

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A) (11)特許出願公表番号

特表2003 - 501088

(P2003 - 501088A)

(43)公表日 平成15年1月14日(2003.1.14)

(51) Int.Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マ-ト [*] (参考)
C 1 2 N 15/09	ZNA	C 0 7 K 1/22	2 G 0 4 5
C 0 7 K 1/22		14/47	4 B 0 2 4
		16/18	4 B 0 6 3
		C 1 2 N 1/15	4 B 0 6 4
C 1 2 N 1/15		1/19	4 B 0 6 5

審査請求 未請求 予備審査請求 (全 68数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001 - 502581(P2001 - 502581)

(86) (22)出願日 平成12年5月16日(2000.5.16)

(85)翻訳文提出日 平成13年12月7日(2001.12.7)

(86)国際出願番号 PCT/US00/13426

(87)国際公開番号 W000/075318

(87)国際公開日 平成12年12月14日(2000.12.14)

(31)優先権主張番号 09/328,869

(32)優先日 平成11年6月8日(1999.6.8)

(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 インサイト・ゲノミクス・インコーポレイテッド

アメリカ合衆国カリフォルニア州94304・パロアルト・ポータードライブ 3160

(72)発明者 カイザー、マシュー・アール

アメリカ合衆国カリフォルニア州94546 - 1017・カストロバレー・ユーイングロード 4793

(72)発明者 ヒルマン、ジェニファー・エル

アメリカ合衆国カリフォルニア州94040・マウンテンビュー・#12・モンロードドライブ 230

(74)代理人 弁理士 大島 陽一

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 脂質輸送タンパク質

(57)【要約】

本発明は、哺乳動物核酸分子及びその断片を提供する。本発明はまた、この核酸分子を用いた、遺伝子発現に関連する症状や疾患、または障害の特徴付け・診断・評価・治療・予防方法、並びにモデル系の作製方法に関する。更に、本発明は、この哺乳動物核酸分子によってコードされるタンパク質を産生する発現ベクター及び宿主細胞を提供する。

```

1772859 56 HKIKRRCQCVYDARELWDLVHDIYKAKGKNSVIEYEDZARLFTVWADVGYVSMRCRPL 125
GI 897786 +E+ +E C PA L DV D+YRK+ND V E ++ + V Y+ + P PL
14 YKVTYLEKCS-PA-LLAADVWELDLRQKQDQVYELVE--KESTEGEYAVYKVPFL 69
1772859 126 KRSDYITLRSNLEMGAO---YIIMYSYKHKPKYFPELWLVZAVSIQTSFLQETVPRK-S 180
GI 897786 ARD + R + U Y+++ S+ P++P + ++R + I+G G K S
70 SNEDYVTRQRDLVDRRKRYVYVLAQSSISAPQFPEKSGVLRVQKQKSLATEGCKRGS 129
1772859 181 CVITVLAQVDFRGLSLEKVVAVKSSQFLAKKAKKAVKAKIAY 222
GI 897786 V Y +P G +P 0++N +++ P IK R EAC V
130 EYFVEYVD-APKQSQIPESLILNAAKQGVNPELRDQVYKQKQK 170

```

【特許請求の範囲】

【請求項1】 SEQ ID NO:2のアミノ酸配列若しくはその一部をコードする実質的に精製された哺乳動物核酸分子。

【請求項2】 SEQ ID NO:1若しくはその断片を含む単離され精製された哺乳動物核酸分子。

【請求項3】 SEQ ID NO:3乃至SEQ ID NO:11 (SEQ ID NO:3 - 11) から選択された請求項1の哺乳動物核酸分子の断片。

【請求項4】 請求項2の核酸分子またはその断片の相補配列。

【請求項5】 請求項3の断片の相補配列。

【請求項6】 高いストリンジェンシー（厳密性）の条件下で、請求項1の核酸分子とハイブリダイズするプローブ。

【請求項7】 少なくとも請求項1の核酸分子のある断片を含む発現ベクター。

【請求項8】 請求項7の発現ベクターを含む宿主細胞。

【請求項9】 タンパク質を作製する方法であって、

(a) 前記タンパク質が発現する条件下で、請求項8の宿主細胞を培養するステップと、

(b) 前記培養宿主細胞から前記タンパク質を回収するステップとを含むタンパク質の製造方法。

【請求項10】 サンプルにおいて核酸分子を検出する方法であって、

(a) 請求項6のプローブを前記サンプル内の少なくとも1つ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するステップと、

(b) 前記ハイブリダイゼーション複合体を検出するステップとを含み、

前記ハイブリダイゼーション複合体の存在が、前記サンプルに前記核酸分子が存在することと相関することを特徴とする核酸分子の検出方法。

【請求項11】 前記ハイブリダイゼーションの前に、前記核酸分子若しくはその断片を増幅するステップを更に含むことを特徴とする請求項10に記載の方法。

【請求項12】 核酸分子を用いて、前記核酸と特異的に結合する少なく

とも1つの分子を同定するべく、分子のライブラリをスクリーニングする方法であって、

(a) 分子のライブラリを準備するステップと、

(b) 特異的な結合が可能な条件下で、請求項1の核酸分子を分子のライブラリと結合させるステップと、

(c) 特異的な結合を検出して、前記核酸分子と特異的に結合する分子を同定するステップとを含むスクリーニング方法。

【請求項13】 前記ライブラリが、DNA分子及びRNA分子、PNA、ペプチド、タンパク質から選択されることを特徴とする請求項12記載の方法。

【請求項14】 前記核酸分子の活性を調節する請求項13の分子。

【請求項15】 核酸分子若しくはその断片を用いて、サンプルから該核酸分子と特異的に結合するリガンドを精製する方法であって、

(a) サンプルを準備するステップと、

(b) 特異的な結合が許容される条件下で、請求項1の核酸分子若しくはその断片とサンプルとを結合させるステップと、

(c) 前記核酸分子と前記リガンドとの特異的な結合を検出するステップと、

(d) 前記結合した核酸分子を回収するステップと、

(e) 前記精製したリガンドから前記核酸分子を分離して精製したリガンドを得るステップとを含むことを特徴とするリガンドの精製方法。

【請求項16】 SEQ ID NO:2のアミノ酸配列若しくはその一部を含む単離され精製された哺乳動物タンパク質。

【請求項17】 タンパク質を用いて、該タンパク質と特異的に結合する少なくとも1つの分子を同定するべく、分子のライブラリをスクリーニングする方法であって、

(a) 分子のライブラリを準備するステップと、

(b) 特異的な結合が許容される条件下で、請求項16のタンパク質を前記分子のライブラリと結合させるステップと、

(c) 特異的な結合を検出して、前記タンパク質と特異的に結合する分子を同定するステップとを含むことを特徴とするスクリーニング方法。

【請求項18】 前記ライブラリが、DNA分子及びRNA分子、PNA、ペプチド、タンパク質、アゴニスト、アンタゴニスト、抗体、免疫グロブリン、インヒビター及び薬剤から選択されることを特徴とする請求項17に記載のスクリーニング方法。

【請求項19】 前記タンパク質の活性を調節する請求項17に記載の方法によって同定された分子。

【請求項20】 哺乳動物タンパク質を用いて、サンプルから該タンパク質と特異的に結合するリガンドを精製する方法であって、

- (a) サンプルを準備するステップと、
- (b) 特異的結合が許容される条件下で、請求項16のタンパク質を前記サンプルと結合させるステップと、
- (c) 前記タンパク質と前記リガンドとの特異的結合を検出するステップと、
- (d) 前記結合したタンパク質を回収するステップと、
- (e) 前記精製したリガンドから前記タンパク質を分離して精製したリガンドを得るステップとを含むことを特徴とするリガンドの精製方法。

【発明の詳細な説明】**【0001】****(発明の技術分野)**

本発明は、新規哺乳動物タンパク質をコードする核酸分子、並びにこれらの分子を用いた細胞増殖、脂質の代謝及び輸送に関連した疾患など症状の特徴付け・診断・予防・治療に関連する。

【0002】**(発明の背景)**

生物間の系統発生的な関係が何度も実証され、様々な原核生物及び真核生物の研究によって、生化学的及び生理学的な機構や代謝経路の実質的に漸進的な進化が示された。異なった進化の圧力にもかかわらず、酵母及び線虫、ハエ、ラット及びヒトにおける細胞周期を調節するタンパク質が、共通の化学的若しくは構造的な特徴を有し、同一の一般的な活性を調節する。ヒト遺伝子配列を、構造及び/または機能が既知である他の生物の遺伝子配列と比較することによって、研究者は類似性を引き出したり、仮説を検証するモデル系を作製することができる。これらのモデル系は、ヒトの症状及び疾患、障害の診断薬及び治療薬の開発及び検査において極めて重要である。

【0003】

リン脂質の輸送に重要なリン脂質輸送タンパク質ファミリーには、ホスファチジルイノシトール輸送タンパク質(酵母SEC 14pと同一であるPI-TP)及び非特異的脂質輸送タンパク質(ステロール担体タンパク質2と同一であるnsL-TP)、ホスファチジルコリン輸送タンパク質(PC-TP)が含まれる。PC-TPの配列はユニークであり、他のサイトゾル脂質輸送タンパク質とは関連性がない。この配列は単一の遺伝子によってコードされ、全ての真核生物に存在すると考えられる(Geijtenbeek 他(1996) Biochem. J. 316:49-55)。ウシPC-TPとブタPC-TPとのアミノ酸組成及び分子量、溶出曲線は著しく異なるが、輸送活性レベルが近いことから、活性及び特異性を変えないでPC-TPのアミノ酸組成を改変することができると考えられる(Chen 他(1991) Biochem. Int. 23:377-382)。

【0004】

PC-TPはPCの膜間輸送を触媒し (Feng and Cohen (1998) J. Lipid Res. 39:1862-1869)、ある種のPC分子が優先的に胆汁内で分泌される。多変量解析を用いて、LaMorte 他 (1998; Hepatology 28:631-637)が、PCの構造と各種のPCが胆汁内に分泌される確率との関係を研究した。この研究結果から、あるPCが胆汁内で分泌される可能性は、PC-TPに対する結合親和性に密接に関連することがわかった。

【0005】

ウシ肝PC-TPは、1つのPC分子と非共有結合的に結合する。結合するPCは、ウシ肝を代表する主な分子種ではない。sn-1位にパルミトイル鎖を有するPC種はウシ肝に豊富に存在するが、PC-TPとして結合して存在するのは殆ど見られない。これらの事実から、Geijtenbeek他が、PC-TPが高度不飽和ステアロイル含有PC分子種の代謝にある役割を果たすと報告した(1996; FEBS Lett. 391:333-335)。

【0006】

PCは、中性脂肪貯蔵病 (NLSD: neutral lipid storage disease) を含むリン脂質の代謝や、無気肺及び浮腫、嚢胞性線維症などの肺疾患や、胆嚢炎に関連する様々な疾患に関係する (Nicholas (1996) Respirology 1:247-257; Griese 他 (1997) Eur. Respir. J. 10:1983-1988; and Venkataramani 他 (1998) Am. J. Gastroenterol. 93:434-441)。NSLDは、リン脂質代謝の調節における異常を起こす遺伝病である。Igal及びColemanは、NSLDにおける調節異常がホスファチジルコリン及びホスファチジルエタノールアミンを含む主な細胞内リン脂質の合成及び分解の速度を変化させると報告した(1998; J. Lipid Res. 39:31-43)。

【0007】

ホスファチジルイノシトール輸送タンパク質は、小胞輸送及びシグナル伝達において重要である (Cockcroft (1998) Bioessays 20:423-432; Alb 他 (1996) Curr. Opin. Cell Biol. 8:534-541)。PC-TPはPI-TPを含むファミリーのメンバーであって、PCの膜間輸送を触媒し (Feng and Cohen、前出)、様々な器官 (肺、腎臓、精巣、肝臓など) に存在することから、PCが小胞輸送障害や輸送障害に関係すると考えられる。従って、PC-TPを制御する能力が疾患を防ぐ能力である。

【0008】

新規のリン脂質輸送タンパク質をコードする核酸分子の発見に基づき、細胞増殖、脂質の代謝及び輸送に関連する疾患の特徴付け・診断・予防・治療に有用な新規の組成物を提供する。

【0009】

(発明の要約)

本発明は、哺乳動物タンパク質であるリン脂質輸送タンパク質(PTP)をコードする核酸分子の発見に基づき、細胞増殖、脂質の代謝及び輸送に関連する疾患など症状の特徴付け・診断・予防・治療に有用な新規の組成物を提供することで当分野のニーズを満たす。

【0010】

本発明は、SEQ ID NO:1若しくはその断片(SEQ ID NO:3-11)を含む単離され精製された哺乳動物核酸分子を提供する。本発明はまた、配列表のSEQ ID NO:12-16として示されているラット由来の哺乳動物核酸分子に相同な断片を提供する。本発明は更に、SEQ ID NO:2のアミノ酸配列若しくはその一部をコードする実質的に精製された哺乳動物核酸分子を提供する。

【0011】

本発明はまた、高いストリンジェンシーの条件下で、SEQ ID NO:1の核酸配列とハイブリダイズする単離され精製された核酸分子若しくはその断片を提供する。本発明はまた、SEQ ID NO:1の核酸配列に相補的な単離され精製された核酸分子若しくはその断片を提供する。一実施態様では、一本鎖相補RNA若しくはDNA分子をプローブとして用いて、高いストリンジェンシーの条件下で、この哺乳動物核酸配列若しくはその断片とハイブリダイズさせる。

【0012】

本発明は更に、サンプルにおいて核酸分子を検出する方法であって、プローブをそのサンプルの少なくとも1つの核酸配列とハイブリダイズして、ハイブリダイゼーション複合体を形成するステップと、そのハイブリダイゼーション複合体を検出するステップとを含み、そのハイブリダイゼーション複合体の存在がそのサンプルにおける核酸配列の存在と相関する方法を提供する。一実施態様では、

この方法は、ハイブリダイゼーションの前にその核酸配列を増幅するステップを更に含む。この核酸分子若しくはその断片を、マイクロアレイ上のエレメント若しくは標的として用いることができる。本発明はまた、核酸配列若しくはその断片を用いて、その核酸配列と特異的に結合する少なくとも1つの分子を同定するべく、分子のライブラリをスクリーニングする方法であって、分子のライブラリを準備するステップと、特異的な結合が可能な条件下で、その核酸配列をその分子のライブラリと結合させるステップと、その特異的な結合を検出して、その核酸配列と特異的に結合する分子を同定するステップとを含むスクリーニング方法を提供する。このようなライブラリには、複製及び転写、翻訳の潜在的な調節因子となり得るDNA分子、RNA分子、ペプチド、PNA、タンパク質等が含まれる。

【0013】

本発明はまた、SEQ ID NO:1の核酸分子の少なくともある断片を含む発現ベクターを提供する。別の実施態様では、この発現ベクターは宿主細胞内に含まれている。

【0014】

本発明は更に、タンパク質が発現する条件下で宿主細胞を培養するステップと、そのタンパク質をその宿主細胞から回収するステップとを含むタンパク質生産方法を提供する。本発明はまた、SEQ ID NO:2のアミノ酸配列若しくはその一部を含む単離され精製されたタンパク質を提供する。更に、本発明は、医薬担体と共にSEQ ID NO:2のアミノ酸配列若しくはその一部を有する実質的に精製されたタンパク質を含む医薬組成物を提供する。

【0015】

本発明は更に、そのタンパク質の一部を用いて抗体を産生させる方法を提供する。本発明はまた、タンパク質若しくはその一部を用いて、そのタンパク質に特異的に結合する少なくとも1つの分子を同定するべく、分子のライブラリをスクリーニングする方法であって、分子のライブラリを準備するステップと、特異的な結合が許容される条件下で、そのタンパク質を分子のライブラリと結合させるステップと、その特異的な結合を検出して、そのタンパク質と特異的に結合する分子を同定するスクリーニング方法を提供する。一実施態様では、この方法で同定さ

れた分子がそのタンパク質の活性を調節する。別の類似の方法では、そのタンパク質若しくはその一部を用いてリガンドを精製する。

【0016】

本発明はまた、哺乳動物のゲノムDNAの中にマーカー遺伝子を挿入して、天然の哺乳動物核酸分子の発現を乱す方法を提供する。本発明はまた、SEQ ID NO:1を用いて哺乳動物モデル系を作製する方法であって、SEQ ID NO:1を含むベクターを作製するステップと、全能性哺乳動物胚性幹細胞の中にこのベクターを導入するステップと、ゲノムDNAの中にこのベクターが組み込まれた胚性幹細胞を選択するステップと、この選択した細胞を哺乳動物胚盤胞の中に微量注入して、キメラ胚盤胞を形成するステップと、偽妊娠メスにキメラ胚盤胞を移植するステップと、このメスが、生殖細胞系に少なくとも1つのSEQ ID NO:1の別の複製を含むキメラ哺乳動物を出産し、そのキメラ哺乳動物を交配して同型接合哺乳動物モデル系を作製するステップとを含む哺乳動物モデル系作製方法を提供する。

