

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2006-51032

(P2006-51032A)

(43) 公開日 平成18年2月23日(2006.2.23)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 B	4 B O 6 4
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	4 B O 6 5
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 C O 8 4
C 1 2 P 21/02 (2006.01)	C 1 2 P 21/02 C	4 C O 8 5

審査請求 未請求 請求項の数 23 O L (全 156 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2005-238274 (P2005-238274)	(71) 出願人	596168317
(22) 出願日	平成17年8月19日 (2005.8.19)		ジェネンテック・インコーポレーテッド
(62) 分割の表示	特願2005-235120 (P2005-235120) の分割		GENENTECH, INC.
原出願日	平成12年5月22日 (2000.5.22)		アメリカ合衆国カリフォルニア・94080-4990・サウス・サン・フランシスコ・ディーエヌイー・ウェイ・1
(31) 優先権主張番号	60/139,695	(74) 代理人	100109726
(32) 優先日	平成11年6月15日 (1999.6.15)		弁理士 園田 吉隆
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100101199
(31) 優先権主張番号	60/145,070		弁理士 小林 義教
(32) 優先日	平成11年7月20日 (1999.7.20)	(72) 発明者	アシケナジ, アヴィ, ジェー.
(33) 優先権主張国	米国 (US)		アメリカ合衆国 カリフォルニア 94402, サン マテオ, テリータウン ストリート 1456
(31) 優先権主張番号	60/145,698		
(32) 優先日	平成11年7月26日 (1999.7.26)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 分泌及び膜貫通ポリペプチドとそれをコードする核酸

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】新規な分泌・膜貫通型ポリペプチド、及びそれらをコードする核酸分子の構造(シグナル配列と細胞外ドメイン等を含む、アミノ酸配列と塩基配列、その分子間相同性等)を明らかにし、医薬品・診断法開発の基礎情報を提供する。

【解決手段】ケモカイン、EGFファミリーの新規ペプチドを含む、多数のポリペプチドをコードする核酸の塩基配列を含むベクター及び宿主細胞、異種性ペプチドに融合したキメラ分子、結合抗体、及びそれらの製造方法を提示した。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下の (a) 又は (b) のポリペプチドをコードする単離された核酸：

- (a) 配列番号：24 に示されているアミノ酸配列を有するポリペプチド；及び
 (b) アミノ酸配列 (a) において、1 若しくは数個のアミノ酸が置換、欠失又は付加されたアミノ酸配列からなり、脂肪細胞においてグルコース及び / 又は F A A の取り込みを促進するポリペプチド。

【請求項 2】

以下の (a) 又は (b) の単離された核酸：

- (a) 配列番号：23 に示されているヌクレオチド配列を有する核酸；及び
 (b) (a) の核酸と相補的なヌクレオチド配列からなる核酸とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、脂肪細胞においてグルコース及び / 又は F A A の取り込みを促進するポリペプチドをコードする核酸。

10

【請求項 3】

以下の (a) 又は (b) の単離された核酸：

- (a) 配列番号：23 に示されているヌクレオチド配列の完全長コード化配列を有する核酸；及び
 (b) (a) の核酸と相補的なヌクレオチド配列からなる核酸とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、脂肪細胞においてグルコース及び / 又は F A A の取り込みを促進するポリペプチドをコードする核酸。

20

【請求項 4】

以下の (a) 又は (b) のポリペプチドをコードする単離された核酸：

- (a) A T C C 寄託番号 2 0 9 4 1 7 で寄託された D N A の完全長コード化配列を有する核酸；及び
 (b) (a) の核酸と相補的なヌクレオチド配列からなる核酸とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、脂肪細胞においてグルコース及び / 又は F A A の取り込みを促進するポリペプチドをコードする核酸。

【請求項 5】

請求項 1 ~ 4 の何れか 1 項に記載の核酸を含んでなるベクター。

【請求項 6】

前記ベクターで形質転換された宿主によって認識されるコントロール配列と作用可能に連結している請求項 5 に記載のベクター。

30

【請求項 7】

請求項 5 に記載のベクターを含んでなる宿主細胞。

【請求項 8】

前記細胞が C H O 細胞である、請求項 7 に記載の宿主細胞。

【請求項 9】

前記細胞が大腸菌である、請求項 7 に記載の宿主細胞。

【請求項 10】

前記細胞が酵母細胞である、請求項 7 に記載の宿主細胞。

40

【請求項 11】

配列番号：15 に示されているポリペプチドの発現に適した条件下で請求項 7 に記載の宿主細胞を培養し、細胞培養から前記ポリペプチドを回収することを含んでなる前記ポリペプチドを生産するための方法。

【請求項 12】

以下の (a) 又は (b) の単離されたポリペプチド：

- (a) 配列番号：24 に示されているアミノ酸配列を有するポリペプチド；及び
 (b) アミノ酸配列 (a) において、1 若しくは数個のアミノ酸が置換、欠失又は付加されたアミノ酸配列からなり、脂肪細胞においてグルコース及び / 又は F A A の取り込みを促進するポリペプチド。

50

【請求項 13】

以下の (a) 又は (b) の単離されたポリペプチド：

(a) ATCC 寄託番号 209417 で寄託された DNA によってコードされているポリペプチド；及び

(b) アミノ酸配列 (a) において、1 若しくは数個のアミノ酸が置換、欠失又は付加されたアミノ酸配列からなり、脂肪細胞においてグルコース及び / 又は F A A の取り込みを促進するポリペプチド。

【請求項 14】

異種アミノ酸配列と融合した請求項 12 又は 13 の何れか 1 項に記載のポリペプチドを含んでなるキメラ分子。

10

【請求項 15】

前記異種アミノ酸配列がエピトープタグ配列である、請求項 14 に記載のキメラ分子。

【請求項 16】

前記異種アミノ酸配列が免疫グロブリンの Fc 領域である、請求項 14 に記載のキメラ分子。

【請求項 17】

請求項 12 又は 13 の何れか 1 項に記載のポリペプチドと特異的に結合する抗体。

【請求項 18】

前記抗体が、モノクローナル抗体、ヒト化抗体又は一本鎖抗体である、請求項 17 に記載の抗体。

20

【請求項 19】

以下の (a) 又は (b) の単離された核酸：

(a) 配列番号：24 のアミノ酸位置 1 ~ 23 に位置するシグナルポリペプチドを欠く、該配列番号：15 に示されているポリペプチドをコードする核酸；及び

(b) (a) の核酸と相補的なヌクレオチド配列からなる核酸とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、脂肪細胞においてグルコース及び / 又は F A A の取り込みを促進するポリペプチドをコードする核酸。

【請求項 20】

以下の (a) 又は (b) の単離された核酸：

(a) 配列番号：24 のアミノ酸位置 1 ~ 23 に位置するシグナルポリペプチドを含む、該配列番号：24 に示されている細胞外ドメインをコードする核酸；及び

(b) (a) の核酸と相補的なヌクレオチド配列からなる核酸とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、脂肪細胞においてグルコース及び / 又は F A A の取り込みを促進するポリペプチドのシグナルポリペプチドを含む細胞外ドメインをコードする核酸。

30

【請求項 21】

以下の (a) 又は (b) の単離された核酸：

(a) 配列番号：24 のアミノ酸位置 1 ~ 23 に位置するシグナルポリペプチドを欠く、該配列番号：15 に示されている細胞外ドメインをコードする核酸；及び

(b) (a) の核酸と相補的なヌクレオチド配列からなる核酸とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、脂肪細胞においてグルコース及び / 又は F A A の取り込みを促進するポリペプチドのシグナルポリペプチドを欠く細胞外ドメインをコードする核酸。

40

【請求項 22】

以下の (a) 又は (b) の単離されたポリペプチドの細胞外ドメイン：

(a) 配列番号：24 のアミノ酸位置 1 ~ 23 に位置するシグナルペプチドを含む、該配列番号：15 に示されているポリペプチド；及び

(b) アミノ酸配列 (a) において、1 若しくは数個のアミノ酸が置換、欠失又は付加されたアミノ酸配列からなり、脂肪細胞においてグルコース及び / 又は F A A の取り込みを促進するポリペプチドの細胞外ドメイン。

【請求項 23】

以下の (a) 又は (b) の単離されたポリペプチドの細胞外ドメイン：

50

(a) 配列番号：24のアミノ酸位置1～23に位置するシグナルペプチドを欠く、該配列番号：24に示されているポリペプチド；及び

(b) アミノ酸配列(a)において、1若しくは数個のアミノ酸が置換、欠失又は付加されたアミノ酸配列からなり、脂肪細胞においてグルコース及び/又はFAAの取り込みを促進するポリペプチドの細胞外ドメイン。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(発明の分野)

本発明は一般に新規なDNAの同定と単離及び新規なポリペプチドの組換え生産に関する。 10

【0002】

(発明の背景)

細胞外タンパク質は、特に、多細胞生物の形成、分化及び維持において重要な役割を担っている。多くの個々の細胞の運命、例えば増殖、移動、分化又は他の細胞との相互作用は、典型的には、他の細胞及び/又は直近の環境から受け取る情報に支配される。この情報は、しばしば分泌ポリペプチド(例えば、分裂促進因子、生存因子、細胞障害性因子、分化因子、神経ペプチド、及びホルモン)により伝達され、これが今度は多様な細胞レセプター又は膜結合タンパク質により受け取られ解釈される。これらの分泌ポリペプチド又はシグナル分子は、通常は細胞分泌経路を通過し、細胞外環境のその作用部位に到達する 20

分泌タンパク質は、製薬、診断、バイオセンサー及びバイオリアクターを含む、様々な産業上の利用性を有している。血栓溶解剤、インターフェロン、インターロイキン、エリスロポエチン、コロニー刺激因子、及び種々の他のサイトカインのような、現在入手可能な大抵のタンパク質薬物は分泌タンパク質である。膜タンパク質であるそのレセプターもまた治療又は診断用薬剤としての可能性を有している。新規な未変性の分泌タンパク質を同定する努力が産業界と学术界の両方によってなされている。多くの努力が新規な分泌タンパク質のコード配列を同定するために哺乳動物組換えDNAライブラリーのスクリーニングに注がれている。スクリーニング方法及び技術の例は文献に記載されている[例えば、Klein等, Proc. Natl. Acad. Sci. 93;7108-7113(1996);米国特許第5,536,637号を参照されたい]。 30

【0003】

膜結合タンパク質とレセプターは、とりわけ、多細胞生物の形成、分化及び維持において重要な役割を担っている。多くの個々の細胞の運命、例えば増殖、移動、分化又は他の細胞との相互作用は、典型的には他の細胞及び/又は直近の環境から受け取る情報に支配される。この情報は、しばしば分泌ポリペプチド(例えば、分裂促進因子、生存因子、細胞障害性因子、分化因子、神経ペプチド、及びホルモン)により伝達され、これが次に多様な細胞レセプター又は膜結合タンパク質により受け取られ解釈される。このような膜結合タンパク質と細胞レセプターは、これらに限定されるものではないが、サイトカインレセプター、レセプターキナーゼ、レセプターホスファターゼ、細胞-細胞間相互作用に関与するレセプター、及びセレクチン及びインテグリンのような細胞接着分子を含む。例えば、細胞の増殖及び分化を調節するシグナルの伝達は、様々な細胞タンパク質のリン酸化により部分的に調節される。そのプロセスを触媒する酵素であるプロテインチロシンキナーゼはまた成長因子レセプターとしても作用しうる。具体例には、線維芽細胞成長因子及び神経成長因子レセプターが含まれる。 40

膜結合タンパク質とレセプター分子は、製薬及び診断薬を含む、様々な産業上の利用性を有している。例えば、レセプターイムノアドヘシンはレセプター-リガンド間相互作用を阻止する治療薬として使用することができる。膜結合タンパク質はまた、関連するレセプター/リガンド間相互作用の可能性のあるペプチド又は小分子インヒビターをスクリーニングするために使用することもできる。 50

新規な未変性のレセプター又は膜結合タンパク質を同定するための努力が産業界と学術界の双方によってなされている。多くの努力が、新規なレセプター又は膜結合タンパク質のコード配列を同定するために、哺乳動物組換えDNAライブラリーのスクリーニングに注がれている。

【0004】

1. PRO196

「TIE」又は「tie」という略語は頭文字であり、「チロシンキナーゼ含有Ig及びEGF相同ドメイン」を意味し、血管内皮細胞及び初期造血細胞でほぼ排他的に発現され、EGF様ドメイン、及び一般に「免疫グロブリン(Ig)様」折り畳みと呼ばれる鎖内ジスルフィド結合で安定化された細胞外折り畳み単位の存在を特徴とするレセプターチロシンキナーゼの新規なファミリーを表すのに作られた。ヒト白血球細胞(tie)からのチロシンキナーゼ相同体cDNA断片は、Partanen等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 8913-8917 (1990)に記載されている。このヒト「tie」レセプターのmRNAは、全てのヒト胎児及びマウス胚組織で検出され、心臓及び血管内皮細胞に局在化していると報告されている。Korhonen等, Blood 80, 2548-2555 (1992); PCT出願公報W0 93/14124(1993年7月22日公開)。ヒトtieのラット相同体は「tie-1」と呼ばれ、Maisonpierre等, Oncogene 8, 1631-1637 (1993)によって同定された。「tie-2」と呼ばれる他のtieレセプターは、最初にラットで同定され(Dumont等, Oncogene 8, 1293-1301 (1993))、「ork」と呼ばれるtie-2のヒト相同体は米国特許第5,447,860号(Ziegler)に記載されている。tie-2のマウス相同体は最初「tek」と命名された。脳毛細管cDNAライブラリーからのマウスtie-2レセプターのクローニングはPCT出願公報W0 95/13387(1995年5月18日公開)に記載されている。TIEレセプターは、血管形成に積極的に含まれ、造血でも役割を果たすと考えられる。

ヒトTIE-2リガンドの発現クローニングはPCT出願公報W0 96/11269(1996年4月18日公開)及び米国特許第5,521,073号(1996年5月28日発行)に記載されている。「htie-2リガンド1」又は「hTL1」と呼称されるTIE-2リガンドをコードするgt10と命名されたベクターはATCC登録番号75928で寄託された。「htie-22」又は「hTL2」と命名された他のTIE-2リガンドをコードするプラスミドは、ATCC登録番号75928で入手できる。この第2のリガンドは、TAI-2レセプターのアンタゴニストとして記載されている。TIE-2レセプターの分泌されたヒト及びマウスリガンドの同定は、Davis等, Cell 87, 1161-1169 (1996)に報告されている。血管形成における役割及び造血中の潜在的な作用を反映して「アンジオポエチン-1(Angiopoietin-1)」と命名されたヒトリガンドは、W0 96/11269において「htie-21」又は「hTL-1」のように様々に呼ばれているリガンドと同じリガンドである。アンジオポエチン-1は、後に血管形成の役割を果たし、VEGFとは区別されることが記載されている(Suri等, Cell 87, 1171-1180 (1996))。腫瘍成長に必要な病的血管形成の間にTIE-2は明らかにアップレギュレートされるので(Kaipainen等, Cancer Res. 54, 6571-6577 (1994))、アンジオポエチン-1は腫瘍血管を特異的に標的化するのに更に有用であることが示唆された(Davis等, 上掲)。

【0005】

2. PRO444

新規で未変性の分泌タンパク質を同定するための努力が、産業界と学術界の両方でなされている。多くの努力は、新規な分泌タンパク質のコード配列を同定するための哺乳動物組換えDNAライブラリーのスクリーニングに注がれている。我々は、ここでPRO444ポリペプチドと命名する新規な分泌ポリペプチドをコードするcDNA分子の同定と単離をここに記載する。

【0006】

3. PRO183

新規で未変性の分泌タンパク質を同定するための努力が、産業界と学術界の両方でなされている。多くの努力は、新規な分泌タンパク質のコード配列を同定するための哺乳動物

10

20

30

40

50

組換えDNAライブラリーのスクリーニングに注がれている。我々は、ここでPRO183ポリペプチドと命名する新規な分泌ポリペプチドをコードするcDNA分子の同定と単離をここに記載する。

【0007】

4. PRO185

新規で未変性の分泌タンパク質を同定するための努力が、産業界と学術界の両方でなされている。多くの努力は、新規な分泌タンパク質のコード配列を同定するための哺乳動物組換えDNAライブラリーのスクリーニングに注がれている。我々は、ここでPRO185ポリペプチドと命名する新規な分泌ポリペプチドをコードするcDNA分子の同定と単離をここに記載する。

【0008】

5. PRO210及びPRO217

上皮成長因子(EGF)は上皮細胞及び線維芽細胞を含む様々なタイプの細胞の増殖を刺激する一般的な分裂促進因子である。EGFはEGFレセプター(EGFR)に結合してそれを活性化させ、それが細胞内シグナル伝達及びそれに引き続く効果を開始させる。EGFRは中枢神経系(CNS)の他の領域に加えて、大脳皮質、小脳、及び海馬のニューロン中で発現される。また、EGFはCNSの様々な領域において発現される。従って、EGFは有糸分裂細胞に対してばかりでなく分裂終了ニューロンに対しても作用する。実際、多くの研究において、EGFがCNS中の様々なタイプのニューロンに神経栄養性及び神経調節性効果を有していることが示されている。例えば、EGFは培養された大脳皮質及び小脳ニューロンに直接作用し、神経突起成長と生存を亢進する。他方、EGFはまた中隔コリン作用性及び中脳ドーパミン作用性ニューロンを含む他の細胞型にもグリア細胞を通して間接的に作用する。CNS中のニューロンに対するEGFの効果の証拠は蓄積されつつあるが、作用の機構は本質的に知られていないままである。有糸分裂細胞におけるEGF-誘発シグナル伝達は細胞分裂終了ニューロンにおいてよりもよりよく理解されている。クローン化されたクロム親和細胞腫PC12細胞と培養された大脳皮質ニューロンの研究により、EGF誘発神経栄養性作用がEGFに応答してのEGFRとマイトジェン活性化プロテインキナーゼ(MAPK)の持続性活性化により媒介されることが示唆されている。持続性細胞内シグナル伝達はEGFR下方制御の減少速度と相関し、これはEGFに対するニューロン細胞の応答を決定するかもしれない。EGFは有糸細胞分裂細胞及び細胞分裂終了ニューロンを含む細胞の様々なタイプに作用する多分化能成長因子である可能性が高い。

EGFは、腎臓、膵臓、甲状腺、脳下垂体、神経系及び胃腸系の唾液腺及びブルンアー腺によりつくられ、体液、例えば唾液、血液、脳脊髄液(CSF)、尿、羊水、前立腺液、膵液、及び母乳に見いだされる。Plata-Salaman, Peptides 12: 653-663 (1991)。

EGFは、内因性チロシンキナーゼを含むその膜特異的レセプターにより媒介される。Stoscheck CM等, J. Cell Biochem. 31: 135-152 (1986)。EGFは内因性チロシンキナーゼを活性化する膜貫通シグナルを誘発するそのレセプターの細胞外部分に結合することにより機能すると信じられている。

EGF様ドメインの精製と配列分析により、交差結合して3つのペプチドループをつくりだす6個の保存システイン残基の存在が明らかになった。Savage CR等, J. Biol. Chem. 248: 7669-7672 (1979)。幾つかの他のペプチドは、Xは任意の非システインアミノ酸を表し、nは可変の繰り返し数である、同じ一般化されたモチーフ $X_nCX_7CX_{4/5}CX_{10}CX_5GX_2CX_n$ を共有するEGFレセプターと反応しうるものが今は一般的に知られている。このモチーフを有する非単離ペプチドは、TGF-、アンフィレギュリン、シュワン細胞腫由来成長因子(SDGF)、ヘパリン結合EGF様成長因子及びある種のウイルス性コード化ペプチド(例えばワクシニアウイルス、Reisner, AH, Nature 313: 801-803 (1985)、ショーブ線維腫ウイルス、Chang W.等, Mol Cell Biol. 7: 535-540 (1987)、伝染性軟属腫、Porter CD及びArchard, LC, J. Gen. Virol. 68: 673-682 (1987)、及び粘液腫ウイルス、Upton C等, J. Virol. 61: 1271-1275 (1987)、Prigent SA及びLem

10

20

30

40

50

oine, N.R., Prog. Growth Factor Res.. 4: 1-24 (1992)を含む。

E G F様ドメインは成長因子に制限されず、細胞接着、タンパク質 - タンパク質相互作用と発達において興味有る性質を有している様々な細胞表面及び細胞外タンパク質において観察されている。Laurence DJR及びGusterson BA, Tumor Biol. 11: 229-261 (1990)。これらのタンパク質は血液凝固因子(因子V I、I X、X、X I I、プロテインC、プロテインS、プロテインZ、組織プラスミノゲンアクチベーター、ウロキナーゼ)、細胞外マトリックス成分(ラミニン、サイトタクチン、エンタクチン)、細胞表面レセプター(L D Lレセプター、トロンボモジュリンレセプター)及び免疫関連タンパク質(補体C 1 r、ウロモジュリン)を含む。

更により興味深いことには、E G F様前駆体の一般的構造パターンは下等生物並びに哺乳動物細胞を通して保存されている。発達上の優位性を持つ多くの遺伝子はE G F様反復を持つ無脊椎動物において同定されている。例えば、ショウジョウバエのnotch遺伝子は、E G Fとの相同性を示す36の直列に配置された40のアミノ酸反復をコードしている。Wharton W等, Cell 43: 557-581 (1985)。ヒドロパシープロットは推定膜貫通スパニングドメインを示し、そのE D F関連配列は膜の細胞外側に位置している。E G F様反復を持つ他のホメオティック遺伝子は、Notchに基づくプローブを使用して同定されたデルタ、95F及び5ZD、及び2つの特定された細胞の間に伝達される発生的シグナルに対する推定レセプターをコードする線虫遺伝子Lin-12を含む。

特に、E G Fは胃腸粘膜の保存と維持及び急性及び慢性粘膜病状の修復、Konturek, PC等, Eur. J. Gastroenterol Hepatol. 7 (10), 933-37 (1995)で、壊死性腸炎、ゾリンジャー・エリソン症候群、胃腸潰瘍形成及び先天性微絨毛萎縮症、A. Guglietta及びPB Sullivan, Eur. J. Gastroenterol Hepatol, 7(10), 945-50 (1995)の治療における可能性を有していることが示された。また、E G Fは、毛包分化; C.L. du Cros, J. Invest. Dermatol. 101 (1 Suppl.), 106S-113S (1993), SG Hillier, Clin. Endocrinol. 33(4), 427-28 (1990); 腎機能、L.L. Hamm等, Semin. Nephrol. 13(1): 109-15 (1993), RC Harris, Am. J. Kidney Dis. 17(6): 627-30 (1991); 涙液、GB van Settent等, Int. Ophthalmol 15(6): 359-62 (1991); ビタミンK媒介血液凝固、J. Stenflo等, Blood 78(7): 1637-51 (1991)に参与していた。E G Fはまた異常なケラチノサイト分化により特徴づけられる様々な皮膚疾患、例えば乾癬、上皮ガン、例えば肺の扁平上皮ガン、外陰部の表皮ガン及び神経膠腫に関連している。King, LE等, Am. J. Med. Sci. 296: 154-158 (1998)

非常に興味深いのは、成長因子シグナル伝達経路における遺伝的変更が発育異常とガンを含む慢性疾患に密接に関連しているという証拠である。Aaronson SA, Science 254: 1146-1153 (1991)。例えば、E G Fレセプタータンパク質と密接な構造類似性を持つプロトガン遺伝子c - e r b - 2 (またH E R - 2としても知られている)がヒト乳ガンにおいて過剰発現されている。King等, Science 229: 974-976 (1985); Gullick, WJ, Hormones and their actions, Cooke BA等, eds, Amsterdam, Elsevier, pp349-360 (1986)。

【 0 0 0 9 】

6 . P R O 2 1 5

タンパク質-タンパク質相互作用はレセプター及び抗原複合体及びシグナル伝達機構を含む。タンパク質-タンパク質相互作用の基となる構造的及び機能的機構についてよく知られているように、タンパク質-タンパク質相互作用は、タンパク質-タンパク質相互作用の特定の結果を調節するように更に容易に操作することができる。従って、タンパク質-タンパク質相互作用の基となる機構は科学及び医学界にとって興味深い。

ロイシンリッチ反復を含む全てのタンパク質はタンパク質-タンパク質相互作用に関与していると考えられている。ロイシンリッチ反復は多様な機能と細胞位置を持つ多くのタンパク質に存在する短い配列モチーフである。リボヌクレアーゼインヒビタータンパク質の結晶構造から、ロイシンリッチ反復は - 構造単位に対応することが明らかになった。これらの単位は、一面が溶媒に暴露された平行なシートを形成するように配置され、タンパク質は珍しい非球状の形状を獲得している。これらの二つの特徴はロイシンリッチ

反復を含むタンパク質のタンパク質結合機能が原因であることが示されている。Kobe及び Deisenhofer, Trends Biochem.Sci., 19(10):415-421 (Oct.1994)を参照されたい。

個体発生の間にコラーゲン原線維を配向させ指令する組織オーガナイザーとなり、創傷治癒、組織修復、及び腫瘍ストロマ形成のような病理プロセスに關与するロイシンリッチプロテオグリカンについての研究が報告されている。Iozzo,R.V., Crit.Rev.Biochem.Mol.Biol., 32(2):141-174 (1997)。創傷治癒及び組織修復におけるロイシンリッチタンパク質の關与を示す他の研究は、De La Salle, C.等, Vouv.Rev.Fr.Hematol. (Germany),37(4):215-222 (1995)であり、出血疾患ベルナル-スーリエ症候群に伴う複合体におけるロイシンリッチモチーフの突然変異を報告しており、Chlemetson,K.J., Thromb.Haemost. (Germany),74(1):111-116 (July 1995)は、血小板がロイシンリッチ反復を有していることを報告している。ロイシンリッチ反復を有することが報告されている他のタンパク質は、アルツハイマー病のような神経変性疾患、パーキンソン病のような神経損傷の治療において、及びガンの診断に対して有用であることが報告されているS L I Tタンパク質であり、エール大学のArtavanistsakonias,S.及びRothberg,J.M.のW09210518-A1を参照されたい。ロイシンリッチ反復を有するタンパク質の生物学的機能を報告している他の研究には：Tayar,N.等, Mol.Cell Endocrinol., (Ireland), 125(1-2):65-70 (Dec.1996)(ゴナドトロピンレセプター関連)；Miura,Y.等,Nippon Rinsho (Japan), 54(7):1784-1789 (July 1996)(アポトーシス関連)；Harris,P.C.等, J.Am.Soc.Nephrol., 6(4):1125-1133 (Oct. 1995)(腎疾患関連)；及びLa Jolla Cancer Research FoundationのRuoslahti, E.I.等のW09110727-A(トランスフォーミング成長因子 に結合しているデコリンがガンの治療、創傷治癒及び癒痕化に關与)が含まれる。

10

20

【 0 0 1 0 】

7 . P R O 2 4 2、P R O 1 3 1 8 及び P R O 1 6 0 0

白血球は単球、マクロファージ、好塩基球、及び好酸球を含み、免疫応答に重要な役割を果たしている。これら細胞はT及び/又はBリンパ球により開始される機構において重要であり、他の炎症性細胞を補充し活性化させ組織破壊に寄与するある範囲のサイトカインを分泌する。

従って、白血球がその適切な目的地まで移動し他の細胞と相互作用する調節プロセスの研究は重要である。現在、白血球は血管壁の内皮細胞に沿って転がることにより損傷を受けたあるいは炎症を起こした組織まで移動すると考えられている。この移動は、セレクチンとそのリガンドの間の一過性の相互作用により媒介される。次に、白血球は血管壁に沿って組織内部まで移動しなければならない。この血液から漏出と管外遊出工程は、またインテグリンとそのリガンドにより媒介される、より安定した白血球-内皮細胞相互作用を促進する細胞活性化を含む。

30

ケモカインは構造的に関連したポリペプチドサイトカインの大きなファミリーである。これらの分子は白血球の動きを刺激し、異なった炎症状況における白血球の情報交換を説明する。ケモカインは内皮細胞上で特定の接着分子の発現を媒介し、それらが特定の細胞型を活性化する化学誘因物質をつくりだす。また、ケモカインは特定の細胞型の増殖を刺激し活性化を調節する。これらの活動の双方において、ケモカインは高度の標的細胞特異性を示す。

40

ケモカインファミリーは、二つのアミノ末端システイン残基が直ぐに隣接しているか(C-C)、一つのアミノ酸によって分離しているか(C-X-C)に基づいて二つのサブファミリーに分割される。C-X-Cファミリーのケモカインは一般に好中球と線維芽細胞を活性化させる一方、C-Cケモカインは単球/マクロファージ、好塩基球、好酸球及びTリンパ球を含むより広範なグループ標的細胞に作用する。両方のサブファミリーの既知のケモカインは、Thomson A. (1994) The Cytokine Handbook, 2nd Ed. Academic Press, N.Y.において概説されているように、多くの多様な細胞型により合成される。

既知のケモカインには、マクロファージ炎症タンパク質アルファ及びベータ(M I P - 1 アルファ及びベータ)、I - 3 0 9、RANTES、及び単球化学走化性タンパク質(M C P - 1)が含まれる。

50

M I P - 1 アルファ及び M I P - 1 ベータは、最初は刺激したマウスマクロファージ細胞系から精製され、正常な組織に注射した場合に炎症反応を誘発した。M I P - 1 アルファ及び M I P - 1 ベータは 6 8 - 6 9 アミノ酸からなり、それらの成熟した分泌形態では約 7 0 % の同一性を共有する。両方ともマイトジェン、抗 - C D 3 及びエンドトキシンにより刺激される単球及び T 細胞、B 細胞で発現し、両方のポリペプチドとも、ヘパリンと結合して単球を刺激する。M I P - 1 アルファは、T リンパ球及び好酸球の C D - 8 サブセットの化学誘引物質として作用する一方、M I P - 1 ベータは T リンパ球の C D - 4 サブセットを化学誘引する。また、これらのタンパク質はマウスの骨髄造血を刺激することが知られている。

