宿主細胞およびその作製方法、ならびにそのような核酸によりコードされたポリペプチドおよびその断片に関する。特に、本発明は、配列番号1、配列番号3および配列番号5の核酸によりコードされたポリペプチド、ならびにペンタペプチドQYNADを含むポリペプチドに関する。

【0013】本発明は、配列番号2、配列番号4または配列番号6のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ配列番号2、配列番号4または配列番号6のアミノ酸配列からなるポリペプチドと同じ機能を有するポリペプチドまたはその断片にも関する。配列番号2、配列番号4または配列番号6のアミノ酸配列からなるポリペプチドと同じ機能としては、ナトリウムチャンネルを、それらの定常状態不活性化を更に負の電位にシフトすることにより遮断する活性、該活性を有する物質の前駆体として機能などを挙げることができる。上記のポリペプチドおよびその断片は、公知の方法、例えば、市販の合成装置を用いて製造することができる。

【0014】本発明は、また、上記の核酸を適切な製薬用希釈剤、賦形剤および/または担体と組み合わせて含

む、医薬組成物に関する。

【0015】さらに、本発明は、上記の核酸分子a) ~ f) のいずれかに1つによりコードされたポリペプチドまたは該ポリペプチドの断片に対して調製した抗体に関する。

【0016】更に、本発明は、神経障害、主にナトリウムチャンネルの機能障害に関連する障害、例えば多発性硬化症(MS)、ギラン-バレー症候群(GBS)または慢性炎症性脱髄性多発神経炎の治療剤であって、in vitroまたはin vivoにてペンタペプチドQYNADの活性を中和できるアンチセンス核酸もしくはその断片、このアンチセンス核酸を適切な製薬用希釈剤、賦形剤および/もしくは担体と組み合わせて含む医薬組成物、またはアミノ酸配列QYNADを含むポリペプチド配列に対して調製した抗体を含む上記治療剤を提供する。

【0017】さらにまた、本発明は、上記の核酸分子またはその断片を不溶性支持体(例えば、膜、フィルター、チップ、紙、スライドガラスなど)に固定した製品に関する。

【0018】本発明はまた、神経障害を検出するための診断キットであって、QYNADを含むポリペプチドをコードするセンス核酸とハイブリダイズできる少なくとも1種のアンチセンス核酸または上記の抗体を含む該診断キットを提供する。

【0019】特に、本発明は、神経障害を検出するためのキットであって、不溶性支持体(好ましくはチップ)と、QYNADを含むポリペプチドもしくはその断片をコードするセンス核酸もしくはポリヌクレオチドとハイブリダイズできる少なくとも1種のアンチセンス核酸とを含む該キットを提供する。

【0020】本発明はまた、核酸を含むサンプル中で、アミノ酸配列QYNADを含むポリペプチドをコードする核酸分子またはポリヌクレオチドを検出する方法であって、

(A) ポリヌクレオチドを、アミノ酸配列QYNADを含むポリペプチドをコードするサンプルの核酸分子とハイブリダイズさせて、ハイブリダイゼーション複合体を形成し；

(B) 該ハイブリダイゼーション複合体を検出し、但しここで、該ハイブリダイゼーション複合体の存在は、サンプル中でのアミノ酸配列QYNADを含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの存在と相互に関連している工程を含む上記方法を包含する。この方法において、ハイブリダイゼーション工程を行う前に、サンプル中の核酸を増幅するとよく、また、サンプルの核酸分子とハイブリダイズさせるポリヌクレオチドは不溶性支持体に固定されているとよい。

【0021】次に、本発明は更に、本発明の核酸分子のいずれかの、分子もしくは化合物のライブラリー(例えば、哺乳動物のライブラリー)をスクリーニングしてこ

の核酸分子に特異的に結合する少なくとも 1 種の分子もしくは化合物を同定するための使用方法であって、

(A) 本発明による核酸分子を、特異的結合を可能にする条件下で、分子もしくは化合物のライブラリーと混ぜ；

(B) 特異的結合を検出して、該核酸と特異的に結合する分子もしくは化合物を同定する工程を含む上記方法を包含する。

【0022】本発明は、配列番号 8 のアミノ酸配列を含むポリペプチドの、分子もしくは化合物のライブラリー (例えば、ペプチド、薬剤、免疫グロブリン、結合試薬、Fab 発現分子、抗体、試験化合物などのライブラリー) をスクリーニングしてこのポリペプチドに特異的に結合する少なくとも 1 種の分子もしくは化合物を同定するための使用方法であって、

(A) 配列番号 8 のアミノ酸配列を含むポリペプチドを、特異的結合を可能にする条件下で、分子もしくは化合物のライブラリーと混ぜ；

(B) 特異的結合を検出して、該ポリペプチドと特異的に結合する分子もしくは化合物を同定する工程を含む上記方法を包含する。

【0023】本発明は、容器に本発明の核酸分子 (例えば、上記の核酸 a) ~ f) のいずれか 1 つにハイブリダイズする核酸分子) と抗体 (すなわち、上記の核酸 a) ~ f) のいずれか 1 つによりコードされたポリペプチドまたは該ポリペプチドの断片に対して調製した抗体) とを含んでなる、神経障害を検出するための診断キットを包含する。

【0024】本発明は、上記の核酸 a) ~ f) のいずれか 1 つにハイブリダイズする核酸分子またはその断片を含む、神経障害 (例えば、多発性硬化症、ギラン-バレー症候群、慢性炎症性脱髄性多発神経炎など) の診断剤を包含する。

【0025】本発明の神経障害診断剤を用いて神経障害を診断する方法は、

a) 被験体の組織サンプルまたは細胞培養物サンプルから核酸を得て；

b) 工程 a) で得た核酸を、不溶性支持体に固定した上記の核酸 a) ~ f) のいずれか 1 つにハイブリダイズする核酸分子またはその断片を含む製品と接触させ；

c) 該製品に固定した核酸と特異的に結合する該組織サンプルまたは細胞培養物からの核酸の量を測定し；

d) 製品に固定した核酸と特異的に結合する該組織サンプルまたは細胞培養物からの核酸の量から神経疾患を診断し、但し、核酸の量が正常値を上回っていれば神経疾患があることを示す工程を含むとよい。

【0026】本発明は、不溶性支持体に固定した本発明の抗体を含む製品を包含する。

【0027】本発明は、本発明の抗体または不溶性支持体に固定した本発明の抗体を含む製品を含む、神経障害

(例えば、多発性硬化症、ギラン-バレー症候群、慢性炎症性脱髄性多発神経炎など) の診断剤を包含する。

【0028】本発明の神経障害診断剤を用いて神経障害を診断する方法は、

a) 被験体から組織または培養細胞のサンプルを得て；

b) 工程 a) で得たサンプルのタンパク質を不溶性支持体に固定した本発明の抗体を含む製品と接触させ；

c) 該製品に固定した抗体と特異的に結合する該組織サンプルまたは細胞培養物からのタンパク質の量を測定し；

d) 該製品に固定した抗体と特異的に結合する該組織サンプルまたは細胞培養物からのタンパク質の量から神経疾患を診断し、但し、タンパク質の量が正常値を上回っていれば神経障害があることを示す工程を含むとよい。

【0029】神経障害が多発性硬化症またはギラン-バレー症候群である場合には、正常な結合タンパク質の量は、例えば、脳脊髄液中で 10 μM の濃度である。

【0030】本発明は、配列番号 2、配列番号 4 または配列番号 6 のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む、単離された核酸を包含する。

【0031】本発明は、上記の核酸 a) ~ f) のいずれか 1 つに完全に相補的である、単離された核酸も包含する。

【0032】

【発明の実施の形態】本発明は、配列 QYNAD (配列番号 8) を含む、または該配列を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド (配列番号 7) を含む核酸分子 (配列番号 1、配列番号 3、配列番号 5) を提供する。本発明による核酸分子は、配列番号 2、配列番号 4 または配列番号 6 の配列のいずれか 1 つを有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む単離された核酸分子である。

【0033】本発明の核酸分子 (配列番号 1、3 および 5) は、「アンキリンリピート (ankyrin repeat)」 (AKN) として同定された少なくとも 1 つの構造を含んでいる。AKN リピートは、タンパク質中に存在するモチーフ配列であり、様々な生物学的活性に関連すると考えられる。ポリペプチド中の AKN リピートは、Sedgwick および Smerdon, 1999, TIBS, 24:311-316 に記載されているような特定の構造であると考えられている。本発明による核酸によりコードされたポリペプチドの AKN リピートの 1 つは、ペンタペプチド QYNAD (配列番号 8) を含んでいる。

【0034】したがって、本発明はまた、ペンタペプチド配列 QYNAD (配列番号 8) をコードする核酸分子 (配列番号 7) を包含する。

【0035】したがって、本発明による単離された核酸分子は、

(a) 配列番号 2、配列番号 4 または配列番号 6 の配列

を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列；

(b) 配列番号8のペプチド配列を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列；

(c) 配列番号1、配列番号3または配列番号5の配列を有するポリヌクレオチド；

(d) 配列番号7の配列を含むポリヌクレオチド配列；

(e) 配列番号7の配列を有する核酸分子；

(f) 配列番号8のペプタペプチドをコードする核酸分子；または

(g) 配列番号2、配列番号4または配列番号6の配列のポリペプチドをコードする核酸分子を含むものとして規定できる。

【0036】本発明はまた、a)～g)の核酸のいずれか1つに相補的なポリヌクレオチド配列を含むアンチセンス核酸分子を包含する。好ましくは、このアンチセンス核酸分子は、a)～g)の核酸のいずれか1つに完全に相補的である。本明細書中で用いられる「相補的」または「相補性」なる用語は、許容される塩および温度の条件下での塩基対合による核酸同士またはポリヌクレオチド同士の自然の結合を意味する。例えば、配列「A-G-T」は、相補的な配列「T-C-A」に結合する。2本の一本鎖分子間の相補性は、核酸のうちの何個かだけが結合するような「部分的」なものであってもよいし、それら一本鎖分子の間に全面的な相補性が存在するような「完全」なものであってもよい。核酸鎖間の相補性の程度は、該核酸鎖間のハイブリダイゼーションの効率および強度に有意に影響を及ぼす。