【0017】

(本発明の記載について)

本発明は、ここに開示した特定の装置及び材料、方法に限定されず、その実施形態を変更できることを理解されたい。また、ここで用いられる用語は、特定の実施例のみを説明する目的で用いるものであり、後述の請求の範囲によってのみ限定され、本発明の範囲を限定することを意図したものではないということも理解されたい。本明細書及び請求の範囲において単数形を表す「或る」、「その(この等)」は、文脈で明確に示していない場合は複数形を含むことに注意されたい。従って、例えば「或る宿主細胞」は当業者には周知の複数の宿主細胞を含む。

【0018】

本明細書で用いた全ての科学技術用語は、別の方法で定義されていない限り、本発明の属する技術分野の一般的な技術者が普通に解釈する意味と同じである。本明細書に記載の全ての文献は、本発明に関連して使用する可能性のある文献に記載された細胞系、プロトコル、試薬、ベクターを記述し開示するために引用した。従来の特許を引用したからと言って、本発明の新規性が損なわれると解釈さ

れるものではない。

【0019】

(定義)

「PTP」は、天然、合成、半合成或いは組み換え体などの全ての種(マウス、ウシ、ヒツジ、ブタ、齧歯類、イヌ、サルを含むが好ましくはヒトである哺乳動物)から得られる、実質的に精製されたタンパク質を指す。

【0020】

「生物学的に活性」は、構造的または免疫学的、調節的、化学的な機能を有する、天然或いは組み換え、または合成分子であるタンパク質を指す。

【0021】

「相補的な」は、プリン塩基とピリミジン塩基との自然な水素結合による塩基対形成を指す。例えば、配列A-C-G-Tは、その相補配列T-G-C-AまたはU-G-C-Aと水素結合する。2つの一本鎖分子の相補性は、ヌクレオチドの幾つかのみが結合する部分的な相補性と、ヌクレオチドの殆ど全てが結合する完全な相補性とがある。核酸鎖間の相補性の程度は、ハイブリダイゼーション及び増幅反応の効率及び強度に影響する。

【0022】

「誘導体」は、化学修飾された核酸分子やタンパク質配列を指す。分子の化学修飾には、アルキル基またはアシル基、アミノ基による水素の置換や、グリコシル化、ポリエチレングリコール化、または生物学的活性または分子の寿命を維持する或いは増大する類似の任意のプロセスが含まれる。

【0023】

「断片」は、有用な機能的特性を維持する核酸分子の任意の一部またはインサイトクローンを指す。有用な断片には、ハイブリダイゼーションや増幅技術、または複製や転写、翻訳の調節に有用なオリゴヌクレオチドを含む。

【0024】

「ハイブリダイゼーション複合体」は、プリン塩基とピリミジン塩基との間の水素結合の形成による2つの核酸分子の複合体を指す。

【0025】

「リガンド」は、核酸分子やタンパク質の相補部位に結合する任意の分子または化合物を指す。

【0026】

「調節する」は、分子または化合物と核酸分子かタンパク質の何れかとの特異的な結合によって、寿命や活性（生物学的または化学的、免疫学的）を変化させることを指す。

【0027】

「分子」は、物質や化合物と同義に用いる。このような分子は、本発明の核酸分子やタンパク質の活性を調節し、核酸及びタンパク質、炭水化物、脂肪、脂質を含む無機及び有機物質の少なくとも1つを含み得る。

【0028】

「核酸分子」は、核酸、オリゴヌクレオチド、ヌクレオチド、ポリヌクレオチド、またはそれらの任意の断片を指す。また、「核酸分子」は、ゲノム若しくは合成起源（cDNA）の二本鎖若しくは一本鎖のDNA或いはRNAであり、炭水化物または脂質、タンパク質、その他の物質と結合して、形質転換などの特定の作用を果たしたり、ペプチド核酸（PNA）等の有用な組成物の形成する。「オリゴヌクレオチド」は、アンプリマー（amplimer）及びプライマー、オリゴマー、エレメント、標的、プローブと実質的に同一であり、好ましくは一本鎖である。

【0029】

「タンパク質」は、天然或いは合成のアミノ酸、アミノ酸配列、オリゴペプチド、ペプチド、ポリペプチド、またはそれらの一部を指す。

【0030】

ここで用いる「一部」は、任意の目的に用いられるタンパク質の任意の一部を指すが、特に、その一部と特異的に結合する分子のライブラリのスクリーニングまたは抗体の産生に用いられる。

【0031】

「サンプル」は、その最も広い意味で用いられる。核酸を含むサンプルは、体液や、細胞抽出物、細胞から単離された染色体、細胞小器官、膜や、溶液中に遊離している或いは基板に結合されたゲノムDNAまたはRNA、cDNAや、組織、細胞、

組織プリント等を含み得る。

【0032】

本哺乳動物核酸分子またはタンパク質に「特異的に結合する」分子または化合物には、核酸、炭水化物、脂質、タンパク質、またはこの哺乳動物タンパク質の活性を安定させる或いは調節するその他の任意の有機分子や無機分子、またはそれらを組み合わせたものが含まれ得る。

【0033】

「実質的に精製された」は、その自然環境から切り離されてから分離或いは単離された、自然の状態では共に存在するその他の成分が少なくとも約60%、好適には約75%、最も好適には、約90%取り除かれた、核酸分子若しくはアミノ酸配列を指す。

【0034】

「基板」は、核酸分子またはタンパク質が結合した任意の固体或いは半固体の支持物を指し、膜またはフィルター、チップ、スライド、ウエハ、ファイバー、磁気または非磁気ビーズ、ゲル、毛細管または他のチューブ、プレート、ポリマー、微小粒子が含まれる。この基板は、孔または溝、ピン、チャンネル、細孔を含む様々な表面形態を有する。

【0035】

(発明)

本発明は、哺乳動物タンパク質であるリン脂質輸送タンパク質(PTP)をコードする新規の哺乳動物核酸分子の発見に基づいた、細胞増殖、脂質の代謝及び輸送に関連した疾患などの病態の特徴付け・診断・治療・予防に関連する。

【0036】

本発明の哺乳動物タンパク質をコードする核酸は、ラット(オス)生殖組織で異なって発現したラット肝ライブラリ(RALINOT01)からのインサイト社クローン700137522 (SEQ ID NO:15)を用いてBLASTで同定された。コンセンサス配列SEQ ID NO:1は、インサイト社クローン3591822F6、745516R6、1807728F6、1772859H1、1505466H1、798614H1、4114738H1、1923871H1、及び2013709H1 (SEQ ID NO:3-11)の核酸断片を重複及び/または伸長して構築した。図1A - 図1Eは、コン

センサス配列であるSEQ ID NO:1及びその翻訳を示す。

【0037】

一実施例では、SEQ ID NO:2のアミノ酸配列からなるタンパク質 (PTP) は、アミノ酸291個の長さであり、N44及びN147、N201残基における3個の潜在的なNグリコシル化部位と、S35及びT81、S271、S284残基における4個の潜在的なカゼインキナーゼIIリン酸化部位と、S32及びS118、T132、S149残基における4個の潜在的なプロテインキナーゼCリン酸化部位とを有する。SEQ ID NO:2のH66～A79残基またはL82～S149残基からなるオリゴペプチドは、リガンドの精製や抗体の産生に有用である。このタンパク質は、マウス肺PC-TP (GI 897786; SEQ ID NO:17) と化学的及び構造的な類似性を有する。特に、図2に示されているように、PTPとマウス肺PC-TPタンパク質は31%の同一性を有し、PTPのH66～Y222残基の類似性は52%である (図2を参照)。

【0038】

表1は、ヒト及びラット由来の核酸断片、それらの適用範囲、及びSEQ ID NO:1との同一性 (%) を示す。列1及び列2はそれぞれ、核酸断片に対応するSEQ ID NOの番号及びインサイト社クローン番号を示す。SEQ ID NO:1の断片であるSEQ ID NO:3-11は、ここで開示するSEQ ID NO:12-16を含む類似配列と本発明の哺乳動物タンパク質とを同一と見なす、または区別するためのハイブリダイゼーションまたは増幅技術に有用である。列3は、各断片のヌクレオチドの長さを示す。列4及び5はそれぞれ、断片が由来する生物名、及び断片が単離されたインサイト社のcDNAライブラリを示す。列6は、各断片が同一性を示すSEQ ID NO:1におけるヌクレオチド残基の適用範囲を示す。列7は、各断片と列6に示したSEQ ID NO:1におけるヌクレオチド残基の適用範囲との間の配列同一性 (%) を示す。

【0039】

ラット由来のSEQ ID NO:12-16からなる各哺乳動物断片は、SEQ ID NO:1或いはSEQ ID NO:3-11の1つを用いて同定された。これらの任意の断片をハイブリダイゼーション及び増幅技術に用いて、サンプルにおける類似配列とSEQ ID NO:1とを同一と見なす、または区別することができる。これらの配列を用いて、ヒ

トの病態や疾患を模倣する遺伝子組み換え動物を作製して、動物毒性検査、臨床検査、及び被験体/患者の治療経過をモニタリングすることができる。ノーザン分析によって、この配列が様々なライブラリ、特に生殖組織(32%)、胃腸組織(28%)、神経組織(15%)のライブラリで発現することが示された。細胞増殖、脂質の代謝及び輸送に関連した症状の組織を用いた各ライブラリでPTPが発現することに注目されたい。

【0040】

(本発明の特徴及び使用)

cDNAライブラリ

ここに開示する特定の実施例では、当分野で周知の方法を用いて哺乳動物の細胞及び組織からmRNAを単離し、これを用いてcDNAライブラリを作製する。上記したインサイト社クローンは、哺乳動物cDNAライブラリから単離された。本発明の代表的な少なくとも1つのライブラリの作製方法を以降に記載する実施例に示す。コンセンサス哺乳動物配列は、AUTOASSEMBLERアプリケーション(PE Biosystems, Foster City CA)などのコンピュータプログラムを用いて、インサイト社クローンを含む断片、伸長、及び/またはショットガン配列から化学的かつ/または電子的に構築した。

【0041】

シーケンシング

核酸をシーケンシングする方法は当分野で周知であり、そのような方法を用いて本発明の任意の実施例を実施することができる。これらの方法は、DNAポリメラーゼIであるクレノウフラグメント、SEQUENASE DNAポリメラーゼ、Taq DNAポリメラーゼ、及びTHERMOSEQUENASE DNAポリメラーゼ(Amersham Pharmacia Biotech (APB), Picataway NJ)等の酵素を用いるか、或いはELONGASE増幅システム(Life Technologies, Rockville MD)に用いられるような校正エクソヌクレアーゼとポリメラーゼとの組み合わせを用いることができる。配列の準備は、HYDRAマイクロディスペンサー(Robbins Scientific, Sunnyvale CA)、MICROLAB 2200システム(Hamilton, Reno NV)、及びDNA ENGINEサーマルサイクラー(PTC 200; MJ Research, Watertown MA)などの装置を用いて自動的に行うのが望まし

い。シーケンシングに用いる装置には、ABI 3700、377または373DNAシーケンシングシステム (PE Biosystems)、及びMEGABACE 1000 DNAシーケンシングシステム (APB) 等がある。当分野で周知の様々なアルゴリズムを用いて、シーケンシングした配列を解析することができる。これらのアルゴリズムは、Ausubel(1997; *Short Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York NY, unit 7.7) 及びMeyers(1995; *Molecular Biology and Biotechnology*, Wiley VCH, New York NY, pp. 856-853)に記載されている。

【0042】

ショットガンシーケンシングを用いて、多数の生物に由来するクローニング挿入断片からより多くの配列を作り出す。ショットガンシーケンシング方法は当分野で周知であり、熱耐性DNAポリメラーゼ類や非熱耐性DNAポリメラーゼ類、及び目的の核酸分子に隣接する代表的な領域から選択されたプライマーを用いる。当分野で周知の様々なアルゴリズムやプログラム (Gordon (1998) *Genome Res.* 8:195-202) を用いて、プレフィニッシュ配列 (構築が不完全な配列) を調べる。ベクターやキメラ配列、または欠失配列を含む汚染配列を除去して、プレフィニッシュ配列を完全な配列に構築する。

【0043】

本発明の配列は、当分野で周知の様々なPCR法を用いた方法で伸長することができる。例えば、XL-PCRキット(PE Biosystems)及び入れ子プライマー (nested primer)、市販のcDNAまたはゲノムDNAライブラリ (Life Technologies; Clontech, Palo Alto CA, respectively) 用いてヌクレオチド配列を伸長することが可能である。全てのPCR系の方法に用いることができるように、プライマーは、OLIGO 4.06ソフトウェア (National Biosciences, Plymouth MN) 等の市販のソフトウェアを用いて、ヌクレオチドの長さが約22~30個、GC含量が約50%以上、約55~68 の温度で標的配列とアニールするように設計することが可能である。調節エレメントを復活させるために配列を伸長する場合は、cDNAライブラリよりゲノムライブラリを用いる方が良い。

【0044】

(本哺乳動物核酸分子の使用)

ハイブリダイゼーション

SEQ ID NO:1の核酸分子及びその断片は、様々な目的のための様々なハイブリダイゼーション技術に用いることができる。ハイブリダイゼーションプローブは、SEQ ID NO:1の一部を用いる、或いはSEQ ID NO:1から設計することができる。このようなプローブは、5'調節領域などの極めて特殊な領域或いは保存されたモチーフから作製可能であり、これらのプローブを、この哺乳動物タンパク質やアレル変位配列、または関連分子をコードする天然の分子を同定するためのプロトコルに用いることができる。これらのプローブの配列は、任意のこのタンパク質の配列と少なくとも50%の配列同一性を有することが望ましい。本発明のハイブリダイゼーションプローブには、SEQ ID NO:1の分子に由来するか、或いはこの哺乳動物遺伝子のプロモーター及びエンハンサー、イントロンを含むゲノム配列に由来するDNA若しくはRNAを用いることができる。ハイブリダイゼーションプローブ或いはPCRプローブは、標識されたヌクレオチドの存在下でのPCR増幅、オリゴ標識化、ニックトランスレーション法、または末端標識化を利用して作製することができる。この核酸分子を含むベクターを用いて、RNAポリメラーゼ及び標識したヌクレオチドを加えてin vitroでmRNAプローブを作製することができる。これらの方法はAPB社が販売するキットを用いて行うことができる。

【0045】

ハイブリダイゼーションのストリンジェンシー（厳密性）は、プローブのGCの含量、塩濃度、及び温度によって決まる。特に、塩濃度を下げる、またはハイブリダイゼーションの温度を上げて、ストリンジェンシーを高めることができる。ある膜系のハイブリダイゼーション用の溶液にホルムアミドなどの有機溶媒を加えて、反応が低い温度で起こるようにすることができる。ハイブリダイゼーションは、低いストリンジェンシーの緩衝液（5xSSC、1%のドデシル硫酸ナトリウム（SDS））で、60℃で行うことができるが、核酸配列間に不適正塩基対を含む複合体の形成を許容し得る。続く洗浄は、45℃（中程度のストリンジェンシー）或いは68℃（高いストリンジェンシー）の何れかの温度、0.2xSSC、0.1% SDSなどの高いストリンジェンシーで行う。高いストリンジェンシーでは、ハイブリダイゼーション複合体は、完全に相補的な核酸配列部分のみが安定して保持される。

ある膜系のハイブリダイゼーションにおいて、好ましくは35%、最も好ましくは50%のホルムアミドをハイブリダイゼーション溶液に加えて、ハイブリダイゼーションを行う温度を下げたり、または、SarkosylやTriton X-100などの界面活性剤及び変性したサケ精子DNAなどのブロッキング試薬を用いてバックグラウンドシグナルを低減することが可能である。ハイブリダイゼーションの条件や要素の選択については当分野で周知であり、Ausubel (supra) 及びSambrook他(1989) *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Plainview N Y. に記載されている。

【0046】

当分野で周知の方法でマイクロアレイを準備して分析することができる。オリゴヌクレオチドをマイクロアレイのプロブや標的として用いることができる。マイクロアレイを用いて、同時に極めて多数の遺伝子の発現レベルをモニタリングし、遺伝子変異体、突然変異及びSNP（一塩基多型）を同定することができる。このようなデータを用いて、遺伝子機能の解明や、症状及び疾患、または障害における遺伝子原理の解明や、症状及び疾患、障害の診断または治療、治療薬の開発、並びにこれらの治療薬の活性のモニタリングが可能である（例えば、Brennan他(1995) USPN 5,474,796; Schena他(1996) Proc. Natl. Acad. Sci. 93:10614-10619; Baldeschweiler他(1995) PCT出願 W095/251116; Shalon他(1995) PCT出願W095/35505; Heller他(1997) Proc. Natl. Acad. Sci. 94:2150-2155; and Heller他(1997) USPN 5,605,662を参照）。