RANTES はインターロイキン - 1 及び - 4、形質転換神経因子及びインターフェロン - ガンマにより調節され、T 細胞、血小板、刺激性リウマチ様滑液線維芽細胞、及びいくつかの腫瘍細胞系に発現する。RANTES はリンパ球、単球、好塩基球及び好酸球に影響を及ぼす。RANTES の発現は T 細胞の刺激時に大幅に低減する。

単球化学走化性タンパク質 (M C P - 1) は 7 6 のアミノ酸のタンパク質であり、多様な薬剤による刺激の際にはほとんど全ての細胞及び組織で発現するようである。しかし、M C P - 1 の標的は単球及び好塩基球に限定されている。これらの細胞では、M C P - 1 は M C P - 1 レセプターを誘発する。2 つの関連したタンパク質である M C P - 2 と M C P - 3 は、それぞれ M C P - 1 と 6 2 % 及び 7 3 % の同一性を有しており、その化学誘引物質特異性及び単球を共有している。

炎症を生じた又は罹患した組織における異常の診断に対する現在の技術は、臨床的徴候の観察又はホルモン、ポリペプチド又は様々な代謝物に対する体の組織又は流体の血清学的な検査に主に依存している。問題はこれらの診断法にある。第 1 に、患者は疾患の初期段階では臨床的徴候を表さないであろう。第 2 に、血清学的試験は浸潤性疾患と遺伝的シンドローム間を必ずしも区別しない。従って、発現されたケモカインの同定は、新規な診断法、効果的な治療法の開発、及び分子病原性の理解の助けとして重要である。

ケモカイン分子は Schall TJ (1994) Chemotactic Cytokines: Targets for Therapeutic Development. International Business Communications, Southborough Mass. pp180-270 ; 及び Paul WE (1993) Fundamental Immunology, 3rd Ed. Raven Press, N.Y. pp822-826 に概説されている。

【 0 0 1 1 】

8 . P R O 2 8 8

哺乳動物における細胞数のコントロールは、細胞増殖と細胞死の間のバランスにより部分的に決定されると考えられている。しばしば壊死性細胞死と称される細胞死の一形態は、典型的には、ある種の外傷又は細胞傷害の結果生じる細胞死の病理的形態として特徴づけられる。これに対して、通常は規則的又はコントロールされた状態で進行する細胞死の他の「生理的」形態がある。細胞死のこの規則的又はコントロールされた形態は、しばしば「アポトーシス」と称される [例えば、Barr 等, Bio/Technology, 12: 487-493 (1994) ; Steller 等, Science, 267: 1445-1449 (1995) を参照]。アポトーシス性細胞死は、免疫系におけるクローン選択と胚の発達を含む多くの生理的プロセスにおいて自然に生じる [Itoh 等, Cell, 66: 233-243 (1991)]。アポトーシス性細胞死のレベルの減少は、ガン、狼瘡、及び疱疹ウイルス感染を含む種々の病理的条件に関連している [Thompson, Science, 267: 1456-1462 (1995)]。アポトーシス性細胞死のレベルの増加は、エイズ、アルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症、多発性硬化症、色素性網膜炎、小脳変性、無形成性貧血、心筋梗塞、脳卒中、再灌流傷害、及び毒素誘発性肝疾患を含む様々な他の病理状態に関連している [上掲の Thompson を参照されたい]。

典型的には、アポトーシス性細胞死には、細胞内における一又は複数の特徴的な形態学的及び生化学的変化、例えば細胞質の凝結、原形質膜の微絨毛の喪失、核の分節化、染色体 D N A の分解又はミトコンドリア機能の喪失が伴う。様々な外因的及び内因的シグナルが、このような形態学的及び生化学的細胞変化を惹起又は誘発すると考えられている [Raff, Nature, 356: 397-400 (1992) ; Steller, 上掲 ; Sachs ら, Blood, 82: 15 (1993)]

10

20

30

40

50

。例えば、ホルモンの刺激、例えば未成熟胸腺細胞に対する糖質コルチコイドホルモン、並びにある種の成長因子の退薬により惹起され得る [Watanabe-Fukunaga等, *Nature*, 356 : 314-317(1992)]。また、幾つかの同定された発ガン遺伝子、例えば *myc*、*rel*、及び *E1A*、及び腫瘍抑制剤、例えば *p53* が、アポトーシスを誘発する際にある役割を有していることも報告されている。ある種の化学療法薬及びある種の放射線も同様にアポトーシス誘発活性を有していることも知見されている [Thompson, 上掲]。

【0012】

様々な分子、例えば腫瘍壊死因子- (*TNF- α*)、腫瘍壊死因子- (*TNF- β*) 又は「リンホトキシン」、*CD30*リガンド、*CD27*リガンド、*CD40*リガンド、*OX-40*リガンド、*4-1BB*リガンド、*Apo-1*リガンド(*Fas*リガンド又は*CD95*リガンドとも称される)、及び*Apo-2*リガンド(トレイル(*TRAIL*)とも称される)が、サイトカインの腫瘍壊死因子(*TNF*)ファミリーのメンバーとして同定されている [例えば、Gruss及びDower, *Blood*, 85 : 3378-3404(1995); Wiley等, *Immunity*, 3 : 673-682(1995); Pitti等, *J. Biol. Chem.*, 271 : 12687-12690(1996)を参照されたい]。これらの分子のなかでも、*TNF- α* 、*TNF- β* 、*CD30*リガンド、*4-1BB*リガンド、*Apo-1*リガンド、及び*Apo-2*リガンド(*TRAIL*)が、アポトーシス性細胞死に関与していることが報告されている。*TNF- α* と *TNF- β* の両方とも、感受性腫瘍細胞におけるアポトーシス性を誘発することが報告されている [Schmid等, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 83 : 1881(1986); Dealtry等, *Eur. J. Immunol.*, 17 : 689(1987)]。Zheng等は、*TNF- α* が *CD8* 陽性 T 細胞の刺激後アポトーシスに関与していることを報告している [Zheng等, *Nature*, 377 : 348-351(1995)]。他の研究者は、*CD30*リガンドが胸腺における自己反応性 T 細胞の欠失に関与していることを報告している [Amakawa等, プログラム細胞死に関するコールドスプリングハーバー研究所のシンポジウム、要約集、第10巻、(1995)]。

マウスの *Fas/Apo-1* レセプター又はリガンド遺伝子(それぞれ *lpr* 及び *gld* と呼ばれる)における突然変異は幾つかの自己免疫疾患に関連しており、*Apo-1*リガンドが末梢の自己反応性リンパ球のクローン欠失を調節する役割を担っていることを示している [Krammer等, *Curr. Op. Immunol.*, 6 : 279-289(1994); Nagata等, *Science*, 267 : 1449-1456(1995)]。また、*Apo-1*リガンドは、*CD4* 陽性 T リンパ球及び B リンパ球において刺激後アポトーシスを誘発することが報告されており、それらの機能がもはや必要でなくなった際の活性化リンパ球の除去に関与している [Krammer等, 上掲; Nagata等, 上掲]。*Apo-1*レセプターと特異的に結合するアゴニストマウスモノクローナル抗体は、*TNF- α* に匹敵するか類似する細胞死滅活性を示すことが報告されている [Yonehara等, *J. Exp. Med.*, 169 : 1747-1756(1989)]。

【0013】

このような *TNF* ファミリーのサイトカインが介在する種々の細胞反応誘導は、特異的な細胞レセプターに結合することにより開始されると考えられている。約 55-kDa (*TNFR1*) と 75-kDa (*TNFR2*) の 2 つの異なる *TNF* レセプターが同定されており [Hohman等, *J. Biol. Chem.*, 264 : 14927-14934(1989); Brockhaus等, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 87 : 3127-3131(1990); 1991年3月20日に公開された EP417,563]、双方のレセプター型に対応するヒト及びマウス *cDNA* が単離され、特徴づけされている [Loetscher等, *Cell*, 61 : 351(1990); Schall等, *Cell*, 61 : 361(1990); Smith等, *Science*, 248 : 1019-1023(1990); Lewis等, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 88 : 2830-2834(1991); Goodwin等, *Mol. Cell. Biol.*, 11 : 3020-3026(1991)]。広範な多型性が、双方の *TNF* レセプター遺伝子に関連している [例えば、Takao等, *Immunogenetics*, 37 : 199-203(1993)を参照]。双方の *TNFR* は細胞外、膜貫通及び細胞内領域を含む細胞表面のレセプターの典型的な構造を共有する。双方のレセプターの細胞外部分はまた可溶性 *TNF* 結合タンパク質として天然に見出される [Nophar, Y等, *EMBO J.*, 9 : 3269(1990); 及び Kohno, T等, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 87 : 8331(1990)]。更に最近になって、組換え体可溶性 *TNF* レセプターのクローニングが Hale 等 [*J. Cell. Biochem.* 増補 15F, 1991, p.113(P424)]

]により報告されている。

1型又は2型のTNFR(TNFR1及びTNFR2)の細胞外部分は、NH₂末端から出発して、1~4とされる4つのシステインに富んだドメイン(CRD)の反復アミノ酸配列パターンを含む。各CRDは約40のアミノ酸長のものであり、良好に保存された位置に4~6のシステイン残基を含んでいる [Schall等, 上掲; Loetscher等, 上掲; Smith等, 上掲; Nophar等, 上掲; Kohno等, 上掲]。TNFR1において、4つのCRDのおおよその境界は次の通りである: CRD1-14から約53までのアミノ酸; CRD2-約54から約97までのアミノ酸; CRD3-約98から約138までのアミノ酸; CRD4-約139から約167までのアミノ酸。TNFR2において、CRD1は、17~約54までのアミノ酸を、CRD2は約55から約97までのアミノ酸を; CRD3は約98から約140までのアミノ酸を; CRD4は約141から約179までのアミノ酸を含む [Banner等, Cell, 73: 431-435(1993)]。また、リガンド結合におけるCRDの可能な役割は前掲のBanner等により記載されている。

【0014】

CRDの類似の反復パターンが、p75神経成長因子レセプター(NGFR) [Johnson等, Cell, 47: 545(1986); Radeke等, Nature, 325: 593(1987)]、B細胞抗原CD40 [Stamenkovic等, EMBO J., 8: 1403(1989)]、T細胞抗原OX40 [Mallet等, EMBO J., 9: 1063(1990)]及びFas抗原 [Yonehara等, 上掲、及びItoh等, Cell, 66: 233-243(1991)]を含むいくつかの他の細胞表面タンパク質に存在している。また、CRDはショープ(Shope)及び粘液腫ポックスウィルスの可溶性TNFR(sTNFR)様のT2タンパク質にも見出されている [Upton等, Virology, 160: 20-29(1987); Smith等, Biochem. Biophys. Res. Commun., 176: 335(1991); Upton等, Virology, 184: 370(1991)]。これらの配列の最適なアラインメントは、システイン残基の位置が良好に保存されていることを示している。これらレセプターは、しばしば集合的に、TNF/NGFレセプタースーパーファミリーのメンバーと称される。p75NGFRに関する最近の研究では、このドメインにおけるCRD1の欠失 [Welcher, A.A.等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 159-163(1991)]又は5-アミノ酸の挿入 [Yan, H及びChao, M.V., J. Biol. Chem., 266: 12099-12104(1991)]は、NGF結合には殆ど又は全く影響を持たないことが示されている [Yan, H及びChao, M.V., 上掲]。p75NGFRはNGF結合に関与せず、そのCRD4と膜貫通領域の間に約60のアミノ酸のプロリンに富んだ伸展を含む [Peetre, C等, Eur. J. Hematol., 41: 414-419(1988); Seckinger, P等, J. Biol. Chem., 264: 11966-11973(1989); Yan, H及びChao, M.V., 上掲]。同様のプロリンに富んだ領域はTNFR2に見出されているが、TNFR1にはない。

Itoh等は、Apo-1レセプターが、55-kDaのTNFR1によりシグナル化されるものと同様のアポトーシス性細胞死をシグナル化し得ることを開示している [Itoh等, 上掲]。また、Apo-1抗原の発現は、細胞をTNF- α 又は抗Apo-1のマウスモノクローナル抗体で処理した場合に、TNFR1のものと共にダウンレギュレーションされることが報告されている [Krammer等, 上掲; Nagata等, 上掲]。従って、Apo-1及びTNFR1レセプターの双方を同時発現する細胞系が、共通のシグナル伝達経路を通して細胞死を媒介しているとの仮説を唱える研究者もいた [同]。

今日までに同定されているTNFファミリーのリガンドは、リンホトキシン- α を除き、II型の膜貫通タンパク質であり、そのC末端は細胞外にある。これに対して、今日までに同定されているTNFレセプター(TNFR)ファミリーのレセプターはI型の膜貫通タンパク質である。しかしながら、TNFリガンド及びレセプターファミリーの双方において、ファミリーメンバー間で同定された相同性は、主として細胞外ドメイン(「ECD」)において見出されている。TNF- α 、Apo-1リガンド及びCD40リガンドを含むTNFファミリーサイトカインのいくつかは、細胞表面においてタンパク質的に切断され; 各場合に得られたタンパク質は、典型的には、可溶性サイトカインとして機能するホモ三量体分子を形成する。また、TNFレセプターファミリーのタンパク質は、通常、タンパク質的に切断され、同族のサイトカインの阻害剤として機能し得る可溶性レセプ

ターのECDを放出する。

【0015】

最近になって、TNFRファミリーの他のメンバーが同定された。Marsters等、Curr. Biol., 6:750(1996)において、研究者は、細胞外のシステインに富んだ反復においてTNFRファミリーに対して類似性を示し、細胞質死亡ドメイン配列を含む点でTNFR1及びCD95に似ており、Apo-3と称される、ヒトのポリペプチド天然配列の全長を記載している [Marsters等, Curr. Biol., 6:1669(1996)もまた参照されたい]。他の研究者によれば、Apo-3は、DR3、wsl-1及びTRAMPとも称されている [Chinnaiyan等, Science, 274:990(1996); Kitson等, Nature, 384:372(1996); Bodmer等, Immunity, 6:79(1997)]。

10

Pan等は、「DR4」と称される他のTNFレセプターファミリーのメンバーを開示している [Pan等, Science, 276:111-113(1997)]。DR4は細胞自殺器を活動させる細胞質死亡ドメインを含むと報告されている。Pan等は、DR4がApo-2リガンド又はTRAILとして知られているリガンドに対するレセプターであると考えられることを開示している。

Sheridan等, Science, 277:818-821(1997)及びPan等, Science, 277:815-818(1997)には、Apo-2リガンド(TRAIL)に対するレセプターであると考えられている他の分子が記載されている。その分子はDR5と称されている(またApo-2とも称されている)。同様に、DR4、DR5は細胞質死亡ドメインを含み、アポトーシスをシグナル伝達しうることが報告されている。

20

Sheridan等, 上掲, において、DcR1(又はApo-2DcR)と呼ばれるレセプターは、Apo-2リガンド(TRAIL)に対する可能なデコイレセプター(decoy receptor)であるとして開示されている。Sheridan等は、DcR1がApo-2リガンドの機能をインビトロで阻害可能であると報告している。また、TRIDと称されるデコイレセプターの開示については、Pan等, 上掲, が参照される。

現在理解されているように、細胞死プログラムは、少なくとも3つの重要な要素-活性化因子、インヒビター及びエフェクターを含む; 線虫(*C. elegans*)において、これらの成分はそれぞれ3つの遺伝子、Ced-4、Ced-9及びCed-3によりコード化されている [Steller, Science, 267:1445(1995); Chinnaiyan等, Science, 275:1122-1126(1997); Wang等, Cell, 90:1-20(1997)]。TNFRファミリーのメンバーの2つ、TNFR1及びFas/Apo1(CD95)は、アポトーシス性細胞死を活性化しうる [Chinnaiyan及びDixit, Current Biology, 6:555-562(1996); Fraser及びEvan, Cell, 85:781-784(1996)]。また、TNFR1は、転写因子、NF- κ Bの活性化を媒介することも知られている [Tartaglia等, Cell, 74:845-853(1993); Hsu等, Cell, 84:299-308(1996)]。ある程度のECD相同性に加えて、これら2つのレセプターは、死亡ドメインとして知られているオリゴマー形成界面の細胞内ドメイン(ICD)での相同性を共有する [Tartaglia, 上掲; Nagata, Cell, 88:355(1997)]。また、死亡ドメインはアポトーシスを調節する幾つかの後生動物タンパク質、すなわちショウジョウバエタンパク質、リーパー(Reaper)、及びFADD/MORT1、TRADD及びRIPと称される哺乳動物タンパク質中においても見出されている [Cleaveland及びIhle, Cell, 81:479-482(1995)]。Ravenらは、酵母-二重ハイブリッド系を使用して、TNFR1死亡ドメインに結合するタンパク質wsl-1の同定を報告している [Ravenら, Programmed Cell Death Meeting, 9月20-24日, 1995年, 127頁の要約; Ravenら, European Cytokine Network, 7:210頁の要約82(1996年4-6月); また, Kitsonら, Nature, 384:372-375(1996)]。wsl-1タンパク質はTNFR1に相同で(48%の同一性)、制限された組織分布を有すると記載されている。Ravenらに依れば、wsl-1の組織分布は、TNFR1結合タンパク質、TRADDとは顕著に異なる。

30

40

【0016】

リガンド結合及びレセプターのクラスター形成の際に、TNFR1とCD95は死亡誘発性シグナル伝達複合体にFADDを補充するものと考えられている。言われるところに

50

よれば、C D 9 5 は F A D D に直接結合する一方、T N F R 1 は T R A D D を介して間接的に F A D D に結合する [Chinnaiyan等, Cell, 81: 505-512(1995); Boldin等, J. Biol. Chem., 270: 387-391(1995); Hsu等, 上掲; Chinnaiyan等, J. Biol. Chem., 271: 4961-4965(1996)]。F A D D は、C e d - 3 - 関連プロテアーゼ、M A C H / F L I C E (カスパーゼ 8) を、死亡シグナル伝達複合体に補充するアダプタータンパク質として供給されることが報告されている [Boldin等, Cell, 85: 803-815(1996); Muzio等, Cell, 85: 817-827(1996)]。M A C H / F L I C E は、細胞死プログラムの幾つかの重要な側面を実施し得る、インターロイキン-1 変換酵素 (I C E) 及び C P P 3 2 / Y a m a を含むアポトーシス性プロテアーゼのカスケードを引き起こすトリガーであることは明らかである [Fraser 及び Evan, 上掲]。

10

プログラム細胞死が、線虫の細胞死遺伝子、c e d - 3、及び哺乳動物の I L - 1 - 変換酵素、I C E に関連したシステインプロテアーゼファミリーのメンバーの活性に関与していることが最近開示された。I C E 及び C P P 3 2 / Y a m a プロテアーゼの活性は、牛痘ウイルス遺伝子、c r m A の産物により阻害されうる [Ray等, Cell, 69: 597-604(1992); Tewari等, Cell, 81: 801-809(1995)]。最近の研究では、C r m A が T N F R 1 - 及び C D 9 5 - 誘発細胞死を阻害しうることを示されている [Enari等, Nature, 375: 78-81(1995); Tewari等, J. Biol. Chem., 270: 3255-3260(1995)]。

Tewari 等により最近レビューされているように、T N F R 1、T N F R 2 及び C D 4 0 は、転写因子、N F - B の活性化により、炎症誘発性及び同時刺激性サイトカイン、サイトカインレセプター、及び細胞接着分子の発現を変調する [Tewari等, Curr. Op. Gene t. Develop., 6: 39-44(1996)]。N F - B は、そのサブユニットが保存 R e l 領域を含む二量体転写因子のファミリーの原型である [Verma等, Genes Develop., 9: 2723-2735(1996); Baldwin, Ann. Rev. Immunol., 14: 649-681(1996)]。その潜伏形態において、N F - B は I B - インヒビターファミリーのメンバーと複合化しており; 所定の刺激に反応して I B の不活性化の際に、放出された N F - B が、特異的 D N A 配列と結合する核に転座して遺伝子転写を活性化する。

20

サイトカインの T N F ファミリーとそれらのレセプターについてのレビューとしては、Gruss 及び Dower, 上掲を参照のこと。

【 0 0 1 7 】

9 . P R O 3 6 5

30

ヒト 2 - 1 9 プロテイン等のポリペプチドはサイトカインとして機能する。サイトカインは免疫細胞の分化、増殖又は機能を刺激又は阻害するように機能する低分子量のタンパク質である。サイトカインはしばしば細胞間メッセンジャーとして作用し、複数の生理学的効果を有する。インビボにおける免疫機構の生理学的重要性が分かっているため、現在、免疫系に影響を与える新規で未変性のタンパク質を同定するための努力がなされている。我々は、ここでヒト 2 - 1 9 プロテインに対して相同性を有する新規なポリペプチドの同定を記載する。

【 0 0 1 8 】

1 0 . P R O 1 3 6 1

40

新規で未変性の膜貫通レセプタータンパク質を同定するための努力が、産業界と学術界の両方でなされている。多くの努力は、新規なレセプタータンパク質のコード配列を同定するための哺乳動物組換え D N A ライブラリーのスクリーニングに注がれている。我々は、ここで P R O 1 3 6 1 ポリペプチドと命名する新規な膜貫通ポリペプチドの同定と特徴付けをここに記載する。

【 0 0 1 9 】

1 1 . P R O 1 3 0 8

50

フォリスタチンは、下垂体濾胞刺激ホルモン (F S H) の分泌を調節する分泌タンパク質である。それは、下垂体前葉からの F S H の生成と分泌を刺激するアクチビン及びトランスフォーミング成長因子ベータ (T G F) ファミリーの他のメンバーのようなタンパク質と結合し、それによってそれらを阻害することにより機能する。フォリスタチンは、神経

発育の誘発を含む、基礎的発育を制御する機構にもまた関与している。またフォリスタチンは、特に塩基性線維芽成長因子(bFGF)と組み合わせられて、血管形成特性を示す。このように、フォリスタチンファミリーのタンパク質の新規なメンバーを同定することには強い関心がある。フォリスタチンの同定及び特徴付けは、出典明示によりここに取り込まれる以下の文献の論題である：Suginoら, *J. Med Invest*(1997)44: (1-2): 1-14; Matherら, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*(1997)215(3): 209-222; Thomsen, G.H., *Trends Genet* (1997)13(6): 209-211; DePaolo, L.V., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*(1997)214(4): 328-339; Pengら, *Biol. Signals*(1996)5(2): 81-89、及びHalvorsonら, *Fertil Steril*(1996)65(3): 459-469。

【0020】

10

12. PRO1183

プロトボルフィリノーゲンオキシダーゼはヘム生合成経路における最後から2番目の工程を触媒する。この酵素の活性が欠如するとヒト遺伝病多彩性ボルフィリン症になる。よって、プロトボルフィリノーゲンオキシダーゼ及びこれらのオキシダーゼに関連するか又はこれを調節する分子には関心が持たれている。さらに、オキシダーゼと関連分子は、一般に関心あるものである。またオキシダーゼは、少なくともBirchfieldら, *Biochemistry*, 37(19): 6905-6910(1998); Fingarら, *Cancer Res.*, 57(20): 4551-4556(1997); Arnoldら, *Biochemistry*, 36(33): 10178-10184(1997); 及びDailey及びDailey, *Cell Mol. Biol.*, 43(1): 67-73(1997)に記載されている。

【0021】

20

13. PRO1272

セメント腺はカエル胎仔の頭部にある外胚葉器官であり、あらゆる神経組織の前側に位置している。神経組織と同様に、セメント腺は背側中胚葉により誘発されることが分かっている。XAG-1は、発育中のセメント腺誘発のマーカーとして有用であるセメント腺特異的タンパク質である。Siveら, *Cell*, 58(1): 171-180(1989); Itohら, *Development*, 121(12): 3979-3988(1995)を参照されたい。XAG-2とXAGファミリーに関与している他のタンパク質はさらにAbergerら, *Mech. Dev.*, 72(1-2): 115-130(1998)及びGammill及びSive, *Development*, 124(2): 471-481(1997)に記載されている。よって、XAGタンパク質と配列同一性を有する新規なポリペプチドには関心が持たれる。

【0022】

30

14. PRO1419

新規で未変性の分泌タンパク質を同定するための努力が、産業界と学術界の両方でなされている。多くの努力は、新規な分泌タンパク質のコード配列を同定するための哺乳動物組換えDNAライブラリーのスクリーニングに注がれている。我々は、ここでPRO1419ポリペプチドと命名する新規な分泌ポリペプチドの同定と特徴付けをここに記載する。

【0023】

15. PRO4999

ウロモジュリンは腎臓で合成され、正常なヒトの尿における最も豊富なタンパク質である。ウロモジュリン遺伝子のエクソンの一つによりコードされるアミノ酸配列は低密度リポタンパク質レセプター及び表皮成長因子前駆体と相同性を有している。Pennicaら, *Science* 236: 83-88(1987)。ウロモジュリンの機能は知られていない; しかし、IL-1、IL-2及びTNFと高親和性で結合するので、多くの強力なサイトカインに特異的に結合し、その循環活性を調節する独特の腎臓調節糖タンパク質として機能しうる。Hessionら, *Science* 237: 1479-1484(1987)を参照されたい。Suらは、ウロモジュリンが泌尿器系に生得的な免疫性において重要な役割を担っており、ウロモジュリンの免疫刺激活性が免疫治療に潜在的に有用であることを示唆している。Suら, *J. Immunology*, 158: 3449-3456(1997)。

40

我々は、ここでPRO4999ポリペプチドと命名する、ウロモジュリンに類似した配列を有する新規なポリペプチドの同定及び特徴付けを記載する。

50

【 0 0 2 4 】

1 6 . P R O 7 1 7 0

新規で未変性の分泌タンパク質を同定するための努力が、産業界と学术界の両方でなされている。多くの努力は、新規な分泌タンパク質のコード配列を同定するための哺乳動物組換えDNAライブラリーのスクリーニングに注がれている。我々は、ここでPRO7170ポリペプチドと命名する新規な分泌ポリペプチドの同定と特徴付けをここに記載する。

【 0 0 2 5 】

1 7 . P R O 2 4 8

サイトカインは、神経学的機能不全がアミノ酸神経伝達物質の代謝の変化に起因する多くの脳疾患の病因に関連している。特に、トランスフォーミング成長因子 (T G F) のメンバーが関与している。トランスフォーミング成長ペプチドは、最初は培養中の非癌細胞の増殖と形質転換を誘発する能力によって同定された小さなポリペプチドである。成長因子として最初は定義されたが、TGF はまた上皮、内皮、リンパ球及び造血細胞の増殖を阻害する。このサイトカインは炎症反応の持続時間の調節において重要な役割を担っており、治癒プロセスを促進させることができる。また強力な免疫調節物質でもあり、多くの他のサイトカインの調節を含む多くの多面発現効果を有する。

TGF ファミリーには塩基性ミエリタンパク質 (B M P - 2 、 B M P - 4 、 B M P - 5 、 B M P - 6 、 B M P - 7) 、アクチビンA及びB、デカペンタプレジック (decapentaplegic) (dpp) 、 6 0 A 、 O P - 2 、 ドルサリン (dorsalin) 、 成長分化因子 (G D F s) 1 、 3 及び 9 、 ノーダル (nodal) 、 M I S 、 インヒピン 、 トランスフォーミング成長因子ベータ (T G F - 1 、 T G F - 2 、 T G F - 3 、 T G F - 5) 及び神経膠細胞誘導神経栄養因子 (G D N F) が含まれる。Atrisanoら, J. Biochemica et Biophysica Acta. 1222: 71-80(1994)。特に関心があるものは成長分化因子であるが、これはその名称が意味するように、これらの因子は細胞の分化に関連しているためである。

よって、TGF ファミリーのメンバー、特に成長分化因子 (G D F) 3 と相同性を有するタンパク質の同定は、医学界及び産業界にとって重要である。一般に、互いに相同性を有するタンパク質は類似した機能を有する。相同性を有するタンパク質が類似した機能を持たない場合、ある種の構造的モチーフが、例えば機能の局所性などの、機能以外の情報を同定することを示すこともまた興味深いことである。

【 0 0 2 6 】

1 8 . P R O 3 5 3

補体タンパク質は、炎症に関連したエフェクター分子を生成する、酵素的カスケードに作用するいくつかの血清タンパク質の大きなグループを含む。補体タンパク質は炎症に関連する細胞の機能及び動きの調節において、特に重要性を有する。インビボにおける炎症及び関連したメカニズムの生理学的な重要性が分かっているため、炎症に関連している新規な未変性タンパク質を同定するための努力がなされている。我々は、ここでPRO353ポリペプチドと命名する、補体タンパク質に対して相同性を有する新規なポリペプチドの同定と特徴付けをここに記載する。

【 0 0 2 7 】

1 9 . P R O 5 3 3

成長因子は、特定の細胞表面レセプターと結合することにより、単独で又は協力して細胞成長又は増殖を亢進する分子シグナル又はメディエータであるが、成長因子への発現時には成長のみ以外の細胞性反応がある。その結果、成長因子は多機能性で強力な細胞レギュレーターとしてよりよく特徴付けられる。その生物学的効果は増殖、走化性及び細胞外マトリックス生産の刺激を含む。成長因子は刺激性及び阻害効果の双方を有しうる。例えば、トランスフォーミング成長因子 (T G F -) は高度に多面的で、ある細胞、特に結合組織では増殖を刺激する一方、他のもの、例えばリンパ球及び上皮細胞では増殖の強力な阻害剤である。

成長因子による成長刺激又は阻害の生理学的効果は標的組織の発達と分化の状態に依存

する。古典的な内分泌分子による局所的細胞調節はオートクライン(同じ細胞)、ジャクスタクリン(近くの細胞)、及びパラクリン(隣接細胞)経路の理解を含む。ペプチド成長因子は複雑な生物学的言語の要素であり、細胞間情報交換の基礎を提供する。それらは細胞が互いに情報を運ぶことを可能にし、細胞間の相互作用を媒介し、遺伝子発現を変化させる。これらの多機能及び多面的因子の効果は他のペプチドの有無に依存している。