【0037】本発明また、a)～g)の核酸のいずれか1つにハイブリダイズするポリヌクレオチド配列を含むアンチセンス核酸分子を包含する。

【0038】本明細書中で用いられる「ハイブリダイゼーション」なる用語は、核酸の鎖が相補的な鎖と塩基対合により結合する任意のプロセスを意味する。

【0039】特に、ハイブリダイゼーションは、好ましくは、「ストリンジェントな条件」下で行われる。本明細書中で用いられる「ストリンジェントな条件」なる用語は、アンチセンス核酸配列とセンス核酸a)～g)の中のいずれか1つとのハイブリダイゼーションを可能にする条件を意味する。適当にストリンジェントな条件は、例えば、プレハイブリダイゼーション溶液中およびハイブリダイゼーション溶液中の塩もしくはホルムアミドの濃度、またはハイブリダイゼーション温度により規定することができ、当技術分野で周知である。特に、ストリンジェントな条件は、塩の濃度を低下させること、ホルムアミドの濃度を増大させること、またはハイブリダイゼーション温度を上げることにより増大させることができる。

【0040】例えば、高ストリンジェントな条件下でのハイブリダイゼーションは、約50%のホルムアミド中

約37～42にて起こり得る。ハイブリダイゼーションは、約35%～25%のホルムアミド中で約30～35という低いストリンジェントな条件下で起こり得る。特に、ハイブリダイゼーションは、42にて50%のホルムアミド、5×SSPE、0.3%のSDSならびに200g/mlの剪断および変性サケ精子DNA中という高ストリンジェントな条件下で起こり得る。ハイブリダイゼーションは、上記のような低いストリンジェントな条件下で起こってもよいが、35%ホルムアミド中で35の低温にて起こってもよい。特定のストリンジェントなレベルに対応する温度範囲は、目的とする核酸のプリン対ピリミジン比を算定し、それに従って温度を調整することにより、更に狭めることができる。上記の範囲および条件のバリエーションは、当技術分野では周知である。

【0041】したがって、本発明はまた、少なくとも配列番号8のペプチドをコードする核酸分子もしくはポリヌクレオチドと相補的な、または該核酸分子もしくはポリヌクレオチドに(好ましくはストリンジェントな条件下で)ハイブリダイズするアンチセンス核酸分子に関する。

【0042】本発明による核酸分子、オリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドは、センスおよびアンチセンスの両者とも、DNAであっても、RNAであっても、ペプチド核酸(PNA)であってもよい。また、この定義に含まれるものは、任意の核酸分子、オリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチド誘導体であり、例えば、米国特許商標庁のユーザーマニュアル、パテントイン(Patentin)バージョン2.1の表13-3またはWIPO規格ST.25(1998)、追補2、表2に掲載されている修飾塩基を有するものが挙げられる。

【0043】本発明による核酸分子またはポリヌクレオチドは、ポリペプチドの調製に使用できる。したがって、本発明はまた、核酸分子a)～g)のいずれか1つによりコードされたポリペプチド、またはセンス核酸a)～g)のいずれか1つと相補的な、もしくはそれとハイブリダイズするアンチセンス核酸によりコードされたポリペプチドの調製方法であって、この核酸分子もしくはポリヌクレオチドをベクターに挿入することにより組換えベクターを作製し、該組換えベクターを培養宿主細胞に導入し、該ポリペプチドの発現に適する条件下で該宿主細胞を培養し、コードされたポリペプチドを回収することを含む該方法を包含する。

【0044】このポリペプチドの発現方法は、当技術分野で公知であるいずれの方法により行ってもよい。これらの方法としては、in vitro組換えDNA法、合成法、およびin vivo遺伝子組換えが挙げられる。そのような技法は、Sambrook, J.ら(1989;Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Plainville, N.Y.)ならびにCurrent Protocols in Molecular Biology, 第2巻, 第16章全体, 「Protein Expression」,

1997年編, John Wiley & Sons, Inc, New York, N.Y.に記載されている。

【0045】本発明はまた、このポリペプチドの発現方法に適するベクターおよび宿主に関する。本発明によるポリペプチドをコードする配列を担持し発現するために、種々の発現ベクター/宿主系が利用可能である。これらとしては、限定されるものではないが、組換えバクテリオファージ、プラスミドまたはコスミドDNA発現ベクターで形質転換した細菌などの微生物；酵母発現ベクターで形質転換した酵母；ウイルス発現ベクター（例えばバキュロウイルス）に感染させた昆虫細胞系；ウイルス発現ベクター〔例えばカリフラワーモザイクウイルス（CaMV）もしくはタバコモザイクウイルス（TMV）〕または細菌発現ベクター（例えばTiもしくはpBR322プラスミド）で形質転換した植物細胞系；または動物細胞系が挙げられる。本発明は、用いる宿主細胞により限定されない。

【0046】適切なベクターは、例えば、Current Protocols（前掲）の第16.3.2章に記載されている。

【0047】細菌系では、本発明によるポリペプチドの目的とする用途に応じて、多くの発現ベクターを選択できる。例えば、抗体を誘導するために大量のポリペプチドが必要である場合には、容易に精製される融合タンパク質の高い発現レベルを誘導するベクターを使用するとよい。そのようなベクターとしては、限定されるものではないが、多機能性大腸菌クローニングおよび発現ベクター、例えばBLUESCRIPT（Stratagene）（本発明のポリペプチドをコードする配列が、このベクターに、アミノ末端Metの配列およびそれに続く7残基からなるβ-ガラクトシダーゼの配列と同じ読み枠で連結されて、ハイブリッドタンパク質が生成されるようにできるもの）や、pINベクター（Van Heeke, G.およびS.M. Schuster（1989）J. Biol. Chem. 264:5503-5509）などが挙げられる。外来ポリペプチドをグルタチオンS-トランスフェラーゼ（GST）との融合タンパク質として発現させるために、pGEXベクター（Promega, Madison, Wis.）を使用してもよい。

【0048】酵母サッカロミセス・セレビシエ（*Saccharomyces cerevisiae*）では、α因子、アルコールオキシダーゼおよびPGHなどの構成的もしくは誘導的プロモーターを含む多くのベクターが使用できる。概説として、Ausubel（前掲）およびGrantら（1987; Methods Enzymol. 153:516-544）を参照されたい。

【0049】上記の宿主細胞は、上記ポリペプチド発現方法に適するいずれの細菌性もしくは原核性の宿主細胞であってもよく、例えば、Current Protocols（前掲）の第16.9～16.20章に記載されているものが挙げられる。特に好適なものは、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞ならびに繊維芽細胞などのヒト細胞である。

【0050】加えて、宿主細胞株は、挿入した配列の発現をモジュレートする、または発現されたポリペプチドが目的の修飾を持つように処理するその能力について選択してもよい。そのようなポリペプチドの修飾としては、限定されるものではないが、アセチル化、カルボキシル化、グリコシル化、リン酸化、脂質化およびアシル化が挙げられる。また、タンパク質の「プレプロ」体を切断する翻訳後プロセッシングも、正確な挿入、ホーディングおよび/または機能を促進するのに使用できる。特定の細胞機構および翻訳後活性についての特徴的な機構を持つ別の宿主細胞（例えばCHO、HeLa、MDCK、HEK293およびWI38）は、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション（ATCC, Bethesda, Md.）から入手可能であり、外来タンパク質の正確な修飾およびプロセッシングを確実にするのに選択できる。

【0051】上記の技術分野の現状のセクションで述べたように、Waxman S.G., 2000年7月, Nature Medicine, 第6巻, 第7号, 738-739およびBrinkmeierら, 2000年7月, Nature Medicine, 第6巻, 第7号, 808-811により報告されているように、ペンタペプチドQYNADはナトリウムチャンネルの活性に関与しており、したがって幾つかの神経障害、例えば多発性硬化症（MS）、ギラン・バレー症候群（GBS）および慢性炎症性脱髄性多発神経炎と関連している。

【0052】本発明はまた、上記のようなa)～g)の核酸またはポリヌクレオチドのいずれか1つに相補的な、好ましくは完全に相補的なアンチセンス核酸分子を包含する。本発明はまた、上記のようなa)～g)の核酸またはポリヌクレオチドのいずれか1つとハイブリダイズする、好ましくはストリンジントな条件下でハイブリダイズする核酸を包含する。かかる相補的またはハイブリダイズ可能な核酸は、特に神経障害の治療、例えば上記で記載した障害の治療に有用である。

【0053】したがって、本発明は、a)～g)のセンス核酸の核酸によりコードされたポリペプチドまたはその断片を包含する。このポリペプチドまたはその断片は、神経障害の治療法において有用である。

【0054】本発明はまた、a)～g)のセンス核酸のいずれか1つに相補的である、もしくはそれにハイブリダイズするアンチセンス核酸またはその断片を、適切な製薬用希釈剤、賦形剤および/もしくは担体と組み合わせて含む医薬組成物を包含する。

【0055】本発明はまた、a)～g)の核酸もしくはポリヌクレオチドのいずれか1つによりコードされたポリペプチドに対して調製した抗体、またはその断片を包含する。

【0056】この抗体は、神経障害の治療法において有用であり、例えば診断キットの作製や、QYNADを特異的に結合するメンバーを同定するための薬剤のライブラリーのスクリーニングに有用である。また、QYNADを含む

ポリペプチドまたはペンタペプチドQYNADに対する抗体も、当技術分野で周知の方法を用いて作製できる。そのような抗体としては、限定されるものではないが、ポリクローナル、モノクローナル、キメラおよび一本鎖抗体、Fab断片、ならびにFab発現ライブラリーにより生じる断片が挙げられる。

【0057】抗体を作製するためには、ヤギ、ウサギ、ラット、マウス、ヒトなどの種々の宿主を、QYNADを含むポリペプチドまたはペンタペプチドQYNADの注射により免疫すればよい。

【0058】QYNADを含むポリペプチドまたはペンタペプチドQYNADに対するモノクローナル抗体は、培養下の連続細胞系により抗体分子の生成をもたらすいずれの技法を用いて調製してもよい。これらの技法としては、限定されるものではないが、ハイブリドーマ法、ヒトB細胞ハイブリドーマ法、およびEBV-ハイブリドーマ法 [Kohler, G.ら, (1975), *Nature* 256:495-497; Kozbor, D.ら, (1985), *J. Immunol. Methods* 81:31-42; Cote, R. J.ら, (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80:2026-2030; およびCole, S.P.ら, 1984, *Mol. Cell Biol.*, 62:109-120] が挙げられる。