【0047】

ハイブリダイゼーションプロブはまた、天然のゲノム配列のマッピングに有用である。この配列は、特定の染色体または染色体の特定の領域、或いは、例えばヒト人工染色体（HAC）や酵母人工染色体（YAC）、細菌人工染色体（BAC）、細菌P1作製物、または単一の染色体DNAライブラリなどの人工染色体作製物にマッピングすることができる。

【0048】

発現

この哺乳動物タンパク質をコード可能な多数の核酸分子をベクターにクローニ

ングして、このタンパク質若しくはその一部を宿主細胞で発現させることができる。このヌクレオチド配列を、DNAシャフリング (Stemmer and Cramer (1996) USPN5,830,721) や部位特異的変異誘発などの方法によって、新規の制限部位を作り出したり、グリコシル化パターンを変えたり、優先コドンを変えて特定の宿主における発現を増大させたり、スプライスバリエーションを作り出したり、半減期を延長する等の操作が可能である。この発現ベクターは、特定の宿主における各要素の効率に基づいて選択された様々なサンプルに由来する転写及び翻訳調節エレメント (プロモーター及びエンハンサー、特定の開始シグナル、3'非翻訳領域) を含み得る。in vitro組み換えDNA技術、合成技術及び/またはin vivo遺伝子組み換え技術を組み合わせて、このベクターに核酸配列と調節エレメントをつなぐことができる。このような技術は、当分野で周知であり、Sambrook(前出、ch. 4, 8, 16 and 17)に記載されている。

【0049】

様々な宿主系を発現ベクターで形質転換することができる。以下に限定するものではないが、これらの中には組み換えバクテリオファージやプラスミド、またはコスミドDNA発現ベクターで形質転換された細菌と、酵母発現ベクターで形質転換された酵母と、バキュロウイルス発現ベクターで形質転換された昆虫細胞系と、ウイルスエレメント及び/または細菌エレメントを含む発現ベクターで形質転換された植物細胞系や動物細胞系が含まれる (Ausubel前出、unit 16)。例えば、アデノウイルス転写/翻訳複合体を哺乳動物細胞に用いることができる。配列をウイルスのゲノムのE1若しくはE3領域に結合させ、この感染ウイルスを用いて形質転換させ、宿主細胞でタンパク質を発現させることができる。また、ラウス肉腫ウイルスエンハンサーやSV40、またはEBV系のベクターを用いてタンパク質を高発現させることができる。

【0050】

核酸配列のルーチンのクローニング及びサブクローニング、増殖は、多機能PB LUESCRIPTベクター (Stratagene, La Jolla CA) またはPSPORT1プラスミド (Life Technologies) を用いて行うことができる。核酸配列をこれらのベクターの多数のクローニング部位に導入すると、lacZ遺伝子が破壊され、形質転換された細

菌を確認するための比色法によるスクリーニングが可能となる。更に、これらのベクターは、クローニングされた配列における *in vitro*での転写及びジデオキシ法によるシーケンシング、ヘルパーファージによる一本鎖の調整、入れ子状欠失の作製において有用である。

【0051】

長期に渡って組み換えタンパク質を産生させるために、同一或いは別のベクター上の選択マーカ―遺伝子或いは可視マーカ―遺伝子と共にこのベクターを持続的に細胞株に形質転換することができる。形質転換後、細胞を強化培地で約1～2日間増殖させてから選択培地に移す。代謝拮抗物質、抗生物質、除草剤耐性遺伝子を含む選択マーカ―は、適正な選択薬剤に対する抵抗性を与え、導入配列を確実に発現する細胞の増殖及び回収が可能となる。アントシアニン、緑色蛍光タンパク質(GFP)、グルクロニダーゼ、ルシフェラーゼなどの可視マーカ―の発現によって同定された、或いは選択培地に生存することによって同定された耐性クローンを、培養技術を用いて増殖することができる。また、可視マーカ―を用いて、導入された遺伝子によって発現するタンパク質を定量することができる。宿主細胞が目的の哺乳動物核酸分子を含むか否かの決定は、DNA-DNAまたはDNA-RNAハイブリダイゼーション、或いはPCR増幅技術に基づいて行うことができる。

【0052】

宿主細胞は、組み換えタンパク質を目的の形に修飾する能力に基づいて選択することができる。このような修飾には、アセチル化及びカルボキシル化、グリコシル化、リン酸化、脂質化、及びアシル化等が含まれる。「プレプロ」型を切断する翻訳後プロセッシングを利用して、タンパク質のターゲッティング、折り畳み及び/または活性を特定することができる。翻訳後活性のための特定の細胞装置及び特徴的な機構を有する異なった宿主細胞(American Type Culture Collection, Manassas VAが販売)を選択して、組み換えタンパク質の正確な修飾及びプロセッシングを確実にすることが可能である。

【0053】

細胞培地からのタンパク質の回収

精製を容易にするために、ベクターに導入する異種部分は、グルタチオンSトランスフェラーゼ (GST)、カルモジュリン結合ペプチド (CBP)、6-His、FLAG、MYC等を含む。GST及びCBP、6-Hisはそれぞれ、グルタチオン及びカルモジュリン、金属キレート樹脂が結合した市販のアフィニティマトリックスを用いて精製される。FLAG及びMYCは、市販のモノクローナル抗体及びポリクローナル抗体を用いて精製される。目的のタンパク質配列と異種部分との間にタンパク分解切断部位を設けて、生成の後の分離が容易にすることができる。組み換えタンパク質の発現及び精製の方法はAusubel(前出、unit 16)に記載され市販されている。

【0054】

ペプチドの化学合成

タンパク質若しくはその一部は、組み換え方法以外の当分野で周知の化学的方法によって合成することもできる。固相技術を用いるペプチド合成は、バッチ式或いは連続的なフロープロセスによって行うことができる。連続的なフロープロセスでは、アミノ保護及び側鎖保護アミノ酸残基をリンカーを介して不溶性の高分子支持物に連続的に追加する。メチルアミン誘導体化ポリエチレングリコールなどのリンカーを、ポリ(スチレン-co-ジビニルベンゼン)に結合させて支持レジン形成する。このアミノ酸残基は、酸不安定Boc(t-butylloxycarbonyl)法若しくは塩基不安定Fmoc(9-fluorenylmethoxycarbonyl)法によって保護されたN-である。保護されたアミノ酸のカルボキシル基をリンカーのアミンに結合して、この残基を固相支持レジンに結合させる。Boc若しくはFmocを用いた場合、トリフルオロ酢酸若しくはピペリジンを用いて保護基を除去する。カップリング試薬若しくは予め活性化されたアミノ酸誘導体を用いて、追加する各アミノ酸を結合された残基に付加してから、レジンを洗浄する。完全長のペプチドは、連続的な保護の停止、即ち誘導体化アミノ酸を結合させて合成し、ジクロロメタン及び/またはN、N-ジメチルホルムアミドで洗浄する。このペプチドは、ペプチドカルボキシル末端とリンカーとの間で切断され、ペプチド酸またはペプチドアミドが作られる (Novabiochem 1997/98 Catalog and Peptide Synthesis Handbook, San Diego CA pp. S1-S20)。ABI 431 A ペプチドシンセサイザー (PE Biosystems) などの装置を用いて、ペプチドを自動合成することができる。タンパク質

またはその一部は調整用の高性能液体クロマトグラフィーによって実質的に精製し、その組成をアミノ酸解析またはシーケンシングによって確認することができる (Creighton (1984) *Proteins. Structures and Molecular Properties*, WH Freeman, New York NY)。

【0055】

抗体の準備及びスクリーニング

ヤギ及びウサギ、ラット、マウス、ヒト等を含む様々な宿主は、哺乳動物タンパク質若しくはその任意の一部を注入して免疫することができる。フロイントなどのアジュバント及びミネラルゲルと、リゾレシチン及びpluronic polyol、ポリアニオン、ペプチド、油乳剤、キーホールリンペットヘモシニアン(KLH)、ジニトロフェノールなどの表面活性物質とを用いて免疫反応を高めることができる。オリゴペプチドやペプチド、またはタンパク質の一部を用いて、少なくとも約5個のアミノ酸、より好ましくは10個の天然のタンパク質の一部と同一のアミノ酸を含む抗体を誘発させる。キメラ分子に対する抗体を産生させるために、オリゴヌクレオチドをKLHなどのタンパク質と融合させることができる。

【0056】

モノクローナル抗体は、培地の連続細胞株によって抗体を産生させる任意の技術を用いて準備する。以下に限定するものではないが、このような技術には、ハイブリドーマ技術及びヒトB細胞ハイブリドーマ技術、EBV-ハイブリドーマ技術が含まれる (例えば、Kohler他(1975) *Nature* 256:495-497; Kozbor他(1985) *J. Immunol. Methods* 81:31-42; Cote他(1983) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80:2026-2030; and Cole他(1984) *Mol. Cell Biol.* 62:109-120.を参照)。

【0057】

別法では、当分野で周知の方法を用いる上記した一本鎖抗体を生産する技術で、エピトープ特異的一本鎖抗体を生産する。本哺乳動物タンパク質のエピトープに対して特異的に結合する部位を含む抗体断片を生産することが可能である。限定するものではないが、このような断片には、例えば、抗体分子のペプシン消化によって作製されたF(ab')₂断片及びこのF(ab')₂断片のジスルフィド架橋を減少させて作製したFab断片が含まれる。別法では、Fab発現ライブラリを作製して、

目的の特異性を有するモノクローナルFab断片の高速かつ容易に同定できるようにする（例えば、Huse他(1989) Science 246:1275-1281を参照）。

【0058】

本哺乳動物タンパク質を用いて、ファージミドまたはBリンパ球免疫グロブリン・ライブラリをスクリーニングして、目的の特異性を有する抗体を同定する。確立された特異性を有するモノクローナル抗体或いはポリクローナル抗体のいずれか一方を用いる、競合的結合またはイムノアッセイの様々なプロトコルが当分野で周知である。このようなイムノアッセイは通常、このタンパク質とその特異的な抗体との複合体形成の測定を行う。2つの非干渉エピトープに反応するモノクローナル抗体を用いる2部位モノクローナル系イムノアッセイが好ましいが、競合的結合によるアッセイを用いることもできる（Pound (1998) *Immunochemical Protocols*. Humana Press, Totowa NJ）。

【0059】

多様な標識化及び接合技術は当分野で周知であり、様々な核酸やアミノ酸、及び抗体のアッセイに用いることができる。標識した分子の合成は、 ^{32}P -dCTPまたはCy3-dCTP、Cy5-dCTP（APB）などの標識したヌクレオチドや ^{35}S メチオニン（APB）などのアミノ酸を組み込むためのAPBキットまたはPromega（Madison WI）を用いて行うことができる。核酸及びアミノ酸は、BIODIPYまたはFITC（Molecular Probes, Eugene OR）などの試薬を用いて分子中に存在するアミン及びチオール基または他の基に化学的に結合させることで、様々な物質（蛍光剤または化学発光剤、色素産生剤など）で直接標識することができる。

【0060】

（診断）

本核酸分子、断片、オリゴヌクレオチド、相補的なRNA及びDNA分子、PNAを用いて、遺伝子発現の変化やmRNAの過剰な発現の不在/存在を検出及び定量、または治療期間中のmRNAレベルのモニタリングを行うことができる。発現の変化に関連する症状や疾患、または異常症の中には、限定するものではないが、日光性角化症及びアテローム性動脈硬化、滑液包炎、硬変、肝炎、混合型結合組織病、骨髓線維症、発作性夜間ヘモグロビン尿症、真性多血症、乾癬、原発性血小板血症

や、腺癌及び白血病、リンパ腫、黒色腫、骨髄腫、肉腫、奇形癌を含む癌や、脂肪肝、胆汁うっ滞、原発性胆汁性肝硬変、カルニチン欠乏症、カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ欠乏症 (carnitine palmitoyltransferase deficiency)、ミオアデニレートデミナーゼ欠乏症 (myoadenylate deaminase deficiency)、高トリグリセリド血症や、脂質貯蔵病、例えば、ファブリー病及びゴーシェ病、ニーマンピック病、変染色性白質ジストロフィー、副腎性白質ジストロフィー、 G_{M2} にガングリオシドーシス、セロイドリポフスチン症、無リポ蛋白血症、タンジアー病、リポ蛋白過剰血症、糖尿病、脂肪異栄養症、脂肪腫症、急性皮下脂肪組織炎、播種性脂肪組織壊死症、有痛脂肪症、リポイド副腎過形成、リポイドネフローズ、脂肪腫、アテローム性動脈硬化症、高コレステロール血症、高トリグリセリド血症を伴った高コレステロール血症、原発性低リポ蛋白血症 (primary hypoalphalipoproteinemia)、低甲状腺症 (hypothyroidism)、腎臓病、肝疾患、レシチン-コレステロールアシルトランスフェラーゼ欠損症、脳腱黄色腫症、低コレステロール血症、テイサックス病、サンドホフ病、高脂血症、脂肪過剰血症、脂質筋障害、肥満症や、運動不能症、筋萎縮性側索硬化症、毛細血管拡張性運動失調、嚢胞性線維症、ベッカー筋ジストロフィー、顔面神経麻痺、シャルコーマリーツース病、糖尿病、尿崩症、糖尿病性ニューロパシー、デュシェンヌ型筋ジストロフィー、高カリウム血性周期性四肢麻痺、正常カリウム血性周期性四肢麻痺、パーキンソン病、悪性高熱、多剤耐性疾患、重症筋無力症、筋緊張性異栄養症、緊張病、錐体外路性終末欠陥症候群、ジストニー、末梢神経疾患、脳腫瘍や、口峽炎及び徐脈型不整脈、頻拍性型不整脈、高血圧症、遺伝性QT延長症候群、心筋炎、心筋症、ネマリンミオパシーラネマリン筋障害、中心核ミオパシー、脂質ミオパシー (lipid myopathy)、ミトコンドリアミオパシー、甲状腺中毒性ミオパシー、エタノールミオパシー (ethanol myopathy)、皮膚筋炎、封入体筋炎、感染性節炎、多発性筋炎などの輸送に関連した心疾患や、アルツハイマー病、健忘症、双極性障害、痴呆、うつ病、癲癇、トゥレット症候群、妄想性精神病、分裂病などの輸送に関連する神経疾患や、輸送に関連するその他の疾患、例えば、神経線維腫症、帯状疱疹後神経痛、3叉神経ニューロパシー、サルコイドーシス、鎌状赤血球性貧血、ウィルソン病、白内障、不妊

症、肺動脈狭窄症、常染色体性感音難聴 (sensorineural autosomal deafness) 、高血糖症、低血糖症、グレーブス病、甲状腺腫、クッシング病、副腎機能不全、グルコース ガラクトース吸収不全症候群、高コレステロール血症、副腎性白質ジストロフィー、Zellweger症候群、メンケス症候群、後角症候群、フォンギルケ病、シスチン尿症、イミノグリシン尿症、Hartup病、ファンコニ病、特に副腎及び膀胱、骨、骨髄、脳、乳房、頸部、胆嚢、神経節、胃腸管、心臓、腎臓、肝臓、肺、筋肉、卵巣、膵臓、副甲状腺、陰茎、前立腺、唾液腺、皮膚、脾臓、精巣、胸腺、甲状腺、子宮の癌が含まれる。ハイブリダイゼーションまたは増幅技術を診断アッセイに用いて、遺伝子発現の変化を検出するべく、患者からの生体サンプルの遺伝子発現レベルを標準的なサンプルの値と比較する。質的または量的なこのような比較法は当分野で周知である。

【0061】

例えば、ヌクレオチド配列を標準的な方法で標識して、これをハイブリダイゼーション複合体の形成に好適な条件下で、患者からの生体サンプルに加える。インキュベーションの後、このサンプルを洗浄し、標識或いはそのシグナルの量を定量して標準値と比較する。患者のサンプルにおける標識の量が標準値と著しく異なっている場合は、関連する症状や疾患、または異常症の存在が示唆される。

【0062】

遺伝子発現に関連する症状や疾患、または異常症の診断のための基準を設けるために、正常或いは標準的な発現プロフィールを確立する。この発現プロフィールは、動物かヒトの正常な被験体から採取した生体サンプルを、ハイブリダイゼーションまたは増幅に好適な条件下で、ある配列またはその断片と結合させることによって確立することができる。標準的なハイブリダイゼーションは、正常な被験体から得た値と、実質的に生成された核酸分子を所定量用いた実験値とを比較することによって定量することができる。このように求めた標準値を、特定の症状や疾患、または異常症を示す患者のサンプルから得た値と比較することができる。標準値と特定の症状に関連する値との偏差からその症状を診断する。