線維芽細胞成長因子(FGFs)は正常な二倍体線維芽細胞と樹立株化細胞の双方に対するヘパリン結合性の強力なマイトジェンのファミリーである。Godpodarowicz, D等, (1984), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6963。FGFファミリーはとりわけ、酸性FGF(FGF-1)、塩基性FGF(FGF-2)、INT-2(FGF-3)、K-FGF/HST(FGF-4)、FGF-5、FGF-6、KGF(FGF-7)、AIGF(FGF-8)を含む。全てのFGFsは2つの保存されたシステイン残基を持ち、アミノ酸レベルで30-50%の配列相同性を共有する。これらの因子は、顆粒膜細胞、副腎皮質細胞、軟骨細胞、筋芽細胞、角膜及び血管内皮細胞(ウシ又はヒト)、血管平滑筋細胞、水晶体、網膜及び前立腺上皮細胞、オリゴデンドロサイト、アストロサイト、クロンドサイト(chondrocytes)、筋芽細胞及び骨芽細胞を含む多様で正常な二倍体中胚葉由来及び神経冠由来細胞に対して分裂促進的である。

線維芽細胞成長因子はまた非分裂促進的な形で多数の細胞型を刺激することができる。これらの活動は、線維芽細胞成長因子はまた創傷領域への細胞移動の促進(走化作用)、新しい血管形成の開始(血管新生)、神経再生と生存の変調(ニューロトロフィズム(neurotrophism))、内分泌機能の変調、及び特異的細胞性タンパク質発現、細胞外マトリックス生産及び細胞生存の刺激又は抑制を含む。Baird, A. & Bohlen, P., Handbook of Exp. Pharmacol. 95(1): 369-418, (1990)。これらの性質は、創傷治癒、神経修復、側枝血管形成等々を加速させる治療的アプローチにおいて線維芽細胞成長因子を使用するための基礎を提供する。例えば、線維芽細胞成長因子が心臓疾患及び手術において心筋損傷を最小にすることが示唆されている(U.S.P. 4,378,437)。

ここで我々は、PRO533ポリペプチドと命名する、FGFと相同性を有する新規なポリペプチドの同定及び特徴付けを記載する。

【0028】

20. PRO301

ガンの広範な発生はかなりの資源と新しい治療法を発見することに捧げることを促した。特定の一方法は腫瘍抗原に特異的である腫瘍又はガン特異的モノクローナル抗体(mAbs)の創造を含む。正常細胞とガン細胞を区別できるそのようなmAbsは疾患の診断、予防及び治療に有用である。特定の抗原は、結腸直腸ガンのような新生物疾患に関連していることが知られている。

一つの特定の抗原であるA33抗原は原発性又は転移性大腸ガン並びに正常な大腸上皮の90%以上において発現される。大腸ガンは広範性疾患であるので、早期の診断と治療が重要な医療目標である。大腸ガンの診断と治療は蛍光、核磁気又は放射性タグを持つそれに特異的なモノクローナル抗体(mAbs)を使用して実施することができる。放射性遺伝子、毒素及び/又は薬物タグmAbsを最小の患者の処方インサイツでの治療に対して使用できる。mAbsはまた大腸ガンの診断と治療における診断に使用することができる。例えば、A33抗原の血清レベルがある患者において上昇している場合、手術後のレベルの降下は腫瘍切除が成功したことを示している。他方、手術後の血清A33抗原レベルの引き続く上昇は元の腫瘍の転移が生じたかあるいは新しい原発性腫瘍が現れたことを示している。そのようなモノクローナル抗体は手術及び/又は化学療法に代わり又はこれと同時に使用することができる。例えばU.S.P.4,579,827とU.S.S.N.424,991(E.P.199,141)はモノクローナル抗体の治療的投与に関しており、その後者は抗A33mAbの適用に関している。

上皮由来の多くのガンはアデノウィルスレセプターを有している。実際、アデノウィルス由来ベクターが腫瘍中にアンチセンス核酸を挿入する手段として提案されている(U.S.P.5,518,885)。よって、新生物腫瘍とのウィルスレセプターの結合は期待できないもので

10

20

30

40

50

はない。

我々は、ここでPRO301ポリペプチドと命名した、ある種のガン関連抗原に対して相同性を有する新規なポリペプチドの同定及び特徴づけをここに記載する。

【0029】

21. PRO187

成長因子は、特定の細胞表面レセプターに結合することにより、単独で又は協力して細胞成長又は増殖を亢進する分子シグナル又はメディエータである。しかし、成長因子への発現時には成長のみ以外の細胞性反応がある。その結果、成長因子は多機能性で強力な細胞レギュレーターとしてよりよく特徴付けられる。その生物学的効果は増殖、走化性及び細胞外マトリックス生産の刺激を含む。成長因子は刺激性及び阻害効果の双方を有しうる。例えば、トランスフォーミング成長因子(TGF-)は高度に多面的で、ある細胞、特に結合組織では増殖を刺激する一方、他のもの、例えばリンパ球及び上皮細胞では増殖の強力な阻害剤である。

成長因子による成長刺激又は阻害の生理学的効果は標的組織の発達と分化の状態に依存する。古典的な内分泌分子による局所的細胞調節のメカニズムはオートクライン(同じ細胞)、ジャクスタクリン(近くの細胞)、及びパラクリン(隣接細胞)経路の理解を含む。ペプチド成長因子は複雑な生物学的言語の要素であり、細胞間情報交換の基礎を提供する。それらは細胞が互いに情報を運ぶことを可能にし、細胞間の相互作用を媒介し、遺伝子発現を変化させる。これらの多機能及び多面的因子の効果は他のペプチドの有無に依存している。

FGF-8は、正常な二倍体線維芽細胞と樹立株化細胞の双方に対するヘパリン結合性の強力なマイトジェンのファミリーである線維芽細胞成長因子(FGFs)のメンバーである。Gospodarowicz等, (1984), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6963. FGFファミリーは、酸性FGF(FGF-1)、塩基性FGF(FGF-2)、INT-2(FGF-3)、KFGF/HST(FGF-4)、FGF-5、FGF-6、KGF(FGF-7)、AIGF(FGF-8)を含む。全てのFGFsは2つの保存されたシステイン残基を持ち、アミノ酸レベルで30-50%の配列相同性を共有する。これらの因子は、顆粒膜細胞、副腎皮質細胞、軟骨細胞、筋芽細胞、角膜及び血管内皮細胞(ウシ又はヒト)、血管平滑筋細胞、水晶体、網膜及び前立腺上皮細胞、オリゴデンドロサイト、アストロサイト、クロンドサイト(chondrocytes)、筋芽細胞及び骨芽細胞を含む広範囲の正常な二倍体中胚葉由来及び神経冠由来細胞に対して分裂促進的である。

線維芽細胞成長因子はまた非分裂促進的な形で多数の細胞型を刺激することができる。これらの活動は、創傷領域への細胞移動の促進(走化作用)、新しい血管形成の開始(血管形成)、神経再生と生存の変調(ニューロトロフィズム(neurotrophism))、内分泌機能の変調、及び特異的細胞性タンパク質発現、細胞外マトリックス生産及び細胞生存の刺激又は抑制を含む。Baird & Bohlen, Handbook of Exp. Pharmacol. 95(1): 369-418, Springer, (1990)。これらの性質は、創傷治癒、神経修復、側枝血管形成等々を加速させる治療的アプローチにおいて線維芽細胞成長因子を使用するための基礎を提供する。例えば、線維芽細胞成長因子が心臓疾患及び手術において心筋損傷を最小にすることが示唆されている(U.S.P. 4,378,347)。

アンドロゲン誘発成長因子(AIGF)としても知られているEGF-8はFGFファミリーの他のメンバーと30-40%の配列相同性を共有する215のアミノ酸タンパク質である。FGF-8はマウス乳ガン株化細胞SC3においてアンドロゲン調節及び誘導下にあることが提案されている。Tanaka等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 8928-8932 (1992); Sato等, J. Steroid Biochem. Molec. Biol. 47: 91-98 (1993)。その結果、FGF-8は、アンドロゲン応答性器官であることが知られている前立腺において局所的な役割を有しうる。FGF-8がまたNIH-3T3線維芽細胞内に形質移入されるとトランスフォーミング活性を示すので発ガン性でありうる。Kouhara等, Oncogene 9 455-462 (1994)。FGF-8は心臓、脳、肺、腎臓、精巣、前立腺及び卵巣において検出されている一方、発現はまた外因性アンドロゲンのない場合にもまた検出された。Schmitt等, J. Ster

10

20

30

40

50

oid Biochem. Mol. Biol. 57 (3-4): 173-78 (1996)。

F G F - 8 は、マウス胚形成の様々な段階で発現されるという性質を幾つかの他の F G F s と共有し、これが、様々な E G F s が分化と胚形成において多重的でおそらくは協動的な役割を有するという理論を裏付けている。更に、F G F - 8 はまた乳房腫瘍形成の過程において W n t - 1 と共同するプロトオンコジーンとして同定されている (Shackleford 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 740-744 (1993); Heikinheimo 等, Mech. Dev. 48: 129-138 (1994))。

他の F G F s とは対照的に、F G F - 8 は一次転写物の選択的スプライシングの結果として、3種のタンパク質アイソフォームとして存在している、上掲の Tanaka 等。F G F - 8 の正常な成人の発現は弱く生殖腺組織に限られているが、ノーザンブロット分析は、F G F - 8 m R N A がマウス妊娠期間の 10 日から 12 日存在していることを示しており、F G F - 8 が正常な発育に重要であることを示唆している。Heikinheimo 等, Mech Dev. 48 (2): 129-38 (1994)。妊娠の 8 から 16 日の間の更なるインサイツハイブリッド形成アッセイは、第一気管支アーチの表面外胚葉、前線鼻突起、前脳及び中脳-後脳移行部において初期の発現を示した。10-12 日で、F G F - 8 は前肢及び後肢芽の表面外胚葉、鼻及び上咽頭、漏斗及び終脳、間脳及び後脳に発現された。発現は妊娠の 13 日で発育中の後肢において継続するがその後は検出できない。この結果は、F G F - 8 が胚形成において独特な時間的かつ空間的パターンを有していることを示唆しており、嚢胚形成後の胚における外胚葉分化の多重領域におけるこの成長因子の役割を示唆している。

ここで我々は、F G F - 8 と相同性を有する新規なポリペプチドの同定を記載し、これらポリペプチドをここで P R O 1 8 7 ポリペプチドと命名した。

【 0 0 3 0 】

2 2 . P R O 3 3 7

高等脊椎動物におけるニューロンの発達は、途中の別個の細胞環境を成功裡にそのシナプス標的まで航路決定しなければならないプロセスにより特徴づけられる。結果は神経回路の機能的に正確な形成である。精度は、成長円錐経路の発見と標的認識を調節し、後者の洗練とニューロン活性を必要とする現象によるそのような突出の再構築が続く機構から得られるものと信じられている。Goodman 及び Shatz, Cell/Neuron [Suppl.] 72(10):77-98 (1993)。更に、異なったニューロンが生化学的に区別される神経線維を伸長し、細胞-細胞、細胞-マトリックス、及び走化性相互作用によって提供される特異的案内キューに依存して、その適切なシナプス標的に到達することが明らかである。Goodman 等、上掲。

ニューロン細胞表面の多様性が作り出される一つの特定の手段は、細胞接着分子 (C A M s) と称される細胞表面タンパク質の差次的な発現を通してである。ニューロンの発現された C A M s は、放射状グリア細胞に沿ったニューロンの移動を含む、広範な発達プロセスに関与し、神経突起伸長に対して許容できる又は反発性の基質を提供し、また突出経路における軸索の選択的束状化を促進することに関与している。Jessel, Neuron 1:3-13 (1998); Edelman 及び Crossin, Annu.Rev.Biochem. 60:155-190 (1991)。成長円錐膜上に存在する C A M s と対向する細胞膜上又は細胞外マトリックス中の分子との間の相互作用は、適切な突出経路に沿って神経線維の成長を方向付ける特異的案内キューを提供すると考えられている。そのような相互作用の結果、神経突起成長を調節する成長円錐内において様々な第 2 のメッセンジャー系の活性化が生じると思われる。Doherty 及び Walsh, Curr.Opin.Neurobiol. 2:595-601 (1992)。

高等脊椎動物において、大抵の神経 C A M s はタンパク質の 3 つの主要な構造ファミリー：インテグリン、カドヘリン、及び免疫グロブリン遺伝子スーパーファミリー (I g S F) のメンバーであることが見出されている。Jessel, 上掲; Takeichi, Annu.Rev.Biochem. 59:237-252 (1990); Reichardt 及び Tomaselli, Annu.Rev.Neurosci. 14:531-570 (1991)。I g S F (又は I g - C A M s) の細胞接着分子は特に、発達の中の神経細胞相互作用及び神経線維成長にしばしば関与しているタンパク質の大きなファミリーを構成している。Salzer 及び Colman, Dev.Neurosci. 11:377-390 (1989); Bruemendorf 及び Rathjen, J.Neurochem. 61:1207-1219 (1993)。しかし、哺乳動物 I g - C A M s の大半はあまりに広範

に発現されているので航路決定又はシナプス標的を特定できないように思われ、まだ同定されていない他のCAMsがニューロンのこれらの更に選択的な相互作用において役割を果たしていることが示唆される。

【0031】

既知の神経Ig-CAMsの多くはグリコシルホスファチジルイノシトール(GPI)アンカーを介して原形質膜に結合していることが見出されている。また、多くの研究によれば、GPIアンカータンパク質が特異的経路におけるニューロンの成長の間、特異的案内キューの提供に参与している。バッタの神経系の研究では、細胞の表面からGPI-アンカータンパク質を選択的に除去するホスファチジルイノシトール特異的ホスホリパーゼC(PiPLC)での胎仔の治療の結果、開拓している成長円錐のサブセットの間での誤案内及び偽りの航路決定、並びに初期ニューロンのサブセットの阻害移動パターンが生じる。Chang等, *Devel.* 114:507-519 (1992)。網膜線維の視蓋への突出は、部分的に33kDaのGPIアンカータンパク質に依存しているように思われるが、このタンパク質の正確な性質は未知である。Stahl等, *Neuron* 5:735-743 (1990)。

10

様々なGPIアンカータンパク質の発現は、後根神経節の一次ラットニューロン、頸部神経節の交感ニューロン、上頸神経節の交感ニューロン、及び小脳顆粒ニューロンの異なった集団のなかで特徴づけられている。Rosen等, *J. Cell Biol.* 117:617-627 (1992)。これらの異なったタイプのニューロンによる全膜タンパク質の発現の類似パターンとは対照に、顕著な差異がこれらのニューロン間でGPIアンカータンパク質の発現において観察された。最近、ニューロトリミン(neurotrimin)として知られている65kDaのタンパク質バンドが発見され、一次ニューロンにより差次的に発現され(Rosen等, 上掲)、神経系に制限され、CNSにおいて最も豊富で最も初期に発現されたGPIアンカー種であることが分かった。Struyk等, *J. Neuroscience* 15(3):2141-2156 (1995)。ニューロトリミンの発見は更に、現在IgLONと名付けられ、それぞれが有意なアミノ酸同一性を共有するIg様ドメインを含んでいるIgSFメンバーのファミリーの同定に至った。Struyk等, 上掲; Pimenta等, *Gene* 170(2):189-95 (1996)。

20

IgLONサブファミリーの更なるメンバーは、オピエート結合細胞接着分子(OBCAM)、Schofield等, *EMBO J.* 8:489-495 (1989); 辺縁随伴膜タンパク質(LAMP)、Pimenta等, 上掲; CEPU-1; GP55、Wilson等, *J. Cell Sci.* 109:3129-3138 (1996); *Eur. J. Neurosci.* 9(2):334-41 (1997); 及びAvGp50、Hancox等, *Brain Res. Mol. Brain Res.* 44(2):273-85 (1997)を含む。

30

【0032】

ニューロトリミンの発現は広範であると思われる一方、幾つかの神経回路の発達に相関していると思われる。例えば、E18とP10の間で、前脳内でのニューロチミンmRNAの発現が、発達中の視床、皮質サブプレート、及び皮質のニューロン、特にラミナV及びVI(II、I及びIVでのあまり強くない発現とラミナIでの最小の発現を伴って)において高レベルに維持される。皮質サブプレートニューロンは、皮質内のその最終のシナプス標的までの途中の内に伸びる視床求心性神経に対する初期の一時的な足場を提供する。Allendoerfer及びShatz, *Annu. Rev. Neurosci.* 17:185-218 (1994)。逆に、サブプレートニューロンは、層Vからの皮質ニューロンがVIを選択して視床内に成長し、層Vからのニューロンが小丘、脳橋、及び脊髄においてその標的を選択するのに必要とされることが示唆されている(McConnell等, *J. Neurosci.* 14:1892-1907 (1994))。これらの突出の多くにおけるニューロトリミンの高レベルの発現はそれがその発達に参与していることを示唆している。

40

後脳において、ニューロトリミンメッセージ発現の高レベルはニューロトリミンはまた脳橋核内に及び小脳のプルキニエ細胞及び内部顆粒細胞によって観察された。脳橋核はV層の皮質脳橋線維を含む様々なソースから求心性線維の入力を受け取り、顆粒細胞への苔状線維を介しての求心性線維の入力の主要ソースであり、該顆粒細胞は次にプルキニエ細胞への平行線維を介しての求心性線維の入力の主たるソースである。[Palay及びChan-Palay, *The cerebellar cortex: cytology and organization.* New York: Springer (1974)]

50

。これらニューロトリミンニューロンの高レベルの発現はこれらの回路の確率における強力な関与を示唆している。

ニューロトリミンはまた初期の出生後線条体において段階的な発現パターンを示す。ニューロトリミンの発現の増加はラットの背外側線条体上に横たわって見出される一方、より低いハイブリダイゼーション強さが腹側正中線条体上に横たわって見られる。Struyk等, 上掲。より高いニューロトリミンハイブリダイゼーション強さのこの領域は細胞構造的に区別しうる領域に対応せず、むしろ、対側性感覚運動皮質のV I層からの求心性入力的一次領域に対応する(Gerfen, Nature 311:461-464 (1984); Donoghue及びHerkenham, Brain Res. 365:397-403 (1986))。対照的に、腹側正中線条体は鼻周囲及び連合野からその大部分の求心性入力を受け取る。LAMP発現の相補的段階的パターンは線条体において、腹側正中領域において最も高い発現と背外側に最も低い発現を伴って観察されている。Levitt, Science 223:299-301 (1985); Chesselet等, Neuroscience 40:725-733 (1991)。

10

【0033】

23. PRO1411

新規で未変性の分泌タンパク質を同定するための努力が、産業界と学術界の両方でなされている。多くの努力は、新規な分泌タンパク質のコード配列を同定するための哺乳動物組換えDNAライブラリーのスクリーニングに注がれている。我々は、ここでPRO1411と命名する新規な分泌タンパク質の同定と特徴付けをここに記載する。

【0034】

24. PRO4356

グリコシルホスファチジルイノシトール(GPI)固着プロテオグリカンは一般的に細胞表面に局在化し、よって多くの成長因子、細胞接着分子及び細胞外マトリクス成分に対する細胞の反応の調節に関与することが知られている。転移関連GPI固着タンパク質(MAGPIAP)は、これらの細胞表面タンパク質の一つであり転移に関与することがわかっている。転移は、形質転換された又は悪性の細胞が移動し、癌を一方の部位から他方へ拡げる癌の形態である。従って、転移及びMAGPIAPに関連するポリペプチドの同定は興味の対象である。

20

【0035】

25. PRO246

細胞表面タンパク質HCARは、アデノウイルスのサブグループC及びコクサッキーウイルスのサブグループBに対するレセプターとして作用する膜結合タンパク質である。よって、HCARは細胞へのウイルス感染を媒介する手段を提供するものであり、細胞表面上にHCARレセプターが存在すると、ウイルス粒子に対する結合部位が提供され、それによってウイルス感染が促進される。

30

膜結合タンパク質、特にウイルスに対する細胞表面レセプターを提供するものの生理学的重要性に鑑みて、新規で未変性の膜結合レセプタータンパク質を同定するための努力が、産業界及び学術界の双方により現在なされている。これらの多くの努力は、新規なレセプタータンパク質のコード配列を同定するために哺乳動物組換えDNAライブラリーのスクリーニングに注がれている。我々は、ここでA33及びガン胎児抗原を含む様々な腫瘍抗原及び細胞表面タンパク質HCARに対して相同性を有する新規な膜結合ポリペプチドポリペプチド(ここでPRO246と命名)をここに記載するもので、このポリペプチドは新規な細胞表面ウイルスレセプター又は腫瘍抗原でありうる。

40

【0036】

26. PRO265

タンパク質-タンパク質相互作用はレセプター及び抗原複合体及びシグナル伝達機構を含む。タンパク質-タンパク質相互作用の基となる構造的及び機能的機構についてよく知られているように、タンパク質-タンパク質相互作用は、タンパク質-タンパク質相互作用の特定の結果を調節するように更に容易に操作することができる。従って、タンパク質-タンパク質相互作用の基となる機構は科学及び医学界にとって興味深い。

50

ロイシンリッチ反復を含む全てのタンパク質はタンパク質-タンパク質相互作用に関与していると考えられている。ロイシンリッチ反復は多様な機能を持つ多くのタンパク質と細胞位置に存在する短い配列モチーフである。リボヌクレアーゼインヒビタータンパク質の結晶構造から、ロイシンリッチ反復は - 構造単位に対応することが明らかになった。これらの単位は、一面が溶媒に暴露された平行なシートを形成するように配置され、タンパク質は珍しい非球状の形状を獲得する。これらの二つの特徴はロイシンリッチ反復を含むタンパク質のタンパク質結合機能の原因であることが示されている。Kobe及びDeisenhofer, Trends Biochem.Sci., 19(10):415-421 (Oct.1994)を参照されたい。

個体発生の間にコラーゲン原線維を配向し指令する組織オーガナイザーとなり、創傷治癒、組織修復、及び腫瘍ストロマ形成のような病理プロセスに関与するロイシンリッチプロテオグリカンについて研究が報告されている。Iozzo, R.V., Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol., 32(2):141-174 (1997)。創傷治癒、組織修復におけるロイシンリッチタンパク質の関与を示す他の研究は、De La Salle, C.等, Vouv. Rev. Fr. Hematol. (Germany), 37(4):215-222 (1995)であり、出血疾患ベルナル-スーリエ症候群に伴う複合体におけるロイシンリッチモチーフの突然変異を報告しており、Chlemetson, K.J., Thromb. Haemost. (Germany), 74(1):111-116 (July 1995)は、血小板がロイシンリッチ反復を有していることを報告している。ロイシンリッチ反復を有することが報告されている特に興味深い他のタンパク質は、アルツハイマー病のような神経変性疾患、パーキンソン病のような神経損傷の治療において、及びガンの診断に対して有用であることが報告されているSLITタンパク質である。エール大学のArtavanistsakon, S.及びRothberg, J.M.のW09210518-A1を参照されたい。ロイシンリッチ反復を有するタンパク質の生物学的機能を報告している他の研究には：Tayar, N.等, Mol. Cell Endocrinol., (Ireland), 125(1-2):65-70 (Dec.1996)(ゴナドトロピンレセプター関連)；Miura, Y.等, Nippon Rinsho (Japan), 54(7):1784-1789 (July 1996)(アポトーシス関連)；Harris, P.C.等, J. Am. Soc. Nephrol., 6(4):1125-1133 (Oct.1995)(腎疾患関連)；及びLa Jolla Cancer Research FoundationのRuoslahti, E.I.等のW09110727-A(トランスフォーミング成長因子に結合するデコリンの、ガンの治療、創傷治癒及び瘢痕化への関与)が含まれる。また興味深いのはフィブロモジュリンと皮膚瘢痕化を防止又は低減するためのその使用である。フィブロモジュリンの研究はRuoslahti等の米国特許第5,654,270に見いだされる。

よって、タンパク質-タンパク質相互作用をよりよく理解するためにロイシンリッチ反復を有する新規なタンパク質を同定するための努力が産業界と学术界の両方によってなされている。特に興味があるものはロイシンリッチ反復とフィブロモジュリン、SLITタンパク質及び血小板糖タンパク質Vのようなロイシンリッチ反復を有する既知のタンパク質と相同性を有するタンパク質である。多くの努力は、ロイシンリッチ反復を有する新規な分泌及び膜貫通タンパク質についてのコード化配列を同定するための哺乳動物組換えDNAライブラリーのスクリーニングに集中している。ここで我々は、ここでPRO265ポリペプチドと命名する、フィブロモジュリンと相同性を有する新規なポリペプチドの同定及び特徴づけについて記載する。

【0037】

27. PRO941

カドヘリンは大きなファミリーの膜貫通タンパク質である。カドヘリンには、事実上、多細胞生物の全ての固体組織において細胞-細胞接着を媒介するように機能するカルシウム依存性糖タンパク質のファミリーが含まれる。少なくともカドヘリン1-13並びにB、E、EP、M、N、P及びR型が同定され、特徴づけられている。幾つかの例外はあるが、カドヘリンの機能の中でも、カドヘリンが細胞凝集に関与しており、細胞-細胞接着部位に付随していることが知られている。最近、全てのカドヘリンが、細胞外ドメインの折り畳みに対応すると考えられているカドヘリン特異的モチーフの多重反復を分かち持つが、カドヘリンスーパーファミリーのメンバーは多様な構造、及びおそらくは機能を有していることが報告されている。特に、カドヘリンスーパーファミリーのメンバーはシグナル伝達に関連していることが報告されている。Suzuki, J. Cell. Biochem., 61(4):531-5

10

20

30

40

50

42(1996)。カドヘリンはさらに、Tanihara等, J. Cell Sci., 107(6):1697-1704(1994)、Aberle等, J. Cell. Biochem., 61(4):514-523(1996)及びTanihara等, Cell Adhes. Commun., 2(1):15-26(1994)にも記載されている。我々は、ここでPRO941と命名した、カドヘリンタンパク質に対して相同性を有する他の新規なポリペプチドの同定及び特徴づけについてここに記載する。

【0038】

28. PRO10096

インターロイキン-10(IL-10)は多面的な免疫抑制サイトカインであり、骨髄及びリンパ細胞の機能の重要なレギュレータとして関連している。IL-10が、例えばIL-1、IL-6、IFN- γ 及びTNF- α を含む種々の炎症性サイトカインの合成活性化の強力なインヒビターとして機能することが示されている(Gesser等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 14620-14625 (1997))。さらに、IL-10はマクロファージの付随的活性の幾つかを強く阻害し、それによりマクロファージ、T細胞及びNK細胞のエフェクター機能の強力なサブレッサとして機能することが示されている(Kuhn等, Cell 75: 263-274 (1993))。さらに、IL-10はB細胞、肥満細胞及び胸腺細胞分化の調節と強く関係している。

10

IL-10は2つの別の実験系から独立に同定された。第1に、マウスIL-10をコードするcDNAクローンが、サイトカイン合成阻害因子の発現に基づいて同定され(Moore等, Science 248: 1230-1234 (1990))、ヒトIL-10対応cDNAが続いてマウスIL-10 cDNAでの交差ハイブリッド形成によって同定された(Viera等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 1172-1176 (1991))。さらにIL-10は、活性胸腺を同時刺激するように機能するB細胞由来のメディエータとして独立に同定された(Suda等, Cell Immunol., 129: 228 (1990))。

20

ここで我々は、ここでPRO10096ポリペプチドと命名する、IL-10と配列類似性を持つ新規なポリペプチドの同定及び特徴づけについて記載する。

【0039】

29. PRO6003

新規で未変性のレセプター又は膜結合タンパク質を同定するための努力が、産業界と学術界の両方でなされている。多くの努力は、新規なレセプター又は膜結合タンパク質のコード配列を同定するための哺乳動物組換えDNAライブラリーのスクリーニングに注がれている。我々は、ここでPRO6003ポリペプチドと命名する新規なポリペプチドの同定と特徴付けをここに記載する。

30

【0040】

(発明の概要)

本発明の一実施態様では、本発明はここに記載したポリペプチドの任意のものをコードするDNAを含んでなるベクターを提供する。そのようなベクターを含んでなる宿主細胞もまた提供される。例を挙げると、宿主細胞はCHO細胞、大腸菌、又は酵母でありうる。ここに記載のポリペプチドの任意のものを生産するための方法が更に提供され、これは、所望のポリペプチドの発現に適した条件下で宿主細胞を培養し、細胞培養物から所望のポリペプチドを回収することを含んでなる。

40

他の実施態様では、本発明は、異種性ポリペプチド又はアミノ酸配列に融合したここに記載のポリペプチドの任意のものを含んでなるキメラ分子を提供する。そのようなキメラ分子の例は、免疫グロブリンのFc領域又はエピトープタグ配列に融合したここに記載のポリペプチドの任意のものが含まれる。

他の実施態様では、本発明は上述の又は下記のポリペプチドの任意のものに特異的に結合する抗体を提供する。場合によっては、抗体はモノクローナル抗体、ヒト化抗体、抗体断片又は一本鎖抗体である。

さらに他の実施態様では、本発明は、アンチセンスプローブとして又はゲノム及びcDNAヌクレオチド配列を単離するために有用なオリゴヌクレオチドプローブを提供し、ここでこれらプローブは上述の又は下記のヌクレオチド配列の任意のものから誘導されうる

50

。他の実施態様では、本発明は P R O ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含んでなる単離された核酸分子を提供する。