【0059】加えて、「キメラ抗体」の作製用に開発された技法、例えばマウス抗体遺伝子をヒト抗体遺伝子へとスプライシングして適当な抗原特異性および生物学的活性を持つ分子を得る方法が使用できる (Morrison, S. L.ら, 1984, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 81:6851-6855; Neuberger, M.S.ら, 1984, *Nature*, 312:604-608; およびTakeda, S.ら, 1985, *Nature*, 314:452-454)。あるいはまた、当技術分野で公知の方法を用い、一本鎖抗体の作製のために記載されている技法を適用して、QYNAD 30 特異的一本鎖抗体を作製してもよい。関連する特異性を持つがイディオタイプ組成が異なる抗体は、無作為なコンビナトリアル免疫グロブリンライブラリーからチェーンシャッフリングにより作製できる (Burton D.R., 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 88:11120-11123)。

【0060】また、抗体は、文献 (Orlandi, R.ら, 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86:3833-3837およびWinter, G.ら, 1991, *Nature*, 349:293-299) に開示されているように、リンパ球集団において *in vivo* 生成を誘導することにより、または免疫グロブリンライブラリーもしくは高度に特異的な結合試薬のパネルをスクリーニングすることにより、作製することもできる。

【0061】QYNADに対する特異的結合部位を含む抗体断片を作製してもよい。例えば、そのような断片としては、限定されるものではないが、抗体分子のペプシン消化により作製されるF(ab')₂断片、およびF(ab)₂断片のジスルフィド結合を還元することにより作製されるFab断片が挙げられる。あるいはまた、Fab発現ライブラリーを構築して、目的の特異性を持つモノクローナルFab断片を迅速かつ容易に同定できるようにしてもよい [Hu 50

se, W.D.ら, (1989) *Science* 254:1275-1281]。

【0062】目的の特異性を持つ抗体を同定するためのスクリーニングには、種々のイムノアッセイを用いることができる。確立した特異性を持つポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体のいずれかを用いる競合的結合アッセイまたは免疫放射定量アッセイのための多くのプロトコルが当技術分野で周知である。そのような免疫アッセイは、典型的には、QYNADを含むポリペプチドもしくはペンタペプチドQYNADとその特異的抗体との複合体形成の測定を含む。2つの非干渉性QYNADエピトープに反応性であるモノクローナル抗体を利用する2部位 (two-site) でのモノクローナルベースの免疫アッセイが好ましいが、競合的結合アッセイを用いてもよい (Maddoxら, 1983, *J. Exp. Med.*, 158:1211-1216)。

【0063】本発明の別の実施形態では、センス核酸 (a) ~ (g) のいずれか1つ (QYNADを含むポリペプチドもしくはペンタペプチドQYNADをコードするもの) に相補的である、またはそれにハイブリダイズする核酸もしくはポリヌクレオチドが、治療の目的で使用できる。例えば、mRNAの転写を遮断することが望まれる場合が挙げられる。特に、細胞は、QYNADをコードする核酸に相補的であるか、またはそれにハイブリダイズする配列により形質転換できる。したがって、これらの相補的な、またはハイブリダイズする分子は、QYNAD活性をモジュレートしたり遺伝子機能の調節を行うのに使用できる。そのような技法は現在では当技術分野で周知であり、アンチセンスオリゴヌクレオチドまたは大きめの断片は、QYNADをコードする配列のコード領域もしくは調節領域に沿って様々な位置から設計できる。

【0064】したがって、本発明は、神経障害の治療剤であって、被験体に、治療上有効な用量のアンチセンス核酸、オリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチドもしくはそれらの断片が、このアンチセンス核酸、オリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチドもしくはそれらの断片を適切な製薬用希釈剤、賦形剤および/もしくは担体と組み合わせて含む医薬組成物が、または上記で開示したような抗体を含む該治療剤に関する。特に、この治療剤において、上記障害はナトリウムチャンネルの活性に関連する障害である。好ましくは、上記障害は、多発性硬化症 (MS)、ギラン-バレー症候群 (GBS) または慢性炎症性脱髄性多発神経炎である。

【0065】治療効果および毒性は、細胞培養物における標準的な薬学的手順により、または実験動物を用いて求めることができ、例えば、ED50 (集団の50%において治療上有効である用量) またはLD50 (集団の50%に対して致死性である用量) の統計値を算定することが挙げられる。治療的作用と毒性作用との用量比は治療指数であり、それはED50 / LD50比として表わすことができる。

【0066】本発明は更に、上記で規定したような神経障害を検出するための診断キットであって、本発明によ

るアンチセンス核酸もしくはポリヌクレオチドまたはこれらの断片、ならびに／または上記のような抗体を含む該診断キットを提供する。

【0067】好ましくは、本発明によるキットは、固定および／または整列させてある本発明による少なくとも1種のアンチセンス核酸分子を含む不溶性支持体を含む。この不溶性支持体は、例えば、膜、フィルター、チップ、紙、スライドガラスとすることができる。

【0068】本発明によるアンチセンス核酸分子は、標準的な技法に従って不溶性支持体（好ましくはチップ支持体）に固定でき、例えば、米国特許第5,837,832号に記載のようにしてチップ上で合成されるか、欧州特許第1041160号に記載のようにして調製した後でチップ上に固定される。本発明によるアンチセンス核酸は、チップ支持体に直接固定してもよいし、スパーサーまたはリンカー配列により固定してもよい。

【0069】本発明はまた、本発明による任意のセンスおよび／またはアンチセンス核酸を含む不溶性支持体を含む。本発明による不溶性支持体は、いずれの適切な形状であってもよく、例えばビーズ、シリンジ、毛細管、チューブ、プレートが挙げられる。この不溶性支持体は、好ましくはチップである（米国特許第5,525,464号）。

【0070】したがって、本発明はまた、上記で開示したような不溶性支持体の使用を含んでなる、上記で規定するような神経障害の検出方法に関する。

【0071】更に、本発明は、核酸を含むサンプル中で、QYNAD（配列番号8）のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする核酸またはポリヌクレオチドを検出する方法であって、

（A）アンチセンス核酸またはポリヌクレオチドを、配列番号8のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードするサンプルのセンス核酸にハイブリダイズさせて、ハイブリダイゼーション複合体を形成し；

（B）該ハイブリダイゼーション複合体を検出し、但しここで、該ハイブリダイゼーション複合体の存在は、サンプル中での配列番号8のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの存在と相互に関連している工程を含む上記方法を包含する。

【0072】好ましくは、上記の方法において、サンプルの核酸は、ハイブリダイゼーション工程の前に増幅する。

【0073】増幅は、当技術分野で公知の増幅方法のいずれか1つに従って行うことができ、好ましくは、増幅は、当技術分野で周知のポリメラーゼ連鎖反応（PCR）技術を用いて行われる。[例えば、Dieffenbach, C.W. およびG.S.Dveksler (1995) PCR Primer, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Plainview, N.Y. を参照されたい。] 本発明はまた、本発明による任意のセンスまたはアンチセンス核酸またはポリヌクレオチド

の、分子もしくは化合物のライブラリーをスクリーニングしてこの核酸に特異的に結合する少なくとも1種の分子もしくは化合物を同定するための使用方法であって、

（A）本発明による任意のセンスまたはアンチセンス核酸またはポリヌクレオチドを、特異的結合を可能にする条件下で、分子もしくは化合物のライブラリーと混ぜ；
（B）特異的結合を検出して、該核酸と特異的に結合する分子もしくは化合物を同定する工程を含む上記方法を包含する。

【0074】特に、上記のライブラリーは、哺乳類生物から選ばれるライブラリーである。

【0075】更に、本発明は、配列番号8のアミノ酸配列を含むポリペプチドまたは配列番号8のペントペプチドの、分子もしくは化合物のライブラリーをスクリーニングして、このポリペプチドに特異的に結合する少なくとも1種の分子もしくは化合物を同定するための使用方法であって、

（A）配列番号8のアミノ酸配列を含むポリペプチドまたは配列番号8のペントペプチドを、特異的結合を可能にする条件下で、分子もしくは化合物のライブラリーと混ぜ；

（B）特異的結合を検出して、該ポリペプチドと特異的に結合する分子もしくは化合物を同定する工程を含む上記方法を包含する。

【0076】特に、このライブラリーは、ペプチド、薬剤、免疫グロブリン、結合試薬、Fab発現分子、抗体および小さな有機化合物から選ばれる。

【0077】本発明を、以下の実施例を参照しながら、更に詳細に説明する。

【0078】

【実施例】実施例1

RNAの調製

ハツカネズミの精巣組織のスライス（0.5～1g）を10mlのD溶液（Chomczynski, P.およびSacchi, N., 1987, *Annal. Biochem.*, 162:156-159）中でホモジナイズし、1mlの2M酢酸ナトリウム（pH 4.0）および同量のフェノール/クロロホルムの混合物（容量比5：1）で抽出した。抽出後、同容量のイソプロパノールを水層に添加してRNAを沈殿させた。このサンプルを氷上で1時間インキュベートし、冷却しながら4000rpmで15分間遠心分離して、沈殿物を回収した。この沈殿物を70%エタノールで洗浄し、8mlの水に溶解した。2mlの5M NaClと、1%CTAB（臭化セチルトリメチルアンモニウム）、4M尿素および50mM Trisを含有する水溶液（pH 7.0）16mlとを添加することにより、RNAを沈殿させ、多糖（溶解性で沈殿しない）を除去した（CTAB沈殿物）。4000rpmで室温にて15分間にわたり遠心分離した後、RNAを4mlの7Mグアニジン-Cl中に溶解した。次に、この溶液に2倍量のエタノールを添加し、氷上で1時間インキュベートし、4000rpmで15分間にわたり遠心分離した。得られ