【0063】

またこのようなアッセイを用いて、動物実験や臨床検査における特定の治療計

画の効果を評価したり、患者個人の治療をモニタリングすることができる。病態が確認されると治療プロトコルを開始し、通常ベースで診断アッセイを繰り返して、被験者における発現のレベルが正常な患者に示される値に近づき始めたか否かを調べることが可能である。連続して行ったアッセイの結果から、数日から数ヶ月に渡る期間の治療効果を調べることができる。

【0064】

免疫学的方法

特異的なポリクローナル抗体若しくはモノクローナル抗体の何れかを用いるタンパク質の検出及び定量は当分野で周知である。このような技術には、ELISA（酵素結合免疫吸着検定法）及びラジオイムノアッセイ（RIA）、蛍光活性化セルソーター法（FACS）が含まれる。2つの非干渉エピトープに反応するモノクローナル抗体を用いる2部位モノクローナル系イムノアッセイが好ましいが、競合的結合アッセイを用いることもできる（例えば、Coligan 他（1997）Current Protocols in Immunology, Wiley-Interscience, New York NY; and Poundを参照）。

【0065】

（治療）

ラット由来のリン脂質のある領域とPTPのある領域との間に、例えば配列及びモチーフの文脈において、化学的及び構造的類似性が存在する。更に、遺伝子の発現は、生殖組織及び胃腸組織、神経組織に密接に関連し、細胞増殖、脂質の代謝及び輸送に関連する疾患の症状にある役割を果たすと考えられる。発現若しくは活性の増大に関連する症状の治療においては、発現またはタンパク質の活性を低下させることが望ましい。また、発現または活性の低下に関連する症状の治療においては、発現またはタンパク質の活性を増大させることが望ましい。

【0066】

一実施例において、本哺乳動物タンパク質の発現または活性の変化に関連する症状の治療または予防のために、患者にこの哺乳動物タンパク質またはその断片や誘導体を投与することが可能である。限定するものではないがこのような疾患の例には、日光性角化症及びアテローム性動脈硬化、滑液包炎、硬変、肝炎、混

合型結合組織病、骨髄線維症、発作性夜間ヘモグロビン尿症、真性多血症、乾癬、原発性血小板血症や、腺癌及び白血病、リンパ腫、黒色腫、骨髄腫、肉腫、奇形癌を含む癌や、脂肪肝、胆汁うっ滞、原発性胆汁性肝硬変、カルニチン欠乏症、カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ欠乏症 (carnitine palmitoyltransferase deficiency)、ミオアデニレートデミナーゼ欠乏症 (myoadenylate deaminase deficiency)、高トリグリセリド血症や、脂質貯蔵病、例えば、ファブリー病及びゴーシェ病、ニーマンピック病、変染色性白質ジストロフィー、副腎性白質ジストロフィー、 G_{M2} にガングリオシドーシス、セロイドリポフスチン症、無リポ蛋白血症、タンジアー病、リポ蛋白過剰血症、糖尿病、脂肪異栄養症、脂肪腫症、急性皮下脂肪組織炎、播種性脂肪組織壊死症、有痛脂肪症、リポイド副腎過形成、リポイドネフローゼ、脂肪腫、アテローム性動脈硬化症、高コレステロール血症、高トリグリセリド血症を伴った高コレステロール血症、原発性低リポ蛋白血症 (primary hypoalphalipoproteinemia)、低甲状腺症 (hypothyroidism)、腎臓病、肝疾患、レシチン-コレステロールアシルトランスフェラーゼ欠損症、脳腱黄色腫症、低コレステロール血症、テイサックス病、サンドホフ病、高脂血症、脂肪過剰血症、脂質筋障害、肥満症や、運動不能症、筋萎縮性側索硬化症、毛細血管拡張性運動失調、嚢胞性線維症、ベッカー筋ジストロフィー、顔面神経麻痺、シャルコーマリーツース病、糖尿病、尿崩症、糖尿病性ニューロパシー、デュシェンヌ型筋ジストロフィー、高カリウム血性周期性四肢麻痺、正常カリウム血性周期性四肢麻痺、パーキンソン病、悪性高熱、多剤耐性疾患、重症筋無力症、筋緊張性異栄養症、緊張病、錐体外路性終末欠陥症候群、ジストニー、末梢神経疾患、脳腫瘍や、口峽炎及び徐脈型不整脈、頻拍性型不整脈、高血圧症、遺伝性QT延長症候群、心筋炎、心筋症、ネマリンミオパシー、ラネマリン筋障害、中心核ミオパシー、脂質ミオパシー (lipid myopathy)、ミトコンドリアミオパシー、甲状腺中毒性ミオパシー、エタノールミオパシー (ethanol myopathy)、皮膚筋炎、封入体筋炎、感染性節炎、多発性筋炎などの輸送に関連した心疾患や、アルツハイマー病、健忘症、双極性障害、痴呆、うつ病、癲癇、トゥーレット症候群、妄想性精神病、分裂病などの輸送に関連する神経疾患や、輸送に関連するその他の疾患、例えば、神経線維腫症、帯状疱疹後神経

痛、3叉神経ニューロパシー、サルコイドーシス、鎌状赤血球性貧血、ウィルソン病、白内障、不妊症、肺動脈狭窄症、常染色体性感音難聴 (sensorineural autosomal deafness)、高血糖症、低血糖症、グレーブス病、甲状腺腫、クッシング病、副腎機能不全、グルコース ガラクトース吸収不全症候群、高コレステロール血症、副腎性白質ジストロフィー、Zellweger症候群、メンケス症候群、後角症候群、フォンギルケ病、シスチン尿症、イミノグリシン尿症、Hartup病、ファンコニ病、特に副腎及び膀胱、骨、骨髄、脳、乳房、頸部、胆嚢、神経節、胃腸管、心臓、腎臓、肝臓、肺、筋肉、卵巣、膵臓、副甲状腺、陰茎、前立腺、唾液腺、皮膚、脾臓、精巣、胸腺、甲状腺、子宮の癌が含まれる。

【0067】

別の実施例では、医薬用担体と共に実質的に精製された哺乳動物タンパク質を含む医薬組成物を患者に投与して、限定するものではないが上記した疾患を含むこの哺乳動物タンパク質の寿命や活性、または発現の変化に関連する症状の治療または予防を行うことが可能である。

【0068】

更なる実施例では、この哺乳動物タンパク質の活性を調節するリガンドを患者に投与して、限定するものではないが上記した疾患を含むこのタンパク質の寿命や発現、または活性の変化に関連する症状の治療または予防を行うことが可能である。一実施態様では、この哺乳動物タンパク質に特異的に結合する抗体を、この哺乳動物タンパク質を発現する組織や細胞に薬剤を送達するためのターゲティング或いは送達機構として用いることもできる。

【0069】

更なる実施例では、この哺乳動物タンパク質またはその一部や誘導体を発現可能なベクターを患者に投与して、限定するものではないが上記した疾患を含むこのタンパク質の寿命や発現、または活性の変化に関連する症状の治療または予防を行うことが可能である。

【0070】

更なる実施例では、この核酸分子やその断片の相補配列を発現するベクターを患者に投与して、限定するものではないが上記した疾患を含むこのタンパク質の

寿命や発現、または活性の変化に関連する症状の治療または予防を行うことが可能である。

【0071】

この核酸分子やその断片、またはタンパク質やその一部の任意のもの、これらの分子を運ぶベクター、及びそれらのリガンドをその他の薬剤と共に投与することが可能である。併用療法に用いる薬剤の選択は、当業者が従来薬学原理に従って行うことができる。薬剤を併用することによって、少量の各薬剤で特定の症状の予防または治療において相乗的な効果をあげることが可能である。

【0072】

核酸を用いる遺伝子発現の調節

遺伝子の発現は、この哺乳動物遺伝子の5'又は3'調節領域、或いは他の調節領域に対して相補的な配列或いはアンチセンス分子(DNAまたはRNA、PNA)を設計し、これを用いて調節することができる。転写開始部位を用いて設計したオリゴヌクレオチドが望ましい。同様に、ポリメラーゼまたは転写因子、調節分子の結合を阻止する三重らせん塩基対合を用いて、遺伝子発現を阻止することができる(Gee他 In: Huber and Carr (1994) *Molecular and Immunologic Approaches*, Futura Publishing, Mt. Kisco NY, pp. 163-177.)。また、相補的な配列を設計し、リボソームとmRNAとの結合を阻害して翻訳を阻害することができる。別法では、核酸分子又はその断片のライブラリをスクリーニングして、翻訳されない調節配列に特異的に結合するものを同定することが可能である。

【0073】

RNA酵素分子であるリボザイムは、RNAの特異的な切断を触媒するために用いることができる。リボザイムの作用には、リボザイム分子と相補的な標的RNAとの配列特異的なハイブリダイゼーション、及びそれに続くGUA及びGUU、GUCなどの部位におけるヌクレオチド鎖切断が含まれる。このような部位が同定された場合、同じ配列を有するオリゴヌクレオチドの、そのオリゴヌクレオチド機能を不全にする二次構造特性を調べることができる。候補標的の適性は、リボヌクレアーゼ保護アッセイを用いて、相補的なオリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーションを検査して評価することもできる。

【0074】

本発明の相補的な核酸及びリボザイムは、in vitroまたはin vivoでの遺伝子組み換え発現によって、或いは固相ホスホラミダイト化学合成を用いて作製することができる。更に、この分子の5'及び/または3'末端に隣接配列を付加することによって、或いは分子の骨格内のホスホジエステラーゼ結合の代わりにホスホ口チオネートや2'-O-メチルを用いることによってRNA分子を改変し、細胞内の安定性及び半減期を増大することができる。この修飾はPNAの生成に固有であり、その他の核酸分子に拡大することが可能である。イノシン及びキエノシン (qu eosine)、ワイプトシン (wybutosine) などの従来のものでない塩基を含めることによって、或いはアデニン、シチジン、グアニン、チミン、及びウリジンをアセチル基、メチル基、及びチオ基で修飾して、この分子が内在性のエンドヌクレアーゼによって加水分解されるのを困難にする。

【0075】

スクリーニングアッセイ

この哺乳動物タンパク質をコードする核酸分子を用いて、分子のライブラリをスクリーニングし、特異的な結合親和性を調べることが可能である。このアッセイを用いて、生物系においてこの核酸分子の活性を調節するDNA分子及びRNA分子、PNA、ペプチド、転写因子を含むタンパク質、エンハンサー、リプレッサー等のライブラリをスクリーニングすることができる。このアッセイには、分子のライブラリを準備するステップと、特異的な結合が許容される条件下で、この哺乳動物核酸分子またはその断片とこの分子のライブラリを結合させるステップと、特異的な結合を検出して、この核酸分子と特異的に結合する少なくとも1つの分子を同定するステップとが含まれる。

【0076】

同様に、この核酸分子またはその断片を用いてサンプル（以下のタンパク質の例を参照）からリガンドを精製することが可能である。哺乳動物核酸タンパク質またはその一部を用いてリガンドを精製する方法は、サンプルを準備するステップと、特異的な結合が許容される条件下で、そのタンパク質とサンプルとを結合させるステップと、その特異的結合を検出するステップと、結合したタンパク質

を回収するステップと、好適な薬剤を用いて精製されたリガンドからそのタンパク質を分離するステップとが含まれ得る。

【0077】

同様に、任意のスクリーニングアッセイにおいて、この哺乳動物タンパク質またはその一部を用いて分子のライブラリをスクリーニングすることが可能である。このようなスクリーニングに用いられるこのタンパク質の一部は、溶液中に遊離しているか、或いは生物若しくは非生物の基板（例えば細胞表面上）に固定されているか、または細胞内に存在し得る。このタンパク質と分子との特異的な結合を測定すること可能である。スクリーニングするライブラリの種類によってアッセイを選択して、このタンパク質に特異的に結合するリガンド、DNAまたはRNA、PNA分子、アゴニスト、アンタゴニスト、抗体、免疫グロブリン、インヒビター、ペプチド、タンパク質、薬剤等を同定することができる。極微量のアッセイ用量及び微量の検査化合物を用いるハイスループット型の方法は、USPN5,876,946に記載され、酵素阻害または受容体結合について多数の分子をスクリーニングすることができる。このハイスループット型の方法は、USPN5,876,946に記載され、引用することを持って本明細書の一部とする。同様に、このタンパク質またはその断片を用いてサンプルからリガンドを精製することが可能である。哺乳動物タンパク質またはその一部を用いてリガンドを精製する方法は、サンプルを準備するステップと、特異的な結合が許容される条件下で、そのタンパク質またはその一部とそのサンプルとを結合させるステップと、そのタンパク質とリガンドとの特異的な結合を検出するステップと、その結合したタンパク質を回収するステップと、好適な薬剤を用いて精製されたリガンドからそのタンパク質を分離するステップとが含まれ得る。

【0078】

薬理学

医薬組成物とは、目的を達成するのに効果的な量の活性処方成分を含む物質のことである。当業者であれば、効果的な服用量を容易に決めることができる。全ての化合物において、治療効果のある薬用量は、初めに細胞培養アッセイ或いは動物モデルで推定される。また、動物モデルを用いて、理想的な濃度範囲や投与

経路を決めることができる。このようなデータを用いて、ヒトにおける有用な薬用量及び投与経路を決定する。

【0079】

治療効果のある薬用量とは、症状や状態を改善するタンパク質やインヒビターの量を指す。このような薬剤の治療効果や毒性は、細胞培養または実験動物における標準的な薬学的方法、例えばED50（集団の50%に医薬的效果がある用量）及びLD50（集団の50%に致命的である用量）によって決めることができる。毒性と治療効果の容量比を、治療指数としてLD50 / ED50と表すことができる。高い治療指数を示す医薬組成物が好ましい。細胞培養アッセイ及び動物実験から得たデータを用いて、ヒトに対する服用量の範囲を決定する。

【0080】

（モデル系）

動物モデルを用いて、動物モデルがヒトに相当する暴露条件でヒトに類似の毒物反応を示すバイオアッセイを行うことができる。哺乳動物が最も一般的なモデルである。大抵の毒物研究は、低コストで入手が容易であり、かつ基準毒素が豊富であることから、主にラット又はマウスなどの齧歯類を用いて行われる。齧歯類近交系は、目的の遺伝子の過剰或いは過少な発現の生理学的な原因を調査するのに便利なモデルであり、疾患の診断及び治療方法の開発にも有用である。特定の遺伝子を大量に発現する齧歯類近交系は、その遺伝子によって発現されるタンパク質の便利な供給源となり得る。

【0081】

中毒学

中毒学とは、生物系における物質の影響を研究する学問である。殆どの毒物研究はラットまたはマウスを用いて、物質がヒトの健康に与える影響を推定する。生理機能及び行動、恒常性プロセス、致死率における質的及び量的変化を観察して、毒性プロフィールを作成し、その物質に曝露された後のヒトの健康状態を評価する。

【0082】

遺伝子毒物学は、物質が遺伝子の突然変異を引き起こす能力を同定し分析する

。遺伝毒性物質は通常、核酸との相互作用を促進する共通の化学的或いは物理的特性を有し、突然変異した染色体が子孫に受け継がれるのが最大の害である。毒物研究によって、受胎前の両親のどちらか一方、または妊娠中の母、発生段階の生物に投与された場合の、子孫における構造的或いは機能的な異常の頻度を増加させる物質を同定することが可能である。マウス及びラットは生殖周期が短く、統計的必要性を満たす多数の子を出産する能力から、これらの試験にはマウス及びラットが用いられる場合が最も多い。

【0083】

急性毒物の検査は、被験体への物質の一回の投与に基づき、その物質による症状または致死率を決定する。この検査では、1) 初めの投与量の範囲を決定する実験と、2) 有効な投与量の範囲を狭める実験と、3) 用量応答曲線を確立する実験の3つの実験が行われる。

【0084】

長期に渡る毒性検査では繰り返し物質を投与する。このような検査には、ラットやイヌが一般的に用いられ、分類学上異なった種からデータを収集する。物質を高い投与濃度で3～4ヶ月間、毎日投与することで、発癌を除く、成体動物における殆どの毒性の種類が明らかになるという研究結果が多数報告されている。

【0085】

一年或いはそれ以上の長期に渡る慢性毒性検査は、物質に毒性がないこと、或いは物質の発癌の可能性の何れかを実証するために行われる。ラットで検査が行われる場合、少なくとも3つの検査グループと1つの対照グループが用いられ、最初から最後までである間隔で検査及びモニタリングが行われる。

【0086】

遺伝子組み換え動物モデル

目的の遺伝子を過剰或いは過少に発現する遺伝子組み換え齧歯類を同系交配し、ヒト疾患モデルとして用いたり、或いは治療薬検査や毒物検査を行う(例えば、USPN 4,736,866及びUSPN 5,175,383、USPN 5,767,337を参照、またこれらを引用することを持って本明細書の一部とする)。場合によっては、導入遺伝子が、胚発生中若しくは出生後の特定の時期に特定の種類の組織で活性化され得る。組