一態様では、単離された核酸分子は、(a)ここに開示された全長アミノ酸配列、ここに開示されたシグナルペプチドを欠くアミノ酸配列、シグナルペプチドを伴うか伴わないここに開示した膜貫通タンパク質の細胞外ドメイン、又はここに開示された全長アミノ酸配列の任意の他の特に定められた断片を有する P R O ポリペプチドをコードする D N A 分子、又は(b)(a)の D N A 分子の補体に対して、少なくとも約 8 0 % の核酸配列同一性、又は少なくとも約 8 1 % の核酸配列同一性、又は少なくとも約 8 2 % の核酸配列同一性、又は少なくとも約 8 3 % の核酸配列同一性、又は少なくとも約 8 4 % の核酸配列同一性、又は少なくとも約 8 5 % の核酸配列同一性、又は少なくとも約 8 6 % の核酸配列同一性、又は少なくとも約 8 7 % の核酸配列同一性、又は少なくとも約 8 8 % の核酸配列同一性、又は少なくとも約 8 9 % の核酸配列同一性、又は少なくとも約 9 0 % の核酸配列同一性、又は少なくとも約 9 1 % の核酸配列同一性、又は少なくとも約 9 2 % の核酸配列同一性、又は少なくとも約 9 3 % の核酸配列同一性、又は少なくとも約 9 4 % の核酸配列同一性、又は少なくとも約 9 5 % の核酸配列同一性、又は少なくとも約 9 6 % の核酸配列同一性、又は少なくとも約 9 7 % の核酸配列同一性、又は少なくとも約 9 8 % の核酸配列同一性、そして又は少なくとも約 9 9 % の核酸配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む。

10

【 0 0 4 1 】

他の態様では、単離された核酸分子は、(a)ここに開示された全長 P R O ポリペプチド c D N A のコード配列、ここに開示されたシグナルペプチドを欠く P R O ポリペプチド c D N A のコード配列、シグナルペプチドを伴うか伴わないここに開示した膜貫通 P R O ポリペプチドの細胞外ドメインのコード配列、又はここに開示された全長アミノ酸配列の任意の他の特に定められた断片のコード配列を含む D N A 分子、又は(b)(a)の D N A 分子の補体に対して、少なくとも約 8 0 % の核酸配列同一性、又は少なくとも約 8 1 % の核酸配列同一性、又は少なくとも約 8 2 % の核酸配列同一性、又は少なくとも約 8 3 % の核酸配列同一性、又は少なくとも約 8 4 % の核酸配列同一性、又は少なくとも約 8 5 % の核酸配列同一性、又は少なくとも約 8 6 % の核酸配列同一性、又は少なくとも約 8 7 % の核酸配列同一性、又は少なくとも約 8 8 % の核酸配列同一性、又は少なくとも約 8 9 % の核酸配列同一性、又は少なくとも約 9 0 % の核酸配列同一性、又は少なくとも約 9 1 % の核酸配列同一性、又は少なくとも約 9 2 % の核酸配列同一性、又は少なくとも約 9 3 % の核酸配列同一性、又は少なくとも約 9 4 % の核酸配列同一性、又は少なくとも約 9 5 % の核酸配列同一性、又は少なくとも約 9 6 % の核酸配列同一性、又は少なくとも約 9 7 % の核酸配列同一性、又は少なくとも約 9 8 % の核酸配列同一性、そして又は少なくとも約 9 9 % の核酸配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む。

20

30

さらなる態様では、本発明は、(a)ここに開示された A T T C に寄託されたヒトタンパク質 c D N A の任意のものによりコードされる同じ成熟ポリペプチドをコードする D N A 分子、又は(b)(a)の D N A 分子の補体に対して、少なくとも約 8 0 % の核酸配列同一性、又は少なくとも約 8 1 % の核酸配列同一性、又は少なくとも約 8 2 % の核酸配列同一性、又は少なくとも約 8 3 % の核酸配列同一性、又は少なくとも約 8 4 % の核酸配列同一性、又は少なくとも約 8 5 % の核酸配列同一性、又は少なくとも約 8 6 % の核酸配列同一性、又は少なくとも約 8 7 % の核酸配列同一性、又は少なくとも約 8 8 % の核酸配列同一性、又は少なくとも約 8 9 % の核酸配列同一性、又は少なくとも約 9 0 % の核酸配列同一性、又は少なくとも約 9 1 % の核酸配列同一性、又は少なくとも約 9 2 % の核酸配列同一性、又は少なくとも約 9 3 % の核酸配列同一性、又は少なくとも約 9 4 % の核酸配列同一性、又は少なくとも約 9 5 % の核酸配列同一性、又は少なくとも約 9 6 % の核酸配列同一性、又は少なくとも約 9 7 % の核酸配列同一性、又は少なくとも約 9 8 % の核酸配列同一性、そして又は少なくとも約 9 9 % の核酸配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む。

40

本発明の他の態様は、膜貫通ドメインが欠失されているか膜貫通ドメインが不活性化されている P R O ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含んでなる単離された核酸

50

分子を提供し、またはそのようなコード化ヌクレオチド配列に相補的であり、ここでそのようなポリペプチドの膜貫通ドメインがここに開示される。従って、ここに記載されたPROポリペプチドの可溶性細胞外ドメインが考慮される。

【0042】

他の実施態様はPROポリペプチドコード化配列の断片、又はその補体に向けられ、それらは、例えば、場合によっては抗-PRO抗体に対する結合部位を含むポリペプチドをコードするPROポリペプチドのコード化断片のハイブリッド形成プローブとして、又はアンチセンスオリゴヌクレオチドプローブとしての用途が見いだされる。このような核酸断片は、通常は少なくとも約20ヌクレオチド長、又は少なくとも約30ヌクレオチド長、又は少なくとも約40ヌクレオチド長、又は少なくとも約50ヌクレオチド長、又は少なくとも約60ヌクレオチド長、又は少なくとも約70ヌクレオチド長、又は少なくとも約80ヌクレオチド長、又は少なくとも約90ヌクレオチド長、又は少なくとも約100ヌクレオチド長、又は少なくとも約110ヌクレオチド長、又は少なくとも約120ヌクレオチド長、又は少なくとも約130ヌクレオチド長、又は少なくとも約140ヌクレオチド長、又は少なくとも約150ヌクレオチド長、又は少なくとも約160ヌクレオチド長、又は少なくとも約170ヌクレオチド長、又は少なくとも約180ヌクレオチド長、又は少なくとも約190ヌクレオチド長、又は少なくとも約200ヌクレオチド長、又は少なくとも約250ヌクレオチド長、又は少なくとも約300ヌクレオチド長、又は少なくとも約350ヌクレオチド長、又は少なくとも約400ヌクレオチド長、又は少なくとも約450ヌクレオチド長、又は少なくとも約500ヌクレオチド長、又は少なくとも約600ヌクレオチド長、又は少なくとも約700ヌクレオチド長、又は少なくとも約800ヌクレオチド長、又は少なくとも約900ヌクレオチド長、及び又は少なくとも約1000ヌクレオチド長であり、ここで「約」という語の内容は参照する長さのプラス又はマイナス10%のヌクレオチド配列長を指すことを意味する。PROポリペプチドコード化ヌクレオチド配列の新規な断片は、多くの良く知られた配列アラインメントプログラムの任意のものを用いてPROポリペプチドコード化ヌクレオチド配列と他の公知のヌクレオチド配列とを整列させ、いずれのPROポリペプチドコード化ヌクレオチド配列断片が新規であるかを決定することにより、日常的な手法で同定してもよい。このようなPROポリペプチドコード化ヌクレオチド配列は全てここで考慮される。また、これらのヌクレオチド分子断片、好ましくは抗-PRO抗体に対する結合部位を含むPROポリペプチド断片によってコードされるPROポリペプチド断片も考慮される。

10

20

30

他の実施態様では、本発明は上記において同定した単離核酸配列の任意のものによりコードされる単離されたPROポリペプチドを提供する。

【0043】

ある態様では、本発明は、ここに開示された全長アミノ酸配列、ここに開示されたシグナルペプチドを欠く全長アミノ酸配列、シグナルペプチドを伴うか伴わないここに開示した膜貫通タンパク質の細胞外ドメイン、又はここに開示された全長アミノ酸配列の任意の他の特に定められた断片を有するPROポリペプチドに対して、少なくとも約80%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約81%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約82%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約83%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約84%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約85%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約86%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約87%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約88%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約89%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約90%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約91%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約92%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約93%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約94%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約95%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約96%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約97%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約98%のアミノ酸配列同一性、そして又は少なくとも約99%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む単離されたPROポリペプチドに関する。

40

50

さらなる態様では、本発明は、ここに開示するATCCに寄託されたヒトタンパク質cDNAの任意のものにコードされるアミノ酸配列に対して少なくとも約80%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約81%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約82%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約83%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約84%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約85%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約86%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約87%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約88%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約89%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約90%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約91%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約92%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約93%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約94%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約95%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約96%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約97%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約98%のアミノ酸配列同一性、そして又は少なくとも約99%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む単離されたPROポリペプチドに関する。

10

さらなる態様では、本発明は、ここに開示する全長アミノ酸配列、ここに開示するシグナルペプチドを欠くアミノ酸配列、シグナルペプチド伴うか伴わないここに開示された膜貫通タンパク質の細胞外ドメイン、又はここに開示する全長アミノ酸配列の任意の他の特に定められた断片を有するPROポリペプチドのアミノ酸配列と比較したときに、少なくとも約80%ポジティブ、又は少なくとも約81%ポジティブ、又は少なくとも約82%ポジティブ、又は少なくとも約83%ポジティブ、又は少なくとも約84%ポジティブ、又は少なくとも約85%ポジティブ、又は少なくとも約86%ポジティブ、又は少なくとも約87%ポジティブ、又は少なくとも約88%ポジティブ、又は少なくとも約89%ポジティブ、又は少なくとも約90%ポジティブ、又は少なくとも約91%ポジティブ、又は少なくとも約92%ポジティブ、又は少なくとも約93%ポジティブ、又は少なくとも約94%ポジティブ、又は少なくとも約95%ポジティブ、又は少なくとも約96%ポジティブ、又は少なくとも約97%ポジティブ、又は少なくとも約98%ポジティブ、そして又は少なくとも約99%ポジティブのスコアとされるアミノ酸配列を含む単離されたPROポリペプチドに関する。

20

【0044】

特定の態様では、本発明は、N末端シグナル配列及び/又は開始メチオニンを持たない単離されたPROポリペプチドを提供し、それは上述したそのようなアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列によりコードされる。これを生産する方法もまたここに記載され、ここで、これらの方法はPROポリペプチドの発現に適した条件下で適当なコード化核酸分子を含むベクターを含んでなる宿主細胞を培養し、細胞培養物からPROポリペプチドを回収することを含んでなる。

30

本発明の他の態様は、膜貫通ドメインが欠失されたか膜貫通ドメインが不活性化された単離されたPROポリペプチドを提供する。これを生産する方法もまたここに記載され、ここで、これらの方法はPROポリペプチドの発現に適した条件下で適当なコード化核酸分子を含むベクターを含んでなる宿主細胞を培養し、細胞培養物からPROポリペプチドを回収することを含んでなる。

40

さらに他の実施態様では、本発明は、ここで特定した天然PROポリペプチドのアゴニスト及びアンタゴニストに関する。特定の態様では、アゴニスト又はアンタゴニストは抗-PRO抗体又は小分子である。

さらなる実施態様では、本発明は、PROポリペプチドを候補分子と接触させ、前記PROポリペプチドによって媒介される生物活性を監視することを含んでなる、PROポリペプチドに対するアゴニスト又はアンタゴニストの同定方法に関する。好ましくは、PROポリペプチドは天然PROポリペプチドである。

またさらなる実施態様では、本発明は、PROポリペプチド、又はここに記載されたPROポリペプチドのアゴニスト又はアンタゴニスト、又は抗-PRO抗体を担体とともに含んでなる物質の組成物に関する。場合によっては、担体は製薬的に許容される担体であ

50

る。

本発明の他の実施態様は、PROポリペプチド、又は上記したようなそのアゴニスト又はアンタゴニスト、又は抗-PRO抗体の、PROポリペプチド、そのアゴニスト又はアンタゴニスト又は抗-PRO抗体に応答性である症状の治療に有用な医薬の調製のための使用に向けられる。

【0045】

(好適な実施態様の詳細な説明)

I. 定義

ここで使用される際の「PROポリペプチド」及び「PRO」という用語は、直後に数値符号がある場合に種々のポリペプチドを指し、完全な符号(例えば、PRO/数字)は、ここに記載する特定のポリペプチド配列を称する。ここで使用される「PRO/数字ポリペプチド」及び「PRO/数字」であって、「数字」がここで使用される実際の数値符号として与えられる用語は、天然配列ポリペプチド及びポリペプチド変異体(ここで更に詳細に定義する)を含む。ここに記載されるPROポリペプチドは、ヒト組織型又は他の供給源といった種々の供給源から単離してもよく、組換え又は合成方法によって調製してもよい。「PROポリペプチド」なる用語は、ここで記載する個々のPRO/数字ポリペプチドを意味する。「PROポリペプチド」に言及するこの明細書中の全ての開示は、ポリペプチドのそれぞれを個々に又は併せて意味する。例えば、調製、精製、誘導、抗体生成、投与、それを含有する組成物、それによる病気の治療などが、本発明の各ポリペプチドにそれぞれ関与している。また「PROポリペプチド」なる用語には、ここに開示されるPRO/数字ポリペプチドの変異体も含まれる。

「天然配列PROポリペプチド」は、天然由来の対応するPROポリペプチドと同一のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含んでいる。このような天然配列PROポリペプチドは、自然から単離することもできるし、組換え又は合成手段により生産することもできる。「天然配列PROポリペプチド」という用語には、特に、特定のPROポリペプチドの自然に生じる切断又は分泌形態(例えば、細胞外ドメイン配列)、自然に生じる変異形態(例えば、選択的にスプライシングされた形態)及びそのポリペプチドの自然に生じる対立遺伝子変異体が含まれる。本発明の種々の実施態様において、天然配列PROポリペプチドは、添付の図面に示される全長アミノ酸配列を含む成熟又は全長天然配列ポリペプチドである。開始及び停止コドンは、図において太字及び下線で示した。しかし、添付の図面に開示したPROポリペプチドは、図面におけるアミノ酸1としてここに命名されるメチオニン残基で始まるように示されているが、図面におけるアミノ酸位置1の上流又は下流に位置する他のメチオニン残基をPROポリペプチドの開始アミノ酸残基として用いることも考えられるし可能でもある。

PROポリペプチド「細胞外ドメイン」又は「ECD」は、膜貫通及び細胞質ドメインを実質的に有しないPROポリペプチドの形態を称する。通常、PROポリペプチドECDは、それらの膜貫通及び/又は細胞質ドメインを1%未満、好ましくはそのようなドメインを0.5%未満しか持たない。本発明のPROポリペプチドについて同定された任意の膜貫通ドメインは、疎水性ドメインのその型を同定するために当該分野において日常的に使用される基準に従い同定されることが理解されるであろう。膜貫通ドメインの厳密な境界は変わり得るが、最初に同定されたドメインのいずれかの末端から約5アミノ酸を越えない可能性が高い。従って、PROポリペプチドの細胞外ドメインは、場合によっては、実施例又は明細書で同定されるように膜貫通ドメイン及び/又は細胞外ドメインの境界のいずれかの側から約5を越えないアミノ酸を含んでもよく、シグナルペプチドを伴う又は伴わない、それらのポリペプチド及びそれらをコードする核酸が、本発明で考慮される。

【0046】

ここに開示する種々のPROポリペプチドの「シグナルペプチド」の適切な位置は、本明細書及び/又は添付図面に示す。しかし、注記するように、シグナルペプチドのC-末端境界は変化するが、ここで最初に定義したようにシグナルペプチドC-末端境界のい

ずれかの側で約5アミノ酸未満である可能性が最も高く、シグナルペプチドのC-末端境界は、そのような型のアミノ酸配列成分を同定するのに日常的に使用される基準に従って同定しうる(例えば、Nielsen等, Prot. Eng. 10: 1-6 (1997)及びvon Heinje等, Nucl. Acids. Res. 14: 4683-4690 (1986))。さらに、幾つの場合には、分泌ポリペプチドからのシグナルペプチドの切断は完全に均一ではなく、結果として一以上の分泌種をもたらすことも認められる。シグナルペプチドがここで同定されるシグナルペプチドのC-末端境界の何れかの側の約5アミノ酸未満内で切断されるこれらの成熟ポリペプチド、及びそれらをコードするポリヌクレオチドが、本発明で考慮される。

「PROポリペプチド変異体」とは、上記又は下記に定義されるように、ここに開示される全長天然配列PROポリペプチド配列、ここに開示されたシグナルペプチドを欠く全長天然配列PROポリペプチド配列、シグナルペプチドを伴うか伴わないここに開示されたPROの細胞外ドメイン、又はここに開示された全長PROポリペプチドの任意の他の断片と、少なくとも約80%のアミノ酸配列同一性を有する活性PROポリペプチドを意味する。このようなPROポリペプチド変異体には、例えば、全長天然アミノ酸配列のN-又はC-末端において一又は複数のアミノ酸残基が付加、もしくは欠失されたPROポリペプチドが含まれる。通常、PROポリペプチド変異体は、ここに開示される全長天然配列ポリペプチド配列、ここに開示されたシグナルペプチドを欠くPROポリペプチド配列、シグナルペプチドを伴うか伴わないここに開示されたPROポリペプチドの細胞外ドメイン、又はここに開示された全長PROポリペプチド配列の他の任意の特に定められた断片と、少なくとも約80%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約81%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約82%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約83%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約84%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約85%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約86%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約87%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約88%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約89%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約90%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約91%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約92%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約93%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約94%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約95%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約96%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約97%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約98%のアミノ酸配列同一性、そして又は少なくとも約99%のアミノ酸配列同一性を有している。通常は、PRO変異体ポリペプチドは、少なくとも約10アミノ酸長、又は少なくとも約20アミノ酸長、又は少なくとも約30アミノ酸長、又は少なくとも約40アミノ酸長、又は少なくとも約50アミノ酸長、又は少なくとも約60アミノ酸長、又は少なくとも約70アミノ酸長、又は少なくとも約80アミノ酸長、又は少なくとも約90アミノ酸長、又は少なくとも約100アミノ酸長、又は少なくとも約150アミノ酸長、又は少なくとも約200アミノ酸長、又は少なくとも約300アミノ酸長、又はそれ以上である。

【0047】

ここに同定されるPROポリペプチド配列に対する「パーセント(%)アミノ酸配列同一性」は、配列を整列させ、最大のパーセント配列同一性を得るために必要ならば間隙を導入し、如何なる保存的置換も配列同一性の一部と考えないとした、特定のPROポリペプチド配列のアミノ酸残基と同一である候補配列中のアミノ酸残基のパーセントとして定義される。パーセントアミノ酸配列同一性を決定する目的のためのアラインメントは、当業者の技量の範囲にある種々の方法、例えばBLAST、BLAST-2、ALIGN又はMegalalign(DNASTAR)ソフトウェアのような公に入手可能なコンピュータソフトウェアを使用することにより達成可能である。当業者であれば、比較される配列の全長に対して最大のアラインメントを達成するために必要な任意のアルゴリズムを含む、アラインメントを測定するための適切なパラメータを決定することができる。しかし、ここでの目的のためには、%アミノ酸配列同一性値は、以下に記載するように、ALIGN-2プログラム用の完全なソースコードが表1に与えられている配列比較コンピュータプログラムALIGN-2を用いて得られる。ALIGN-2

10

20

30

40

50

配列比較コンピュータプログラムはジェネンテック社によって作成され、表1に示したソースコードは米国著作権庁、Washington D.C., 20559に使用者用書類とともに提出され、米国著作権登録番号TXU510087の下で登録されている。ALIGN-2プログラムはジェネンテック社、South San Francisco, Californiaを通して公的に入手可能であり、また表1に与えたソースコードからコンパイルしてもよい。ALIGN-2プログラムは、UNIXオペレーティングシステム、好ましくはデジタルUNIX V4.0Dでの使用のためにコンパイルされる。全ての配列比較パラメータは、ALIGN-2プログラムによって設定され変動しない。

【0048】

アミノ酸配列比較にALIGN-2が用いられる状況では、与えられたアミノ酸配列Aの、与えられたアミノ酸配列Bとの、又はそれに対する%アミノ酸配列同一性(あるいは、与えられたアミノ酸配列Bと、又はそれに対して或る程度の%アミノ酸配列同一性を持つ又は含む与えられたアミノ酸配列Aと言うこともできる)は次のように計算される：

分率 X/Y の100倍

ここで、Xは配列アラインメントプログラムALIGN-2のA及びBのプログラムアラインメントによって同一であると一致したスコアのアミノ酸残基の数であり、YはBの全アミノ酸残基数である。アミノ酸配列Aの長さがアミノ酸配列Bの長さとは異なる場合、AのBに対する%アミノ酸配列同一性は、BのAに対する%アミノ酸配列同一性とは異なると認識されるであろう。%アミノ酸配列同一性の計算の例として、表2及び3は、「比較タンパク質」と称されるアミノ酸配列の「PRO」と称されるアミノ酸配列に対する%アミノ酸配列同一性の計算方法を示し、ここで「PRO」は関心ある仮定PROポリペプチドのアミノ酸配列を表し、「比較タンパク質」は関心ある「PRO」ポリペプチドと比較され、これに対するポリペプチドのアミノ酸配列を表し、「X」、「Y」及び「Z」は、それぞれ異なる仮定アミノ酸残基を表す。

特に断らない限りは、ここで使用されるの全ての%アミノ酸配列同一性値は上記のようにALIGN-2コンピュータプログラムを用いて得られる。しかしながら、%アミノ酸配列同一性は、WU-BLAST-2コンピュータプログラム(Altschul等, Methods in Enzymology 266: 460-480 (1996))を用い、以下に記載するようにしても得られる。殆どのWU-BLAST-2検索パラメータはデフォルト値に設定される。デフォルト値に設定されない、即ち調節可能なパラメータは以下の値に設定する：オーバーラップスパン = 1、オーバーラップフラクション = 0.125、ワード閾値(T) = 11、及びスコアリングマトリクス = BLOSUM62。WU-BLAST-2を使用する場合、%アミノ酸配列同一性値は、(a)天然PROポリペプチドから誘導された配列を有する関心あるPROポリペプチドのアミノ酸配列と、関心ある比較アミノ酸配列(即ち、関心あるPROポリペプチドが比較されるPROポリペプチド変異体であってもよい配列)との間の、WU-BLAST-2によって決定した一致する同一アミノ酸残基の数を、(b)関心あるPROポリペプチドの残基の総数で除した商によって決定される。例えば、「アミノ酸配列Bに対して少なくとも80%のアミノ酸配列同一性を持つ又は持っているアミノ酸配列Aを含んでなるポリペプチド」という表現では、アミノ酸配列Aが関心ある比較アミノ酸配列であり、アミノ酸配列Bが関心あるPROポリペプチドのアミノ酸配列である。

【0049】

また、パーセントアミノ酸配列同一性は配列比較プログラムNCBI-BLAST2(Altschul等, Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402 (1997))を用いて決定してもよい。NCBI-BLAST2配列比較プログラムは、<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>からダウンロードするか、又は国立衛生研究所、Bethesda, MD.から得ることができる。NCBI-BLAST2は幾つかの検索パラメータを使用し、それら検索パラメータの全てはデフォルト値に設定され、例えば、unmask = 可、鎖 = 全て、予測される発生 = 10、最小低複合長 = 15 / 5、マルチパス e-値 = 0.01、マルチパスの定数 = 25、最終ギャップアラインメントのドロップオフ = 25、及びスコアリングマトリクス = BLOSUM62を含む。

アミノ酸配列比較にNCBI-BLAST2が用いられる状況では、与えられたアミノ酸配列Aの、与えられたアミノ酸配列Bとの、又はそれに対する%アミノ酸配列同一性(あるいは、

10

20

30

40

50

与えられたアミノ酸配列 B と、又はそれに対して或る程度の % アミノ酸配列同一性を持つ又は含む与えられたアミノ酸配列 A と言うこともできる)は次のように計算される：

分率 X/Y の 100 倍

ここで、 X は配列アラインメントプログラム NCBI-BLAST2 の A 及び B のプログラムアラインメントによって同一であると一致したスコアのアミノ酸残基の数であり、 Y は B の全アミノ酸残基数である。アミノ酸配列 A の長さがアミノ酸配列 B の長さとは異なる場合、A の B に対する % アミノ酸配列同一性は、B の A に対する % アミノ酸配列同一性とは異なると評価されるであろう。

【0050】

「PRO 変異体ポリヌクレオチド」又は「PRO 変異体核酸配列」は、以下に定義する
 ような活性な PRO ポリペプチドをコードする核酸分子を意味し、ここに開示する全長天然
 配列 PRO ポリペプチド配列、ここに開示するシグナルペプチドを欠く全長天然配列 P
 RO ポリペプチド配列、ここに開示するシグナルペプチド有又は無の PRO ポリペプチド
 細胞外ドメイン、又はここに開示する全長 PRO ポリペプチド配列の任意の他の断片をコ
 ードする核酸配列に対して少なくとも約 80% の核酸配列同一性を有する。通常は、P R
 O 変異体ポリヌクレオチドは、ここに開示する全長天然配列 PRO ポリペプチド配列、こ
 こに開示するシグナルペプチドを欠く全長天然配列 PRO ポリペプチド配列、ここに開示
 するシグナルペプチド有又は無の PRO ポリペプチド細胞外ドメイン、又はここに開示す
 る全長 PRO ポリペプチド配列の任意の他の断片をコードする核酸配列と少なくとも約 8
 0% の核酸配列同一性、又は少なくとも約 81% の核酸配列同一性、又は少なくとも約 8
 2% の核酸配列同一性、又は少なくとも約 83% の核酸配列同一性、又は少なくとも約 8
 4% の核酸配列同一性、又は少なくとも約 85% の核酸配列同一性、又は少なくとも約 8
 6% の核酸配列同一性、又は少なくとも約 87% の核酸配列同一性、又は少なくとも約 8
 8% の核酸配列同一性、又は少なくとも約 89% の核酸配列同一性、又は少なくとも約 9
 0% の核酸配列同一性、又は少なくとも約 91% の核酸配列同一性、又は少なくとも約 9
 2% の核酸配列同一性、又は少なくとも約 93% の核酸配列同一性、又は少なくとも約 9
 4% の核酸配列同一性、又は少なくとも約 95% の核酸配列同一性、又は少なくとも約 9
 6% の核酸配列同一性、又は少なくとも約 97% の核酸配列同一性、又は少なくとも約 9
 8% の核酸配列同一性、そして又は少なくとも約 99% の核酸配列同一性を有している。
 変異体は、天然のヌクレオチド配列を含まない。

通常は、PRO 変異体ポリヌクレオチドは、少なくとも約 30 ヌクレオチド長、又は少
 なくとも約 60 ヌクレオチド長、又は少なくとも約 90 ヌクレオチド長、又は少なくとも
 約 120 ヌクレオチド長、又は少なくとも約 150 ヌクレオチド長、又は少なくとも約 1
 80 ヌクレオチド長、又は少なくとも約 210 ヌクレオチド長、又は少なくとも約 240
 ヌクレオチド長、又は少なくとも約 270 ヌクレオチド長、又は少なくとも約 300 ヌク
 レオチド長、又は少なくとも約 450 ヌクレオチド長、又は少なくとも約 600 ヌクレオ
 チド長、又は少なくとも約 900 ヌクレオチド長、又はそれ以上である。

【0051】

ここに同定される PRO ポリペプチドコード化核酸配列に対する「パーセント (%) 核
 酸配列同一性」は、配列を整列させ、最大のパーセント配列同一性を得るために必要なら
 ば間隙を導入し、関心ある PRO 核酸配列のヌクレオチドと同一である候補配列中のヌク
 レオチドのパーセントとして定義される。パーセント核酸配列同一性を決定する目的のた
 めのアラインメントは、当業者の技量の範囲にある種々の方法、例えば BLAST、BLAST-2、
 ALIGN 又は Megalign (DNASTAR) ソフトウェアのような公に入手可能なコンピュータソフトウ
 エアを使用することにより達成可能である。しかし、ここでの目的のためには、% 核酸配
 列同一性値は、以下に記載するように、ALIGN-2 プログラム用の完全なソースコードが表
 1 に与えられている配列比較コンピュータプログラム ALIGN-2 を用いて得られる。ALIGN-2
 配列比較コンピュータプログラムはジェネンテック社によって作成され、表 1 に示したソー
 スコードは米国著作権庁、Washington D.C., 20559 に使用者用書類とともに提出され、米
 国著作権登録番号 TXU510087 の下で登録されている。ALIGN-2 プログラムはジェネンテック社

、South San Francisco, Californiaを通して公的に入手可能であり、また表1に与えたソースコードからコンパイルしてもよい。ALIGN-2プログラムは、UNIXオペレーティングシステム、好ましくはデジタルUNIX V4.0Dでの使用のためにコンパイルされる。全ての配列比較パラメータは、ALIGN-2プログラムによって設定され変動しない。

【0052】

核酸配列比較にALIGN-2が用いられる状況では、与えられた核酸配列Cの、与えられた核酸配列Dとの、又はそれに対する%核酸配列同一性(あるいは、与えられた核酸配列Dと、又はそれに対して或る程度の%核酸配列同一性を持つ又は含む与えられたアミノ酸配列Cと言うこともできる)は次のように計算される：

分率 W/Z の100倍

ここで、Wは配列アラインメントプログラムALIGN-2のC及びDのプログラムアラインメントによって同一であると一致したスコアのヌクレオチドの数であり、ZはDの全ヌクレオチド数である。核酸配列Cの長さが核酸配列Dの長さとは異なる場合、CのDに対する%核酸配列同一性は、DのCに対する%核酸配列同一性とは異なると評価されるであろう。%核酸配列同一性の計算の例として、表4及び5は、「比較DNA」と称される核酸配列の「PRO-DNA」と称される核酸配列に対する%核酸配列同一性の計算方法を示しており、ここで「PRO-DNA」は関心ある仮定PROコード化核酸配列を表し、「比較DNA」は関心ある「PRO-DNA」核酸分子と比較され、これに対する核酸分子のヌクレオチド配列を表し、「N」、「L」及び「V」は、それぞれ異なる仮定ヌクレオチドを表す。