た沈殿物を70%エタノールで洗浄して回収した。この沈殿物を、再度水に溶解し、OD比260/280(>1.8)および230/260(<0.45)を測定することによりRNAの純度を求めた。

cDNAの合成

このRNA 5~10 µg、BamHIおよびSstI制限部位を含む第1鎖プライマー[5'-(GA)₅-AGGATCCAAGAGCTC(T)₁₆-VN-3'] (配列番号9、「V」はG、CまたはA) 5 µg、ならびに80%グリセロール11.2 µlを混ぜて全容量を24 µlとした。このRNA-プライマー混合物を65 °Cで10分間変性させた。これと平行して、18.2 µlの5 × 第1鎖合成緩衝液、9.1 µlの0.1M DTT、6.0 µlの10mMの(各) dTTP、dTTP、dATPおよび5-メチル-dCTP (dCTPの代わり)、29.6 µlの飽和トレハロース(約80%、低い金属含有量; Fluka Biochemika)、ならびに10.0 µlのSuperscript II逆転写酵素(200U/µl)を混ぜて、最終容量を76 µlとした。第3の試験管に1.0 µlの[α-³²P]dGTPを入れた。mRNA、グリセロールおよびプライマーを氷上で、Superscriptを含む溶液と混合し、アリコート(20%)を[α-³²P]dGTPを含む試験管に速やかに添加した。第1鎖cDNAの合成は、覆い(lid)を加熱したサーマルサイクラー(例えばMJ Research)内で、次のプログラムに従って行った: ステップ1、45 °Cで2分; ステップ2、勾配アニーリング: 1分かけて35 °Cまで冷却; ステップ3、完全なアニーリング: 35 °Cで2分; ステップ4、50 °Cで5分; ステップ5、0.1 °C/秒で60 °Cまで昇温; ステップ6、55 °Cで2分; ステップ7、60 °Cで2分; ステップ8、ステップ6に戻り、更に10サイクル。放射能の取込みから、cDNAの収量を見積もった(CarninciおよびHayashizaki, 1999, Methods in Enzymology, 第303巻:19-44)。cDNAをプロティナーゼKで処理し、フェノール/クロロホルムおよびクロロホルムで抽出し、塩として酢酸アンモニウムを用いてエタノール沈殿させた(CarninciおよびHayashizaki, 1999)。

mRNAのビオチン化

ビオチン化する前に、再懸濁したmRNA/第1鎖cDNAハイブリッド、66mMの酢酸ナトリウム(pH 4.5)および5 mMのNaIO₄を含む最終容量50 µl中で、mRNAのキャップならびに3'末端のジオール基を酸化した。サンプルを暗所にて氷上で45分間インキュベートした。次に、0.5 µlの10%SDS、11 µlの5 M NaClおよび61 µlのイソプロパノールを添加することにより、mRNA/cDNAハイブリッドを沈殿させた。暗所にて氷上で45分間、または-20~-80 °Cにて30分間インキュベートした後、サンプルを15,000rpmで10分間遠心分離した。最後に、mRNA/cDNAハイブリッドを70%エタノールで2回濯ぎ、50 µlの水に再懸濁した。続いて、5 µlの1 M酢酸ナトリウム(pH 6.1)、5 µlの10%SDSおよび150 µlの10mMビオチンヒド

0 µl)。

【0079】室温(22~26 °C)で一夜(10~16時間)インキュベートした後、75 µlの1 M酢酸ナトリウム(pH 6.1)、5 µlの5 M NaClおよび750 µlの無水エタノールを添加することによりmRNA/cDNAハイブリッドを沈殿させ、氷上で1時間または-20~-80 °Cで30分間インキュベートした。15,000rpmで10分間遠心分離することによりmRNA/cDNAハイブリッドをペレット化し、次に、このペレットを70%エタノールで1回、80%エタノールで1回洗浄した。mRNA/cDNAハイブリッドを70 µlの0.1 × TE [1 mM Tris (pH 7.5)、0.1 mM EDTA]に再懸濁した。

全長cDNAの捕捉および分離

50 µlのMPG-ストレプトアビジンビーズおよび100 µgのDNA不含tRNAを混ぜ、この混合物を時々混合しながら氷上で30分間インキュベートした。ビーズは3分間マグネチックスタンドを用いて分離し、上清を除去した。次に、ビーズを500 µlの洗浄/結合溶液(2 M NaCl、50 mM EDTA、pH 8.0)で3回洗浄した。

【0080】同時に、製造元により提供された緩衝液に加えたmRNA/cDNAハイブリッドサンプルに、最初のmRNAのµg当たり1ユニットのRNase I (Promega)を添加し(最終容量は200 µl)、このサンプルを37 °Cで15分間インキュベートした。反応を停止させるために、サンプルを氷上に置き、100 µgのtRNAおよび100 µgの5 M NaClを添加した。全コード/全長mRNA/cDNAハイブリッドを捕捉するために、ビオチン化しRNase I処理したmRNA/cDNAと、洗浄したビーズとを混ぜ、それらを400 µlの洗浄/結合溶液に再懸濁した。混合した後、試験管を室温で30分間にわたり穏やかに回した。ビーズ上には全コード/全長cDNAが残り、短くなったcDNAは残らなかった。マグネチックスターラーでビーズを上清から分離した。このビーズを穏やかに洗浄して、非特異的に吸着したcDNAを除去した(洗浄/結合溶液で2回、0.4% SDS、50 µg/ml tRNAで1回、10 mM Tris-HCl (pH 7.5)、0.2 mM EDTA、40 µg/ml tRNA、10 mM NaClおよび20%グリセロールで1回、そしてtRNAの50 µg/ml水溶液で1回洗浄)。

【0081】50 µlの50 mM NaOH、5 mM EDTAを添加し、時々混合しながら室温で10分間インキュベートすることにより、cDNAをビーズから切り離した。次に、このビーズを磁氣的に除去し、溶出したcDNAを氷上で、50 µlの1 M Tris-HCl (pH 7.5)を含む試験管に移した。溶出サイクルは、50 mM NaOH、5 mM EDTAの50 µlアリコートで、ビーズからcDNAの大部分(小型モニターで放射能をモニターすることにより測定した場合に、80~90%)を回収するまで1回または2回繰り返した。

【0082】後でビオチン化RNAドライバに干渉する可能性のある微量のRNAを除去するために、回収したcDNAに、氷上で、素早く100 µlの1 M Tris-HCl (pH 7.0)および1 µlのRNase I (10U/µl)を添加した。次に、そのサンプルを37 °Cで10分間インキュベートした。cDNA

をプロティナーゼKで処理し、フェノール/クロロホルムで抽出し、逆抽出した。次に、2～3 μgのグリコーゲンを添加し、サンプルをシリコン処理試験管内でエタノール沈殿させた。あるいはまた、サンプルは、Microcon 100 (Millipore) による2000rpmで40～60分間の限外濾過1ラウンドを用いて濃縮してもよい。エタノール沈殿させたら、cDNAは、20 μlの0.1×TE中に再溶解させることができる。この実験では、RNase H消化は行わなかった。第2鎖の変性および加水分解は、NaOHによる加水分解により行った。

cDNAのCL-4Bスピン-カラム分画

上記のcDNAサンプルを、CL-4Bクロマトグラフィー (CarninciおよびHayashizaki, 1999, Methods Enzymol, 303, 1-44) およびS-400スピンカラム (Amersham-Pharmacia) により、基本的には製造元により説明されているようにして処理した。

第1鎖cDNAのオリゴ-dGテイリング

上記のcDNAサンプル、5 μlの10×TdT緩衝液 [2 Mカコジル酸カリウム(pH 7.2)、10mM MgCl₂、10mM 2-メルカプトエタノール]、5 μlの50 μM dGTP、5 μlの10mM C oCl₂ および40Uのターミナルデオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼを混ぜて、最終容量を50 μlとした。サンプルを37 °Cで30分間インキュベートした。最後に、20mMのEDTAで反応を停止させ、cDNAをプロティナーゼKで処理し、フェノール/クロロホルムで抽出し、エタノール沈殿させた。最後に、サンプルをTE [10mM Tris(pH 7.5～8.0)、EDTA 1 mM] に再溶解させた。記載されているようにして (CarninciおよびHayashizaki, 1999) テイル部の長さを調べ、その後、このcDNAを、ライブラリーのチェックに用いるための第2鎖の合成 (後記を参 照) に用いるか、または標準化/サブトラクションに処 した。

標準化ドライバー

最初のmRNAのアリコートを含むmRNAドライバーは「標準化 (normalizingまたはnormalization) ドライバー」と呼んだ。標準化ドライバーの濃度を算定するために、第1鎖合成の取込み率が実際のmRNA濃度を反映すると仮定して、つまり、プライミングおよび伸長の効率が100%であると仮定して、最初のmRNAにおけるリボゾームRNA / 構造RNA (例えば、翻訳またはスプライシングに関与するRNA) の混入を見積もった。第1鎖cDNAに変換されるmRNAの割合が有効な (真の) mRNA濃度に該当すると仮定して、全長より短いcDNAは考慮に入れなかった (通常は全てのmRNAがプライムされる訳ではない)。標準化ドライバーがわずかに過剰であっても、それはドライバーが不足している場合ほど著しく標準化プロセスに干渉しないと思われた。したがって、サンプル中のmRNAの量は生成した第1鎖cDNAの量と同じであると考えた。

サブトラクションドライバー

サブトラクションドライバーは、非重複cDNAからのクロ

ーン化ミニライブラリーおよび再整列したライブラリーからT7およびT3 RNAポリメラーゼを用いて調製した全ランオフ (run-off) 転写産物を含むものであった。

【0083】このサンプル中のミニライブラリーは、本実施例でここに記載する実験と同様にして行った先の標準化実験から誘導した約1000～2000クローンのcDNAを含んでいる。標準的プロトコルを用いることにより、標準化実験の副生成物であるアリコート (cDNAが豊富な画分) からミニライブラリーを調製した。標準化の後、ビーズから50mM NaOH / 5 mM EDTAを用いて、cDNAが豊富な画分を取り出した。中和した後、第2鎖cDNAを調製した。クローニングは、先に記載されている (CarninciおよびHayashizaki, 1999) のと同様にして行った。次に、プラスミドをバルク切除し (bulk-excised)、アガロース / アンピシリン上で、ミニライブラリー当たり1000～2000個のクローンを増幅させた。ドライバーを調製するために、SOB-アガロース / アンピシリン上で20,000～50,000個のコロニーをプレーティングし (プレートの大きさ: 直径150mm) (Sambrookら, 1989, 「Molecular cloning: A Laboratory Manual」 Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY)、そのプレートを37 °Cで一晩インキュベートした。そのプレートから、再懸濁溶液 (Wizard DNA抽出キット; Promega) の存在下で細菌細胞を擦り取り、製造元のプロトコルに従った。