み換え遺伝子の発現は、表現型の分析や組織特異的なmRNAの発現、或いは実験的薬剤治療を施すことによってモニタリングされる。

【0087】

胚性幹細胞

齧歯類胚から単離された胚性幹細胞（ES細胞）は、胚を形成する潜在能力を維持している。ES細胞が担体となる胚の中に導入されると、正常な発生が再開され、生まれる動物の組織全てに関与する。ES細胞は、実験的なノックアウト及びノックイン齧歯類系を作製するのに好適な細胞である。マウス129/SvJ細胞株などのマウスES細胞は、マウスの初期胚から採取されてから当分野で周知の培養条件下で増殖されたものである。ノックアウト系に用いるベクターには、in vivoで転写及び/又は翻訳を阻害するマーカー遺伝子配列を含むように改変された疾患遺伝子候補が含まれる。このベクターが、当分野で周知の電気穿孔法及びリポソーム輸送、マイクロインジェクション等の形質転換方法によってES細胞に導入される。齧歯類の内在性遺伝子が、細胞分裂の際の相同組み換えや組み込みによって改変された疾患遺伝子に置換される。次に、形質転換されたES細胞が、所定の条件下で選択され同定され、C57BL/6マウス系などのマウス細胞胚盤胞に微量注入されるのが好ましい。この胚盤胞を偽妊娠メスに外科的に導入すると、生まれるキメラ子孫が共通の遺伝子型を有し、交配によってヘテロ接合系またはホモ接合系が作り出される。

【0088】

また、ES細胞を用いて、in vitroでの神経細胞及び造血系、心筋細胞などの様々な細胞型や組織の分化を研究する（Bain 他（1995）Dev. Biol. 168:342-357; Wiles and Keller（1991）Development 111:259-267; and Klug 他（1996）J. Clin. Invest. 98:216-224）。最近の研究により、ヒト胚盤胞由来ES細胞をin vitroで操作して、内胚葉及び中胚葉、外胚葉性の細胞型を含む8つの別の細胞系譜に分化可能であることも実証された（Thomson（1998）Science 282:1145-1147）。

【0089】

ノックアウト分析

遺伝子ノックアウト分析では、ヒト疾患遺伝子候補のある領域がネオマイシン・ホスホトランスフェラーゼ遺伝子などの非哺乳動物遺伝子を含むように酵素によって改変する (neo ; Capecchi (1989) Science 244:1288-1292)。挿入されたコーディング配列は、標的遺伝子の転写及び翻訳を阻害して疾患候補タンパク質の生化学的な合成を阻止する。この改変した遺伝子を培養胚幹細胞 (上記) に形質転換し、この形質転換細胞を齧歯類胞胚に注入し、この胞胚を偽妊娠メスに移植する。この遺伝子組み換え子孫をクロス交配して、ホモ接合近交系を作り出す。

【0090】

ノックイン分析

胚発達の初期段階に現れる分化全能性ES細胞を用いてノックインヒト化動物 (ブタ) 又は遺伝子組み換えヒト疾患動物モデル (マウス又はラット) を作り出すことが可能である。ノックイン技術を用いて、ヒト遺伝子のある領域を動物ES細胞に注入し、組み換えによってそのヒトの配列が動物細胞ゲノムの中に組み込まれる。ヒト遺伝子が組み込まれた全能性ES細胞に対して上記したような操作を行う。ヒトの症状に類似の情報を収集するべく、この同系動物の研究及び処置が行われる。これらの方法を用いて、幾つかのヒト疾患モデル系を作り出す (例えば、Lee 他 (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. 95:11371-11376 ; Baudoin 他 (1998) Genes Dev. 12:1202-1216; and Zhuang 他 (1998) Mol. Cell Biol. 18:3340-3349)。

【0091】

非ヒト霊長類モデル

この動物実験の分野は、生理学及び遺伝学、化学、薬理学、統計学等の基本科学から得たデータ及び方法論を利用する。これらのデータは、ヒトの健康に関連し得る非ヒト霊長類における治療薬の効果の評価に重要である。ワクチン及び薬剤の評価においてヒトの代わりにサルを用いる。サルの反応は、類似の条件下でのヒトへの暴露に相当する。カニクイザル (*Macaca fascicularis*, *M. mulatta*) 及び一般的なマーモセット (*Callithrix jacchus*) は、これらの研究に用いられる最も一般的な非ヒト霊長類 (NHP) である。NHPの群体作り及び維持に

は多大な費用が掛かるため、初期の研究及び毒物学的な研究は、通常は齧歯類モデルで行われる。薬物嗜癖などの行動を調べる研究では、NHPは最良の実験動物である。更に、個々のNHP及びヒトは、多くの薬剤及び毒物に対して異なった感受性を示すため、これらの物質に対して「高代謝型」と「低代謝型」に分類することができる。

【0092】

更なる実施例では、限定するものではないが、トリプレット遺伝子コード及び特異的な塩基対形成相互作用などの特性を含む、現在知られている核酸配列の特性に新しい技術が依存する場合は、この哺乳動物タンパク質をコードする核酸分子を、開発中の任意の分子生物学技術に用いることが可能である。

【0093】

【実施例】

本発明は、記載した特定の装置及び物質、方法に限定されるものではないことを理解されたい。特定の実施例について説明するが、同等の実施例を用いて本発明を具現することも可能である。本発明の範囲は、前記請求の範囲によってのみ限定されるものであって、記載した実施例によって限定されるものではない。また、以下に記載の実施例は、本発明を例示するためのものであって本発明を限定するものではない。例示目的で、ヒト髄膜腫cDNAライブラリMENTUNON3の作製方法を記載する。

【0094】

1 代表的なcDNA配列の調整

標準化されたヒト髄膜腫cDNAライブラリMENTUNON3は、35歳の白人女性の右後頭下開頭術の際に採取した組織から作製した。この冷凍組織をPOLYTRONホモジナイザー (PT-3000; Brinkmann Instruments, Westbury, NY) を用いて、グアニジニウムイソチオシアネート溶液中でホモジナイズして溶解した。その溶解物を、L8-70M超遠心分離機 (Beckman Coulter, Fullerton CA) でSW28ロータを用いて、5.7 M CsClクッションにおいて、毎秒25,000の回転の速度、周囲温度で18時間遠心分離した。RNAを酸性フェノール (pH 4.7) で抽出し、0.3 M 酢酸ナトリウム及び2.5倍量のエタノールを用いて沈殿させ、RNAを含まない水に再懸濁し、

35 でDNアーゼ (Life Technologies) で処理した。前述のように、RNAの抽出及び沈澱を2回繰り返した。

【0095】

メッセンジャーRNA (mRNA) を、OLIGOTEXキット(QIAGEN, Valencia CA)を用いて単離してcDNAライブラリを作製した。このmRNAは、mRNAのポリA尾部で第一鎖cDNAの合成を開始するように設計されたNotIアダプタープライマーを含むSUPERSCRIPTプラスミドシステム (Life Technologies) を用いて、推奨プロトコルに従って処理した。二本鎖cDNAの末端を平滑化し、EcoRIアダプターを結合した後、この作製物をNotI (New England Biolabs, Beverly MA)で消化した。このcDNAをSEPHAROSE CL-4Bカラム (APB)上で分画し、400 bpを超えるcDNAをpINCYプラスミド (Incyte Pharmaceuticals, Palo Alto CA)のNotI及びEcoRI部位に結合した。この組み換えプラスミドで、コンピテントDH5 細胞 (Life Technologies) またはELECTROMAX DH 10B細胞 (Life Technologies) を形質転換した。

【0096】

プラスミドDNAを、REAL Prep 96 プラスミドキット (QIAGEN) を用いてその細胞から放出させてから精製した。推奨プロトコルに従ったが、以下の点を変更した。(1) 25mg/lのカルベニシリン及び0.4%のグリセロールを含む1mlの滅菌Terrific Broth (Life Technologies) において細菌を培養した。(2) 接種後、培溶液を19時間インキュベートし、この細胞を0.3mlの溶解緩衝液に溶解した。(3) イソプロパノール沈澱を行った後、プラスミドDNAのペレットを0.1mlの蒸留水に再懸濁した。このプロトコルを終了した後このサンプルを96ウェルブロックに移して4 で保管した。

【0097】

MICROLAB 2200システム (Hamilton, Reno NV) 若しくはHYDRAマイクロディスペンサー (Robbins Scientific, Sunnyvale CA) の何れか一方と、DNA ENGINEサーマルサイクラー (MJ Research) を組み合わせて用いて、cDNAを調製した。このcDNAを、ABI PRISM 377 (PE Biosystems) 若しくはMEGABACE 1000シーケンシングシステム (APB) の何れか一方を用いて、Sanger及びCoulson (J. Mol. Biol. (1975) 94:441-448) の方法でシーケンシングした。大抵の単離物は、0.25

x ~ 1.0x の濃度の溶液を用いて標準的なABIプロトコル及びキット (PE Biosystems) に従ってシーケンシングした。別法では、Amersham Pharmacia Biotech (APB) 製の溶液及び色素を用いてcDNAをシーケンシングすることもできる。

【0098】

2 本配列の同定及び伸長、構築、解析

ラットcDNA配列のZOOSEQデータベース (Incyte Pharmaceuticals) からのインサイト社クローン700137522 (SEQ ID NO:15) は、オス生殖組織において異なって発現する配列の解析中に同定された。このインサイト社クローン700137522を用いて、LIFESEQデータベース (Incyte Pharmaceuticals) において、第一パス及び伸長したcDNA、即ちSEQ ID NO:3 - 1を同定し、それらはPhrap (Green, University of Washington) で構築された。MACDNASIS PROソフトウェア (Hitachi Software Engineering) を用いて構築した配列SEQ ID NO:1を翻訳して、コーディング領域SEQ ID NO:2を解明した。この核酸配列及びアミノ酸配列を、BLASTを用いてGenBank データベース及びSwissProt、BLOCKS、PRINTS、Prosite、PFAM等のデータベースに対して問い合わせた。機能解析は、MOTIFS (GCG) 及びHMMアルゴリズムを用いて行い、抗原性指数 (Jameson-Wolf解析) は、LASERGENEソフトウェア (DNASTAR) を用いて求めた。次に、BLASTを用いてクローン及び構築した配列を全ての哺乳動物ライブラリに渡って比較し、相同な核酸配列、SEQ ID NO:12 - 16を同定した。

【0099】

3 配列類似性

配列類似性は、MEGALIGNプログラム (DNASTAR) のクラスタ法を用いて、少なくとも2つの核酸配列間或いはアミノ酸配列間の比較に基づいて同一性 (%) として計算した。このクラスタ法は、全ての対間の距離を調べて配列をクラスタに分類するアルゴリズムを用いる。クラスタを対に並べた後、再びグループに分ける。配列A及びBの2つの配列間の配列類似性は、配列AとBの一致する残基の合計数を、配列Aの合計残基数から配列Aのギャップ残基数と配列Bのギャップ残基数とを減じたもので除して求める。2つの配列間の類似性が0或いは0に近いところのギャップは含めていない。

【0100】

4 ノーザン分析

ノーザン分析は、遺伝子の転写物の存在を検出するために用いる実験用技術であり、標識したプローブを特定の細胞型或いは組織から抽出したRNAを固定した膜にハイブリダイズさせることが含まれる。

【0101】

BLASTに用いられる類似性コンピュータ技術を用いて、GenBank或いはLIFESEQ (Incyte Pharmaceuticals) のようなヌクレオチドデータベースにおいて、同一或いは関連する分子を検索する。この配列に基づいた解析は、多くの膜系ハイブリダイゼーションより非常に速度が速い。さらにコンピュータ検索の感度を調節して、任意の特定の一致を、同一または類似と分類することができる。検索の基準は、 $(\% \text{配列同一性} \times \% \text{最大BLASTスコア}) / 100$ と定義される積スコアである。積スコアは、2つの配列間の類似度及び配列一致の長さの両方を考慮する。例えば、積スコアが40の場合、その一致は1～2%誤差の範囲内で正確であり、70以上であればその一致は正確であろう。類似する分子或いは関連する分子は通常、8～40の範囲の積スコアを示す分子を選択することにより同定される。

【0102】

ノーザン分析の結果は、この哺乳動物タンパク質をコードする転写物が発生したライブラリの分布割合として報告される。分析には、器官/組織及び疾患によるcDNAライブラリの分類も含まれる。器官/組織のカテゴリーには、心血管、皮膚、発生、内分泌、胃腸、造血/免疫、筋骨格、神経、生殖、泌尿器が含まれる。疾患のカテゴリーには、癌、炎症/外傷、細胞増殖、神経が含まれる。カテゴリー別に、目的の配列を発現するライブラリ数を数えて、それを全てのカテゴリーのライブラリ数で除した。

【0103】

5 核酸配列の伸長

SEQ ID NO:1の核酸配列は、第一パス及び伸長した各クローンから構築した。少なくとも1つのインサイト社cDNAクローンは、オリゴヌクレオチドプライマーを用いて伸長した。このオリゴヌクレオチドのプライマーの内、一方のプライマ

ーは既知の断片の5'の伸長を開始するために合成し、他方のプライマーは既知の断片の3'の伸長を開始するために合成した。開始プライマーは、OLIGO 4.06ソフトウェア(National Biosciences)を用いて、約22~約30個のヌクレオチドの長さ、約50%以上のGC含量で、約55~68の温度で標的配列にアニールするように設計した。ヘアピン構造及びプライマー-プライマー二量体が生じる断片は排除した。選択されたヒトcDNAライブラリを用いてこの配列を伸長した。2段階以上の伸長が必要な場合は、追加の或いは組みになった入れ子のプライマー(nested primer)を設計する。

【0104】

PTC-200 (MJ Research, Inc.)を用いて96ウェルプレートでPCR法を実施し、高い忠実度の増幅を達成した。反応混合液には、鋳型DNA及び200 nmolの各プライマー、反応緩衝液(Mg^{2+} 、 $(NH_4)_2SO_4$ 、 β -メルカプトエタノールを含む)、Taq DNAポリメラーゼ(APB)、ELONGASE酵素(Life Technologies)、Pfu DNAポリメラーゼ(Stratagene)を含まれている。プラスミドから選択したプライマーの組みに対して以下のパラメーターで増幅を行った。

- | | | |
|-------|---------------------|------|
| ステップ1 | 94 | で3分間 |
| ステップ2 | 94 | で15秒 |
| ステップ3 | 60 | で1分間 |
| ステップ4 | 68 | で2分間 |
| ステップ5 | ステップ2、3、及び4を20回繰り返す | |
| ステップ6 | 68 | で5分間 |
| ステップ7 | 4 | で保管。 |

別法では、プライマーの組、T7とSK+(Stratagene)に対して以下のパラメーターで増幅を行った。

- | | | |
|-------|---------------------|------|
| ステップ1 | 94 | で3分間 |
| ステップ2 | 94 | で15秒 |
| ステップ3 | 57 | で1分間 |
| ステップ4 | 68 | で2分間 |
| ステップ5 | ステップ2、3、及び4を20回繰り返す | |

ステップ6 68 で5分間

ステップ7 4 で保管。

【0105】

各ウェルのDNA濃度は、1x TE及び0.5 µlの希釈していないPCR産物に溶解した100 µlのPICOGREEN定量試薬(0.25% (v/v); Molecular Probes)を不透明な蛍光度計プレート(Corning Science Products, Corning NY)の各ウェルに分注して、DNAがその試薬と結合できるようにして測定する。このプレートをFluoroskan II (Labsystems Oy, Helsinki, Finland)でスキャンして、サンプルの蛍光を測定してDNAの濃度を定量化する。反応混合物の5~10 µlのアリコットを1%のアガロースミニゲル上で電気泳動させて解析し、何れの反応がより長い配列の伸長に成功したかを決定する。

【0106】

伸長した配列を脱塩及び濃縮してから384ウェルプレートに移し、CviJIコレラウィルスエンドヌクレアーゼ(Molecular Biology Research, Madison WI)で消化し、pUC 18ベクター(APB)に再連結する前に音波処理または切断した。ショットガンシーケンシングのために、消化した断片を0.6~0.8%の濃度のアガロースゲル上に分離させ、UV光で視認できるように断片を切断し、寒天をAGARAC E (Promega)で消化/除去した。T4 DNAリガーゼ(New England Biolabs, Beverly MA)を用いて伸長した断片をpUC 18ベクター(APB)に再連結し、Pfu DNAポリメラーゼ(Stratagene)で制限部位の伸び出しを処理してから、コンピテント大腸菌細胞に形質転換した。形質転換細胞が抗生物質を含む培地で選択され、それぞれのコロニーを切りとって、LB/2Xカルベニシリン培養液の入った384ウェルプレートの中で、37 で一晩培養した。