特に断らない限りは、ここでの全ての%核酸配列同一性値は上記のようにALIGN-2配列比較コンピュータプログラムを用いて得られる。しかしながら、%核酸配列同一性は、WU-BLAST-2コンピュータプログラム(Altschul等, Methods in Enzymology 266: 460-480 (1996))を用い、以下に記載するようにしても得られる。殆どのWU-BLAST-2検索パラメータはデフォルト値に設定される。デフォルト値に設定されない、即ち調節可能なパラメータは以下の値に設定する：オーバーラップスパン = 1、オーバーラップフラクション = 0.125、ワード閾値(T) = 11、及びスコアリングマトリクス = BLOSUM62。WU-BLAST-2を使用する場合、%核酸配列同一性値は、(a)天然配列PROポリペプチドコード化核酸から誘導された配列を有する関心あるPROポリペプチドコード化核酸分子の核酸配列と、関心ある比較核酸配列(即ち、関心あるPROポリペプチドコード化核酸配列が比較される変異体PROポリペプチドであってもよい配列)との間の、WU-BLAST-2によって決定した一致する同一ヌクレオチドの数を、(b)関心あるPROポリペプチドコード化核酸分子のヌクレオチドの総数で除した商によって決定される。例えば、「核酸配列Bに対して少なくとも80%の核酸配列同一性を持つ又は持っている核酸配列Aを含んでなる単離された核酸分子」という表現では、核酸配列Aが関心ある比較核酸配列であり、核酸配列Bが関心あるPROポリペプチドコード化核酸分子の核酸配列である。

【0053】

また、パーセント核酸配列同一性を配列比較プログラムNCBI-BLAST2(Altschul等, Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402 (1997))を用いて決定してもよい。NCBI-BLAST2配列比較プログラムは、<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>からダウンロードするか、又は国立衛生研究所, Bethesda, MD. から得ることができる。NCBI-BLAST2は幾つかの検索パラメータを使用し、それら検索パラメータの全てはデフォルト値に設定され、例えば、unmask = 可、鎖 = 全て、予測される発生 = 10、最小低複合長 = 15 / 5、マルチパス e-値 = 0.01、マルチパスの定数 = 25、最終ギャップアラインメントのドロップオフ = 25、及びスコアリングマトリクス = BLOSUM62を含む。

配列比較にNCBI-BLAST2が用いられる状況では、与えられた核酸配列Cの、与えられた核酸配列Dとの、又はそれに対する%核酸配列同一性(与えられた核酸配列Dと、又はそれに対して或る程度の%核酸配列同一性を持つ又は含む与えられた核酸配列Cと言うこともできる)は次のように計算される：

分率 W/Z の100倍

10

20

30

40

50

ここで、Wは配列アラインメントプログラムNCBI-BLAST2のC及びDのプログラムアラインメントによって同一であると一致したスコアのヌクレオチドの数であり、ZはDの全ヌクレオチド数である。核酸配列Cの長さが核酸配列Dの長さとは異なる場合、CのDに対する%核酸配列同一性は、DのCに対する%核酸配列同一性とは異なると評価されるであろう。

【0054】

他の実施態様では、PRO変異体ポリペプチドヌクレオチドは、活性PROポリペプチドをコードし、好ましくは緊縮性ハイブリッド形成及び洗浄条件下で、ここに開示する全長PROポリペプチドをコードするヌクレオチド配列にハイブリッド形成する核酸分子である。PRO変異体ポリペプチドは、PRO変異体ポリヌクレオチドにコードされるものであってもよい。

【0055】

「陽性(ポジティブ)」という用語は、上記のように実施された配列比較の中で、比較された配列において同一ではないが類似の特性を有している残基(例えば、保存的置換の結果として、下記の表6参照)を含む。ここでの目的のために、陽性の%値は、(a)天然PROポリペプチドから誘導された配列を有する関心あるPROポリペプチドアミノ酸配列と、関心ある比較アミノ酸配列(即ち、PROポリペプチド配列が比較されるアミノ酸配列)との間の、WU-BLAST-2のBLOSUM62マトリクス内でポジティブな値が付けられたアミノ酸残基の数を、(b)関心あるPROポリペプチドのアミノ酸残基の総数で除した商によって決定される。

特に断らない限り、陽性の%値は、直上のパラグラフに記載したようにして計算される。しかしながら、ALIGN-2及びNCBI-BLAST2について上記したように実施されるアミノ酸配列同一性には、配列比較において同一のみならず類似した特性をもつ配列におけるアミノ酸残基を含む。関心あるアミノ酸残基に対して陽性とされたアミノ酸残基は、関心あるアミノ酸残基と同一であるか、又は関心あるアミノ酸残基の好ましい置換(下記の表6に定義)であるものである。

ALIGN-2又はNCBI-BLAST2を用いたアミノ酸配列比較では、与えられたアミノ酸配列Aの、与えられたアミノ酸配列Bとの、又はそれに対する陽性の%値(あるいは、与えられたアミノ酸配列Bと、又はそれに対して或る程度の%アミノ酸配列同一性を持つ又は含む与えられたアミノ酸配列Aと言うこともできる)は次のように計算される：

分率 X/Y の100倍

ここで、Xは配列アラインメントプログラムALIGN-2又はNCBI-BLAST2のA及びBのアラインメントによって陽性であるとされたスコアのアミノ酸残基の数であり、YはBの全アミノ酸残基数である。アミノ酸配列Aの長さがアミノ酸配列Bの長さとは等しくない場合、AのBに対する%陽性は、BのAに対する%陽性とは異なると評価されるであろう。

【0056】

「単離された」とは、ここに開示された種々のポリペプチドを記述するために使用するときは、その自然環境の成分から同定され分離され及び/又は回収されたポリペプチドを意味する。その自然環境の汚染成分とは、そのポリペプチドの診断又は治療への使用を典型的には妨害する物質であり、酵素、ホルモン、及び他のタンパク質様又は非タンパク質様溶質が含まれる。好ましい実施態様において、ポリペプチドは、(1)スピニングカップシークエネーターを使用することにより、少なくとも15残基のN末端あるいは内部アミノ酸配列を得るのに十分なほど、あるいは、(2)クーマシーブルーあるいは好ましくは銀染色を用いた非還元あるいは還元条件下でのSDS-PAGEによる均一性まで精製される。単離されたポリペプチドには、PROポリペプチドの自然環境の少なくとも一つの成分が存在しないため、組換え細胞内のインサイツのポリペプチドが含まれる。しかしながら、通常は、単離されたポリペプチドは少なくとも一つの精製工程により調製される。

「単離された」PROポリペプチドコード化核酸又は他のポリペプチドコード化核酸は、同定され、PROポリペプチドコード化核酸の天然源に通常付随している少なくとも一つの汚染核酸分子から分離された核酸分子である。単離されたPROポリペプチドコード

10

20

30

40

50

化核酸分子は、天然に見出される形態あるいは設定以外のものである。ゆえに、単離されたPROポリペプチドコード化核酸分子は、天然の細胞中に存在する特定のPROポリペプチドコード化核酸分子とは区別される。しかし、単離されたPROポリペプチドコード化核酸分子は、例えば、核酸分子が天然細胞のものとは異なった染色体位置にあるポリペプチドを通常発現する細胞に含まれるポリペプチドコード核酸分子を含む。

「コントロール配列」なる用語は、特定の宿主生物において作用可能に結合したコード配列を発現するために必要なDNA配列を指す。例えば原核生物に好適なコントロール配列は、プロモーター、場合によってはオペレータ配列、及びリボソーム結合部位を含む。真核生物の細胞は、プロモーター、ポリアデニル化シグナル及びエンハンサーを利用することが知られている。

核酸は、他の核酸配列と機能的な関係にあるときに「作用可能に結合し」ている。例えば、プレ配列あるいは分泌リーダーのDNAは、ポリペプチドの分泌に参画するプレタンパク質として発現されているなら、そのポリペプチドのDNAに作用可能に結合している；プロモーター又はエンハンサーは、配列の転写に影響を及ぼすならば、コード配列に作用可能に結合している；又はリボソーム結合部位は、もしそれが翻訳を容易にするような位置にあるなら、コード配列と作用可能に結合している。一般的に、「作用可能に結合している」とは、結合したDNA配列が近接しており、分泌リーダーの場合には近接して読みフェーズにあることを意味する。しかし、エンハンサーは必ずしも近接している必要はない。結合は簡便な制限部位でのライゲーションにより達成される。そのような部位が存在しない場合は、従来手法に従って、合成オリゴヌクレオチドアダプターあるいはリンカーが使用される。

【0057】

「抗体」という用語は最も広い意味において使用され、例えば、単一の抗-PROモノクローナル抗体(アゴニスト、アンタゴニスト、及び中和抗体を含む)、多エピトープ特異性を持つ抗-PRO抗体組成物、一本鎖抗-PRO抗体、及び抗-PRO抗体の断片(下記参照)を包含している。ここで使用される「モノクローナル抗体」という用語は、実質的に均一な抗体の集団、すなわち、集団を構成する個々の抗体が、少量存在しうる自然に生じる可能性のある突然変異を除いて同一である集団から得られる抗体を称する。

ハイブリッド形成反応の「緊縮性」は、当業者によって容易に決定され、一般的にプローブ長、洗浄温度、及び塩濃度に依存する経験的な計算である。一般に、プローブが長くなると適切なアニーリングのための温度が高くなり、プローブが短くなると温度は低くなる。ハイブリッド形成は、一般的に、相補的鎖がその融点に近いがそれより低い環境に存在する場合における変性DNAの再アニールする能力に依存する。プローブとハイブリッド形成可能な配列との間の所望の相同性の程度が高くなると、使用できる相対温度が高くなる。その結果、より高い相対温度は、反応条件をより緊縮性にするが、低い温度は緊縮性を低下させる。ハイブリッド形成反応の緊縮性の更なる詳細及び説明は、Ausubel等, *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley Interscience Publishers, (1995)を参照のこと。

ここで定義される「緊縮性条件」又は「高度の緊縮性条件」は、(1)洗浄のために低イオン強度及び高温、例えば、50において0.015Mの塩化ナトリウム/0.0015Mのクエン酸ナトリウム/0.1%のドデシル硫酸ナトリウムを用いるもの；(2)ハイブリッド形成中にホルムアミド等の変性剤、例えば、42において50%(v/v)ホルムアミドと0.1%ウシ血清アルブミン/0.1%フィコール/0.1%のポリビニルピロリドン/50mMのpH6.5のリン酸ナトリウムバッファー、及び750mMの塩化ナトリウム、75mMクエン酸ナトリウムを用いるもの；又は(3)42における50%ホルムアミド、5xSSC(0.75MのNaCl、0.075Mのクエン酸ナトリウム)、50mMのリン酸ナトリウム(pH6.8)、0.1%のピロリン酸ナトリウム、5xデンハート液、超音波処理サケ精子DNA(50µg/ml)、0.1%SDS、及び10%のデキストラン硫酸と、42における0.2xSSC(塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム)中の洗浄及び55での50%ホルムアミド、次いで55におけるEDTAを

10

20

30

40

50

含む 0.1 x SSC からなる高緊縮性洗浄を用いるものによって特定される。

「中程度の緊縮性条件」は、Sambrook等, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989に記載されているように特定され、上記の緊縮性より低い洗浄溶液及びハイブリッド形成条件(例えば、温度、イオン強度及び% SDS)の使用を含む。中程度の緊縮性条件の例は、20%ホルムアミド、5 x SSC (150 mMのNaCl、15 mMのクエン酸三ナトリウム)、50 mMリン酸ナトリウム(pH 7.6)、5 x デンハート液、10%デキストラン硫酸、及び20 mg/mLの変性切断サケ精子DNAを含む溶液中の37 °Cでの終夜インキュベーション、次いで1 x SSC中37 - 50 °Cでのフィルターの洗浄といった条件である。当業者であれば、プローブ長などの因子に適合させる必要に応じて、どのようにして温度、イオン強度等を調節するかを認識するであろう。

【0058】

「エピトープタグ」なる用語は、ここで用いられるときは、「タグポリペプチド」に融合したPROポリペプチドを含んでなるキメラポリペプチドを指す。タグポリペプチドは、その抗体が産生され得るエピトープを提供するに十分な残基を有しているが、その長さはそれが融合するポリペプチドの活性を阻害しないよう十分に短い。また、タグポリペプチドは、好ましくは、抗体が他のエピトープと実質的に交差反応をしないようかなり独特である。適切なタグポリペプチドは、一般に、少なくとも6のアミノ酸残基、通常は約8 ~ 約50のアミノ酸残基(好ましくは約10 ~ 約20のアミノ酸残基)を有する。

ここで用いられる「イムノアドヘシン」なる用語は、異種タンパク質(「アドヘシン」)の結合特異性と免疫グロブリン定常ドメインのエフェクター機能とを結合した抗体様分子を指す。構造的には、イムノアドヘシンは、所望の結合特異性を持ち、抗体の抗原認識及び結合部位以外である(即ち「異種の」)アミノ酸配列と、免疫グロブリン定常ドメイン配列との融合物を含む。イムノアドヘシン分子のアドヘシン部分は、典型的には少なくともレセプター又はリガンドの結合部位を含む隣接アミノ酸配列である。イムノアドヘシンの免疫グロブリン定常ドメイン配列は、IgG-1、IgG-2、IgG-3又はIgG-4サブタイプ、IgA(IgA-1及びIgA-2を含む)、IgE、IgD又はIgMなどの任意の免疫グロブリンから得ることができる。

ここで目的としている「活性な」及び「活性」とは、天然又は天然に生じるPROの生物学的及び/又は免疫学的活性を保持するPROポリペプチドの形態を称し、「生物学的」活性とは、天然又は天然に生じるPROによって生ずる(阻害性又は刺激性の)生物学的機能であって、天然又は天然に生じるPROが有する抗原性エピトープに対して抗体を生成する能力を除くものを意味し、「免疫学的」活性とは、天然又は天然に生じるPROが有する抗原性エピトープに対して抗体を生成する能力を称する。

「アンタゴニスト」なる用語は最も広い意味で用いられ、ここに開示した天然PROポリペプチドの生物学的活性を部分的もしくは完全に阻止、阻害、又は中和する任意の分子を含む。同様に「アゴニスト」なる用語も最も広い意味で用いられ、ここに開示した天然PROポリペプチドの生物学的活性を模倣する任意の分子を含む。好適なアゴニスト又はアンタゴニスト分子は特に、アゴニスト又はアンタゴニスト抗体又は抗体断片、天然PROポリペプチドの断片又はアミノ酸配列変異体、ペプチド、アンチセンスオリゴヌクレオチド、有機小分子等を含む。PROポリペプチドのアゴニスト又はアンタゴニストの同定方法は、PROポリペプチドを候補アンタゴニスト又はアゴニストと接触させ、PROポリペプチドに通常付随する一又は複数の生物学的活性の検出可能な変化を測定することを含む。

【0059】

ここで使用される「治療」とは、治癒的処置、予防的療法及び防止的療法の両方を意味し、目的は標的とする病理学的状態又は疾患を防止又は低下(減少)させることにある。治療が必要なものとは、既に疾患に罹っているもの、並びに疾患に罹りやすいもの又は疾患が防止されるべきものを含む。

「慢性」投与とは、急性様式とは異なり連続的な様式での薬剤を投与し、初期の治療効

果(活性)を長時間に渡って維持することを意味する。「間欠」投与とは、中断無く連続的になされるのではなく、むしろ周期的になされる性質の治療である。

治療の目的のための「哺乳動物」は、ヒト、家庭及び農業用動物、動物園、スポーツ、又はペット動物、例えばイヌ、ネコ、ウシ、ウマ、ヒツジ、ブタ、ヤギ、ウサギなどを含む哺乳類に分類される任意の動物を意味する。好ましくは、哺乳動物はヒトである。

一又は複数の治療薬と「組み合わせた」投与とは、同時(同時期)及び任意の順序での連続した投与を含む。

ここで用いられる「担体」は、製薬的に許容されうる担体、賦形剤、又は安定化剤を含み、用いられる用量及び濃度でそれらに暴露される細胞又は哺乳動物に対して非毒性である。生理学的に許容されうる担体は、水性pH緩衝溶液であることが多い。生理学的に許容されうる担体の例は、リン酸塩、クエン酸塩、及び他の有機酸塩のバッファー；アスコルビン酸を含む酸化防止剤；低分子量(約10残基未満)ポリペプチド；タンパク質、例えば血清アルブミン、ゼラチン、又は免疫グロブリン；親水性ポリマー、例えばポリビニルピロリドン；アミノ酸、例えばグリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニン又はリシン；グルコース、マンノース又はデキストリンを含む単糖類、二糖類、及び他の炭水化物；EDTA等のキレート剤；マンニトール又はソルビトール等の糖アルコール；ナトリウム等の塩形成対イオン；及び/又は非イオン性界面活性剤、例えばTWEEN^{T M}、ポリエチレングリコール(PEG)、及びPLURONICS^{T M}を含む。

【0060】

「抗体断片」は、無傷の抗体の一部、好ましくは無傷の抗体の抗原結合又は可変領域を含む。抗体断片の例は、Fab、Fab'、F(ab')₂、及びFv断片；ダイアボディ(diabodies)；直鎖状抗体(Zapata等, Protein Eng. 8(10): 1057-1062 [1995])；一本鎖抗体分子；及び抗体断片から形成された多重特異性抗体を含む。

抗体のパイン消化は、「Fab」断片と呼ばれる2つの同一の抗体結合断片を生成し、その各々は単一の抗原結合部位を持ち、残りは容易に結晶化する能力を反映して「Fc」断片と命名される。ペプシン処理はF(ab')₂断片を生じ、それは2つの抗原結合部位を持ち、抗原を交差結合することができる。

「Fv」は、完全な抗原認識及び結合部位を含む最小の抗体断片である。この領域は、密接に非共有結合した1本の重鎖と1本の軽鎖の可変領域の二量体からなる。この配置において各可変ドメインの3つのCDRが相互作用してV_H-V_L二量体の表面に抗原結合部位を決定する。集合的には、6つのCDRsは抗体に対して抗原結合特異性をもたらす。しかしながら、単一の可変ドメイン(又は抗原に特異的な3つのCDRのみを含んでなるFvの半分)でさえ、結合部位全体よりは低い親和性であるが、抗原を認識し結合する能力を持つ。

またFab断片は、軽鎖の定常ドメイン及び重鎖の第1の定常ドメイン(CH1)も含む。Fab断片は、抗体ヒンジ領域からの一又は複数のシステインを含む重鎖CH1ドメインのカルボキシ末端に幾つかの残基が付加されていることによりFab断片と相違する。ここで、Fab'-SHは、定常ドメインのシステイン残基が遊離のチオール基を持つFab'を表す。F(ab')₂抗体断片は、最初はFab'断片の対として生成され、それらの間にヒンジシステインを有する。抗体断片の他の化学的結合も知られている。

任意の脊椎動物種からの抗体(免疫グロブリン)の「軽鎖」は、それらの定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、カッパ及びラムダと呼ばれる二つの明らかに異なる型の一方に分類される。

それらの重鎖の定常ドメインのアミノ酸配列に依存して、免疫グロブリンは異なるクラスに分類できる。免疫グロブリンには五つの主要なクラス：IgA、IgD、IgE、IgG及びIgMがあり、それらの幾つかは更にサブクラス(アイソタイプ)、例えばIgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA及びIgA2に分類される。

【0061】

「一本鎖Fv」又は「sFv」抗体断片は、抗体のV_H及びV_Lドメインを含み、これらのドメインは単一のポリペプチド鎖に存在する。好ましくは、FvポリペプチドはV_H

10

20

30

40

50

及び V_L ドメイン間にポリペプチドリンカーを更に含み、それは sFv が抗原結合に望まれる構造を形成するのを可能にする。 sFv の概説については、The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg及びMoore編, Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994)のPluckthunを参照のこと。

用語「ダイアボディ(diabodies)」は、二つの抗原結合部位を持つ小型の抗体断片を指し、その断片は同じポリペプチド鎖($V_H - V_L$)内で軽鎖可変ドメイン(V_L)に結合した重鎖可変ドメイン(V_H)を含む。同じ鎖の二つのドメイン間に対形成するには短すぎるリンカーを用いることにより、ドメインは強制的に他の鎖の相補的ドメインと対形成して二つの抗原結合部位を生成する。ダイアボディは、例えば、EP 404,097; WO 93/11161; 及びHollinger等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 6444-6448 (1993)に十分に記載されている。

10

「単離された」抗体は、その自然環境の成分から同定され分離及び/又は回収されたものである。その自然環境の汚染成分とは、その抗体の診断又は治療への使用を妨害する物質であり、酵素、ホルモン、及び他のタンパク質様又は非タンパク質様溶質が含まれる。好ましい実施態様において、抗体は、(1)ローリ法(Lowry method)で測定した場合95重量%を越える抗体、最も好ましくは99重量%を越えるまで、(2)スピニングカップシークエネーターを使用することにより、少なくとも15残基のN末端あるいは内部アミノ酸配列を得るのに十分なほど、あるいは、(3)クーマシーブルーあるいは好ましくは銀染色を用いた非還元あるいは還元条件下でのSDS-PAGEによる均一になるまで精製される。単離された抗体には、抗体の自然環境の少なくとも一つの成分が存在しないため、組織換え細胞内のインサイツの抗体が含まれる。しかしながら、通常は、単離された抗体は少なくとも一つの精製工程により調製される。

20

「標識」なる語は、ここで用いられる場合、抗体に直接又は間接的に抱合して「標識」抗体を生成する検出可能な化合物又は組成物を称する。標識は、それ自身検出可能でもよく(例えば、放射性標識又は蛍光標識)、又は酵素標識の場合、検出可能な基質化合物又は組成物の化学変化を触媒してもよい。

「固相」とは、本発明の抗体がそれに付着することのできる非水性マトリクスを意味する。ここに包含する固相の例は、部分的又は全体的に、ガラス(例えば、孔調整ガラス)、多糖類(例えばアガロース)、ポリアクリルアミド、ポリスチレン、ポリビニルアルコール及びシリコンから形成されたものを含む。或る種の実施態様では、内容に応じて、固相はアッセイプレートのウェルを構成することができ;その他では精製カラム(例えばアフィニティークロマトグラフィーカラム)とすることもできる。また、この用語は、米国特許第4,275,149号に記載されたような、別個の粒子の不連続な固相も包含する。

30

「リボソーム」は、種々の型の脂質、リン脂質及び/又は界面活性剤からなる小型の小胞であり、哺乳動物への薬物(PROポリペプチド又はその抗体など)の送達に有用である。リボソームの成分は、通常は生体膜の脂質配置に類似する二層構造に配置される。

「小分子」とは、ここでは約500ダルトン未満の分子量を持つと定義される。

「FGFR-1」、「FGFR-2」、「FGFR-3」及び「FGFR-4」は、Isacchira, Nuc. Acids Res. 18(7):1906(1990), Dionneら, EMBO J.9(9):2685-2692(1990), Keeganら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:1095-1099(1991)及びPartanenら, EMBO J. 10(6):1347-1354(1991)にそれぞれ開示されているように、線維芽細胞成長因子レセプター1、2、3及び4を意味する。

40

【0062】

表1

```

/*
 *
 * C-C increased from 12 to 15
 * Z is average of EQ
 * B is average of ND
 * match with stop is _M; stop-stop = 0; J (joker) match = 0
 */
#define _M -8 /* value of a match with a stop */

int _day[26][26] = {
/* A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U V W X Y Z */
/* A */ { 2, 0, -2, 0, 0, -4, 1, -1, -1, 0, -1, -2, -1, 0, _M, 1, 0, -2, 1, 1, 0, 0, -6, 0, -3, 0},
/* B */ { 0, 3, -4, 3, 2, -5, 0, 1, -2, 0, 0, -3, -2, 2, _M, -1, 1, 0, 0, 0, 0, -2, -5, 0, -3, 1},
/* C */ {-2, -4, 15, -5, -5, -4, -3, -3, -2, 0, -5, -6, -5, -4, _M, -3, -5, -4, 0, -2, 0, -2, -8, 0, 0, -5},
/* D */ { 0, 3, -5, 4, 3, -6, 1, 1, -2, 0, 0, -4, -3, 2, _M, -1, 2, -1, 0, 0, 0, -2, -7, 0, -4, 2},
/* E */ { 0, 2, -5, 3, 4, -5, 0, 1, -2, 0, 0, -3, -2, 1, _M, -1, 2, -1, 0, 0, 0, -2, -7, 0, -4, 3},
/* F */ {-4, -5, -4, -6, -5, 9, -5, -2, 1, 0, -5, 2, 0, -4, _M, -5, -5, -4, -3, -3, 0, -1, 0, 0, 7, -5},
/* G */ { 1, 0, -3, 1, 0, -5, 5, -2, -3, 0, -2, -4, -3, 0, _M, -1, -1, -3, 1, 0, 0, -1, -7, 0, -5, 0},
/* H */ {-1, 1, -3, 1, 1, -2, -2, 6, -2, 0, 0, -2, -2, 2, _M, 0, 3, 2, -1, -1, 0, -2, -3, 0, 0, 2},
/* I */ {-1, -2, -2, -2, -2, 1, -3, -2, 5, 0, -2, 2, 2, -2, _M, -2, -2, -2, -1, 0, 0, 4, -5, 0, -1, -2},
/* J */ { 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, _M, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0},
/* K */ {-1, 0, -5, 0, 0, -5, -2, 0, -2, 0, 5, -3, 0, 1, _M, -1, 1, 3, 0, 0, 0, -2, -3, 0, -4, 0},
/* L */ {-2, -3, -6, -4, -3, 2, -4, -2, 2, 0, -3, 6, 4, -3, _M, -3, -2, -3, -3, -1, 0, 2, -2, 0, -1, -2},
/* M */ {-1, -2, -5, -3, -2, 0, -3, -2, 2, 0, 0, 4, 6, -2, _M, -2, -1, 0, -2, -1, 0, 2, -4, 0, -2, -1},
/* N */ { 0, 2, -4, 2, 1, -4, 0, 2, -2, 0, 1, -3, -2, 2, _M, -1, 1, 0, 1, 0, 0, -2, -4, 0, -2, 1},
/* O */ {_M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, 0, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M},
/* P */ { 1, -1, -3, -1, -1, -5, -1, 0, -2, 0, -1, -3, -2, -1, _M, 6, 0, 0, 1, 0, 0, -1, -6, 0, -5, 0},
/* Q */ { 0, 1, -5, 2, 2, -5, -1, 3, -2, 0, 1, -2, -1, 1, _M, 0, 4, 1, -1, -1, 0, -2, -5, 0, -4, 3},
/* R */ {-2, 0, -4, -1, -1, -4, -3, 2, -2, 0, 3, -3, 0, 0, _M, 0, 1, 6, 0, -1, 0, -2, 2, 0, -4, 0},
/* S */ { 1, 0, 0, 0, 0, -3, 1, -1, -1, 0, 0, -3, -2, 1, _M, 1, -1, 0, 2, 1, 0, -1, -2, 0, -3, 0},
/* T */ { 1, 0, -2, 0, 0, -3, 0, -1, 0, 0, 0, -1, -1, 0, _M, 0, -1, -1, 1, 3, 0, 0, -5, 0, -3, 0},
/* U */ { 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, _M, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0},
/* V */ { 0, -2, -2, -2, -2, -1, -1, -2, 4, 0, -2, 2, 2, -2, _M, -1, -2, -2, -1, 0, 0, 4, -6, 0, -2, -2},
/* W */ {-6, -5, -8, -7, -7, 0, -7, -3, -5, 0, -3, -2, -4, -4, _M, -6, -5, 2, -2, -5, 0, -6, 17, 0, 0, -6},
/* X */ { 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, _M, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0},
/* Y */ {-3, -3, 0, -4, -4, 7, -5, 0, -1, 0, -4, -1, -2, -2, _M, -5, -4, -4, -3, -3, 0, -2, 0, 0, 10, -4},
/* Z */ { 0, 1, -5, 2, 3, -5, 0, 2, -2, 0, 0, -2, -1, 1, _M, 0, 3, 0, 0, 0, 0, -2, -6, 0, -4, 4}
};

```

表1(続き)

```

/*
*/
#include <stdio.h>
#include <ctype.h>

#define MAXJMP      16      /* max jumps in a diag */
#define MAXGAP      24      /* don't continue to penalize gaps larger than this */
#define JMPS        1024    /* max jmps in an path */
#define MX          4       /* save if there's at least MX-1 bases since last jmp */

#define DMAT        3       /* value of matching bases */
#define DMIS        0       /* penalty for mismatched bases */
#define DINS0       8       /* penalty for a gap */
#define DINS1       1       /* penalty per base */
#define PINS0       8       /* penalty for a gap */
#define PINS1       4       /* penalty per residue */

struct jmp {
    short      n[MAXJMP];    /* size of jmp (neg for dely) */
    unsigned short x[MAXJMP]; /* base no. of jmp in seq x */
};
/* limits seq to 2^16 - 1 */

struct diag {
    int      score;          /* score at last jmp */
    long     offset;        /* offset of prev block */
    short    ijmp;          /* current jmp index */
    struct jmp jp;          /* list of jmps */
};

struct path {
    int      spc;            /* number of leading spaces */
    short    n[JMPS];       /* size of jmp (gap) */
    int      x[JMPS];       /* loc of jmp (last elem before gap) */
};

char        *ofile;        /* output file name */
char        *namex[2];     /* seq names: getseqs() */
char        *prog;         /* prog name for err msgs */
char        *seqx[2];      /* seqs: getseqs() */
int         dmax;          /* best diag: nw() */
int         dmax0;         /* final diag */
int         dna;           /* set if dna: main() */
int         endgaps;       /* set if penalizing end gaps */
int         gapx, gapy;     /* total gaps in seqs */
int         len0, len1;     /* seq lens */
int         ngapx, ngapy;   /* total size of gaps */
int         smax;          /* max score: nw() */
int         *xbm;          /* bitmap for matching */
long        offset;        /* current offset in jmp file */
struct      diag *dx;       /* holds diagonals */
struct      path pp[2];     /* holds path for seqs */

char        *calloc(), *malloc(), *index(), *strcpy();
char        *getseq(), *g_calloc();