非重複cDNAライブラリードライバーの調製

先に述べたと同様の実験で得られた全長cDNAからの単一クローンを、サブトラクションのために再整列させた。384ウェルプレートから、再整列させたcDNAをSOB-アガロース / アンピシリンプレートにプレーティングした。プラスミドの抽出、DNAの切断、およびRNAの調製を、ミニライブラリーの場合と同様にして行った。

【0084】ライブラリーをSstI部位でクローニングした場合、抽出したプラスミドは、SstIを用いて多重クローニング部位の3'末端にて消化した (しかし、肝臓および肺から抽出したmRNAの場合は、ミニライブラリーはXhoIを用いて3'末端部位にてクローニングし、PvuIを用いて消化した)。RNAは、該ドライバーの調製に用いた構築物のマップに応じて、T3 RNAポリメラーゼもしくはT7 RNAポリメラーゼ (Life Technologies) のいずれかを用いて合成して、センス・ランオフRNAを調製した。PvuIで切断したミニライブラリーについてはT3ポリメラーゼを用い、SstIで切断したミニライブラリーについてはT7ポリメラーゼを用いた。RNAは、RNAポリメラーゼ (Life Technologies) を用い、製造元の説明書に従って調製した。1～2 μlのDNase I (RQ1, RNase不含、Promega) による完全な消化を30分間行った。次に、プロティナーゼKによる消化を行い、続いてフェノール / クロロホルムおよびクロロホルムによる抽出を行い、cDNAを沈殿させた。

標準化/サブトラクションRNAドライバーのビオチン標識

標識する前に、Rneasy（登録商標）（QIAGEN）を用い、製造元の説明書に従って、RNAドライバーを更に精製した。続いて、Mirus（登録商標）核酸ビオチン化キット（Panvera）を、基本的には製造元により説明されているように用いた。RNAミックス10 μ gは、それらを10 μ lのLabel IT試薬および10 μ lの標識用緩衝液Aと混ぜて最終容量100 μ lとし、常に該キットのプロトコール説明書に従って標識した。この反応物を37 で1時間インキュベートし、その後、1/20倍容量の5 M NaClおよび2倍容量の99%エタノールを添加することにより、ビオチン化RNAを沈殿させた。標準的なエタノール沈殿を行った後、ペレットを80%エタノールで1回洗浄し、20 μ lの1 $\times$ Mirus標識用緩衝液Aに再懸濁し、使用するまで-80 で保存した。[あるいはまた、mRNAは、ソラレンビオチン化キット（Ambion）を用いて、製造元の説明書に従って標識してもよい。]

標準化/サブトラクション

上記のRNAドライバーおよびcDNAを、プロティナーゼKを用いて脱タンパク質化し、続いてフェノール/クロロホルム抽出、クロロホルム抽出、およびエタノール沈殿を行った。基質としてオリゴ-dGテイル付加cDNAを用い、これをRNAドライバーおよびブロッキング用オリゴヌクレオチド（ビオチン-dG₅~-dG₃₀、ここではビオチン-dG₁₆を用いた）と混合して、サブトラクションドライバー内に存在するC-ストレッチとハイブリダイズさせ、オリゴdTプライマーを用いてポリA配列をブロックした。しかし、ドライバーとcDNAとに共通する配列をブロックできるオリゴヌクレオチドであればいずれのものも使用できる。

【0085】ハイブリダイゼーションは、80%ホルムアミド（脱イオン化ストックからのもの）、250mM NaCl、25mM HEPES（pH 7.5）および5 mM EDTAを含有する緩衝液中で、1~500のRoT値（RoTは、例えば、Sagerstromら、1997、Ann. Rev. Biochem., 66:751-783において定義されている）にて行った。ハイブリダイゼーションは、乾燥オープン内で42 で行った。5 μ lという少量の場合には鉱油の積層は必要なかった。ハイブリダイゼーションの後、2.5倍容量の無水エタノールを添加することにより、サンプルを沈殿させ、それを氷上で30分間インキュベートした。このサンプルを15,000rpmで10分間遠心分離し、70%エタノールで1回洗浄した。cDNA（一本鎖cDNAおよびmRNA/一本鎖cDNAハイブリッドの両者）を、氷上で10 μ lの水に慎重に再懸濁した。

RNase Iによる処理

場合によっては、上記の工程で得たテスター/ドライバーハイブリッドは、RNase Iで処理して、該テスターcDNAに非特異的に結合しているmRNA標準化およびサブトラクションドライバーを除去してもよい。

【0086】サンプルから上清を取り除き、上記で記載したようにしてハイブリダイゼーションした後で沈殿させた後、ペレットを、氷上で（非特異的な再アニリングを最低限に抑えるため）、45 μ lの再蒸留水（di-distilled water）または0.1 $\times$ TE（1mM Tris, 0.1mM EDTA, pH 7.5）に再懸濁した。次の工程に進む前に、それを完全に再溶解させた。

【0087】次に、ドライバーRNA 10 μ g当たり5 μ lの10 $\times$ RNase I緩衝液（Promega）および0.5ユニットのRNase Iを添加した。

【0088】この混合物を、37 で10分間インキュベートした。次に、65 で10分間加熱し、氷上に置いた。（場合によっては、このサンプルは、次の工程に進む前に、プロティナーゼKで処理し、フェノール/クロロホルム、クロロホルムで抽出し、エタノールで沈殿させてもよい。）

ハイブリッドの取出し

上記の工程で指示したようにしてRNase Iで処理した、または処理していない標準化/サブトラクトした混合物に、次の工程を適用することができる。

【0089】ビオチン化ドライバーRNAの各1 μ lに対して、50 μ lのMPG-ストレプトアビジンマグネチックビーズ（CPG Inc.）を調製した。5 μ lのビーズは、400ngを上回る量のビオチン化ドライバーを結合できた。ビーズの各50 μ lに、ブロック剤として10 μ gのtRNAを添加し、次にそのビーズを、時々振盪させながら室温で10~20分間または氷上で30~60分間インキュベートした。マグネチックスタンドを用いてビーズを取り出し、それを次に、大過剰の1 M NaCl、10mM EDTAで3回洗浄し、それらをビーズ懸濁液の最初の容量と等容量の1 M NaCl、10 mM EDTAに再懸濁した。

【0090】ブロックしたビーズを、再溶解したテスター/ドライバー混合物と混合し、そのサンプル全体を、時々穏やかに混合しながら室温で15分間インキュベートした。マグネチックスタンドを3分間用いてビーズを除去した後、上清（一本鎖の標準化/サブトラクトされたcDNAを含んでいる）を回収した。そのビーズを過剰容量の結合緩衝液（1 M NaCl、10mM EDTA）で1回洗浄して、残存するssDNAを回収した。この操作の前後に、標識したサンプルの放射能を測定して、標準化/サブトラクションの歩留りを見積もった。

【0091】Microcon 100限外濾過を用いて製造元（Millipore）により説明されているようにして、上記cDNA溶液を約50 μ lに濃縮した。続いて、標準イソプロパノール法を用いてそのcDNAをペレット化した。このペレットを44 μ lの0.1 $\times$ TEに再懸濁し、この溶液に、5 μ lのRNase I緩衝液および1 U RNase Iを添加して、50 μ lの容量とした。次に、サンプルを37 で20分間インキュベートし、その後、400 μ lの0.2% SDSを添加してRNase Iを不活性化した。微量の分解したRNA、ブロック用オリゴ

ヌクレオチド、SDSおよび緩衝液は、容量が20 μ l未満に減るまでMicrocon100フィルターを用いて2000rpmで25にて限外濾過することにより除去した。このサンプルは、400 μ lの0.1 $\times$ TEを添加し、次に上記のようにして遠心分離して全部で3回洗浄することにより脱塩した。新しい試験管内でフィルターを反転させ、9000rpmで1分間遠心分離することにより、cDNAを回収した。

第2鎖cDNAの合成

標準化/サブトラクトしたcDNAについて、標準的な対照ライブラリー、ミニライブラリー、第2鎖の合成およびクローニングの工程は同じとした。第1鎖cDNAプライマーの場合と同様にして、標準的な技法を用いて、XhoIを含むプライマー：5'-(GA)₇TTCTCGAGTTAATTAAATTAATC₁₃-3' (配列番号10)を調製し精製した。

【0092】第2鎖反応物を調製するために、オリゴ-dG-テイル付加cDNAを6 μ lの100ng/ μ lの第2鎖プライマー用アダプター、6 μ lのEx-Taq第2鎖用緩衝液 (Takara) および6 μ lの (それぞれ) 2.5mM dNTPと混合した。高度に特異的なプライミングを確実にするために、試薬は50 (通常は45 ~ 約80) で酵素と混ぜた (ホットスタートと呼ぶ)。次に、サーマルサイクラー内で、3 μ lの5U/ μ l ExTaqポリメラーゼ (Takara) を65 で添加することにより、プライミングを行った。混合した後、アニーリング温度を下げて、XhoIプライマーについては45 に、SstIプライマーについては35 にした。このアニーリング温度で10分後静置した後、68 で20分間インキュベートする間に第2鎖cDNAを伸長させた。このアニーリング-伸長サイクルをもう1回繰り返し、続いて最後の伸長工程を72 で10分間行った。ホットスタートの開始時点で、0.5 μ lの[α -³²P]dGTPまたは[α -³²P]dCTPを含む5 μ lのアリコートを追加し、取込みを行った。反応の終点で、標識したアリコートを用いてcDNAを可視化し、第2鎖の収量を算定した (CarninciおよびHayashizaki, 1999)。

cDNAのクローニング、配列決定および相同性検索

cDNAのクローニング、配列決定および相同性の検索を含む次の工程は全て、当技術分野で周知の技法に従って行った。クローニングおよび配列決定の方法は、例えば、Sambrookら, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press、ならびにHunkpillerら, 1991, Science, 第254巻: 59-67、およびShibata K.ら, 2000年11月, Genome Research, 第10巻, 11号, 1757-1771に従って行った。

cDNAのクローニング

二本鎖cDNAは、標準的な手順 (Sambrookら, 1989) に従って、プロティナーゼKで処理し、フェノール-クロロホルムおよびクロロホルムで抽出し、エタノール沈殿させた。次に、このcDNAをそれぞれ25U/ μ gのBamHIおよびXhoIで切断した。この消化の後、cDNAをプロティナーゼKで処理し、フェノール-クロロホルムで抽出し、CL-4Bスピнкаラム (Pharmacia) にかけて精製した。エタノール