【0107】

この細胞を溶解して、Taq DNAポリメラーゼ(APB)及びPfu DNAポリメラーゼ(Stratagene)を用いて以下の手順でDNAを増幅した。

ステップ1 94 で3分間

ステップ2 94 で15秒

ステップ3 60 で1分間

- ステップ4 72 で2分間
ステップ5 ステップ2、3、及び4を29回繰り返す
ステップ6 72 で5分間
ステップ7 4 で保管。

上記したようにPICOGREEN試薬(Molecular Probes)でDNAを定量した。DNA回収率の悪いサンプルは、上記した条件で再び増幅した。サンプルを20%のジメチルサルホサイド(dimethylsulphoxide)(1:2, v/v)で希釈し、DYENAMICエネルギー移動シーケンシングプライマー及びDYENAMIC DIRECTキット(APB)またはABI PRISM BIGDYE Terminator cycle sequencing ready reactionキット(Perkin-Elmer)を用いてシーケンシングした。

【0108】

同様に上述の手順で、SEQ ID NO:1のヌクレオチド配列を利用し、外側に伸長するように設計したオリゴヌクレオチドとゲノムDNAライブラリを用いて調節配列を得た。

【0109】

6 プローブの標識化及びハイブリダイゼーション分析

基板の準備

以下に示す任意の方法によって、核酸配列を生体サンプルから単離し、標準的な核酸ハイブリダイゼーションプロトコル用の基板にその単離した核酸配列を固定する。標的核酸(ゲノムDNAの制限酵素断片)の混合液を、1x TAE(Tris-アセテート-エチレンジアミン4酢酸(EDTA)を含む)緩衝液において、0.7%アガロースゲルで電気泳動して分画し、20xクエン酸ナトリウム(SSC)を用いて毛管輸送によってナイロン膜に移す。別法では、標的核酸を個別にベクターに結合させ、細菌宿主細胞に挿入してライブラリを作製する。標的核酸を以下の任意の方法によって基板上に並べる。第1の方法では、個々のクローンを含む細菌細胞を機械的に選んでナイロン膜上に並べる。細菌増殖培地(カルベニシリンを含むLB寒天)にこのナイロン膜を置き、37 で16時間インキュベートする。細菌コロニーをプロテインキナーゼKで変性及び中和、消化する。STRATALINKER UVクロスリンカー(Stratagene, La Jolla CA)において、ナイロン膜をUV照射してDNAを

その膜に架橋結合させる。

【0110】

第2の方法では、挿入物に近接するベクター配列に相補的なプライマーを用いてPCRのサイクルを30回繰り返し、標的核酸を細菌ベクターから増幅する。増幅した標的核酸をSEPHACRYL-400ビーズ(APB)を用いて精製する。精製した標的核酸をガラス製の顕微鏡スライド(Corning Science Products, Corning NY)上に機械的に並べる。このスライドは、0.05%のアミノプロピルシラン(Sigma-Aldrich, St Louis MO)で予めコーティングしてから110℃で硬化したものである。ガラススライドのアレイ(マイクロアレイ)を、STRATALINKER UVクロスリンカー(Stratagene)においてUV照射する。

【0111】

プローブの作製

cDNAプローブ配列は、鋳型mRNAから作製する。5 µgのmRNAを1 µgのランダムプライマー(Life Technologies)と混合し、70℃で10分間インキュベートしてから凍結乾燥する。この凍結乾燥したサンプルを、dNTP混合物及び[³²P]dCTP、ジチオスレイトール、MMLV逆転写酵素(Stratagene)を含む50 µlの1×第1鎖緩衝液(cDNA Synthesis system; Life Technologies)に再懸濁し、42℃で1~2時間インキュベートする。インキュベートした後、プローブを42 µlの蒸留水で希釈して95℃で3分間加熱し、その後氷上で冷却する。プローブに含まれるmRNAをアルカリ分解によって除去する。このプローブを中和し、PROBEQUANT G-50マイクロカラム(APB)を用いて、変性したmRNAや組み込まれなかったヌクレオチドを除去する。プローブは、放射性核種[³²P]dCTPの代わりに標識マーカースy3-dCTP或いはCy5-dCTP (APB)で標識することもできる。

【0112】

ハイブリダイゼーション

ハイブリダイゼーションは、0.5Mリン酸ナトリウム(pH7.2)及び7%SDS、1 mM EDTAを含むハイブリダイゼーション緩衝液において65℃で行う。ハイブリダイゼーション緩衝液において、基板を少なくとも2時間、65℃でインキュベートした後、この緩衝液をプローブ配列を含む新しい緩衝液10 mlに取り替える。

65 で18時間インキュベートした後、ハイブリダイゼーション緩衝液を除去し、最大で40 mM リン酸ナトリウム及び1% SDS、1 mM EDTA、65 の条件になるまで徐々にストリンジェンシーを増しながら、連続的に基板を洗浄する。膜にハイブリダイズした放射線標識したプローブによって生成されるシグナルを検出するために、この基板をPHOSPHOR IMAGERカセット(APB)に曝露し、そのイメージをIMAGEQUANTデータ解析ソフトウェア(APB)を用いて解析する。マイクロアレイにハイブリダイズした蛍光プローブによって生成されるシグナルを検出するために、この基板を共焦点レーザー顕微鏡検査によって検査し、GEMTOOLS遺伝子発現解析ソフトウェア(Incyse Pharmaceuticals)を用いてイメージを収集して解析する。

【0113】

7 相補的な核酸配列

本核酸分子に相補的な配列、或いはその断片を用いて、遺伝子の発現を検出したり、低下させたり、阻害することができる。約15～約30個の塩基対からなるオリゴヌクレオチドの使用について記載するが、それより小さい或いは大きい配列の断片、またはその誘導体(PNA)の場合でも同じ方法を用いることができる。オリゴヌクレオチドは、SEQ ID NO:1若しくはその断片であるSEQ ID NO:3-11を用いて、Oligo4.06ソフトウェア(National Biosciences)で設計する。プロモーターの結合を阻害して転写を阻止するために、相補的なヌクレオチドを、最も好ましくはオープンリーディングフレームの開始コドンの前の約10個のヌクレオチドである最もユニークな5'配列に結合するように設計する。翻訳を阻害するために、相補的なオリゴヌクレオチドを、本哺乳動物タンパク質をコードするmRNAにリボソームが結合するのを阻害するように設計する。

【0114】

8 本哺乳動物タンパク質の発現

本哺乳動物タンパク質の発現及び精製は、細菌若しくはウイルス系の発現系を用いて行うことができる。細菌で発現させるために、抗生物質耐性遺伝子とcDNAを高レベルで転写させる誘導性プロモーターとを含むベクターにcDNAをサブクローニングする。このようなプロモーターには、以下に限定するものではないが、

lacオペレーター調節エレメントに関連するT5またはT7バクテリオファージプロモーター及びtrp-lac(tac)ハイブリッドプロモーターが含まれる。組み換えベクターを、例えばBL21(DE3)などの好適な細菌宿主に形質転換する。イソプロピル-Dチオガラクトピラノシド(IPTG)で誘導されると、抗生物質耐性細菌がこの哺乳動物タンパク質を発現する。真核細胞での発現は、*Autographica californica*核多面性ウイルス(AcMNPV)という組み換えバキュロウイルスを*Spodoptera frugiperda* (Sf9)昆虫細胞に感染させて行う。バキュロウイルスのポリヘドリン遺伝子を、相同組み換え或いは転移プラスミド中間体が関係する細菌媒介遺伝子転移の何れかによって、この哺乳動物cDNAと置換する。ウイルスの感染力は維持され、強力なポリヘドリンプロモータによって高いレベルでcDNAが転写される。

【0115】

大抵の発現系では、この哺乳動物タンパク質がGSTまたはFLAGなどとの融合タンパク質として合成されるため、未精製の細胞溶解物から親和性を用いた迅速な一段階の組み換え融合タンパク質の精製を行うことができる。GSTによって、タンパク質の活性及び抗原性を維持する条件下で、固定されたグルタチオンでの融合タンパク質の精製が可能となる(APB)。精製の後、GST部分をこの哺乳動物タンパク質から蛋白分解的に遺伝子操作された特定部位で切断できる。アミノ酸8個のペプチドからなるFLAGによって、市販のモノクローナル及びポリクローナル抗FLAG抗体(Eastman Kodak)を用いたイムノアフィニティー精製が可能となる。6個の連続するヒスチジン残基のストレッチである6-Hisによって、金属キレート樹脂(QIAGEN)での精製が可能となる。タンパク質の発現及び精製の方法は、Ausubel (1995, 前出, ch 10, 16)に記載されている。これらの方法で精製したこの哺乳動物タンパク質を直接用いて以下のアッセイを行うことができる。

【0116】

9 機能的アッセイ

タンパク質の機能は、哺乳動物細胞培養でPTPをコードする配列を生理学的に高レベルで発現させてアッセイする。この核酸配列を、強力なサイトメガロウイルスプロモーターを含むPCMV SPORTベクター(Life Technologies.)にサブクローニングし、この組み換えベクター5~10 µgを、当分野で周知の形質転換法方

によってヒトの内皮細胞株或いは造血細胞株に形質転換する。更に、蛍光マーカーとなるCD64-GFP (Clontech)をコードする配列を含むプラスミド1~2 µgを同時に形質転換して、フローサイトメトリー (FCM) で形質転換細胞を同定できるようにする。

【0117】

発現における導入された遺伝子の影響は、精製されたこれらの形質転換細胞集団を用いて評価することができる。形質転換細胞の表面で発現されるCD64-GFPが、ヒト免疫グロブリンG (IgG) の保存された領域と結合するため、この形質転換細胞を、ヒトIgGか抗CD64抗体の何れかで被覆された磁気ビーズを用いて分離することができる(DYNAL, Lake Success, NY)。mRNAを細胞から単離して、ハイブリダイゼーション技術で分析することができる。

【0118】

1.0 PTPに特異的な抗体の生産

ポリアクリルアミドゲル電気泳動法でPTPを精製し、これを用いてウサギを免疫する。当分野で周知の標準的なプロトコルを用いて抗体を生産する。

【0119】

別法では、PTPのアミノ酸配列をLASERGENEソフトウェア (DNASTAR) を用いて解析し、免疫原性の高い領域を決定する。通常はC末端付近或いは親水性領域内に存在する免疫原性エピトープを選択して合成し、これを用いて当分野で周知の方法で抗体を増大させる。

【0120】

通常は15残基程度の長さのエピトープを、Fmoc法でABI 431Aペプチドシンセサイザー (PE Biosystems) で合成し、これをN-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステルとの反応でKLH (Sigma-Aldrich) に結合させて免疫原性を高める。エピトープ-KLH複合体をフロイントの完全アジュバントと共に投与してウサギを免疫する。その後、間隔を置いてフロイントの不完全アジュバントで免疫化を繰り返す。マウスの場合は少なくとも7週間、ウサギの場合は少なくとも12週間が経過した後、抗血清を採取して抗ペプチド活性を検査する。この検査には、このペプチドをプラスチックに結合し、1%ウシ血清アル

ブミン (BSA) でブロッキング処理し、ウサギ抗血清と反応させ、洗浄し、さらに放射性ヨウ素標識されたヤギ抗ウサギIgGと反応させる。当分野で周知の方法を用いて抗体力価及び形成された複合体の収量を測定する。

【0121】

1.1 特異的な抗体を用いる天然タンパク質の精製

天然或いは組み換えの哺乳動物タンパク質を、このタンパク質に特異的な抗体を用いてイムノアフィニティークロマトグラフィで実質的に精製する。イムノアフィニティークラムは、この抗体をCNBr-活性化SEPHAROSEレジン (APB) に共有結合させて作製する。このタンパク質を含む培養液をイムノアフィニティークラムに通し、このタンパク質を優先的に吸着できるように、界面活性剤の存在下で高イオン強度緩衝液でそのカラムを洗浄する。結合後、緩衝液 (pH 2~3) 或いは高濃度の尿素やチオシアネートイオンを用いて抗体とこのタンパク質との結合を切断し、そのカラムからこのタンパク質を溶離させて回収する。

【0122】

1.2 本核酸分子若しくはタンパク質と特異的に結合する分子のスクリーニング

本核酸分子やその断片、或いは本タンパク質やその断片を、 ^{32}P -dCTP、Cy3-dCTP、Cy5-dCTP (APB)、またはBIODIPYやFITC (Molecular Probes) でそれぞれ標識する。予め基板上に配列した候補分子のライブラリを、標識した核酸分子またはタンパク質の存在下でインキュベートする。核酸分子或いはアミノ酸配列の何れかが存在する条件下でインキュベートした後、その基板を洗浄し、特異的な結合或いは複合体形成を示唆する標識が保持されている基板の全ての部分をアッセイし、結合している分子を同定する。様々な濃度の核酸分子若しくはタンパク質で得られたデータを用いて、標識した核酸分子またはタンパク質と候補分子との親和性を計算する。

【0123】

1.3 タンパク質の活性の実証

PTP若しくは生物学的活性を有するその断片を、 ^{125}I ボルトンハンター試薬 (Bolton 他 (1973) Biochem. J. 133:529-539) で標識する。マルチウェルプレー

トのウェルにおいて、様々なPC分子種を含む候補分子を標識したPTPと共にインキュベートし、次に洗浄してから、標識した複合体を有する全てのウェルをアッセイする。様々な濃度のPTPで得られたデータを用いて、PTPと結合した候補分子の関連性、数量、親和性を計算する。

【0124】

(表の簡単な説明)

表1は、ヒト及びラット由来のSEQ ID NO:1と相同性を有するインサイト社クローン番号、それらのヌクレオチドの長さ、由来生物、SEQ ID NO:1と重複する領域、SEQ ID NO:1との同一性(%)を示す。

【表1】

表 1

核酸 SEQ ID NO:	インサイト社 クローン番号	スクレオチアド の長さ	由来生物	ライブラリ	残基の適用範囲	同一性 (%)
3	3591822F6	573	ヒト	293TF5T01	1 - 573	n/a(未入手)
4	745516R6	516	ヒト	BRAITUT01	459 - 981	n/a
5	1807728F6	411	ヒト	SINTNOT13	709 - 1122	n/a
6	1772859H1	248	ヒト	MENTUNON3	924 - 1171	n/a
7	1505466H1	277	ヒト	BRAITUT07	1097 - 1374	n/a
8	798614H1	287	ヒト	OVARNOT03	1112 - 1398	n/a
9	4114738H1	278	ヒト	UTRSTUT07	1333 - 1615	n/a
10	1923871H1	278	ヒト	BRSTTUT01	1393 - 1668	n/a
11	2013709H1	232	ヒト	TESTNOT03	1633 - 1865	n/a
12	700488211H1	289	ドブネズミ	RATENOT01	710 - 1000	69.2
13	700607704H1	279	ドブネズミ	RALINOH01	923 - 1201	87.4
14	701255162H1	272	ドブネズミ	RALITXT03	1172 - 1443	95.2
15	700137522H1	239	ドブネズミ	RALLNOT01	1387 - 1669	84.9
16	701435117T1	270	ドブネズミ	RALITXT06	1585 - 1859	67.8

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> INCYTE GENOMICS, INC.
 KASER, Matthew, R.
 HILLMAN, Jennifer, L.
 BAUGHN, Mariah, R.