```

10

20

30

表1(続き)

```

/* Needleman-Wunsch alignment program
 *
 * usage: progs file1 file2
 * where file1 and file2 are two dna or two protein sequences.
 * The sequences can be in upper- or lower-case and may contain ambiguity
 * Any lines beginning with ';', '>' or '<' are ignored
 * Max file length is 65535 (limited by unsigned short x in the jmp struct)
 * A sequence with 1/3 or more of its elements ACGTU is assumed to be DNA
 * Output is in the file "align.out"
 *
 * The program may create a tmp file in /tmp to hold info about traceback.
 * Original version developed under BSD 4.3 on a vax 8650
 */
#include "nw.h"
#include "day.h"

static _dbval[26] = {
    1,14,2,13,0,0,4,11,0,0,12,0,3,15,0,0,0,5,6,8,8,7,9,0,10,0
};

static _pbval[26] = {
    1, 2|(1<<('D'-'A'))|(1<<('N'-'A')), 4, 8, 16, 32, 64,
    128, 256, 0xFFFFFFFF, 1<<10, 1<<11, 1<<12, 1<<13, 1<<14,
    1<<15, 1<<16, 1<<17, 1<<18, 1<<19, 1<<20, 1<<21, 1<<22,
    1<<23, 1<<24, 1<<25|(1<<('E'-'A'))|(1<<('Q'-'A'))
};

main(ac, av) main
{
    int ac;
    char *av[];

    prog = av[0];
    if (ac != 3) {
        fprintf(stderr, "usage: %s file1 file2\n", prog);
        fprintf(stderr, "where file1 and file2 are two dna or two protein sequences.\n");
        fprintf(stderr, "The sequences can be in upper- or lower-case\n");
        fprintf(stderr, "Any lines beginning with ';' or '<' are ignored\n");
        fprintf(stderr, "Output is in the file \"align.out\"\n");
        exit(1);
    }
    namex[0] = av[1];
    namex[1] = av[2];
    seqx[0] = getseq(namex[0], &len0);
    seqx[1] = getseq(namex[1], &len1);
    xbm = (dna)? _dbval : _pbval;

    endgaps = 0; /* 1 to penalize endgaps */
    ofile = "align.out"; /* output file */

    nw(); /* fill in the matrix, get the possible jmps */
    readjmps(); /* get the actual jmps */
    print(); /* print stats, alignment */

    cleanup(); /* unlink any tmp files */
}

```

表1(続き)

```

/* do the alignment, return best score: main()
* dna: values in Fitch and Smith, PNAS, 80, 1382-1386, 1983
* pro: PAM 250 values
* When scores are equal, we prefer mismatches to any gap, prefer
* a new gap to extending an ongoing gap, and prefer a gap in seqx
* to a gap in seq y.
*/
nw()
{
    char          *px, *py;          /* seqs and ptrs */
    int           *ndely, *dely;     /* keep track of dely */
    int           ndelx, delx;       /* keep track of delx */
    int           *tmp;              /* for swapping row0, row1 */
    int           mis;               /* score for each type */
    int           ins0, ins1;        /* insertion penalties */
    register      id;                /* diagonal index */
    register      ij;                /* jmp index */
    register      *col0, *col1;      /* score for curr, last row */
    register      xx, yy;            /* index into seqs */

    dx = (struct diag *)g_malloc("to get diags", len0+len1+1, sizeof(struct diag));

    ndely = (int *)g_malloc("to get ndely", len1+1, sizeof(int));
    dely = (int *)g_malloc("to get dely", len1+1, sizeof(int));
    col0 = (int *)g_malloc("to get col0", len1+1, sizeof(int));
    col1 = (int *)g_malloc("to get col1", len1+1, sizeof(int));
    ins0 = (dna)? DINS0 : PINS0;
    ins1 = (dna)? DINS1 : PINS1;

    smax = -10000;
    if (endgaps) {
        for (col0[0] = dely[0] = -ins0, yy = 1; yy <= len1; yy++) {
            col0[yy] = dely[yy] = col0[yy-1] - ins1;
            ndely[yy] = yy;
        }
        col0[0] = 0; /* Waterman Bull Math Biol 84 */
    }
    else
        for (yy = 1; yy <= len1; yy++)
            dely[yy] = -ins0;

    /* fill in match matrix
    */
    for (px = seqx[0], xx = 1; xx <= len0; px++, xx++) {
        /* initialize first entry in col
        */
        if (endgaps) {
            if (xx == 1)
                col1[0] = delx = -(ins0+ins1);
            else
                col1[0] = delx = col0[0] - ins1;
            ndelx = xx;
        }
        else {
            col1[0] = 0;
            delx = -ins0;
            ndelx = 0;
        }
    }
}

```

表1(続き)

...nw

```

for (py = seqx[1], yy = 1; yy <= len1; py++, yy++) {
  mis = col0[yy-1];
  if (dna)
    mis += (xbm[*px-'A']&xbm[*py-'A'])? DMAT : DMIS;
  else
    mis += _day[*px-'A'][*py-'A'];

  /* update penalty for del in x seq;
   * favor new del over ongong del
   * ignore MAXGAP if weighting endgaps
   */
  if (endgaps || ndely[yy] < MAXGAP) {
    if (col0[yy] - ins0 >= dely[yy]) {
      dely[yy] = col0[yy] - (ins0+ins1);
      ndely[yy] = 1;
    } else {
      dely[yy] -= ins1;
      ndely[yy]++;
    }
  } else {
    if (col0[yy] - (ins0+ins1) >= dely[yy]) {
      dely[yy] = col0[yy] - (ins0+ins1);
      ndely[yy] = 1;
    } else
      ndely[yy]++;
  }
}

/* update penalty for del in y seq;
 * favor new del over ongong del
 * /
if (endgaps || ndelx < MAXGAP) {
  if (coll[yy-1] - ins0 >= delx) {
    delx = coll[yy-1] - (ins0+ins1);
    ndelx = 1;
  } else {
    delx -= ins1;
    ndelx++;
  }
} else {
  if (coll[yy-1] - (ins0+ins1) >= delx) {
    delx = coll[yy-1] - (ins0+ins1);
    ndelx = 1;
  } else
    ndelx++;
}

/* pick the maximum score; we're favoring
 * mis over any del and delx over dely
 */

```

10

20

30

表1(続き)

```

...nw
id = xx - yy + len1 - 1;
if (mis >= delx && mis >= dely[yy])
    coll[yy] = mis;
else if (delx >= dely[yy]) {
    coll[yy] = delx;
    ij = dx[id].ijmp;
    if (dx[id].jp.n[0] && (!dna || (ndelx >= MAXJMP
    && xx > dx[id].jp.x[ij]+MX) || mis > dx[id].score+DINS0)) {
        dx[id].ijmp++;
        if (++ij >= MAXJMP) {
            writeimps(id);
            ij = dx[id].ijmp = 0;
            dx[id].offset = offset;
            offset += sizeof(struct jmp) + sizeof(offset);
        }
    }
    dx[id].jp.n[ij] = ndelx;
    dx[id].jp.x[ij] = xx;
    dx[id].score = delx;
}
else {
    coll[yy] = dely[yy];
    ij = dx[id].ijmp;
if (dx[id].jp.n[0] && (!dna || (ndely[yy] >= MAXJMP
    && xx > dx[id].jp.x[ij]+MX) || mis > dx[id].score+DINS0)) {
        dx[id].ijmp++;
        if (++ij >= MAXJMP) {
            writeimps(id);
            ij = dx[id].ijmp = 0;
            dx[id].offset = offset;
            offset += sizeof(struct jmp) + sizeof(offset);
        }
    }
    dx[id].jp.n[ij] = -ndely[yy];
    dx[id].jp.x[ij] = xx;
    dx[id].score = dely[yy];
}
if (xx == len0 && yy < len1) {
    /* last col
    */
    if (endgaps)
        coll[yy] -= ins0+ins1*(len1-yy);
    if (coll[yy] > smax) {
        smax = coll[yy];
        dmax = id;
    }
}
}
if (endgaps && xx < len0)
    coll[yy-1] -= ins0+ins1*(len0-xx);
if (coll[yy-1] > smax) {
    smax = coll[yy-1];
    dmax = id;
}
tmp = col0; col0 = coll; coll = tmp;
}
(void) free((char *)ndely);
(void) free((char *)dely);
(void) free((char *)col0);
(void) free((char *)coll);
}

```

10

20

30

40

表1(続き)

```

/*
 *
 * print() -- only routine visible outside this module
 *
 * static:
 * getmat() -- trace back best path, count matches: print()
 * pr_align() -- print alignment of described in array p[]: print()
 * dumpblock() -- dump a block of lines with numbers, stars: pr_align()
 * nums() -- put out a number line: dumpblock()
 * putline() -- put out a line (name, [num], seq, [num]): dumpblock()
 * stars() -- put a line of stars: dumpblock()
 * stripname() -- strip any path and prefix from a seqname
 */
#include "nw.h"

#define SPC 3
#define P_LINE 256 /* maximum output line */
#define P_SPC 3 /* space between name or num and seq */

extern _day[26][26];
int olen; /* set output line length */
FILE *fx; /* output file */

print() print
{
    int lx, ly, firstgap, lastgap; /* overlap */
    if ((fx = fopen(ofile, "w")) == 0) {
        fprintf(stderr, "%s: can't write %s\n", prog, ofile);
        cleanup(1);
    }
    fprintf(fx, "<first sequence: %s (length = %d)\n", namex[0], len0);
    fprintf(fx, "<second sequence: %s (length = %d)\n", namex[1], len1);
    olen = 60;
    lx = len0;
    ly = len1;
    firstgap = lastgap = 0;
    if (dmax < len1 - 1) { /* leading gap in x */
        pp[0].spc = firstgap = len1 - dmax - 1;
        ly -= pp[0].spc;
    }
    else if (dmax > len1 - 1) { /* leading gap in y */
        pp[1].spc = firstgap = dmax - (len1 - 1);
        lx -= pp[1].spc;
    }
    if (dmax0 < len0 - 1) { /* trailing gap in x */
        lastgap = len0 - dmax0 - 1;
        lx -= lastgap;
    }
    else if (dmax0 > len0 - 1) { /* trailing gap in y */
        lastgap = dmax0 - (len0 - 1);
        ly -= lastgap;
    }
    getmat(lx, ly, firstgap, lastgap);
    pr_align();
}

```

10

20

30

40

表1(続き)

```

/*
 * trace back the best path, count matches
 */
static
getmat(lx, ly, firstgap, lastgap)                                getmat
    int    lx, ly;                                           /* "core" (minus endgaps) */
    int    firstgap, lastgap;                                /* leading trailing overlap */
{
    int    nm, i0, i1, siz0, siz1;
    char    outx[32];
    double    pct;
    register    n0, n1;
    register char    *p0, *p1;

    /* get total matches, score
     */
    i0 = i1 = siz0 = siz1 = 0;
    p0 = seqx[0] + pp[1].spc;
    p1 = seqx[1] + pp[0].spc;
    n0 = pp[1].spc + 1;
    n1 = pp[0].spc + 1;

    nm = 0;
    while ( *p0 && *p1 ) {
        if (siz0) {
            p1++;
            n1++;
            siz0--;
        }
        else if (siz1) {
            p0++;
            n0++;
            siz1--;
        }
        else {
            if (xbm[*p0-'A']&xbm[*p1-'A'])
                nm++;
            if (n0++ == pp[0].x[i0])
                siz0 = pp[0].n[i0++];
            if (n1++ == pp[1].x[i1])
                siz1 = pp[1].n[i1++];
            p0++;
            p1++;
        }
    }

    /* pct homology:
     * if penalizing endgaps, base is the shorter seq
     * else, knock off overhangs and take shorter core
     */
    if (endgaps)
        lx = (len0 < len1)? len0 : len1;
    else
        lx = (lx < ly)? lx : ly;
    pct = 100.*(double)nm/(double)lx;
    fprintf(fx, "\n");
    fprintf(fx, "< %d match%s in an overlap of %d: %.2f percent similarity\n",
        nm, (nm == 1)? "" : "es", lx, pct);
}

```

10

20

30

40

表1(続き)

```

fprintf(fx, "< gaps in first sequence: %d", gapx);
if (gapx) {
    (void) sprintf(outx, "(%d %s%s)",
        ngapx, (dna)? "base":"residue", (ngapx == 1)? "" : "s");
    fprintf(fx, "%s", outx);

fprintf(fx, ", gaps in second sequence: %d", gapy);
if (gapy) {
    (void) sprintf(outx, "(%d %s%s)",
        ngapy, (dna)? "base":"residue", (ngapy == 1)? "" : "s");
    fprintf(fx, "%s", outx);
}
if (dna)
    fprintf(fx,
        "\n<score: %d (match = %d, mismatch = %d, gap penalty = %d + %d per base)\n",
        smax, DMAT, DMIS, DINS0, DINS1);
else
    fprintf(fx,
        "\n<score: %d (Dayhoff PAM 250 matrix, gap penalty = %d + %d per residue)\n",
        smax, PINS0, PINS1);
if (endgaps)
    fprintf(fx,
        "<endgaps penalized. left endgap: %d %s%s, right endgap: %d %s%s\n",
        firstgap, (dna)? "base" : "residue", (firstgap == 1)? "" : "s",
        lastgap, (dna)? "base" : "residue", (lastgap == 1)? "" : "s");
else
    fprintf(fx, "<endgaps not penalized\n");
}

static nm;          /* matches in core -- for checking */
static lmax;       /* lengths of stripped file names */
static ij[2];      /* jmp index for a path */
static nc[2];      /* number at start of current line */
static ni[2];      /* current elem number -- for gapping */
static siz[2];
static char *ps[2]; /* ptr to current element */
static char *po[2]; /* ptr to next output char slot */
static char out[2][P_LINE]; /* output line */
static char star[P_LINE]; /* set by stars() */

/*
 * print alignment of described in struct path pp[]
 */
static
pr_align()
{
    int nn;          /* char count */
    int more;
    register i;

    for (i = 0, lmax = 0; i < 2; i++) {
        nn = stripname(namex[i]);
        if (nn > lmax)
            lmax = nn;

        nc[i] = 1;
        ni[i] = 1;
        siz[i] = ij[i] = 0;
        ps[i] = seqx[i];
        po[i] = out[i];
    }
}

```

...getmat

10

20

30

pr_align

40

表1(続き)

```

for (nn = nm = 0, more = 1; more; ) {
    for (i = more = 0; i < 2; i++) {
        /*
         * do we have more of this sequence?
         */
        if (!*ps[i])
            continue;

        more++;

        if (pp[i].spc) { /* leading space */
            *po[i]++ = ' ';
            pp[i].spc--;
        }
        else if (siz[i]) { /* in a gap */
            *po[i]++ = '-';
            siz[i]--;
        }
        else {
            /* we're putting a seq element
             */
            *po[i] = *ps[i];
            if (islower(*ps[i]))
                *ps[i] = toupper(*ps[i]);
            po[i]++;
            ps[i]++;

            /*
             * are we at next gap for this seq?
             */
            if (ni[i] == pp[i].x[ij[i]]) {
                /*
                 * we need to merge all gaps
                 * at this location
                 */
                siz[i] = pp[i].n[ij[i] + +];
                while (ni[i] == pp[i].x[ij[i]])
                    siz[i] += pp[i].n[ij[i] + +];
            }
            ni[i]++;
        }
    }
    if (++nn == olen || !more && nn) {
        dumpblock();
        for (i = 0; i < 2; i++)
            po[i] = out[i];
        nn = 0;
    }
}

/*
 * dump a block of lines, including numbers, stars: pr_align()
 */
static
dumpblock()
{
    register i;

    for (i = 0; i < 2; i++)
        *po[i]-- = '\0';
}

```

...pr_align

10

20

30

dumpblock

40

Table 1 (cont')**...dumpblock**

```

(void) putc('\n', fx);
for (i = 0; i < 2; i++) {
    if (*out[i] && (*out[i] != ' ' || *(po[i]) != ' ')) {
        if (i == 0)
            nums(i);
        if (i == 0 && *out[1])
            stars();
        putline(i);
        if (i == 0 && *out[1])
            fprintf(fx, star);
        if (i == 1)
            nums(i);
    }
}
}

/*
 * put out a number line: dumpblock()
 */
static
nums(ix)                                nums
{
    int    ix;        /* index in out[] holding seq line */

    char    nline[P_LINE];
    register i, j;
    register char    *pn, *px, *py;

    for (pn = nline, i = 0; i < lmax+P_SPC; i++, pn++)
        *pn = ' ';
    for (i = nc[ix], py = out[ix]; *py; py++, pn++) {
        if (*py == ' ' || *py == '-')
            *pn = ' ';
        else {
            if (i%10 == 0 || (i == 1 && nc[ix] != 1)) {
                j = (i < 0)? -i : i;
                for (px = pn; j /= 10, px--)
                    *px = j%10 + '0';
                if (i < 0)
                    *px = '-';
            }
            else
                *pn = ' ';
            i++;
        }
    }
    *pn = '\0';
    nc[ix] = i;
    for (pn = nline; *pn; pn++)
        (void) putc(*pn, fx);
    (void) putc('\n', fx);
}

/*
 * put out a line (name, [num], seq, [num]): dumpblock()
 */
static
putline(ix)                                putline
    int    ix;        {

```

10

20

30

40

Table 1 (cont')

```

int          i;
register char *px;

for (px = namex[ix], i = 0; *px && *px != ':'; px++, i++)
    (void) putc(*px, fx);
for (; i < lmax+P_SPC; i++)
    (void) putc(' ', fx);

/* these count from 1:
 * ni[] is current element (from 1)
 * nc[] is number at start of current line
 */
for (px = out[ix]; *px; px++)
    (void) putc(*px&0x7F, fx);
(void) putc('\n', fx);
}

/*
 * put a line of stars (seqs always in out[0], out[1]): dumpblock()
 */
static
stars()
{
    int          i;
    register char *p0, *p1, cx, *px;

    if (!*out[0] || (*out[0] == ' ' && *(po[0]) == ' ') ||
        !*out[1] || (*out[1] == ' ' && *(po[1]) == ' '))
        return;
    px = star;
    for (i = lmax+P_SPC; i; i--)
        *px++ = ' ';

    for (p0 = out[0], p1 = out[1]; *p0 && *p1; p0++, p1++) {
        if (isalpha(*p0) && isalpha(*p1)) {
            if (xbm[*p0-'A']&xbm[*p1-'A']) {
                cx = '*';
                nm++;
            }
            else if (ldna && _day[*p0-'A'][*p1-'A'] > 0)
                cx = '.';
            else
                cx = ' ';
        }
        else
            cx = ' ';
        *px++ = cx;
    }
    *px++ = '\n';
    *px = '\0';
}

```

...putline

stars

10

20

30

表1(続き)

```
/*
 * strip path or prefix from pn, return len: pr_align()
 */
static
stripname(pn)
    char    *pn;    /* file name (may be path) */
{
    register char    *px, *py;

    py = 0;
    for (px = pn; *px; px++)
        if (*px == '/')
            py = px + 1;
    if (py)
        (void) strcpy(pn, py);
    return(strlen(pn));
}
```

stripname

表1(続き)

```

/*
 * cleanup() -- cleanup any tmp file
 * getseq() -- read in seq, set dna, len, maxlen
 * g_alloc() -- calloc() with error checkin
 * readjimps() -- get the good jimps, from tmp file if necessary
 * writejimps() -- write a filled array of jimps to a tmp file: nw()
 */
#include "nw.h"
#include <sys/file.h>

char *jname = "/tmp/homgXXXXXX"; /* tmp file for jimps */
FILE *fj;

int cleanup(); /* cleanup tmp file */
long lseek();

/*
 * remove any tmp file if we blow
 */
cleanup(i)
int i;
{
    if (fj)
        (void) unlink(jname);
    exit(i);
}

/*
 * read, return ptr to seq, set dna, len, maxlen
 * skip lines starting with ';', '<', or '>'
 * seq in upper or lower case
 */
char *
getseq(file, len)
char *file; /* file name */
int *len; /* seq len */
{
    char line[1024], *pseq;
    register char *px, *py;
    int natgc, tlen;
    FILE *fp;

    if ((fp = fopen(file, "r")) == 0) {
        fprintf(stderr, "%s: can't read %s\n", prog, file);
        exit(1);
    }
    tlen = natgc = 0;
    while (fgets(line, 1024, fp)) {
        if (*line == ';' || *line == '<' || *line == '>')
            continue;
        for (px = line; *px != '\n'; px++)
            if (isupper(*px) || islower(*px))
                tlen++;
    }
    if ((pseq = malloc((unsigned)(tlen+6))) == 0) {
        fprintf(stderr, "%s: malloc() failed to get %d bytes for %s\n", prog, tlen+6, file);
        exit(1);
    }
    pseq[0] = pseq[1] = pseq[2] = pseq[3] = '\0';
}

```

10

cleanup

20

getseq

30

40

表1(続き)

<pre> py = pseq + 4; *len = tlen; rewind(fp); while (fgets(line, 1024, fp)) { if (*line == ';' *line == '<' *line == '>') continue; for (px = line; *px != '\n'; px++) { if (isupper(*px)) *py++ = *px; else if (islower(*px)) *py++ = toupper(*px); if (index("ATGCU", *(py-1))) natgc++; } *py++ = '\0'; *py = '\0'; (void) fclose(fp); dna = natgc > (tlen/3); return(pseq+4); } char * g_alloc(msg, nx, sz) char *msg; /* program, calling routine */ int nx, sz; /* number and size of elements */ { char *px, *calloc(); if ((px = calloc((unsigned)nx, (unsigned)sz)) == 0) { if (*msg) { fprintf(stderr, "%s: g_alloc() failed %s (n=%d, sz=%d)\n", prog, msg, nx, sz); exit(1); } } return(px); } /* * get final jmps from dx[] or tmp file, set pp[], reset dmax: main() */ readjmps() { int fd = -1; int siz, i0, i1; register i, j, xx; if (fj) { (void) fclose(fj); if ((fd = open(jname, O_RDONLY, 0)) < 0) { fprintf(stderr, "%s: can't open() %s\n", prog, jname); cleanup(1); } } for (i = i0 = i1 = 0, dmax0 = dmax, xx = len0; ; i++) { while (1) { for (j = dx[dmax].ijmp; j >= 0 && dx[dmax].jp.x[j] >= xx; j--) </pre>	<p>...getseq</p> <p>g_alloc</p> <p>readjmps</p>	<p>10</p> <p>20</p> <p>30</p> <p>40</p>
--	--	---

表 1 (続き)

...readjumps

```

    if (j < 0 && dx[dmax].offset && fj) {
        (void) lseek(fd, dx[dmax].offset, 0);
        (void) read(fd, (char *)&dx[dmax].jp, sizeof(struct jmp));
        (void) read(fd, (char *)&dx[dmax].offset, sizeof(dx[dmax].offset));
        dx[dmax].ijmp = MAXJMP-1;
    }
    else
        break;
}
if (i >= JMPS) {
    fprintf(stderr, "%s: too many gaps in alignment\n", prog);
    cleanup(1);
}
if (j >= 0) {
    siz = dx[dmax].jp.n[j];
    xx = dx[dmax].jp.x[j];
    dmax += siz;
    if (siz < 0) { /* gap in second seq */
        pp[1].n[i1] = -siz;
        xx += siz;
        /* id = xx - yy + len1 - 1
        */
        pp[1].x[i1] = xx - dmax + len1 - 1;
        gapy++;
        ngapy -= siz;
/* ignore MAXGAP when doing endgaps */
        siz = (-siz < MAXGAP || endgaps)? -siz : MAXGAP;
        i1++;
    }
    else if (siz > 0) { /* gap in first seq */
        pp[0].n[i0] = siz;
        pp[0].x[i0] = xx;
        gapx++;
        ngapx += siz;
/* ignore MAXGAP when doing endgaps */
        siz = (siz < MAXGAP || endgaps)? siz : MAXGAP;
        i0++;
    }
}
else
    break;
}

/* reverse the order of jumps
*/
for (j = 0, i0--; j < i0; j++, i0--) {
    i = pp[0].n[j]; pp[0].n[j] = pp[0].n[i0]; pp[0].n[i0] = i;
    i = pp[0].x[j]; pp[0].x[j] = pp[0].x[i0]; pp[0].x[i0] = i;
}
for (j = 0, i1--; j < i1; j++, i1--) {
    i = pp[1].n[j]; pp[1].n[j] = pp[1].n[i1]; pp[1].n[i1] = i;
    i = pp[1].x[j]; pp[1].x[j] = pp[1].x[i1]; pp[1].x[i1] = i;
}
if (fd >= 0)
    (void) close(fd);
if (fj) {
    (void) unlink(jname);
    fj = 0;
    offset = 0;
}
}

```

10

20

30

40

表1(続き)

```

/*
 * write a filled jmp struct offset of the prev one (if any): nw()
 */
writejmps(ix)
{
    int ix;
    char *mktemp();

    if (!fj) {
        if (mktemp(jname) < 0) {
            fprintf(stderr, "%s: can't mktemp() %s\n", prog, jname);
            cleanup(1);
        }
        if ((fj = fopen(jname, "w")) == 0) {
            fprintf(stderr, "%s: can't write %s\n", prog, jname);
            exit(1);
        }
    }
    (void) fwrite((char *)&dx[ix].jp, sizeof(struct jmp), 1, fj);
    (void) fwrite((char *)&dx[ix].offset, sizeof(dx[ix].offset), 1, fj);
}

```

writejmps

10

【 0 0 6 3 】

表2

20

PRO	XXXXXXXXXXXXXXXXXX	(長さ = 15 アミノ酸)
比較タンパク質	XXXXXXYYYYYYY	(長さ = 12 アミノ酸)

% アミノ酸配列同一性 =

(ALIGN-2によって決定した二つのポリペプチド配列間で等しく一致するアミノ酸残基の数) を(PROポリペプチドの全アミノ酸残基の数)で割る=

5 ÷ 15 = 33.3%

30

表3

PRO	XXXXXXXXXX	(長さ = 10 アミノ酸)
比較タンパク質	XXXXXXYYYYYYZZYZ	(長さ = 15 アミノ酸)

% アミノ酸配列同一性 =

(ALIGN-2によって決定した二つのポリペプチド配列間で等しく一致するアミノ酸残基の数) を(PROポリペプチドの全アミノ酸残基の数)で割る=

5 ÷ 10 = 50%

40

表4

PRO-DNA	NNNNNNNNNNNNNN	(長さ = 14 ヌクレオチド)
比較DNA	NNNNNNLLLLLLLL	(長さ = 16 ヌクレオチド)

% 核酸配列同一性 =

(ALIGN-2によって決定した二つの核酸配列間で等しく一致するヌクレオチド残基の数を(PRO-DNA核酸配列の全ヌクレオチド数)で割る=

10

$$6 \div 14 = 42.9\%$$

表5

PRO-DNA	NNNNNNNNNNNN	(長さ = 12 ヌクレオチド)
比較DNA	NNNNLLLVV	(長さ = 9 ヌクレオチド)

% 核酸配列同一性 =

(ALIGN-2によって決定した二つの核酸配列間で等しく一致するヌクレオチド残基の数を(PRO-DNA核酸配列の全ヌクレオチド数)で割る=

20

$$4 \div 12 = 33.3\%$$

【 0 0 6 4 】

II. 本発明の組成物と方法

A. 全長PROポリペプチド

本発明は、本出願でPROポリペプチドと命名されるポリペプチドをコードする新規に同定され単離されたヌクレオチド配列を提供する。特に下記の実施例でさらに詳細に説明するように、種々のPROポリペプチドをコードするcDNAが同定され単離された。別々の発現ラウンドで生成されたタンパク質には異なるPRO番号が与えられるが、UNQ番号は全ての与えられたDNA及びコード化タンパク質に独特であり、変わることはないことを記しておく。しかしながら、単純化のために、本明細書において、ここに開示した全長天然核酸分子にコードされるタンパク質並びに上記のPROの定義に含まれるさらなる天然相同体及び変異体は、それらの起源又は調製形式に関わらず、「PRO/番号」で呼称する。

30

下記の実施例に開示するように、種々のcDNAクローンがATCCに寄託されている。これらのクローンの正確なヌクレオチド配列は、この分野で日常的な方法を用いて寄託されたクローンを配列決定することにより容易に決定することができる。予測されるアミノ酸配列は、ヌクレオチド配列から常套的技量を用いて決定できる。ここに記載したPROポリペプチド及びコード化核酸について、本出願人は、現時点で入手可能な配列情報と最も良く一致するリーディングフレームであると考えられるものを同定した。

40

【 0 0 6 5 】

1. 全長PRO196ポリペプチド

本発明は、本出願においてPRO196と称されるポリペプチドをコードする、新規に同定され単離されたヌクレオチド配列を提供する。特に、本出願人は以下の実施例で更に詳細に開示するように、PRO196ポリペプチドをコードするcDNAを同定し単離し

50

た。BLAST及びFastA配列アラインメントコンピュータプログラムを用いて、本出願人は、全長天然配列PRO196をコードするcDNA配列が、種々のTIEリガンドポリペプチドのアミノ酸配列と同一性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードしていることを見出した。

【0066】

2. 全長PRO444ポリペプチド

DNA26846-1397クローンは、分泌タンパク質をコードするヌクレオチドを選択する捕捉技術を用いてヒト胎児肺ライブラリーから単離した。よってDNA26846-1397クローンは分泌因子をコードする。知りうる限り、DNA26846-1397配列はPRO444とここで称される新規な因子をコードする。WU-BLAST2配列アラインメントコンピュータプログラムを用いて、公知のタンパク質とある程度の配列同一性があることが明らかになった。