ール沈殿させた後、このcDNAを、Sambrookらの手法に従い、ZAP-II (Stratagene) ベクターおよび大腸菌SOLR (Stratagene) 細菌を用いてクローニングした。

【0093】市販のピッキング装置 (Q-BotおよびQ-pix; Genetics, UK) を用いて細菌を釣り上げ、384マイクロウェルプレートに移した。2連のプレートを用いて、プラスミドDNAを調製した。プラスミドDNAについては、384ウェルプレートを分割し、4 $\times$ 96ディープウェルプレートで増殖させた。一夜増殖させた後、プラスミドを自動的に抽出した (Itohら, 1999, Genome Research, 9:463-470)。

配列決定

クラスター分析 (clustering) のための配列は、次のようにして分析した。(3'末端に対しては) ポリ-T領域および(5'末端に対しては) C-ストレッチの領域を、ワンパス配列からトリミングした。トリミングした配列から100bpの配列を選択して、タグ配列として用いた。BLAST 2.0.9を用いて、この新規なタグと非重複100bpタグ配列のデータベースとの間の相同性について検索した。BLASTパラメーターがE=1.0e⁻²⁵以下である配列を共にクラスタリングした。データベースがこのタグを含んでいる場合には、それを同じタグを持つ同一グループのメンバーに加えた。このタグがデータベース中で見られ、それと同時にシフトが10塩基未満であり、オーバーラップが80塩基よりも多く、そのオーバーラップ内で90%より高い同一性があるならば、それらの配列は同じグループに分類した。

【0094】各グループから代表的なものとして、1つのクローンを選択した。この代表的なクローンは、Q-bot (Genetics, UK) により釣り上げ384フォーマットウェルに移した。再整列プレートを作製するために、大腸菌を50 μ lのLB培地 (宿主/ベクター系の場合は、100mg/mlのアンプシリン/25mg/mlのストレプトマイシン) を用いて30 で18~24時間培養した。

【0095】各クローンを、Shibataら, 2000年11月に従って培養した。QIAprep 96 Turbo (QIAGEN) を用いてプラスミドDNAを精製した。cDNAの大きさを調べるために、プラスミドDNAの1/30をPvuIIで消化し、1%のアガロース電気泳動にかけた。

【0096】全長配列決定分析については、3種類の配列決定装置を用いた。cDNAは、インサートの大きさに応じて、例えば2.5kbより小さいものと2.5kbより大きいものの、という2つのカテゴリーに分類した。第1のカテゴリーの短いクローンは、LiCorDNA4200 (ロングリードシーケンサー) を用いて、サーモシーケンナーゼ・プライマーサイクル配列決定キット (ThermoSequenase Primer Cycle Sequencing Kit) (Amersham Pharmacia Biotech) を用いて両末端から配列決定を行った。末端配列決定のための順方向および逆方向の配列決定を行うために、ZAPについてはプライマー対: cacgacgttgtaaacgac

(配列番号11) / GGATAACAATTCACACAGG (配列番号12) を用いた。残っているギャップは、プライマー歩行法 (Hunkapillerら, 1991, Science, 第254巻:59-67) を用いて埋めた。上記のプライマー配列は、コンピュータソフトウェアconsed (Cordon, D., Abajian, C. & Green, P., Consed: a graphical tool for sequence finishing, 1998, Genome Res, 8:195-202) により設計し、プライマー歩行により得られた追加の配列データは、ABI Prism 377および/またはABI Prism 3700 (Applied Biosystems Inc.) シーケンサーを用いて、BigDye 10ターミネーターキットおよびCycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (Applied Biosystems Inc.) により、ギャップを有する元の配列の、該ギャップを埋めるのに用いた。第2のカテゴリの長いクローンは、RISA-384 (Shimadzu) (Shibataら, 2000年11月) によるショットガン配列決定戦略に基づいて、DYEnamic ETターミネーターサイクル配列決定キット (AmershamPharmacia Biotech) を用いて配列決定した。

【0097】ショットガンライブラリーを作製するために、48種の独立した代表的クローンから48のPCR増幅DNA断片 (それらの正体は、末端配列決定により確認した) をプールし、鎖状体化し、続いてDouble Stroke Shearing Device (Fiore Automation Inc., Salt Lake City, UT, USA) を用いて製造元のマニュアルに従って剪断工程を行った。これらのDNA断片の末端は切断して、T4 DNAポリメラーゼにより平滑末端にした。これらのDNA断片を、標準的な手順 (Sambrookら, 1989) に従ってpUC18 (Nippon Gene, 日本国) にクローニングし、DH10B細胞に形質転換した。ショットガン配列は、12~15の重複度で達成された。残っているギャップは、上記で記載されているようなプライマー歩行法により埋めた。

アセンブリおよびギャップの埋め合わせ

RISA (Shibataら, 2000年11月)、Licor DNA4200、ABI377およびABI3700の4種の配列決定装置から得られた全ての配列データ (エレクトロフェログラム) は、Phred (Ewing, B. & Green, P., Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment, 1998, Genome Res., 8:175-85) により塩基呼出し (base-called) し、phrap (Ewing, B. & Green, P., Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities, 1998, Genome Res., 8:186-94 (1998)) を用いてアセンブリした。Licor DNA4200のエレクトロフェログラムはBaseImagIR バージョン3.1 (LiCor) を用いて得た。

【0098】これらのクローンは、LiCorおよびABI377シーケンサーおよび適切なプライマーを用いて配列決定した。

配列および相溶性の検索

配列の検索

各cDNAクローンのコード配列をアミノ酸配列に翻訳し

て、データベースを作製した。このデータベースについてアミノ酸配列の検索を行った。

【0099】ペンタペプチドQYNADをコードする核酸配列を含む3種のクローンが見い出され、これらの配列をそれぞれ配列番号1、配列番号3および配列番号5とした。これらの配列においてCDS配列を決定し、コードされたポリペプチドの配列は配列番号2、配列番号4および配列番号6に報告した。

相溶性の検索

大まかな相溶性検索を、当技術分野で公知である公的に入手可能なホモロジーデータベースソフトウェア: BLAST, BLASTX (Altschul S.F., ら, 1997, NucleicAcids Res., 25(17):3389-3402) を用いて標準的な手順に従って行った。これらのプログラムを用いれば、目的の配列に対して相同かつ/または同一の核酸配列またはアミノ酸配列を検出することが可能である。

【0100】この分析に基づけば、上記3種のクローンは新規な遺伝子である。

【0101】ドメインまたはモチーフの検索は、Swiss Prot, TrEMBL, PfamおよびInterProを用いて標準的な手順に従って行った。上記3種のクローンは5つのアンキリンリピートを含むことが判明した。

配列決定装置およびプライマー

3種の選択したクローンについての上記の配列決定工程で用いた配列決定装置およびプライマーは以下のとおりであった。

【0102】配列番号1のクローンの配列は、LiCor DNA4200シーケンサーを用いて決定し、2つのプライマーは以下のものとした。

【0103】

(LiCor-Rev) ggataacaatttcacacagg (配列番号13);

(LiCor-Fwd) CACGACGTGTGTAACACGAC (配列番号14)。

【0104】配列番号3のクローンの配列は、ABI377シーケンサーを用いて決定し、4つのプライマーは以下のものとした。

【0105】

(1233) AGCGGATAACAATTCACACAGGA (配列番号15);

(PSFWD) TCACTAGGGCGAATTGGAGC (配列番号16);

(000111w2g03) ACAGGAGTCTCAGGGCTA (配列番号17);

(000111w2g04) CCTGTGTCTATGGCCG (配列番号18)。

【0106】配列番号5のクローンの配列は、ABI377シーケンサーを用いて決定し、4つのプライマーは以下のものとした。

【0107】

(1233) AGCGGATAACAATTCACACAGGA (配列番号15);

(PSFWD) TCACTAGGGCGAATTGGAGC (配列番号16);

(000107w2c05) CAATAGCGTAGCGTAATGC (配列番号19);

(000107w2c06) CTATGGCCGGCTACC (配列番号20)。

【0108】これに関して、20種の配列についての配列表を添付するが、参照により本明細書に組み入れるもの

とする。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> HAYASHIZAKI, Yoshihide
SUZUKI, Harukazu
<120> NUCLEIC ACID SEQUENCES, E
NCODED POLYPEPTIDES AND THEIR USE IN T
HE
RAPY
<130> P01-071
<160> 20
<170> PatentIn version 3.0
<210> 1
<211> 1456
<212> DNA
<213> Mus musculus
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1456)
<223> Tissue type = testis
Sex = male
<220>
<221> CDS
<222> (150)..(1454)
<400> 1
gaccaactgt ataaggccct ggttggcaga gggt
taagcc ctgaggtcct ctgtgcaa 60
gtggctggtg aggctctcgt ttactaaga ccta
aaattg ggctccagga ccagaaaaga 120
tgagaggttt ggaaggacc tgaggccaa atg t
cc ttt tcc atg aag aag atc 173
Met Ser Phe Ser Met Ly
s Lys Ile
1 5

ttt ggg gct aag gaa aag aca ccc ttg ggt
ttc tgt gat gcc cca caa 221
Phe Gly Ala Lys Glu Lys Thr Pro Leu Gly
Phe Cys Asp Ala Pro Gln
10 15 20

atg act gtc tct gag ttt ttc ttc ggt gaa
aat cca aac tat ccg aaa 269
Met Thr Val Ser Glu Phe Phe Phe Gly Glu
Asn Pro Asn Tyr Pro Lys
25 30 35 40

tac cat aca aca tac aga ccg ttg ggg cat
att cac agg gtt gct gct 317
Tyr His Thr Thr Tyr Arg Pro Leu Gly His
Ile His Arg Val Ala Ala
45 50 55