<120> PHOSPHOLIPID TRANSFER PROTEIN

<130> PC-0003 PCT

<140> To Be Assigned

<141> Herewith

<150> 09/328,869

<151> 1999-06-08

<160> 17

<170> PERL Program

<210> 1

<211> 1865

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<223> Incyte ID No.: 1772859CB1

<400> 1

```

atcgttctgt ggtcctttct tttatgattc acaaggaatg accctcttca tgcctctcc 60
taattcagtc ctcacaacag tccttttaca aatgggacaa cagggttagag gaagtcaggc 120
agatttccag catcatagag agtaaaggac cagggaaagga tcaggattca aggactgcac 180
ccaggctctg cttccagctt gctgtgtgac tttgggtaat tttgttccct tagggaaactg 240
agcttttctca ttgtaaaatg caaacaggct gttgggagga tcaaatagaga tccaggggtg 300
aaaacagctt agtttacttt caggaattta cccacgcggt atataaaggc aaaaattat 360
tatagtcagg tgattgtaga ttgaggaacc catttctca tectgcaaat tgcaaacctg 420
agggcccaaa gagggacagg ggcttgcccc aggtctcagc aggctgtgag caagagctaa 480
agcctaatec tcctgccttt ggcctggag cccttctctg taccoaggg gtcagtgtct 540
ttgttgata caggcttaga ttgactgact gtaccctgag aacctagggg agtccctgtt 600
cccaattctt ctctacccc caccttgccc tgatggagga agaccctgct gtgttgagat 660
gagcaccaga gccaagaagc tgaggaggat ctggagaatt ctggaggaag aggagagtgt 720
tgctggagct gtacagacc tgcttctcag gtcccaggaa ggtggcgtca gcatctgcag 780
ccgcgtcgac gttgtcggag cctccgcgga ggaccagga gagccgact aggaccaggg 840
ccctgggctt cccacactc cccatggaga agctggcggc ctctacagag cccaagggc 900
ctgggccggt cctgggcccgt gagagtgtcc aggtgccga tgaccaagac tttcgcagct 960
tccggtcaga gttgaggct gaggtgggct ggaacctgac ctatagcagg gctgggggtg 1020
ctgtctgggt gcaggctgtg gagatggatc ggacgctgca caagatcaag tgccggatgg 1080
agtgtctgta tgtgccagcc gagacactct acgacgtcct acacgacatt gagtaccgca 1140
agaaatggga cagcaacgtc attgagactt ttgacatcgc ccgcttgaca gtcaacgctg 1200
acgtgggcta ttactcctgg aggtgtccca agcccctgaa gaacctgat gtcacacc 1260
tccgctctct gctccccatg ggcgctgatt acatcattat gaactactca gtcaaacatc 1320
ccaaatcccc acctcggaaa gacttggctc gagctgtgtc catccagacg ggtacactca 1380
tccagagcac agggcccaag agctgcgtca tcacctacct ggcccagggtg gacccccaaag 1440
gctccttacc caagtgggtg gtgaataaat cttctcagtt cctggctccc aaggccatga 1500
agaagatgta caaggcgtgc ctcaagtacc ccgagtggaa acagaagcac ctgcctcact 1560
tcaagccgtg gctgcaccg gacagagcc cgttgccgag cctggcgtg tcggagctgt 1620
cgggtgcagca tgcggactca ctggagaaca tcgacgagag cgoggtggcc gagagcagag 1680
aggagcggat gggcggcgcg ggcggcgagg gcagcgaega cgacacctcg ctcaacctgag 1740
cgccgcaccg cttcagggac ggagacagga ccgggcgagc cctggggcgg cggecgtcc 1800
tgcactttct cccctcccc acccggcacc tgggtggcacc gggccaggcc caggcgggtg 1860
ctgca 1865

```

<210> 2
 <211> 291
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> Incyte ID No.: 1772859CD1

<400> 2
 Met Glu Lys Leu Ala Ala Ser Thr Glu Pro Gln Gly Pro Arg Pro
 1 5 10 15
 Val Leu Gly Arg Glu Ser Val Gln Val Pro Asp Asp Gln Asp Phe
 20 25 30
 Arg Ser Phe Arg Ser Glu Cys Glu Ala Glu Val Gly Trp Asn Leu
 35 40 45
 Thr Tyr Ser Arg Ala Gly Val Ser Val Trp Val Gln Ala Val Glu
 50 55 60
 Met Asp Arg Thr Leu His Lys Ile Lys Cys Arg Met Glu Cys Cys
 65 70 75
 Asp Val Pro Ala Glu Thr Leu Tyr Asp Val Leu His Asp Ile Glu
 80 85 90
 Tyr Arg Lys Lys Trp Asp Ser Asn Val Ile Glu Thr Phe Asp Ile
 95 100 105
 Ala Arg Leu Thr Val Asn Ala Asp Val Gly Tyr Tyr Ser Trp Arg
 110 115 120
 Cys Pro Lys Pro Leu Lys Asn Arg Asp Val Ile Thr Leu Arg Ser
 125 130 135
 Trp Leu Pro Met Gly Ala Asp Tyr Ile Ile Met Asn Tyr Ser Val
 140 145 150
 Lys His Pro Lys Tyr Pro Pro Arg Lys Asp Leu Val Arg Ala Val
 155 160 165
 Ser Ile Gln Thr Gly Tyr Leu Ile Gln Ser Thr Gly Pro Lys Ser
 170 175 180
 Cys Val Ile Thr Tyr Leu Ala Gln Val Asp Pro Lys Gly Ser Leu
 185 190 195
 Pro Lys Trp Val Val Asn Lys Ser Ser Gln Phe Leu Ala Pro Lys
 200 205 210
 Ala Met Lys Lys Met Tyr Lys Ala Cys Leu Lys Tyr Pro Glu Trp
 215 220 225
 Lys Gln Lys His Leu Pro His Phe Lys Pro Trp Leu His Pro Glu
 230 235 240
 Gln Ser Pro Leu Pro Ser Leu Ala Leu Ser Glu Leu Ser Val Gln
 245 250 255
 His Ala Asp Ser Leu Glu Asn Ile Asp Glu Ser Ala Val Ala Glu
 260 265 270
 Ser Arg Glu Glu Arg Met Gly Gly Ala Gly Gly Glu Gly Ser Asp
 275 280 285
 Asp Asp Thr Ser Leu Thr
 290

<210> 3
 <211> 573
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> Incyte ID No.: 3591822F6

<400> 3
 atcgttctgt ggctctttct tttatgattc acaaggaatg acctctttca tcgctctcc 60
 taattcagtc ctcaaacag tctttttaca aatgggacaa caggttagag gaagtcaggc 120

```

agatttccag catcatagag agtaaaggac cagggaaagga tcaggattca aggactgcac 180
ccaggctctg cttccagctt gctgtgtgac ttgggtaat ttgttccct tagggaactg 240
agctttctca tttgtaaagc caaacaggct gttgggagga tcaaatgaga tccaggggtg 300
aaaacagctt agtttacttt caggaattta cccacgcggt atataaaggc aaaaattat 360
tatagtcaag tgattgtaga ttgaggaacc catttccotca ttctgcaaat tgcaaacctg 420
agggcccaaa gagggacagg ggcttgcccc aggtctcagc aggtctgtgag caagagctaa 480
agcctaatac tcctgccttt gggcctggag ccttcccttg taccccaggg gtcagtgtct 540
ttgttgata caggcttaga ttgactgact gta 573

```

```

<210> 4
<211> 516
<212> DNA
<213> Homo sapiens

```

```

<220>
<221> misc_feature
<223> Incyte ID No.: 745516R6

```

```

<220>
<221> unsure
<222> 46, 312, 351, 373, 453
<223> a, t, c, g, or other

```

```

<400> 4
gcaggctgtg agcaagaget aaagcctaata cctcctgcct ttgggnetgg agccttccct 60
gtaacccagc ggtcagtgtc tttgttggat acaggcttag attgactgac tgtaccctga 120
gaacctaggg gagtccctgt tccaattct tctcctacc ccaccttggc ctgatggagg 180
aagaccctgc tgtgttgaga tgagcaccag agccaagaag ctgaggagga tctggagaat 240
tctggaggaa gaggagagtg ttgctggagc tgtacagacc ctgcttctca ggtcccagga 300
aggtggcgtc anatctgcag ccgcgtcgac gttgtcggag cctccgcgga ngacccagc 360
agagccggac tangaccagg gccttgggct tcccaacttc ccatggagaa gctggcgggc 420
ttaagagccc aagggtcgc cgtctggcgt aanttcagtg ccatacaact tgagtctgta 480
attagtagtg tgactactta aggtgggttt tgtage 516

```

```

<210> 5
<211> 411
<212> DNA
<213> Homo sapiens

```

```

<220>
<221> misc_feature
<223> Incyte ID No.: 1807728F6

```

```

<220>
<221> unsure
<222> 63, 396, 406-408, 410
<223> a, t, c, g, or other

```

```

<400> 5
ggcaccocgg ccccgccggg ccccgccgga cggcgggcaa aggtcccagg aaggtggcgt 60
canatctgca gccgcgtcga cgttctcgga gcctccgagg aggaccagg agagccggac 120
taggaccagg gccctgggac tccccacact ccccatggag aagctggcgg cctctacaga 180
gccccaaagg cctcggccgg tcctgggccc tgagagtgtc caggtgcccg atgaccaaga 240
ctttcgcagc ttccggtcag agtgtgaggg tgaggtgggc tggaacctga cctatagcag 300
ggctggggtg tctgtctggg tgcaggctgt ggagatggat cggacgctgc acaagatcaa 360
gtgccggatg gactgtctgt atgtgccagc cgaganatct acgacnnncn a 411

```

```

<210> 6
<211> 248
<212> DNA
<213> Homo sapiens

```

```

<220>
<221> misc_feature
<223> Incyte ID No.: 1772859H1

<400> 6
gagtgtcag gtgcccgatg accaagactt tcgcagcttc cggtcagagt gtgaggctga 60
ggtggctgg aacctgacct atagcagggc tgggggtgtct gtctgggtgc aggctgtgga 120
gatgatcgg acgctgcaca agatcaagtg ccgatggag tgctgtgatg tgccagccga 180
gacactctac gacgtectac acgacattga gtaccgcaag aaatgggaca gcaacgtcat 240
tgagactt 248

<210> 7
<211> 277
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<223> Incyte ID No.: 1505466H1

<400> 7
agccgagaca ctctacgacg tcctacaoga cattgagtac cgcaagaaat gggacagcaa 60
cgtcattgag acctttgaca tcgcccgtt gacagtcaac gctgacgtgg gctattactc 120
ctggaggtgt cccaagcccc tgaagaaccg tgatgtcacc accctccgct cctggctccc 180
catgggctgt gattacatca ttatgaacta ctcaagtcaa catcccaaat acccacctcg 240
gaaagattgg tccgagctgt gtccatccag acgggct 277

<210> 8
<211> 287
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<223> Incyte ID No.: 798614H1

<220>
<221> unsure
<222> 7, 28, 87, 97, 184, 198, 224, 277
<223> a, t, c, g, or other

<400> 8
cgacgtincta cagcagattg agtaccgnaa gaaatgggac agcaacgtca ttgagacttt 60
tgacatcgac cgcttgacag tcaacgntga cgtgggntat tactctctgga ggtgtcccaa 120
gccctgaag aaccgtgatg tcatcaacct tcggttctgg gttcccatgg gcgctgatta 180
catnattatg aactactnag tcaaacatcc caaatacca cctnngaaaag acttggctccg 240
agctgtgtcc atccagacgg ggtacctgat tcagagnaca agggcca 287

<210> 9
<211> 278
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<223> Incyte ID No.: 4114738H1

<220>
<221> unsure
<222> 46, 82, 83, 201, 203, 222, 228
<223> a, t, c, g, or other

```

<400> 9
 ctcggaaaaga cttggtccga gctgtgtcca tccagacggg ctaccncatc cagagcacag 60
 ggcccaagag ctgctgcatc annacctggc ccagggtggac cccaaaggct ccttaccocaa 120
 gtgggtgggtg aataaatctt ctcaagtctt ggctcccaag gccatgaaga agatgtacaa 180
 ggcgtgcctc aagtaccccg ngnggaaaca gaagcacctg gnetcatnca agtgtggctg 240
 caccocggagc agagcccgtt gccgagcctg gcgctgtc 278

<210> 10
 <211> 278
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> Incyte ID No.: 1923871H1

<400> 10
 caggcccaag agctgcgtca tcacctacct ggcccagggtg gaccccaaaag gctccttacc 60
 caagtgggtg gtgaataaat cttctcagtt cctggctccc aaggccatga agaagatgta 120
 caaggcgtgc ctcaagtacc ccgagtggaa acagaagcac ctgcctcact tcaagccgtg 180
 gctgcacccg gaggagagcc cgttgcggag cctggcgtctg tcggagctgt ccgtgcagca 240
 tgcggactca ctggagaaca tcgacgagag ccgctgtg 278

<210> 11
 <211> 232
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> Incyte ID No.: 2013709H1

<220>
 <221> unsure
 <222> 61
 <223> a, t, c, g, or other

<400> 11
 cggactcact ggagaacatc gaccgagcgc cgggtggccga gaccgagag gagcggatgg 60
 ncggcgcggg cggcgagggc agcgcagcgc acacctcgtc cacctgagcg ccgcaccgct 120
 tcagggacgg agacaggacc gggcgagccc tggggcggcg gccgctcctg cactttctcc 180
 cctccccac ccggcacctg gtggcacggg ccaggcccag gccgggtgctg ca 232

<210> 12
 <211> 289
 <212> DNA
 <213> Rattus norvegicus

<220>
 <221> misc_feature
 <223> Incyte ID No.: 700488211H1

<220>
 <221> unsure
 <222> 37
 <223> a, t, c, g, or other

<400> 12
 gaggccacct tctgggacc tgtacgggct tcttgcnngg gccggccggg gccggggtgc 60
 gagctcttcc gccgcgccga cgttgtotga gctcgcggg aggaccocagg agagtccggac 120
 taggaccagg gccccgggccc tccccacgct ctctatggaa aagccagctg cttcaacaga 180

accccaaggg cctcggcccg ctttgggocg tgaaagtgtc caggtgcccg atgaccagga 240
 cttccgcagt ttctggtcag agtgtgagge cgaggtgggtg gaacctgac 289

<210> 13
 <211> 279
 <212> DNA
 <213> Rattus norvegicus

<220>
 <221> misc_feature
 <223> Incyte ID No.: 700607704H1

<400> 13
 aagtgtccag gtgcccgatg accaggactt ccgcagtttt cggtcagagt gtgaggccga 60
 ggtgggctgg aacctgacct acagcaaggc cgggtgtgtct gtgtgggtgc aggctgtgga 120
 gatggatcga actctgcaca agatcaagtg caggatggaa tgctgtgacg taccagctga 180
 gacgtcttac gatgtcctgc acgacataga ataccgaaag aagtgggaca gtaatgtcat 240
 cgagacattc gacatcgctc gactgactgt caacgctga 279

<210> 14
 <211> 272
 <212> DNA
 <213> Rattus norvegicus

<220>
 <221> misc_feature
 <223> Incyte ID No.: 701255162H1

<400> 14
 cgacatcgct cgactgactg tcaacgctga cgtaggatat tactcctgga ggtgtcccaa 60
 gccctgaag aaccgtgatg tcatcacctt ccgctcctgg ctccccatgg gcgctgatta 120
 catcattatg aactactcag tgaaacacc ctaaatacca cctcggaaag acttgggtccg 180
 agctgtgtcc atccagacgg gctacctcat ccagagcacg gggcccaaga gctgtgtcat 240
 cacctacctg gcccaagtgg accccaaagg ct 272

<210> 15
 <211> 239
 <212> DNA
 <213> Rattus norvegicus

<220>
 <221> misc_feature
 <223> Incyte ID No.: 700137522H1

<220>
 <221> unsure
 <222> 194
 <223> a, t, c, g, or other

<400> 15
 tcttgcccc caaggccatg aagaagatgt acaaggcctg catcaagtac cctgagtgga 60
 agcagaaaca ccagccacat ttcaagccat ggctgcaccc ggagcagagc ccgttaccca 120
 gcctggcgct gtcagagctg tcgggtgcaac acgcagactc actggagAAC atcgacgaga 180
 gcgccgtgac aganagccgg gaggagcggg cgggtggagc aggagagggc agcogatgac 239

<210> 16
 <211> 270
 <212> DNA
 <213> Rattus norvegicus

```

<220>
<221> misc_feature
<223> Incyte ID No.: 701435117T1

<220>
<221> unsure
<222> 2, 5, 34, 52, 74, 216
<223> a, t, c, g, or other

<400> 16
anctnagcag gagcccagtg cccccaaaag gcangtgggg gaagggagga antgcagaag 60
gctcagtgcc ccanggttcc acnccagtec tgtcttggtc cttgaagaga ggcggttctc 120
aggtagtgga tgtgtcgtca tcgctgcct ctctgctcc aaccgnccgc tectcccggc 180
tctctgtcac ggcgtctcg tegatgtct ccagtnagtc tgcgtgttgc accgacagct 240
ctgacagcgc caggctgggt aacgggctct 270

<210> 17
<211> 174
<212> PRT
<213> Mus musculus

<300>
<308> g897786

<400> 17
Ile Tyr Arg Leu Leu Asp Gln Pro Ser Gly Leu Tyr Glu Tyr Lys
 1 5 10 15
Val Phe Gly Val Leu Glu Gly Cys Ser Pro Ala Leu Leu Ala Asp
 20 25 30
Val Tyr Met Asp Leu Asp Tyr Arg Lys Gln Trp Asp Gln Tyr Val
 35 40 45
Lys Glu Leu Tyr Glu Lys Glu Ser Asp Glu Gln Met Val Ala Tyr
 50 55 60
Trp Glu Val Lys Tyr Pro Phe Pro Leu Ser Asn Arg Asp Tyr Val
 65 70 75
Tyr Thr Arg Gln Arg Arg Asp Leu Asp Val Asp Arg Arg Lys Ile
 80 85 90
Tyr Val Val Leu Ala Gln Ser Ile Ser Ala Pro Gln Phe Pro Glu
 95 100 105
Lys Ser Gly Val Ile Arg Val Lys Gln Tyr Lys Gln Ser Leu Ala
 110 115 120
Ile Glu Ser Asp Gly Lys Lys Gly Ser Arg Val Phe Met Tyr Tyr
 125 130 135
Phe Asp Asn Pro Gly Gly Gln Ile Pro Ser Trp Leu Ile Asn Trp
 140 145 150
Ala Ala Lys Asn Gly Val Pro Asn Phe Leu Lys Asp Met Val Lys
 155 160 165
Ala Cys Gln Asn Tyr His Lys Lys Thr
 170