10

【0067】

3. 全長PRO183ポリペプチド

DNA28498クローンはヒト組織ライブラリーから単離した。知りうる限り、DNA28498配列はPRO183とここで称される新規な因子をコードする。WU-BLAST2配列アラインメントコンピュータプログラムを用いて、公知のタンパク質とある程度の配列同一性があることが明らかになった。

【0068】

4. 全長PRO185ポリペプチド

DNA28503クローンはヒト組織ライブラリーから単離した。知りうる限り、DNA28503配列はPRO185とここで称される新規な因子をコードする。WU-BLAST2配列アラインメントコンピュータプログラムを用いて、公知のタンパク質とある程度の配列同一性があることが明らかになった。

20

【0069】

5. 全長PRO210及びPRO217ポリペプチド

本発明は、本出願においてPRO210及びPRO217と称されるポリペプチドをコードする、新規に同定され単離されたヌクレオチド配列を提供する。特に、本出願人は以下の実施例で更に詳細に開示するような、PRO210及びPRO217ポリペプチドをコードするcDNAを同定し単離した。BLAST(FastAフォーマット)配列アラインメントコンピュータプログラムを用いて、本出願人は全長天然配列PRO210及びPRO217ポリペプチドをコードするcDNA配列が、EGF様ドメインを有する公知のタンパク質に対して相同性を有していることを見出した。従って、今では、本出願で開示されたPRO210及びPRO217がEGF様ファミリーの新規に同定されたメンバーであり、EGF様タンパク質ファミリーに典型的な性質を有すると信じられる。

30

【0070】

6. 全長PRO215ポリペプチド

本発明は、本出願においてPRO215と称されるポリペプチドをコードする、新規に同定され単離されたヌクレオチド配列を提供する。特に、本出願人は以下の実施例で更に詳細に開示するような、PRO215ポリペプチドをコードするcDNAを同定し単離した。BLAST及びFastA配列アラインメントコンピュータプログラムを用いて、本出願人は全長天然配列PRO215(図11及び配列番号:16に示す)をコードするcDNA配列が、SLITタンパク質前駆物質のアミノ酸配列と同一性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードすることを見出した。またPRO215は、ロイシンリッチ反復タンパク質との同一性も有する。

40

【0071】

7. 全長PRO242ポリペプチド

本発明は、本出願においてPRO242と称されるポリペプチドをコードする、新規に同定され単離されたヌクレオチド配列を提供する。特に、本出願人は以下の実施例で更に詳細に開示するような、PRO242ポリペプチドをコードするcDNAを同定し単離し

50

た。BLAST及びFastA配列アラインメントコンピュータプログラムを用いて、本出願人は全長天然配列PRO242(図15及び配列番号:23に示す)をコードするcDNA配列が、ヒトマクロファージ炎症性タンパク質1-アルファ、ウサギマクロファージ炎症性タンパク質1-ベータ、ヒトLD78及びウサギ免疫活性化遺伝子2とアミノ酸配列同一性を有することを見出した。従って、今では、本出願で開示されたPRO242ポリペプチドがケモカインファミリーの新規に同定されたメンバーであり、ケモカインファミリーに典型的な性質を有すると信じられる。

【0072】

8. 全長PRO288ポリペプチド

本発明は、新規に同定され単離されたPRO288ポリペプチドを提供する。特に、本出願人は種々のヒトPRO288ポリペプチドを同定し単離した。これらPRO288ポリペプチドのいくつかの性質と特徴を以下の実施例で更に詳細に記載する。ここで開示されるPRO288ポリペプチドの性質と特徴に基づき、本出願人は、PRO288がTNFRのメンバーであり、特にApo-2リガンドのレセプターであると信じる。

10

【0073】

9. 全長PRO365ポリペプチド

本発明は、本出願においてPRO365と称されるポリペプチドをコードする、新規に同定され単離されたヌクレオチド配列を提供する。特に、本出願人は以下の実施例で更に詳細に開示するような、PRO365ポリペプチドをコードするcDNAを同定し単離した。BLAST及びFastA配列アラインメントコンピュータプログラムを用いて、本出願人はPRO365ポリペプチドの種々の部分がヒト2-19プロテインと有意な相同性を有していることを見出した。従って、今では、本出願で開示されたPRO365ポリペプチドがヒト2-19プロテインファミリーの新規に同定されたメンバーであると信じられる。

20

【0074】

10. 全長PRO1361ポリペプチド

DNA60783-1611クローンはヒトB細胞ライブラリーから単離した。知りうる限り、DNA60783-1611配列はPRO1361とここで称される新規な因子をコードし;WU-BLAST2配列アラインメントコンピュータプログラムを用いて、任意の公知のタンパク質と配列同一性がないことが明らかになった。

【0075】

30

11. 全長PRO1308ポリペプチド

WU-BLAST2配列アラインメントコンピュータプログラムを用いて、PRO1308が、Dayhoffデータベースにおいて「S55369」と命名されたフォリスタチンタンパク質のアミノ酸配列とある程度のアミノ酸配列同一性を共有することを見出した。従って、今では、本出願で開示されたPRO1308がフォリスタチンタンパク質ファミリーの新規に同定されたメンバーであり、該タンパク質ファミリーの典型的な活性又は性質を有していると信じられる。

【0076】

12. 全長PRO1183ポリペプチド

WU-BLAST2配列アラインメントコンピュータプログラムを用いて、全長天然配列PRO1183(図26及び配列番号:52に示す)が、プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼとある程度のアミノ酸配列同一性を有していることを見出した。従って、今では、本出願で開示されたPRO1183がオキシダーゼファミリーの新規に同定されたメンバーであり、オキシダーゼに典型的な酵素活性を有していると信じられる。

40

【0077】

13. 全長PRO1272ポリペプチド

WU-BLAST2配列アラインメントコンピュータプログラムを用いて、全長天然配列PRO1272(図28及び配列番号:54に示す)が、アフリカツメガエル(Xenopus laevis)からのセメント腺特異的タンパク質とある程度のアミノ酸配列同一性を有していることを見出した。従って、今では、本出願で開示されたPRO1272がXAGファミリーの新

50

規に同定されたメンバーであり、XAGタンパク質と少なくとも一つの機構を共有すると信じられる。

【0078】

14. 全長PRO1419ポリペプチド

知りうる限り、DNA71290-1630配列はPRO1419とここで称される新規な因子をコードする。WU-BLAST2配列アラインメントコンピュータプログラムを用いて、公知のタンパク質との最小の配列同一性が明らかになった。

【0079】

15. 全長PRO4999ポリペプチド

上に引用したALIGN-2配列アラインメントコンピュータプログラムを用いて、全長天然配列PRO4999(図32及び配列番号:55に示す)が、UROM_HUMANとある程度のアミノ酸配列同一性を有していることを見出した。従って、今では、本出願で開示されたPRO4999ポリペプチドがウロモジュリタンパク質ファミリーの新規に同定されたメンバーであり、該タンパク質ファミリーに典型的な一又は複数の生物学的及び/又は免疫学的活性又は性質を有すると信じられる。

10

【0080】

16. 全長PRO7170ポリペプチド

DNA108722-2743クローンは、以下の実施例に記載したようにしてヒトライブラリーから単離した。知りうる限り、DNA108722-2743ヌクレオチド配列はPRO7170とここで称される新規な因子をコードし;ALIGN-2配列アラインメントコンピュータプログラムを用いて、如何なる既知のタンパク質とも有意な配列同一性がないことが明らかになった。

20

【0081】

17. 全長PRO248ポリペプチド

本発明は、本出願においてPRO248と称されるポリペプチドをコードする、新規に同定され単離されたヌクレオチド配列を提供する。特に、本出願人は以下の実施例で更に詳細に開示するような、PRO248ポリペプチドをコードするcDNAを同定し単離した。BLAST及びFastA配列アラインメントコンピュータプログラム等の公知のプログラムを用いて、本出願人は、全長天然配列PRO248(図36及び配列番号:65に示すアミノ酸配列)をコードするcDNA配列が、マウス及びホモサピエンスからの成長分化因子3とある程度のアミノ酸配列同一性を有していることを見出した。従って、今では、本出願で開示されたPRO248ポリペプチドが、トランスフォーミング成長因子ファミリーの新規に同定されたメンバーであり、このファミリーに典型的な成長及び分化能力を有すると信じられる。

30

【0082】

18. 全長PRO353ポリペプチド

本発明は、本出願においてPRO353と称されるポリペプチドをコードする、新規に同定され単離されたヌクレオチド配列を提供する。特に、本出願人は以下の実施例で更に詳細に開示するような、PRO353ポリペプチドをコードするcDNAを同定し単離した。BLAST及びFastA配列アラインメントコンピュータプログラムを用いて、本出願人はPRO353ポリペプチドの種々の部分が、ヒト及びマウス補体タンパク質とある程度の相同性を有していることを見出した。従って、今では、本出願で開示されたPRO353ポリペプチドが補体タンパク質ファミリーの新規に同定されたメンバーであり、補体ファミリーのタンパク質に典型的なように炎症プロセスに影響を及ぼす能力を有していると思われ。

40

【0083】

19. 全長PRO1318及びPRO1600ポリペプチド

本発明は、本出願においてPRO1318及びPRO1600と称されるポリペプチドをコードする、新規に同定され単離されたヌクレオチド配列を提供する。特に、本出願人は以下の実施例で更に詳細に開示するような、PRO1318及びPRO1600ポリペ

50

プチドをコードする cDNA を同定し単離した。BLAST及びFastA配列アラインメントコンピュータプログラム等の公知のプログラムを用いて、本出願人は、全長天然配列 PRO1318 及び PRO1600 (それぞれ、図 40 及び配列番号：78、及び図 42 及び配列番号：80 に示す) をコードする cDNA 配列が、一又は複数のケモカインとアミノ酸配列同一性を有していることを見出した。従って、今では、本出願で開示された PRO1318 及び PRO1600 ポリペプチドが、ケモカインファミリーの新規に同定されたメンバーであり、ケモカインファミリーに典型的な活性を有すると信じられる。

【0084】**20. 全長 PRO533 ポリペプチド**

本発明は、本出願において PRO533 と称されるポリペプチドをコードする、新規に同定され単離されたヌクレオチド配列を提供する。特に、本出願人は以下の実施例で更に詳細に開示するような、PRO533 ポリペプチドをコードする cDNA を同定し単離した。BLAST及びFastA配列アラインメントコンピュータプログラムを用いて、本出願人は全長天然配列 PRO533 (図 46 及び配列番号：86 に示す) が、線維芽細胞成長因子 (FGF) と 509 の Blast スコア及び 53% のアミノ酸配列同一性を有していることを見出した。従って、今では、本出願で開示される PRO533 は線維芽細胞成長因子ファミリーの新規に同定されたメンバーであり、そのようなポリペプチドに典型的な活性を有していると信じられる。

10

【0085】**21. 全長 PRO301 ポリペプチド**

本発明は、本出願において PRO301 と称されるポリペプチドをコードする、新規に同定され単離されたヌクレオチド配列を提供する。特に、本出願人は、以下の実施例で更に詳細に開示するような、PRO301 ポリペプチドをコードする cDNA を同定し単離した。BLAST及びFastA配列アラインメントコンピュータプログラムを用いて、本出願人は、全長天然配列 PRO301 (図 48 と配列番号：91 に示される) がヒト A33 抗原前駆体と 30% のアミノ酸配列同一性に対応する 246 の Blast スコアを有していることを見出した。従って、今では、本出願で開示される PRO301 は A33 抗原タンパク質ファミリーの新規に同定されたメンバーであり、結腸直腸ガンのようなヒト新生物性疾患に発現されうると信じられる。

20

【0086】**22. 全長 PRO187 ポリペプチド**

本発明は、本出願において PRO187 と称されるポリペプチドをコードする、新規に同定され単離されたヌクレオチド配列を提供する。特に、本出願人は、以下の実施例で更に詳細に開示するような、PRO187 ポリペプチドをコードする cDNA を同定し単離した。BLAST及びFastA配列アラインメントコンピュータプログラムを用いて、本出願人は、全長天然配列 PRO187 (図 50 に示す) が様々なアンドロゲン誘導成長因子及び FGF-8 と 74% のアミノ酸同一性及び 310 の BLAST スコアを有していることを見出した。従って、今では、本出願で開示される PRO187 ポリペプチドは FGF-8 タンパク質ファミリーの新規に同定されたメンバーであり、FGF-8 様タンパク質ファミリーに典型的な活性又は性質を有すると信じられる。

30

40

【0087】**23. 全長 PRO337 ポリペプチド**

本発明は、本出願において PRO337 と称されるポリペプチドをコードする、新規に同定され単離されたヌクレオチド配列を提供する。特に本出願人は、以下の実施例で更に詳細に開示するような、PRO337 ポリペプチドをコードする cDNA を同定し単離した。BLAST、BLAST-2及びFastA配列アラインメントプログラムを用いて、本出願人は、全長天然配列 PRO337 が、ラットニューロトリンと 97% の配列同一性、チキン CEPU と 85% の配列同一性、チキン G55 と 73% の配列同一性、ヒト LAMP と 59% の相同性、及びヒト OPCAM と 84% の相同性を有することを見出した。従って、今では、本出願で開示される PRO337 が免疫グロブリンスーパーファミリーの IGLON

50

サブファミリーの新規に同定されたメンバーであり、神経突起成長及び分化可能特性を有すると信じられる。

【0088】

24. 全長PRO1411ポリペプチド

知りうる限り、DNA59212-1627配列はPRO1411とここで称される新規な因子をコードする。しかし、WU-BLAST2配列アラインメントコンピュータプログラムを用いて、公知のタンパク質とのある程度の配列同一性が明らかになった。

【0089】

25. 全長PRO4356ポリペプチド

WU-BLAST2配列アラインメントコンピュータプログラムを用いて、全長天然配列PRO4356(図56及び配列番号:108に示す)が、転移関連GPIアンカータンパク質とある程度のアミノ酸配列同一性を有していることを見出した。従って、今では、本出願で開示されたPRO4356が該ファミリーの新規に同定されたメンバーであり、同様の機構を共有すると信じられる。

【0090】

26. 全長PRO246ポリペプチド

本発明は、本出願においてPRO246と称されるポリペプチドをコードする、新規に同定され単離されたヌクレオチド配列を提供する。特に、本出願人は、以下の実施例で更に詳細に開示するような、PRO246ポリペプチドをコードするcDNAを同定し単離した。BLAST及びFastA配列アラインメントコンピュータプログラムを用いて、本出願人は、PRO246ポリペプチドの一部がヒト細胞表面タンパク質HCARと有意な相同性を有していることを見いだした。従って、今では、本出願で開示されるPRO246ポリペプチドは新規に同定された膜結合ウイルスレセプター又は腫瘍細胞特異的抗原であると信じられる。

【0091】

27. 全長PRO265ポリペプチド

本発明は、本出願においてPRO265と称されるポリペプチドをコードする、新規に同定され単離されたヌクレオチド配列を提供する。特に、本出願人は、以下の実施例で更に詳細に開示するような、PRO265ポリペプチドをコードするcDNAを同定し単離した。BLAST及びFastA配列アラインメントコンピュータプログラム等のプログラムを用いて、本出願人は、PRO265ポリペプチドの種々の部分がフィブロモジュリンタンパク質及びフィブロモジュリン前駆体タンパク質と有意な相同性を有していることを見いだした。本出願人はまたPRO265ポリペプチドをコードしているDNAが皮膚と創傷修復に関与するロイシンリッチ反復タンパク質ファミリーのメンバーである血小板糖タンパク質Vと有意な相同性を有していることを見いだした。従って、今では、本出願で開示されるPRO265ポリペプチドはロイシンリッチ反復タンパク質ファミリーの新規に同定されたメンバーであり、このファミリーに典型的なタンパク質間結合能を有し並びに皮膚と創傷修復への関与していると信じられる。

【0092】

28. 全長PRO941ポリペプチド

本発明は、本出願においてPRO941と称されるポリペプチドをコードする、新規に同定され単離されたヌクレオチド配列を提供する。特に本出願人は、以下の実施例で更に詳細に開示するような、PRO941ポリペプチドをコードするcDNAを同定し単離した。BLAST及びFastA配列アラインメントコンピュータプログラムを用いて、本出願人は、PRO941ポリペプチドが—又は複数のカドヘリンタンパク質と有意な類似性を有していることを見出した。従って、今では、本出願で開示されるPRO941ポリペプチドが新規に同定されたカドヘリン相同体であると信じられる。

【0093】

29. 全長PRO10096ポリペプチド

上に引用されたALIGN-2配列アラインメントコンピュータプログラムを用いて、全長天

10

20

30

40

50

然配列 P R O 1 0 0 9 6 (図 6 4 及び配列番号：1 2 6 に示す)が、種々のインターロイキン-1 0 関連分子とある程度のアミノ酸配列同一性を有していることを見出した。従って、今では、本出願で開示された P R O 1 0 0 9 6 ポリペプチドが新規に同定された I L - 1 0 相同体であり、該タンパク質に典型的な一又は複数の生物学的及び/又は免疫学的活性又は性質を有すると信じられる。

【 0 0 9 4 】

3 0 . 全長 P R O 6 0 0 3 ポリペプチド

D N A 8 3 5 6 8 - 2 6 9 2 クローンは、以下の実施例に記載したようにしてヒト胎児腎臓ライブラリーから単離した。知りうる限り、D N A 8 3 5 6 8 - 2 6 9 2 ヌクレオチド配列は P R O 6 0 0 3 とここで称される新規な因子をコードし；ALIGN-2配列アラインメントコンピュータプログラムを用いて、如何なる既知のタンパク質とも有意な配列同一性がないことが明らかになった。

10

【 0 0 9 5 】

B . P R O ポリペプチド変異体

ここに記載した全長天然配列 P R O ポリペプチドに加えて、P R O 変異体も調製できると考えられる。P R O 変異体は、P R O D N A に適当なヌクレオチド変化を導入することにより、あるいは所望の P R O ポリペプチドを合成することにより調製できる。当業者であれば、グリコシル化部位の数又は位置の変化あるいは膜固着特性の変化などのアミノ酸変化が P R O の翻訳後プロセスを変えうることを理解するであろう。

天然全長配列 P R O 又はここに記載した P R O の種々のドメインにおける変異は、例えば、米国特許第 5,364,934 号に記載されている保存的及び非保存的変異についての任意の技術及び指針を用いてなすことができる。変異は、天然配列 P R O と比較して P R O のアミノ酸配列が変化することになる P R O をコードする一又は複数のコドンの置換、欠失又は挿入であってよい。場合によっては、変異は少なくとも一つのアミノ酸の P R O の一又は複数のドメインの任意の他のアミノ酸による置換である。どのアミノ酸残基が所望の活性に悪影響を与えることなく挿入、置換又は欠失されるかの指針は、P R O の配列を、相同性な既知のタンパク質分子のものと比較し、相同性の高い領域になされるアミノ酸配列変化の数を最小にすることによって見出される。アミノ酸置換は、一のアミノ酸の類似した構造及び/又は化学特性を持つ他のアミノ酸での置換、例えばロイシンのセリンでの置換、即ち保存的アミノ酸置換の結果とすることができる。挿入及び欠失は、場合によっては約 1 から 5 のアミノ酸の範囲内とすることができる。許容される変異は、配列においてアミノ酸の挿入、欠失又は置換を系統的に作成し、得られた変異体について全長又は成熟天然配列が示す活性を試験することにより決定される。

20

30

【 0 0 9 6 】

P R O ポリペプチド断片がここに提供される。このような断片は、例えば、全長天然タンパク質と比較した際に、N-末端又はC-末端で切断されてもよく、又は内部残基を欠いていてもよい。或る種の断片は、P R O ポリペプチドの所望の生物学的活性に必須ではないアミノ酸残基を欠いている。

P R O 断片は、多くの一般的な技術の任意のものによって調製されうる。所望のペプチド断片は化学合成されてもよい。代替方法は、酵素的消化、例えば特定のアミノ酸残基によって定められる部位のタンパク質を切断することが知られた酵素でタンパク質を処理することにより、あるいは適当な制限酵素で D N A を消化して所望の断片を単離することによる P R O 断片の生成を含む。さらに他の好適な技術は、ポリメラーゼ連鎖反応 (P C R) により、所望のポリペプチド断片をコードする D N A 断片を単離し増幅することを含む。D N A 断片の所望の末端を定めるオリゴヌクレオチドは、P C R の 5 ' 及び 3 ' プライマーで用いられる。好ましくは、P R O ポリペプチド断片は、ここに開示した天然 P R O ポリペプチドと少なくとも一つの生物学的及び/又は免疫学的活性を共有する。

40

特別の実施態様では、関心ある保存的置換を、好ましい置換との表題で表 6 に示す。このような置換が生物学的活性の変化をもたらす場合、表 6 に置換例と命名され、又は以下にアミノ酸分類に関してさらに記載されるような、より実質的な変化が導入され、生成物

50

がスクリーニングされる。

表6

元の残基	置換例	好適な置換	
Ala (A)	val; leu; ile	val	
Arg (R)	lys; gln; asn	lys	
Asn (N)	gln; his; lys; arg	gln	
Asp (D)	glu	glu	
Cys (C)	ser	ser	10
Gln (Q)	asn	asn	
Glu (E)	asp	asp	
Gly (G)	pro; ala	ala	
His (H)	asn; gln; lys; arg	arg	
Ile (I)	leu; val; met; ala; phe; ノルロイシン	leu	
Leu (L)	ノルロイシン; ile; val; met; ala; phe	ile	20
Lys (K)	arg; gln; asn	arg	
Met (M)	leu; phe; ile	leu	
Phe (F)	leu; val; ile; ala; tyr	leu	
Pro (P)	ala	ala	
Ser (S)	thr	thr	
Thr (T)	ser	ser	
Trp (W)	trp; phe	tyr	
Tyr (Y)	trp; phe; thr; ser	phe	30
Val (V)	ile; leu; met; phe; ala; ノルロイシン	leu	

【 0 0 9 7 】

PROポリペプチドの機能又は免疫学的同一性の実質的修飾は、(a)置換領域のポリペプチド骨格の構造、例えばシート又は螺旋配置、(b)標的部位の分子の電荷又は疎水性、又は(c)側鎖の嵩を維持しながら、それらの効果において実質的に異なる置換基を選択することにより達成される。天然に生じる残基は共通の側鎖特性に基づいてグループ分けすることができる：

- (1) 疎水性：ノルロイシン, met, ala, val, leu, ile;
- (2) 中性の親水性：cys, ser, thr;
- (3) 酸性：asp, glu;
- (4) 塩基性：asn, gln, his, lys, arg;
- (5) 鎖配向に影響する残基：gly, pro; 及び
- (6) 芳香族：trp, tyr, phe。

40

非保存的置換は、これらの分類の一つのメンバーを他の分類に交換することを必要とするであろう。また、そのように置換された残基は、保存的置換部位、好ましくは残された(非保存)部位に導入されうる。

変異は、オリゴヌクレオチド媒介(部位特異的)突然変異誘発、アラニンスキャンニング、及びPCR突然変異誘発等の当該分野において公知の技術を使用して作成することがで

50

きる。部位特異的突然変異誘発 [Carter等, Nucl. Acids Res., 13: 4331 (1986); Zoller等, Nucl. Acids Res., 10: 6487 (1987)]、カセット突然変異誘発 [Wells等, Gene, 34: 315 (1985)]、制限選択突然変異誘発 [Wells等, Philos. Trans. R. Soc. London Ser A, 317: 415 (1986)]又は他の周知の技術が、P R O変異体D N Aを製造するために、クローン化されたD N Aに実施できる。

また、隣接配列に沿って一又は複数のアミノ酸を同定するのにスキャンニングアミノ酸分析を用いることができる。好ましいスキャンニングアミノ酸は比較的小さく、中性のアミノ酸である。そのようなアミノ酸は、アラニン、グリシン、セリン、及びシステインを含む。アラニンは、ベータ炭素を越える側鎖を排除し変異体の主鎖構造を変化させにくいので、この群の中で典型的に好ましいスキャンニングアミノ酸である [Cunningham及びWells, Science, 244: 1081-1085 (1989)]。また、アラニンは最もありふれたアミノ酸であるため典型的には好ましい。さらに、それは埋もれた及び露出した位置の両方に見られることが多い [Creighton, The Proteins, (W.H. Freeman & Co., N.Y.); Chothia, J. Mol. Biol., 150: 1 (1976)]。アラニン置換が十分な量の変異体を生じない場合は、アイソテリック(isoteric)アミノ酸を用いることができる。

【0098】

C . P R Oの修飾

P R Oの共有結合的修飾は本発明の範囲内に含まれる。共有結合的修飾の一型は、P R Oポリペプチドの標的とするアミノ酸残基を、P R Oの選択された側鎖又はN又はC末端残基と反応できる有機誘導体化試薬と反応させることを含む。二官能性試薬での誘導体化が、例えばP R Oを水不溶性支持体マトリクスあるいは抗-P R O抗体の精製方法又はその逆で用いるための表面に架橋させるのに有用である。通常用いられる架橋剤は、例えば、1, 1-ビス(ジアゾアセチル)-2-フェニルエタン、グルタルアルデヒド、N-ヒドロキシスクシンイミドエステル、例えば4-アジドサリチル酸、3, 3'-ジチオビス(スクシンイミジルプロピオネート)等のジスクシンイミジルエステルを含むホモ二官能性イミドエステル、ビス-N-マレイミド-1, 8-オクタン等の二官能性マレイミド、及びメチル-3-[(p-アジドフェニル)-ジチオ]プロピオイミダート等の試薬を含む。

他の修飾は、グルタミル及びアスパラギン残基の各々対応するグルタミル及びアスパルチル残基への脱アミノ化、プロリン及びリシンのヒドロキシル化、セリル又はトレオニル残基のヒドロキシル基のリン酸化、リシン、アルギニン、及びヒスチジン側鎖の - アミノ基のメチル化 [T.E. Creighton, Proteins: Structure and Molecular Properties, W.H. Freeman & Co., San Francisco, pp.79-86 (1983)]、N末端アミンのアセチル化、及び任意のC末端カルボキシル基のアミド化を含む。

【0099】

本発明の範囲内に含まれるP R Oポリペプチドの共有結合的修飾の他の型は、ポリペプチドの天然グリコシル化パターンの変更を含む。「天然グリコシル化パターンの変更」とは、この目的で意図されるのは、天然配列P R Oに見られる一又は複数の炭水化物部分の欠失(存在するグリコシル化部位の除去又は化学的及び/又は酵素的手段によるグリコシル化の削除のいずれかによる)、及び/又は天然配列P R Oに存在しない一又は複数のグリコシル化部位の付加を意味する。さらに、この文節は、存在する種々の炭水化物部分の性質及び特性の変化を含む、天然タンパク質のグリコシル化における定性的変化を含む。

P R Oポリペプチドへのグリコシル化部位の付加はアミノ酸配列の変更を伴ってもよい。この変更は、例えば、一又は複数のセリン又はトレオニン残基の天然配列P R O(O-結合グリコシル化部位)への付加、又は置換によってなされてもよい。P R Oアミノ酸配列は、場合によっては、D N Aレベルでの変化、特に、P R OポリペプチドをコードするD N Aを予め選択された塩基において変異させ、所望のアミノ酸に翻訳されるコドンを生成させることを通して変更されてもよい。

【0100】

P R Oポリペプチド上に炭水化物部分の数を増加させる他の手段は、グリコシドのポリペプチドへの化学的又は酵素的結合による。このような方法は、この技術分野において、

例えば、1987年9月11日に公開されたWO 87/05330、及びAplin及びWriston, *CRC Crit. Rev. Biochem.*, pp. 259-306 (1981)に記載されている。

P R Oポリペプチド上に存在する炭水化物部分の除去は、化学的又は酵素的に、あるいはグルコシル化の標的として提示されたアミノ酸残基をコードするコドンの変異的置換によってなすことができる。化学的脱グリコシル化技術は、この分野で知られており、例えば、Hakimuddin等, *Arch. Biochem. Biophys.*, 259:52 (1987)により、及びEdge等, *Anal. Biochem.*, 118: 131 (1981)により記載されている。ポリペプチド上の炭水化物部分の酵素的切断は、Thotakura等, *Meth. Enzymol.* 138:350 (1987)に記載されているように、種々のエンド及びエキソグリコシダーゼを用いることにより達成される。

P R Oの共有結合的修飾の他の型は、P R Oポリペプチドの、種々の非タンパク質様ポリマー、例えばポリエチレングリコール(PEG)、ポリプロピレングリコール、又はポリオキシアルキレンの一つへの、米国特許第4,640,835号；第4,496,689号；第4,301,144号；第4,670,417号；第4,791,192号又は第4,179,337号に記載された方法での結合を含む。

【0101】

また、本発明のP R Oは、他の異種ポリペプチド又はアミノ酸配列に融合したP R Oを含むキメラ分子を形成する方法で修飾してもよい。

一実施態様では、このようなキメラ分子は、抗タグ抗体が選択的に結合できるエピトープを提供するタグポリペプチドとP R Oとの融合を含む。エピトープタグは、一般的にはP R Oのアミノ又はカルボキシル末端に位置する。このようなP R Oのエピトープタグ形態の存在は、タグポリペプチドに対する抗体を用いて検出することができる。また、エピトープタグの提供は、抗-タグ抗体又はエピトープタグに結合する他の型の親和性マトリクスを用いたアフィニティ精製によってP R Oを容易に精製できるようにする。種々のタグポリペプチド及びそれら各々の抗体はこの分野で良く知られている。例としては、ポリ-ヒスチジン(poly-his)又はポリ-ヒスチジン-グリシン(poly-his-gly)タグ；flu HAタグポリペプチド及びその抗体12CA5 [Field等, *Mol. Cell. Biol.*, 8:2159-2165 (1988)]；c-mycタグ及びそれに対する8F9、3C7、6E10、G4、B7及び9E10抗体 [Evan等, *Molecular and Cellular Biology*, 5:3610-3616 (1985)]；及び単純ヘルペスウイルス糖タンパク質D (gD)タグ及びその抗体 [Paborsky等, *Protein Engineering*, 3(6):547-553 (1990)]を含む。他のタグポリペプチドは、フラッグペプチド [Hopp等, *Biotechnology*, 6:1204-1210 (1988)]；K T 3エピトープペプチド [Martin等, *Science*, 255:192-194 (1992)]； α -チューブリンエピトープペプチド [Skinner等, *J. Biol. Chem.*, 266:15163-15166 (1991)]；及びT7遺伝子10タンパク質ペプチドタグ [Lutz-Freyermuth等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:6393-6397 (1990)]を含む。