gag ggt gat gca gcc cgg atg gag att ctc

125	130	135
ggc gct gat ccg aac att aga gac agc agt		
ggc aac agt gcc ttg cac 605		
Gly Ala Asp Pro Asn Ile Arg Asp Ser Ser		
Gly Asn Ser Ala Leu His		
140	145	150
tac gct gtg tac aac ggg cat cag gag atg		
gcc tcc cta ctg ctt cag 653		
Tyr Ala Val Tyr Asn Gly His Gln Glu Met		
Ala Ser Leu Leu Leu Gln		
155	160	165
tac aac gct gat atc gaa caa aaa acc aag		
gat ggc ttc aca cca ctg 701		
Tyr Asn Ala Asp Ile Glu Gln Lys Thr Lys		
Asp Gly Phe Thr Pro Leu		
170	175	180
ttg ctg gca ctc cga gaa aag cgg gtg gag		
gtg gca gag ttt tta gta 749		
Leu Leu Ala Leu Arg Glu Lys Arg Val Glu		
Val Ala Glu Phe Leu Val		
185	190	195
00		
aga atg gga gca gac ata cac gtg gta gat		
gag ctg caa aga aac acc 797		
Arg Met Gly Ala Asp Ile His Val Val Asp		
Glu Leu Gln Arg Asn Thr		
205	210	215
ttg ata tac gct ata aga tgt gga tca aaa		
gat ctg tct gta tta ctc 845		
Leu Ile Tyr Ala Ile Arg Cys Gly Ser Lys		
Asp Leu Ser Val Leu Leu		
220	225	230
ctt gag aaa ggt att gac ttc ttc tat aag		
gat gtc ttc gga tgg aca 893		
Leu Glu Lys Gly Ile Asp Phe Phe Tyr Lys		
Asp Val Phe Gly Trp Thr		
235	240	245
gca tta cgc tac gct att gaa ggc cac tgt		
act ttt aga cag aca ctt 941		
Ala Leu Arg Tyr Ala Ile Glu Gly His Cys		
Thr Phe Arg Gln Thr Leu		
250	255	260
ctg gat ttt gaa gaa agt cta cat agt aac		
aaa aaa gat aag gaa cca 989		
Leu Asp Phe Glu Glu Ser Leu His Ser Asn		

Thr Glu Leu Glu Leu Met Ser Val Glu Glu
Asp Val Ser His Glu Ser

395

400

405

gaa aat gac cac cct ttg aga gaa tcg gag
cat ctt cca aag atc aag 1421
Glu Asn Asp His Pro Leu Arg Glu Ser Glu
His Leu Pro Lys Ile Lys

410

415

420

gtt ggc cat tca tct cgt tca gga tat caa
atg gg 1456
Val Gly His Ser Ser Arg Ser Gly Tyr Gln
Met

425

430

435

<210> 2

<211> 435

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(1456)

<223> Tissue type = testis

Sex = male

<400> 2

Met Ser Phe Ser Met Lys Lys Ile Phe Gly
Ala Lys Glu Lys Thr Pro

1

5

10

15

Leu Gly Phe Cys Asp Ala Pro Gln Met Thr
Val Ser Glu Phe Phe Phe

20

25

30

Gly Glu Asn Pro Asn Tyr Pro Lys Tyr His
Thr Thr Tyr Arg Pro Leu

35

40

45

Gly His Ile His Arg Val Ala Ala Glu Gly
Asp Ala Ala Arg Met Glu

50

55

60

Ile Leu Leu Thr Leu Gly Gln Cys Asn Val
Tyr His Arg Asp Arg Lys

65

70

75

80

Asp Arg Thr Ala Leu His Phe Ala Cys Val

(18)

特開2002-360274

165

170

175

Thr Lys Asp Gly Phe Thr Pro Leu Leu Leu
Ala Leu Arg Glu Lys Arg

180

185

190

Val Glu Val Ala Glu Phe Leu Val Arg Met
Gly Ala Asp Ile His Val

195

200

205

Val Asp Glu Leu Gln Arg Asn Thr Leu Ile
Tyr Ala Ile Arg Cys Gly

210

215

220

Ser Lys Asp Leu Ser Val Leu Leu Leu Glu
Lys Gly Ile Asp Phe Phe

225

230

235

2

40

Tyr Lys Asp Val Phe Gly Trp Thr Ala Leu
Arg Tyr Ala Ile Glu Gly

245

250

255

His Cys Thr Phe Arg Gln Thr Leu Leu Asp
Phe Glu Glu Ser Leu His

260

265

270

Ser Asn Lys Lys Asp Lys Glu Pro Glu Leu
Gln Val Glu Pro Ser Thr

275

280

285

Ser Cys Ile Leu Ala Lys Gln Ile Asp Ala
Gly Asn Asp Ser Leu Ala

290

295

300

Arg Ile Ser Ser Cys Pro Ser Pro Glu Thr
Pro Val Leu Thr Met Lys

305

310

315

3

20

Glu Asp Glu Asn Ser Asp Ala Arg Ser Asn
Ser Glu Ser Lys Pro Pro

325

330

335

Tyr Gln Met
435

<210> 3
<211> 1441
<212> DNA
<213> Mus musculus
<220>
<221> misc
<222> (1)..(1441)
<223> Tissue type = testis
Sex = male
<220>
<221> CDS
<222> (150)..(1193)
<400> 3

gaccaactgt ataaggccct ggttggcaga gggt
taagcc ctgaggtcct ctgtgcaaat 60
gtggctgggtg aggctctcgt ttactaaga ccta
aaattg ggctccagga ccagaaaaga 120
tgagaggttt ggaagggacc tgaggccaa atg t
cc ttt tcc atg aag aag atc 173
Met Ser Phe Ser Met Ly
s Lys Ile

1 5

ttt ggg gct aag gaa aag aca ccc ttg ggt
ttc tgt gat gcc cca caa 221
Phe Gly Ala Lys Glu Lys Thr Pro Leu Gly
Phe Cys Asp Ala Pro Gln
10 15 20

atg act gtc tct gag ttt ttc ttc ggt gaa
aat cca aac tat ccg aaa 269
Met Thr Val Ser Glu Phe Phe Phe Gly Glu
Asn Pro Asn Tyr Pro Lys
25 30 35 40

tac cat aca aca tac aga ccg ttg ggg cat
att cac agg gtt gct gct 317
Tyr His Thr Thr Tyr Arg Pro Leu Gly His
Ile His Arg Val Ala Ala
45 50 55

gag ggt gat gca gcc cgg atg gag att ctc
ctc acg ctt gga caa tgc 365
Glu Gly Asp Ala Ala Arg Met Glu Ile Leu
Leu Thr Leu Gly Gln Cys
60 65 70

aac gtg tac cac aga gac cgc aag gac agg
aca gct ttg cac ttt gcc 413
Asn Val Tyr His Arg Asp Arg Lys Asp Arg

155	160	165	
tac aac gct gat atc gaa caa aaa acc aag			
gat ggc ttc aca cca ctg	701		
Tyr Asn Ala Asp Ile Glu Gln Lys Thr Lys			
Asp Gly Phe Thr Pro Leu			
170	175	180	
ttg ctg gca ctc cga gaa aag cgg gtg gag			
gtg gca gag ttt tta gta	749		
Leu Leu Ala Leu Arg Glu Lys Arg Val Glu			
Val Ala Glu Phe Leu Val			
185	190	195	2
00			
aga atg gga gca gac ata cac gtg gta gat			
gag ctg caa aga aac acc	797		
Arg Met Gly Ala Asp Ile His Val Val Asp			
Glu Leu Gln Arg Asn Thr			
205	210	215	
ttg ata tac gct ata aga tgt gga tca aaa			
gat ctg tct gta tta ctc	845		
Leu Ile Tyr Ala Ile Arg Cys Gly Ser Lys			
Asp Leu Ser Val Leu Leu			
220	225	230	
ctt gag aaa ggt att gac ttc ttc tat aag			
gat gtc ttc gga tgg aca	893		
Leu Glu Lys Gly Ile Asp Phe Phe Tyr Lys			
Asp Val Phe Gly Trp Thr			
235	240	245	
gca tta cgc tac gct att gaa ggc cac tgt			
act ttt aga cag aca ctt	941		
Ala Leu Arg Tyr Ala Ile Glu Gly His Cys			
Thr Phe Arg Gln Thr Leu			
250	255	260	
ctg gat ttt gaa gaa agt cta cat agt aac			
aaa aaa gat aag gaa cca	989		
Leu Asp Phe Glu Glu Ser Leu His Ser Asn			
Lys Lys Asp Lys Glu Pro			
265	270	275	2
80			
gaa cta caa gtg gag ccc agt acc tcc tgc			
att tta gca aaa caa ata	1037		
Glu Leu Gln Val Glu Pro Ser Thr Ser Cys			
Ile Leu Ala Lys Gln Ile			
285	290	295	
gat gct gga aat gac tca cta gca agg atc			
tcc agc tgt cct agc cct	1085		
Asp Ala Gly Asn Asp Ser Leu Ala Arg Ile			

Leu Gly Phe Cys Asp Ala Pro Gln Met Thr
Val Ser Glu Phe Phe Phe

20 25 30

Gly Glu Asn Pro Asn Tyr Pro Lys Tyr His
Thr Thr Tyr Arg Pro Leu

35 40 45

Gly His Ile His Arg Val Ala Ala Glu Gly
Asp Ala Ala Arg Met Glu

50 55 60

Ile Leu Leu Thr Leu Gly Gln Cys Asn Val
Tyr His Arg Asp Arg Lys

65 70 75 80

Asp Arg Thr Ala Leu His Phe Ala Cys Val
Tyr Gly Arg Leu Pro Val

85 90 95

Val Thr Ile Leu Val Lys Asn Asn Cys Glu
Ile Asp Ala Leu Asp Lys

100 105 110

Asn His Thr Thr Pro Leu Met Lys Ser Val
Gln Cys Trp Lys Gln Lys

115 120 125

Cys Ala Thr Val Leu Leu Glu His Gly Ala
Asp Pro Asn Ile Arg Asp

130 135 140

Ser Ser Gly Asn Ser Ala Leu His Tyr Ala
Val Tyr Asn Gly His Gln

145 150 155 1
60

Glu Met Ala Ser Leu Leu Leu Gln Tyr Asn
Ala Asp Ile Glu Gln Lys

165 170 175

Thr Lys Asp Gly Phe Thr Pro Leu Leu Leu
Ala Leu Arg Glu Lys Arg

180 185 190

Ser Cys Ile Leu Ala Lys Gln Ile Asp Ala
Gly Asn Asp Ser Leu Ala

290 295 300

Arg Ile Ser Ser Cys Pro Ser Pro Glu Thr
Pro Val Leu Thr Met Lys

305 310 315 3
20

Glu Asp Glu Asn Ser Asp Ala Arg Val Asn
Cys Ser Ser Val Glu Leu

325 330 335

Leu Pro Trp Pro Lys Phe Val Phe Gly Leu
Phe

340 345

<210> 5

<211> 1400

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> misc

<222> (1)..(1400)