```

【図面の簡単な説明】

【図1A】

本哺乳動物タンパク質のアミノ酸配列 (SEQ ID NO:2) をコードする核酸配列 (SEQ ID NO:1) を示す。このアラインメントは、MACDNASIS PROソフトウェア(Hitachi Software Engineering, South San Francisco CA)を用いて作成した。

【図1B】

本哺乳動物タンパク質のアミノ酸配列 (SEQ ID NO:2) をコードする核酸配列 (SEQ ID NO:1) を示す。このアラインメントは、MACDNASIS PROソフトウェア(H

Hitachi Software Engineering, South San Francisco CA)を用いて作成した。

【図1C】

本哺乳動物タンパク質のアミノ酸配列 (SEQ ID NO:2) をコードする核酸配列 (SEQ ID NO:1) を示す。このアラインメントは、MACDNASIS PROソフトウェア (Hitachi Software Engineering, South San Francisco CA)を用いて作成した。

【図1D】

本哺乳動物タンパク質のアミノ酸配列 (SEQ ID NO:2) をコードする核酸配列 (SEQ ID NO:1) を示す。このアラインメントは、MACDNASIS PROソフトウェア (Hitachi Software Engineering, South San Francisco CA)を用いて作成した。

【図1E】

本哺乳動物タンパク質のアミノ酸配列 (SEQ ID NO:2) をコードする核酸配列 (SEQ ID NO:1) を示す。このアラインメントは、MACDNASIS PROソフトウェア (Hitachi Software Engineering, South San Francisco CA)を用いて作成した。

【図2】

MEGALIGNプログラム (DNASTAR, Madison WI)を用いて作成した、SEQ ID NO:1とSEQ ID NO:17 (マウス肺PC-TP ; GI897786) との間のアラインメントを示す。

【图 1 A】

11 5' ATCGT TCT GTG GTC CTT TCT TTT ATG ATT CAC AAG GAA TGA CCC TCT TCA TCG CCT 56
 20 38 47
 65 CTC CTA ATT CAG TCC TCA CAA CAG TCC TTT TAC AAA TGG GAC AAC AGG TTA GAG 110
 74 83 92 101
 119 GAA GTC AGG CAG ATT TCC AGC ATC ATA GAG AGT AAA GGA CCA GGG AAG GAT CAG 164
 128 137 146 155
 173 GAT TCA AGG ACT GCA CCC AGG CTC TGC TTC CAG CTT GCT GTG TGA CTT TGG GTA 218
 182 191 200 209
 227 ATT TTG TTC CCT TAG GGA ACT GAG CTT TCT CAT TTG TAA ATG CAA ACA GGC TGT 272
 236 245 254 263
 281 TGG GAG GAT CAA ATG AGA TCC AGG GGT GAA AAC AGC TTA GTT TAC TTT CAG GAA 326
 290 299 308 317
 335 TTT ACC CAC GCG GTA TAT AAA GGC AAA ATA TTA TTA TAG TCA GGT GAT TGT AGA 380
 344 353 362 371

【 1 B 】

389 398 407 416 425 434
 TTG AGG AAC CCA TTT CCT CAT CCT GCA AAT TGC AAA CCT GAG GGC CCA AAG AGG

 443 452 461 470 479 488
 GAC AGG GGC TTG CCC CAG GTC TCA GCA GGC TGT GAG CAA GAG CTA AAG CCT AAT

 497 506 515 524 533 542
 CCT CCT GCC TTT GGG CCT GGA GCC CTT CCT TGT ACC CCA GGG GTC AGT GTC TTT

 551 560 569 578 587 596
 GTT GGA TAC AGG CTT AGA TTG ACT GAC TGT ACC CTG AGA ACC TAG GGG AGT CCC

 605 614 623 632 641 650
 TGT TCC CAA TTC TTC TCC TAC CCC CAC CTT GGC CTG ATG GAG GAA GAC CCT GCT

 659 668 677 686 695 704
 GTG TTG AGA TGA GCA CCA GAG CCA AGA AGC TGA GGA GGA TCT GGA GAA TTC TGG

 713 722 731 740 749 758
 AGG AAG AGG AGA GTG TTG CTG GAG CTG TAC AGA CCC TGC TTC TCA GGT CCC AGG

【図 1 C】

767	AAG GTG GCG TCA GCA TCT GCA GCC GCG TCG ACG TTG TCG GAG CCT CCG CGG AGG	776	785	794	803	812
821	ACC CAG GAG AGC CGG ACT AGG ACC AGG GCC CTG GGC CTC CCC ACA CTC CCC ATG M	830	839	848	857	866
875	GAG AAG CTG GCG GCC TCT ACA GAG CCC CAA GGG CCT CGG CCG GTC CTG GGC CGT	884	893	902	911	920
929	GAG AGT GTC CAG GTG CCC GAT GAC CAA GAC TTT CGC AGC TTC CGG TCA GAG TGT	938	947	956	965	974
983	GAG GCT GAG GTG GGC TGG AAC CTG ACC TAT AGC AGG GCT GGG GTG TCT GTC TGG	992	1001	1010	1019	1028
1037	GTG CAG GCT GTG GAG ATG GAT CGG ACG CTG CAC AAG ATC AAG TGC CGG ATG GAG	1046	1055	1064	1073	1082
1091	TGC TGT GAT GTG CCA GCC GAG ACA CTC TAC GAC GTC CTA CAC GAC ATT GAG TAC	1100	1109	1118	1127	1136

【圖 1 D】

1145	1154	1163	1172	1181	1190
CGC AAG AAA TGG GAC AGC AAC GTC ATT GAG ACT TTT GAC ATC GCC CGC TTG ACA					
R K K W D S N V I E T F D I A R L T					
1199	1208	1217	1226	1235	1244
GTC AAC GCT GAC GTG GGC TAT TAC TCC TGG AGG TGT CCC AAG CCC CTG AAG AAC					
V N A D V G G Y S W R C P K P L K N					
1253	1262	1271	1280	1289	1298
CGT GAT GTC ATC ACC CTC CGC TCC TGG CTC CCC ATG GGC GCT GAT TAC ATC ATT					
R D V I T L R S W L P M G A D Y I I					
1307	1316	1325	1334	1343	1352
ATG AAC TAC TCA GTC AAA CAT CCC AAA TAC CCA CCT CGG AAA GAC TTG GTC CGA					
M N Y S V K H P K Y P P R K D L V R					
1361	1370	1379	1388	1397	1406
GCT GTG TCC ATC CAG ACG GGC TAC CTC ATC CAG AGC ACA GGG CCC AAG AGC TGC					
A V S I Q T G Y L I Q S T G P K S C					
1415	1424	1433	1442	1451	1460
GTC ATC ACC TAC CTG GCC CAG GTG GAC CCC AAA GGC TCC TTA CCC AAG TGG GTG					
V I T Y L A Q V D P K G S L P K W V					
1469	1478	1487	1496	1505	1514
GTG AAT AAA TCT TCT CAG TTC CTG GCT CCC AAG GCC ATG AAG AAG ATG TAC AAG					
V N K S S Q F L A P K A M K K M Y K					

【 1 E 】

1523 1532 1541 1550 1559 1568
 GCG TGC CTC AAG TAC CCC GAG TGG AAA CAG AAG CAC CTG CCT CAC TTC AAG CCG
 A C L K Y P E W K Q K H L P H F K P

 1577 1586 1595 1604 1613 1622
 TGG CTG CAC CCG GAG CAG AGC CCG TTG CCG AGC CTG GCG CTG TCG GAG CTG TCG
 W L H P E Q S P L P S L A L S E L S

 1631 1640 1649 1658 1667 1676
 GTG CAG CAT GCG GAC TCA CTG GAG AAC ATC GAC GAG AGC GCG GTG GCC GAG AGC
 V Q H A D S L E N I D E S A V A E S

 1685 1694 1703 1712 1721 1730
 AGA GAG GAG CCG ATG GGC GGC GGC GGC GGC GGC AGC GAC GAC GAC ACC TCG
 R E R M G G A G G E G S D D T S

 1739 1748 1757 1766 1775 1784
 CTC ACC TGA GCG CCG CAC CGC TTC AGG GAC GGA GAC AGG ACC GGG CGA GCC CTG
 L T

 1793 1802 1811 1820 1829 1838
 GGG CCG CCG CTC CTG CAC TTT CTC CCC TCC CCC ACC CGG CAC CTG GTG GCA

 1847 1856 1865
 CCG GGC CAG GCC CAG GCG GGT GCT GCA 3'

1772859 66 HKIKCFMECCDVP AETLYDVLHDI EYRKKWDSNVIEIFDIARLIVNADVGYYSWRCPKPL 125
 +K+ +E C PA L DV D++YRK+WD V E ++ + + V Y+ + P PL
 GI 897786 14 YKVFVLECCS-PA-LLADVMDLDYRKQWDQYVKELYE--KESDEQMVAXWEVKYPPFL 69

1772859 126 KNRDVITLRSWLPMGAD----YIIMNYSVKHPKYP PPKDLVRAVSIQTGYLIQSTGPK-S 180
 NRD + R + D Y+++ S+ P++P + ++R + I+S G K S
 GI 897786 70 SNRDYVYTRQRRDLVD RRRKIYVVL AQSISAPQFPEKSGVIRVKQYKQSLAIESDGKKS 129

1772859 181 CVITYLAQVDPKGS LPKWVVKSSQFLAPKAMKMYKACLKY 222
 V Y +P G +P W++N +++ P +K M KAC Y
 GI 897786 130 RVFMYFD-NPGGQIPSWLINWAAKNGV PNF LKDMVKACQNY 170

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/US 00/13426

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>DATABASE EMBL 'Online! EBI; ACC. NO.: AF151810, 1 June 1999 (1999-06-01) LAI ET AL.: "Identification of novel human genes evolutionary conserved in Caenorhabditis elegans by comparative proteomics" XP002147773 abstract</p>	1-13,15, 16
A	<p>PONTING ET AL.: "START: a lipid binding domain in StAR, HD-ZIP and signalling proteins" TRENDS IN BIOCHEMICAL SCIENCES, vol. 24, no. 4, April 1999 (1999-04), pages 130-131, XP004162804 page 130, column 3 -page 131, column 1; figure 1</p>	1-13, 15-18,20
A	<p>US 5 622 843 A (DAY JOSEPH R ET AL) 22 April 1997 (1997-04-22) claims 1-8; examples 1,2</p>	1-13, 15-18,20
A	<p>GEIJTENBEEK ET AL.: "cDNA cloning and tissue-specific expression of the phosphatidylcholine transfer protein gene" BIOCHEMICAL JOURNAL, vol. 316, 1996, pages 49-55, XP002147771 cited in the application figures 2,4</p>	1-13, 15-18,20

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 14,19

Claims 14, 19 refer to a molecule without giving a true technical characterization. Moreover, no such compound is defined in the application. In consequence, the scope of said claims is ambiguous and vague, and their subject-matter is not sufficiently disclosed and supported (Art. 5 and 6 PCT). No search can be carried out for such purely speculative claims whose wording is, in fact, a mere recitation of the results to be achieved.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International Application No
PCT/US 00/13426

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5622843 A	22-04-1997	AU 1339595 A	17-07-1995
		WO 9518227 A	06-07-1995
		US 5610019 A	11-03-1997

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)	
C 1 2 N	1/19	C 1 2 N	1/21	4 C 0 8 4
	1/21	C 1 2 P	21/02	C 4 C 0 8 5
	5/10	C 1 2 Q	1/68	A 4 H 0 4 5
C 1 2 P	21/02	G 0 1 N	33/15	Z
C 1 2 Q	1/68		33/50	Z
G 0 1 N	33/15		33/53	M
	33/50		33/566	
	33/53	A 6 1 K	39/395	D
	33/566			Y
// A 6 1 K	38/00		45/00	
	39/395		48/00	
		A 6 1 P	1/00	
	45/00		3/00	
	48/00		7/00	
A 6 1 P	1/00		9/00	
	3/00		13/00	
	7/00		17/00	
	9/00		19/00	
	13/00		21/00	
	17/00		25/00	
	19/00		27/02	
	21/00		35/00	
	25/00	C 1 2 N	15/00	Z N A A
	27/02		5/00	A
	35/00	A 6 1 K	37/02	

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(72)発明者 ボーゲン、マライア・アール
 アメリカ合衆国カリフォルニア州94577・
 サンレアンドロ・サンティアゴロード
 14244

Fターム(参考) 2G045 AA40 DA12 DA13 DA14 FB02
FB03
4B024 AA01 AA11 BA80 CA04 CA09
CA11 DA01 DA02 DA05 DA11
EA01 EA02 EA03 EA04 GA11
HA01 HA12
4B063 QA01 QA18 QA19 QQ42 QQ52
QR08 QR42 QR55 QR62 QR82
QS25 QS34 QS36 QX02
4B064 AG01 CA01 CC24 DA01 DA13
4B065 AA01X AA57X AA87X AA90Y
AB01 BA01 CA24 CA44 CA46
4C084 AA02 AA06 AA13 AA17 BA01
BA08 BA22 BA23 BA35 BA44
CA17 CA70 NA14 ZA012
ZA332 ZA362 ZA512 ZA662
ZA812 ZA942 ZB262 ZC332
ZC352 ZC542
4C085 AA13 AA33 BB11 BB31 CC01
CC21 CC22 EE01
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10
CA40 DA00 DA76 EA20 EA50
FA72 FA74 GA26

专利名称(译)	脂质转运蛋白		
公开(公告)号	JP2003501088A	公开(公告)日	2003-01-14
申请号	JP2001502581	申请日	2000-05-16
[标]申请(专利权)人(译)	洞察Genomics公司		
申请(专利权)人(译)	洞察基因组公司		
[标]发明人	カイザーマシューアール ヒルマンジェニファーエル ボーグンマライアアール		
发明人	カイザー、マシューアール ヒルマン、ジェニファーエル ボーグン、マライアアール		
IPC分类号	G01N33/50 A61K38/00 A61K39/395 A61K45/00 A61K48/00 A61P1/00 A61P3/00 A61P7/00 A61P9/00 A61P13/00 A61P17/00 A61P19/00 A61P21/00 A61P25/00 A61P27/02 A61P35/00 C07K1/22 C07K14 /47 C07K16/18 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12N15/12 C12P21/02 C12Q1 /68 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/566		
CPC分类号	A61P1/00 A61P3/00 A61P13/00 A61P17/00 A61P19/00 A61P21/00 A61P25/00 A61P27/02 C07K14/47 Y10T436/143333		
FI分类号	C07K1/22 C07K14/47 C07K16/18 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02.C C12Q1/68.A G01N33 /15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.M G01N33/566 A61K39/395.D A61K39/395.Y A61K45/00 A61K48/00 A61P1/00 A61P3/00 A61P7/00 A61P9/00 A61P13/00 A61P17/00 A61P19/00 A61P21/00 A61P25/00 A61P27/02 A61P35/00 C12N15/00.ZNA.A C12N5/00.A A61K37/02		
F-TERM分类号	2G045/AA40 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/FB02 2G045/FB03 4B024/AA01 4B024 /AA11 4B024/BA80 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/CA11 4B024/DA01 4B024/DA02 4B024/DA05 4B024/DA11 4B024/EA01 4B024/EA02 4B024/EA03 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA01 4B024 /HA12 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QR08 4B063/QR42 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QR82 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QX02 4B064 /AG01 4B064/CA01 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA01X 4B065/AA57X 4B065 /AA87X 4B065/AA90Y 4B065/AB01 4B065/BA01 4B065/CA24 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA06 4C084/AA13 4C084/AA17 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA22 4C084/BA23 4C084 /BA35 4C084/BA44 4C084/CA17 4C084/CA70 4C084/NA14 4C084/ZA012 4C084/ZA332 4C084 /ZA362 4C084/ZA512 4C084/ZA662 4C084/ZA812 4C084/ZA942 4C084/ZB262 4C084/ZC332 4C084 /ZC352 4C084/ZC542 4C085/AA13 4C085/AA33 4C085/BB11 4C085/BB31 4C085/CC01 4C085/CC21 4C085/CC22 4C085/EE01 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045 /CA40 4H045/DA00 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/FA74 4H045/GA26		
优先权	09/328869 1999-06-08 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了哺乳动物核酸分子及其片段。本发明还涉及用于表征, 诊断, 评估, 治疗和预防与基因表达有关的症状, 疾病或病症的方法, 以及使用该核酸分子产生模型系统的方法。本发明进一步提供表达载体和宿主细胞, 其产生由该哺乳动物核酸分子编码的蛋白质。