<223> Tissue type = testis

Sex = male

<220>

<221> misc

<222> (1)..(1400)

<223> Clone 4930418121

<220>

<221> CDS

<222> (150)..(1193)

<400> 5

aaccaactgt ataaggccct ggttggcaga gggt

taagcc ctgaggtcct ctgtgcaaat 60

gtggctgggtg aggctcacgt ttactaaga ccta

aaattg ggctccagga ccagaaaaga 120

tgagaggttt ggaagggacc tgaggccaa atg t

cc ttt tcc atg aag aag atc 173

Met Ser Phe Ser Met Ly

s Lys Ile

1 5

ttt ggg gct aag gaa aag aca ccc ttg ggt

ttc tgt gat gcc cca caa 221

Phe Gly Ala Lys Glu Lys Thr Pro Leu Gly

Phe Cys Asp Ala Pro Gln

10 15 20

tgt gtc tat ggc cgg cta cca gta gtg acc
 att cta gtg aag aat aat 461
 Cys Val Tyr Gly Arg Leu Pro Val Val Thr
 Ile Leu Val Lys Asn Asn
 90 95 100

tgt gag atc gat gcc ttg gac aag aac cat
 acc aca cct ctg atg aag 509
 Cys Glu Ile Asp Ala Leu Asp Lys Asn His
 Thr Thr Pro Leu Met Lys
 105 110 115 1
 20

tct gtc caa tgc tgg aag cag aaa tgt gcg
 acc gtg ctg ctg gag cac 557
 Ser Val Gln Cys Trp Lys Gln Lys Cys Ala
 Thr Val Leu Leu Glu His
 125 130 135

ggc gct gat ccg aac att aga gac agc agt
 ggc aac agt gcc ttg cac 605
 Gly Ala Asp Pro Asn Ile Arg Asp Ser Ser
 Gly Asn Ser Ala Leu His
 140 145 150

tac gct gtg tac aac ggg cat cag gag atg
 gcc tcc cta ctg ctt cag 653
 Tyr Ala Val Tyr Asn Gly His Gln Glu Met
 Ala Ser Leu Leu Leu Gln
 155 160 165

tac aac gct gat atc gaa caa aaa acc aag
 gat ggc ttc aca cca ctg 701
 Tyr Asn Ala Asp Ile Glu Gln Lys Thr Lys
 Asp Gly Phe Thr Pro Leu
 170 175 180

ttg ctg gca ctc cga gaa aag cgg gtg gag
 gtg gca gag ttt tta gta 749
 Leu Leu Ala Leu Arg Glu Lys Arg Val Glu
 Val Ala Glu Phe Leu Val
 185 190 195 2
 00

aga atg gga gca gac ata cac gtg gta gat
 gag ctg caa aga aac acc 797
 Arg Met Gly Ala Asp Ile His Val Val Asp
 Glu Leu Gln Arg Asn Thr
 205 210 215

ttg ata tac gct ata aga tgt gga tca aaa
 gat ctg tct gta tta ctc 845
 Leu Ile Tyr Ala Ile Arg Cys Gly Ser Lys
 Asp Leu Ser Val Leu Leu
 220 225 230

345

ggtagtcga cagaacaag agtgtagca ggct
 aaaaca cttatcaatt tggtaagcaa 1293
 tcagaaggat tggggtaac tactttgatg tcct
 aggcaa atgtgtcaaa atatggagcc 1353
 caagagaaat tgcattgttt ccaacaatag agga
 aacttt aaactgg 1400

<210> 6

<211> 347

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 6

Met Ser Phe Ser Met Lys Lys Ile Phe Gly
 Ala Lys Glu Lys Thr Pro

1 5 10 15

Leu Gly Phe Cys Asp Ala Pro Gln Met Thr
 Val Ser Glu Phe Phe Phe

20 25 30

Gly Glu Asn Pro Asn Tyr Pro Lys Tyr His
 Thr Thr Tyr Arg Pro Leu

35 40 45

Gly His Ile His Arg Val Ala Ala Glu Gly
 Asp Ala Ala Arg Met Glu

50 55 60

Ile Leu Leu Thr Leu Gly Gln Cys Asn Val
 Tyr His Arg Asp Arg Lys

65 70 75 80

Asp Arg Thr Ala Leu His Phe Ala Cys Val
 Tyr Gly Arg Leu Pro Val

85 90 95

Val Thr Ile Leu Val Lys Asn Asn Cys Glu
 Ile Asp Ala Leu Asp Lys

100 105 110

Asn His Thr Thr Pro Leu Met Lys Ser Val
 Gln Cys Trp Lys Gln Lys

115 120 125

210 215 220

Ser Lys Asp Leu Ser Val Leu Leu Leu Glu

Arg Gly Ile Asp Phe Phe

225 230 235 2

40

Tyr Lys Asp Val Phe Gly Trp Thr Ala Leu

Arg Tyr Ala Ile Glu Gly

245 250 255

His Cys Thr Phe Arg Gln Thr Leu Leu Asp

Phe Glu Glu Ser Leu His

260 265 270

Ser Asn Lys Lys Asp Lys Glu Pro Glu Leu

Gln Val Glu Pro Ser Thr

275 280 285

Ser Cys Ile Leu Ala Lys Gln Ile Asp Ala

Gly Asn Asp Ser Leu Ala

290 295 300

Arg Ile Ser Ser Cys Pro Ser Pro Glu Thr

Pro Val Leu Thr Met Lys

305 310 315 3

20

Glu Asp Glu Asn Ser Asp Ala Arg Val Asn

Cys Ser Ser Val Glu Leu

325 330 335

Leu Pro Trp Pro Lys Phe Val Phe Gly Leu

Phe

340 345

<210> 7

<211> 15

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 7

cagtacaacg ctgat

15

<210> 8

<211> 5

<212> PRT

<400> 9
gagagagaga aggatccaag agctcttttt tttt
tttttt tvn 43

<210> 10
<211> 49
<212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> Synthetic primer derived
from Mus musculus.
<400> 10
gagagagaga gagattctcg agttaattaa atta
atcccc cccccccc 49

<210> 11
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> Synthetic primer derived
from Mus musculus.
<400> 11
cacgacgttg taaaacgac
19

<210> 12
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> Synthetic primer derived
from Mus musculus.
<400> 12
ggataacaat ttcacacagg
20

<210> 13
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> Synthetic primer derived
from Mus musculus.
<400> 13
ggataacaat ttcacacagg
20

<210> 14
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial
<220>

<212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> Synthetic primer derived
from Mus musculus.
<400> 15
agcggataac aatttcacac agga
24

<210> 16
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> Synthetic primer derived
from Mus musculus.
<400> 16
tcactagggc gaattggagc
20

<210> 17
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> Synthetic primer derived
from Mus musculus.
<400> 17
acaggagtct cagggcta
18

<210> 18
<211> 16
<212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> Synthetic primer derived
from Mus musculus.
<400> 18
cctgtgtcta tggccg
16

<210> 19
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> Synthetic primer derived
from Mus musculus.
<400> 19
caatagcgta gcgtaatgc
19

ctatggccgg ctacc

15

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マコ-ト [*] (参考)
A 6 1 K 39/395		C 0 7 K 14/47	
48/00		16/18	
A 6 1 P 25/00		C 1 2 M 1/00	A
C 0 7 K 14/47		1/34	Z
16/18		C 1 2 N 1/15	
C 1 2 M 1/00		1/19	
1/34		1/21	
C 1 2 N 1/15		C 1 2 P 21/02	C
1/19		C 1 2 Q 1/68	A
1/21		G 0 1 N 33/53	D
5/10			M
C 1 2 P 21/02		37/00	1 0 2
C 1 2 Q 1/68		C 1 2 N 15/00	Z N A A
G 0 1 N 33/53		5/00	A
		15/00	F
37/00	1 0 2	A 6 1 K 37/02	

专利名称(译)	核酸序列，编码的多肽及其在治疗中的用途		
公开(公告)号	JP2002360274A	公开(公告)日	2002-12-17
申请号	JP2001388116	申请日	2001-12-20
[标]申请(专利权)人(译)	独立行政法人理化学研究所		
申请(专利权)人(译)	RIKEN		
[标]发明人	林崎良英 鈴木治和		
发明人	林崎 良英 鈴木 治和		
IPC分类号	G01N33/53 A61K31/7088 A61K38/00 A61K39/395 A61K48/00 A61P25/00 C07K14/47 C07K16/18 C12M1/00 C12M1/34 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12P21/02 C12Q1/68 G01N37/00		
FI分类号	A61K31/7088 A61K39/395.D A61K39/395.N A61K48/00 A61P25/00 C07K14/47 C07K16/18 C12M1/00.A C12M1/34.Z C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02.C C12Q1/68.A G01N33/53.D G01N33/53.M G01N37/00.102 C12N15/00.ZNA.A C12N5/00.A C12N15/00.F A61K37/02 A61K38/00 C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A C12N15/09.200 C12N5/00.101 C12N5/10		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA80 4B024/CA04 4B024/GA11 4B024/HA12 4B029/AA07 4B029/AA21 4B029/AA23 4B029/BB20 4B029/FA15 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QR84 4B063/QS25 4B063/QS34 4B064/AG01 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA90Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA13 4C084/NA14 4C084/ZA012 4C084/ZB212 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/AA16 4C085/BB11 4C085/BB31 4C085/BB41 4C085/CC29 4C085/CC31 4C085/DD62 4C085/EE01 4C086/AA02 4C086/AA03 4C086/EA16 4C086/MA02 4C086/MA05 4C086/NA14 4C086/ZA01 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA21 4H045/EA50 4H045/FA74		
优先权	60/256934 2000-12-21 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

(带更正) 解决的问题：提供与神经系统疾病有关的基因和编码的多肽。 SOLUTION：编码具有源自小鼠睾丸组织的特定氨基酸序列的多肽的多核苷酸；编码具有含有特定肽序列的多肽的多核苷酸；具有源自小鼠睾丸组织的特定序列的多核苷酸。 核苷酸；一种多核苷酸，其包含衍生自小家蝇的睾丸组织的特定序列；具有衍生自小家鼠的睾丸组织的特定序列；以及一种多核苷酸。 分离的核酸分子。