それに換わる実施態様では、キメラ分子はP R Oの免疫グロブリン又は免疫グロブリンの特定領域との融合体を含んでもよい。キメラ分子の二価形態(「イムノアドヘン」とも呼ばれる)については、そのような融合体はI g G分子のF c領域であり得る。I g融合体は、好ましくはI g分子内の少なくとも一つの可変領域に換えてP R Oポリペプチドの可溶化(膜貫通ドメイン欠失又は不活性化)形態を含む。特に好ましい実施態様では、免疫グロブリン融合体は、I g G 1分子のヒンジ、C H 2及びC H 3、又はヒンジ、C H 1、C H 2及びC H 3領域を含む。免疫グロブリン融合体の製造については、1995年6月27日発行の米国特許第5,428,130号を参照のこと。

【0102】

D. P R Oの調製

以下の説明は、主として、P R O核酸を含むベクターで形質転換又は形質移入された細胞を培養することによりP R Oを生産する方法に関する。もちろん、当該分野においてよく知られている他の方法を用いてP R Oを調製することができると考えられる。例えば、P R O配列、又はその一部は、固相技術を用いた直接ペプチド合成によって生産してもよい [例えば、Stewart等, *Solid-Phase Peptide Synthesis*, W.H. Freeman Co., San Francisco, CA (1969)；Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.*, 85:2149-2154 (1963)参照]。手動技術又は自動によるインビトロタンパク質合成を行ってもよい。自動合成は、例えば、ア

プライド・バイオシステムズ・ペプチド合成機 (Foster City, CA) を用いて、製造者の指示により実施してもよい。PROの種々の部分は、別々に化学的に合成され、化学的又は酵素的方法を用いて結合させて全長PROを生産してもよい。

【0103】

1. PROをコードするDNAの単離

PROをコードするDNAは、PRO mRNAを保有してそれを検出可能なレベルで発現すると考えられる組織から調製されたcDNAライブラリーから得ることができる。従って、ヒトPRO DNAは、実施例に記載されるように、ヒトの組織から調製されたcDNAライブラリーから簡便に得ることができる。またPRO-コード化遺伝子は、ゲノムライブラリーから又は公知の合成方法(例えば、自動化核酸合成)により得ることも

10

ライブラリーは、関心ある遺伝子あるいはその遺伝子によりコードされるタンパク質を同定するために設計されたプローブ(PROに対する抗体又は少なくとも約20 - 80塩基のオリゴヌクレオチド等)によってスクリーニングできる。選択されたプローブによるcDNA又はゲノムライブラリーのスクリーニングは、例えばSambrook等, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)に記載されている標準的な手順を使用して実施することができる。PROポリペプチドをコードする遺伝子を単離する他の方法はPCR法を使用するものである[Sambrook等, 上掲; Dieffenbach等, PCR Primer: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995)]。

20

【0104】

下記の実施例には、cDNAライブラリーのスクリーニング技術を記載している。プローブとして選択されたオリゴヌクレオチド配列は、十分な長さで、疑陽性が最小化されるよう十分に明瞭でなければならない。オリゴヌクレオチドは、スクリーニングされるライブラリー内のDNAとのハイブリッド形成時に検出可能であるように標識されていることが好ましい。標識化の方法は当該分野において良く知られており、³²P標識されたATPのような放射線標識、ビオチン化あるいは酵素標識の使用が含まれる。中程度の厳密性及び高度の厳密性を含むハイブリッド形成条件は、上掲のSambrook等に与えられている。

このようなライブラリースクリーニング法において同定された配列は、Genbank等の公共データベース又は個人の配列データベースに寄託され公衆に利用可能とされている周知の配列と比較及びアラインメントすることができる。分子の決定された領域内又は全長に渡っての(アミノ酸又はヌクレオチドレベルのいずれかでの)配列同一性は、この分野で知られた、そしてここに記載した方法を用いて決定することができる。

30

タンパク質コード配列を有する核酸は、初めてここで開示された推定アミノ酸配列を使用し、また必要ならば、cDNAに逆転写されなかったmRNAの生成中間体及び先駆物質を検出する上掲のSambrook等に記述されているような従来のプライマー伸展法を使用し、選択されたcDNA又はゲノムライブラリーをスクリーニングすることにより得られる。

【0105】

2. 宿主細胞の選択及び形質転換

宿主細胞を、ここに記載したPRO生産のための発現又はクローニングベクターで形質移入又は形質転換し、プロモーターを誘導し、形質転換体を選択し、又は所望の配列をコードする遺伝子を増幅するために適当に変性された常套的栄養培地で培養する。培養条件、例えば培地、温度、pH等々は、過度の実験をすることなく当業者が選ぶことができる。一般に、細胞培養の生産性を最大にするための原理、プロトコール、及び実用技術は、Mammalian Cell Biotechnology: a Practical Approach, M. Butler編 (IRL Press, 1991)及びSambrook等, 上掲に見出すことができる。

40

原核生物細胞形質移入及び真核生物細胞形質転換の方法、例えば、CaCl₂、CaPO₄、リポソーム媒介及びエレクトロポレーションは当業者に知られている。用いられる宿主細胞に応じて、その細胞に対して適した標準的な方法を用いて形質転換はなされる。

50

前掲のSambrook等に記載された塩化カルシウムを用いるカルシウム処理又はエレクトロポレーションが、一般的に原核生物に対して用いられる。アグロバクテリウム・トゥメファシエンスによる感染が、Shaw等, *Gene*, 23:315 (1983)及び1989年6月29日公開のW0 89/05 859に記載されているように、或る種の植物細胞の形質転換に用いられる。このような細胞壁のない哺乳動物の細胞に対しては、Graham及びvan der Eb, *Virology*, 52:456-457 (1978)のリン酸カルシウム沈降法を使用することができる。哺乳動物細胞の宿主系形質転換の一般的な態様は米国特許第4,399,216号に記載されている。酵母菌中への形質転換は、典型的には、Van Solingen等, *J. Bact.*, 130:946 (1977)及びHsiao等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76:3829 (1979)の方法に従って実施される。しかしながら、DNAを細胞中に導入する他の方法、例えば、核マイクロインジェクション、エレクトロポレーション、無傷の細胞、又はポリカチオン、例えばポリブレン、ポリオルニチン等を用いる細菌プロトプラスト融合もまた用いることもできる。哺乳動物細胞を形質転換するための種々の技術については、Keown等, *Methods in Enzymology*, 185:527-537 (1990)及びMansour等, *Nature*, 336:348-352 (1988)を参照のこと。

10

20

30

40

50

【0106】

ここに記載のベクターにDNAをクローニングあるいは発現するために適切な宿主細胞は、原核生物、酵母菌、又は高等真核生物細胞である。適切な原核生物は、限定するものではないが、真正細菌、例えばグラム陰性又はグラム陽性生物体、例えば大腸菌のような腸内細菌科を含む。種々の大腸菌株が公衆に利用可能であり、例えば、大腸菌K12株MM294 (ATCC31,446)；大腸菌X1776 (ATCC31,537)；大腸菌株W3110 (ATCC27,325)及びK5772 (ATCC53,635)である。他の好ましい原核動物宿主細胞は、大腸菌、例えば、*E. coli*、エンテロバクター、エルビニア (*Erwinia*)、クレブシエラ (*Klebsiella*)、プロテウス (*Proteus*)、サルモネラ、例えば、ネズミチフス菌、セラチア、例えば、セラチアマルセサンス (*Serratia marcescans*)、及び赤痢菌、並びに桿菌、例えばバシリスプチリス (*B. subtilis*)及びバシリリチェニフォルミス (*B. licheniformis*) (例えば、1989年4月12日発行のDD 266,710に記載されたバシリリチェニフォルミス41P)、シュードモナス、例えば緑膿筋及びストレプトマイセスなどの腸内細菌科を含む。これらの例は限定ではなく例示である。株W3110は、組換えDNA生産発行のための共通の宿主株であるので一つの特に好ましい宿主又は親宿主である。好ましくは、宿主細胞は最小量のタンパク質分解酵素を分泌する。例えば、株W3110は、細胞に外来のタンパク質をコードする遺伝子における遺伝子変異をするように修飾してもよく、そのような宿主の例としては、完全な遺伝子型 *tonA* を有する大腸菌W3110株1A2；完全な遺伝子型 *tonA ptr3* を有する大腸菌W3110株9E4；完全な遺伝子型 *tonA prt3 phoA E15 (argF-lac)169 degP ompT kanr* を有する大腸菌W3110株27C7 (ATCC 55,244)；完全な遺伝子型 *tonA ptr3 phoA E15 (algF-lac)169 degP ompT rbs7ilvGkanr* を有する大腸菌W3110株37D6；非カナマイシン耐性 *degP* 欠失変異を持つ37D6株である大腸菌W3110株40B4；及び1990年8月7日発行の米国特許第4,946,783号に開示された変異周辺質プロテアーゼを有する大腸菌株を含む。あるいは、クローニングのインビトロ法、例えばPCR又は他の核酸ポリメラーゼ反応が好ましい。

【0107】

原核生物に加えて、糸状菌又は酵母菌のような真核微生物は、PROポリペプチドコード化ベクターのための適切なクローニング又は発現宿主である。サッカロミセス・セレヴィシアは、通常用いられる下等真核生物宿主微生物である。他に、シゾサッカロミセスプロンプ (*Schizosaccharomyces pombe*) (Beach及びNurse, *Nature*, 290: 140 [1981]；1985年5月2日公開のEP 139,383)；クルベロミセスホスツ (*Kluyveromyces hosts*) (米国特許第4,943,529号；Fleer等, *Bio/Technology*, 9: 968-975 (1991))、例えばケー・ラクチス (*K. lactis*) (MW98-8C, CBS683, CBS4574；Lourencourt等, *J. Bacteriol.* 154(2): 737-742 [1983])、ケー・フラギリス (*K. fragilis*) (ATCC 12,424)、ケー・ブルガリクス (*K. bulgaricus*) (ATCC 16,045)、ケー・ウケラマイ (*K. wickeramii*) (ATCC 24,178)、ケー・ワルチ

イ(*K. waltii*)(ATCC 56,500)、ケー・ドロソフィラルム(*K. drosophilum*)(ATCC 36,906 ; Van den Berg等, *Bio/Technology*, 8: 135 (1990))、ケー・テモトレランス(*K. thermotolerans*)及びケー・マルキシアナス(*K. marxianus*) ; ヤロウイア(*Yarrowia*)(EP 402,226) ; ピッチャパストリス(*Pichia pastoris*)(EP 183,070; Sheekrishna等, *J. Basic Microbiol.*, 28: 265-278 [1988]) ; カンジダ ; トリコデルマレーシア(*Trichoderma reesei*)(EP 244,234) ; アカパンカビ(Case等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76: 5259-5263 [1979]) ; シュワニオマイセス(*Schwanniomyces*)、例えばシュワニオマイセスオクシデンタリス(*occidentalis*)(1990年10月31日公開のEP 394,538) ; 及び糸状真菌、例えば、ニューロスポラ、ペニシリウム、トリポクラジウム(*Tolyposcladium*)(1991年1月10日公開のWO 91/00357) ; 及びコウジ菌、例えば偽単性コウジ菌(Ballance等, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 112: 284-289 [1983]; Tilburn等, *Gene*, 26: 205-221 [1983]; Yelton等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 1470-1474 [1984])及びクロカビ(Kelly及びHynes, *EMBO J.*, 4: 475-479 [1985])が含まれる。ここで好ましいメチロトロピック(methylotropic)酵母は、これらに限られないが、ハンセヌラ(*Hansenula*)、カンジダ、クロエケラ(*Kloeckera*)、ピチア(*Pichia*)、サッカロミセス、トルロプシス(*Torulopsis*)、及びロドトルラ(*Rhodotorula*)からなる属から選択されるメタノールで成長可能な酵母を含む。この酵母の分類の例示である特定の種のリストは、C. Anthony, *The Biochemistry of Methylotrophs*, 269 (1982)に記載されている。

【0108】

グリコシル化PROの発現に適切な宿主細胞は、多細胞生物から誘導される。無脊椎動物細胞の例としては、ショウジョウバエS2及びスポドスベラSf9等の昆虫細胞並びに植物細胞が含まれる。有用な哺乳動物宿主株化細胞の例は、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)及びCOS細胞を含む。多くの特異的な例は、SV40によって形質転換されたサル腎臓CV1株(COS-7, ATCC CRL 1651);ヒト胚腎臓株(293又は懸濁培養での増殖のためにサブクローン化された293細胞、Graham等, *J. Gen Virol.*, 36:59 (1977));チャイニーズハムスター卵巣細胞ノ-DHFR(CHO, Urlaub及びChasin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:4216 (1980));マウスのセルトリ細胞(TM4, Mather, *Biol. Reprod.*, 23:243-251 (1980))ヒト肺細胞(W138, ATCC CCL 75);ヒト肝細胞(Hep G2, HB 8065);及びマウス乳房腫瘍細胞(MMT 060562, ATCC CCL51)を含む。適切な宿主細胞の選択は、この分野の技術常識内にある。

【0109】

3. 複製可能なベクターの選択及び使用

PROをコードする核酸(例えば、cDNA又はゲノムDNA)は、クローニング(DNAの増幅)又は発現のために複製可能なベクター内に挿入される。様々なベクターが公的に入手可能である。ベクターは、例えば、プラスミド、コスミド、ウイルス粒子、又はファージの形態とすることができる。適切な核酸配列が、種々の手法によってベクターに挿入される。一般に、DNAはこの分野で周知の技術を用いて適当な制限エンドヌクレアーゼ部位に挿入される。ベクター成分としては、一般に、これらに制限されるものではないが、一又は複数のシグナル配列、複製開始点、一又は複数のマーカー遺伝子、エンハンサーエレメント、プロモーター、及び転写終結配列を含む。これらの成分の一又は複数を含む適当なベクターの作成には、当業者に知られた標準的なライゲーション技術を用いる。

PROは直接的に組換え手法によって生産されるだけでなく、シグナル配列あるいは成熟タンパク質あるいはポリペプチドのN-末端に特異的切断部位を有する他のポリペプチドである異種性ポリペプチドとの融合ペプチドとしても生産される。一般に、シグナル配列はベクターの成分であるか、ベクターに挿入されるPRO-コード化DNAの一部である。シグナル配列は、例えばアルカリホスファターゼ、ペニシリンナーゼ、lppあるいは熱安定性エンテロトキシンIIリーダーの群から選択される原核生物シグナル配列であってよい。酵母の分泌に関しては、シグナル配列は、酵母インペルターゼリーダー、因子リーダー(酵母菌属(*Saccharomyces*)及びクルイペロマイシス(*Kluyveromyces*) 因子リーダーを含み、後者は米国特許第5,010,182号に記載されている)、又は酸ホスファターゼリ

ーダー、白体 (*C. albicans*) グルコアミラーゼリーダー (1990年4月4日公開のEP362179)、又は1990年11月15日に公開されたW0 90/13646に記載されているシグナルであり得る。哺乳動物細胞の発現においては、哺乳動物シグナル配列は、同一あるいは関連ある種の分泌ポリペプチド由来のシグナル配列並びにウイルス分泌リーダーのようなタンパク質の直接分泌に使用してもよい。

【0110】

発現及びクローニングベクターは共に一又は複数の選択された宿主細胞においてベクターの複製を可能にする核酸配列を含む。そのような配列は多くの細菌、酵母及びウイルスに対してよく知られている。プラスミド pBR322 に由来する複製開始点は大部分のグラム陰性細菌に好適であり、2 μ プラスミド開始点は酵母に適しており、様々なウイルス開始点 (SV40、ポリオーマ、アデノウイルス、VSV又はBPV) は哺乳動物細胞におけるクローニングベクターに有用である。

10

発現及びクローニングベクターは、典型的には、選択性マーカーとも称される選択遺伝子を含む。典型的な選択遺伝子は、(a)アンピシリン、ネオマイシン、メトトレキセートあるいはテトラサイクリンのような抗生物質あるいは他の毒素に耐性を与え、(b)栄養要求性欠陥を補い、又は(c)例えばパシリに対する遺伝子コードD-アラニンラセマーゼのような、複合培地から得られない重要な栄養素を供給するタンパク質をコードする。

哺乳動物細胞に適切な選べるマーカーの例は、DHF Rあるいはチミジンキナーゼのように、PRO-コード化核酸を取り込むことのできる細胞成分を同定することのできるものである。野生型DHF Rを用いた場合の好適な宿主細胞は、Urlaub等により、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216 (1980)に記載されているようにして調製され増殖されたDHF R活性に欠陥のあるCHO株化細胞である。酵母菌中での使用に好適な選択遺伝子は酵母プラスミドYRp7に存在するtrp1遺伝子である [Stinchcomb等, Nature, 282:39(1979); Kingman等, Gene, 7:141(1979); Tschemper等, Gene, 10:157(1980)]。trp1遺伝子は、例えば、ATCC番号44076あるいはPEP4-1のようなトリプトファン内で成長する能力を欠く酵母菌の突然変異株に対する選択マーカーを提供する [Jones, Genetics, 85:12 (1977)]。

20

【0111】

発現及びクローニングベクターは、通常、PRO-コード化核酸配列に作用可能に結合し、mRNA合成を制御するプロモーターを含む。種々の可能な宿主細胞により認識されるプロモーターが知られている。原核生物宿主での使用に好適なプロモーターは -ラクタマーゼ及びラクトースプロモーター系 [Cahng等, Nature, 275:615 (1978); Goeddel等, Nature, 281:544 (1979)]、アルカリホスファターゼ、トリプトファン(trp)プロモーター系 [Goeddel, Nucleic Acids Res., 8:4057 (1980); EP 36,776]、及びハイブリッドプロモーター、例えばtacプロモーター [deBoer等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80:21-25 (1983)]を含む。細菌系で使用するプロモーターもまたPROをコードするDNAと作用可能に結合したシャイン・ダルガーノ(S.D.)配列を有する。

30

酵母宿主と共に用いて好適なプロモーター配列の例としては、3-ホスホグリセラートキナーゼ [Hitzeman等, J. Biol. Chem., 255:2073 (1980)] 又は他の糖分解酵素 [Hess等, J. Adv. Enzyme Reg., 7:149 (1968); Holland, Biochemistry, 17:4900(1978)]、例えばエノラーゼ、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ、ヘキソキナーゼ、ピルビン酸デカルボキシラーゼ、ホスホフルクトキナーゼ、グルコース-6-リン酸イソメラーゼ、3-ホスホグリセラートムターゼ、ピルビン酸キナーゼ、トリオセリン酸イソメラーゼ、ホスホグルコースイソメラーゼ、及びグルコキナーゼが含まれる。

40

他の酵母プロモーターとしては、成長条件によって転写が制御される付加的効果を有する誘発的プロモーターであり、アルコールデヒドロゲナーゼ2、イソチトクロムC、酸ホスファターゼ、窒素代謝と関連する分解性酵素、メタロチオネイン、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ、及びマルトース及びガラクトースの利用を支配する酵素のプロモーター領域がある。酵母菌での発現に好適に用いられるベクターとプロモーターはEP 73,657に更に記載されている。

50

哺乳動物の宿主細胞におけるベクターからのP R O転写は、例えば、ポリオーマウィルス、伝染性上皮腫ウィルス(1989年7月5日公開のUK 2,211,504)、アデノウィルス(例えばアデノウィルス2)、ウシ乳頭腫ウィルス、トリ肉腫ウィルス、サイトメガロウィルス、レトロウィルス、B型肝炎ウィルス及びサルウィルス40(SV40)のようなウィルスのゲノムから得られるプロモーター、異種性哺乳動物プロモーター、例えばアクチンプロモーター又は免疫グロブリンプロモーター、及び熱衝撃プロモーターから得られるプロモーターによって、このようなプロモーターが宿主細胞系に適合し得る限り制御される。

【0112】

より高等の真核生物による所望のP R OをコードするD N Aの転写は、ベクター中にエンハンサー配列を挿入することによって増強され得る。エンハンサーは、通常は約10から300塩基対で、プロモーターに作用してその転写を増強するD N Aのシス作用要素である。哺乳動物遺伝子由来の多くのエンハンサー配列が現在知られている(グロビン、エラスターゼ、アルブミン、 α -フェトプロテイン及びインスリン)。しかしながら、典型的には、真核細胞ウィルス由来のエンハンサーが用いられるであろう。例としては、複製起点の後期側のS V 40エンハンサー(100-270塩基対)、サイトメガロウィルス初期プロモーターエンハンサー、複製起点の後期側のポリオーマエンハンサー及びアデノウィルスエンハンサーが含まれる。エンハンサーは、P R Oコード配列の5'又は3'位でベクター中にスプライシングされ得るが、好ましくはプロモーターから5'位に位置している。

また真核生物宿主細胞(酵母、真菌、昆虫、植物、動物、ヒト、又は他の多細胞生物由来の有核細胞)に用いられる発現ベクターは、転写の終結及びm R N Aの安定化に必要な配列も含む。このような配列は、真核生物又はウィルスのD N A又はc D N Aの通常は5'、時には3'の非翻訳領域から取得できる。これらの領域は、P R Oをコードするm R N Aの非翻訳部分にポリアデニル化断片として転写されるヌクレオチドセグメントを含む。

組換え脊椎動物細胞培養でのP R Oの合成に適応化するのに適切な他の方法、ベクター及び宿主細胞は、Gething等, Nature, 293:620-625 (1981); Mantei等, Nature, 281:40-46 (1979); EP 117,060; 及びEP 117,058に記載されている。

【0113】

4. 遺伝子増幅/発現の検出

遺伝子の増幅及び/又は発現は、ここで提供された配列に基づき、適切に標識されたプローブを用い、例えば、従来よりのサザンプロット法、m R N Aの転写を定量化するノーザンプロット法[Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:5201-5205 (1980)]、ドットプロット法(D N A分析)、又はインサイツハイブリッド形成法によって、直接的に試料中で測定することができる。あるいは、D N A二本鎖、R N A二本鎖及びD N A-R N Aハイブリッド二本鎖又はD N A-タンパク二本鎖を含む、特異的二本鎖を認識することができる抗体を用いることもできる。次いで、抗体を標識し、アッセイを実施することができる。ここで二本鎖は表面に結合しており、その結果二本鎖の表面での形成の時点でその二本鎖に結合した抗体の存在を検出することができる。

あるいは、遺伝子の発現は、遺伝子産物の発現を直接的に定量する免疫学的な方法、例えば細胞又は組織切片の免疫組織化学的染色及び細胞培養又は体液のアッセイによって、測定することもできる。試料液の免疫組織化学的染色及び/又はアッセイに有用な抗体は、モノクローナルでもポリクローナルでもよく、任意の哺乳動物で調製することができる。簡便には、抗体は、天然配列P R Oポリペプチドに対して、又はここで提供されるD N A配列をベースとした合成ペプチドに対して、又はP R O D N Aに融合し特異的抗体エピトープをコードする外因性配列に対して調製され得る。

【0114】

5. ポリペプチドの精製

P R Oの形態は、培地又は宿主細胞の溶菌液から回収することができる。膜結合性であるならば、適切な洗浄液(例えばトリトン-X 100)又は酵素的切断を用いて膜から引き

10

20

30

40

50

離することができる。PROの発現に用いられる細胞は、凍結融解サイクル、超音波処理、機械的破壊、又は細胞溶解剤などの種々の化学的又は物理的手段によって破壊することができる。

PROを、組換え細胞タンパク又はポリペプチドから精製することが望ましい。適切な精製手順の例である次の手順により精製される：すなわち、イオン交換カラムでの分画；エタノール沈殿；逆相HPLC；シリカ又はカチオン交換樹脂、例えばDEAEによるクロマトグラフィー；クロマトフォーカシング；SDS-PAGE；硫酸アンモニウム沈殿；例えばセファデックスG-75を用いるゲル濾過；IgGのような汚染物を除くプロテインAセファロースカラム；及びPROのエピトプタグ形態を結合させる金属キレート化カラムである。この分野で知られ、例えば、Deutcher, *Methodes in Enzymology*, 182 (1990)；Scopes, *Protein Purification: Principles and Practice*, Springer-Verlag, New York (1982)に記載された多くのタンパク質精製方法を用いることができる。選ばれる精製過程は、例えば、用いられる生産方法及び特に生産される特定のPROの性質に依存する。

10

【0115】

E. PROの用途

PROをコードするヌクレオチド配列(又はそれらの補体)は、ハイブリッド形成プローブとしての使用を含む分子生物学の分野において、染色体及び遺伝子マッピングにおいて、及びアンチセンスRNA及びDNAの生成において種々の用途を有している。また、PRO核酸も、ここに記載される組換え技術によるPROポリペプチドの調製に有用である

20

全長天然配列PRO遺伝子又はその一部は、全長PRO cDNAの単離又はここに開示したPRO配列に対して所望の配列同一性を持つ更に他の遺伝子(例えば、PROの天然に生じる変異体又は他の種からのPROをコードするもの)の単離のためのcDNAライブラリー用のハイブリッド形成プローブとして使用できる。場合によっては、プローブの長さは約20~約50塩基である。ハイブリッド形成プローブは、少なくとも部分的に全長天然ヌクレオチド配列の新規な領域から誘導してもよく、それらの領域は、過度の実験をすることなく、天然配列PROのプロモーター、エンハンサー成分及びイントロンを含むゲノム配列から誘導され得る。例えば、スクリーニング法は、PRO遺伝子のコード化領域を周知のDNA配列を用いて単離して約40塩基の選択されたプローブを合成することを含む。ハイブリッド形成プローブは、³²P又は³⁵S等の放射性ヌクレオチド、又はアビディン/ビオチン結合系を介してプローブに結合したアルカリホスファターゼ等の酵素標識を含む種々の標識で標識されうる。本発明のPRO遺伝子に相補的な配列を有する標識されたプローブは、ヒトcDNA、ゲノムDNA又はmRNAのライブラリーをスクリーニングし、そのライブラリーの何れのメンバーがプローブにハイブッド形成するかを決定するのに使用できる。ハイブリッド形成技術は、以下の実施例において更に詳細に記載する。

30

【0116】

本出願で開示する任意のEST配列はプローブとして、ここに記載した方法で用いることができる。

40

PRO核酸の他の有用な断片は、標的PRO mRNA(センス)又はPRO DNA(アンチセンス)配列に結合できる一本鎖核酸配列(RNA又はDNAのいずれか)を含むアンチセンス又はセンスオリゴヌクレオチドを含む、アンチセンス又はセンスオリゴヌクレオチドは、本発明によると、PRO DNAのコード化領域の断片を含む。このような断片は、一般的には少なくとも約14ヌクレオチド、好ましくは約14から30ヌクレオチドを含む。与えられたタンパク質をコードするcDNA配列に基づく、アンチセンス又はセンスオリゴヌクレオチドを誘導する能力は、例えば、Stein及びCohen(*Cancer Res.* 48: 2659: 1988)及び van der Krol等(*BioTechniques* 6: 958, 1988)に記載されている。

アンチセンス又はセンスオリゴヌクレオチドの標的核酸配列への結合は二重鎖の形成をもたらす、それは、二重鎖の分解の促進、転写又は翻訳の期外停止を含む幾つかの方法の

50

一つ、又は他の方法により、標的配列の転写又は翻訳を阻止する。よって、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、PROタンパク質の発現を阻止するのに用いられる。アンチセンス又はセンスオリゴヌクレオチドは、修飾糖-ホスホジエステル骨格(又は他の糖結合、WO 91/06629に記載のもの等)を有するオリゴヌクレオチドをさらに含み、そのような糖結合は内因性ヌクレアーゼ耐性である。そのような耐性糖結合を持つオリゴヌクレオチドは、インビボで安定であるが(即ち、酵素分解に耐えうるが)、標的ヌクレオチド配列に結合できる配列特異性は保持している。

【0117】

センス又はアンチセンスオリゴヌクレオチドの他の例は、WO 90/10048に記載されているもののような、有機部分、及びオリゴヌクレオチドの標的核酸配列への親和性を向上させる他の部分、例えばポリ-(L-リジン)に共有結合したオリゴヌクレオチドを含む。さらにまた、エリプチシン等の挿入剤、アルキル化剤又は金属作体をセンス又はアンチセンスオリゴヌクレオチドに結合させ、アンチセンス又はセンスオリゴヌクレオチドの標的ヌクレオチド配列への結合特異性を改変してもよい。

アンチセンス又はセンスオリゴヌクレオチドは、例えば、CaPO₄-媒介DNA形質移入、エレクトロポレーションを含む任意の遺伝子転換方法により、又はエプスタイン-バーウイルスなどの遺伝子転換ベクターを用いることにより、標的核酸配列を含む細胞に導入される。好ましい方法では、アンチセンス又はセンスオリゴヌクレオチドは、適切なレトロウイルスベクターに挿入される。標的核酸配列を含む細胞は、インビボ又はエキソビボで組換えレトロウイルスベクターに接触させる。好適なレトロウイルスベクターは、これらに限られないが、マウスレトロウイルスM-MuLVから誘導されるもの、N2(M-MuLVから誘導されたレトロウイルス)、又はDCT5A、DCT5B及びDCT5Cと命名されたダブルコピーベクター(WO 90/13641参照)を含む。

また、センス又はアンチセンスオリゴヌクレオチドは、WO 91/04753に記載されているように、リガンド結合分子との複合体の形成により標的ヌクレオチド配列を含む細胞に導入してもよい。適切なリガンド結合分子は、これらに限られないが、細胞表面レセプター、成長因子、他のサイトカイン、又は細胞表面レセプターに結合する他のリガンドを含む。好ましくは、リガンド結合分子の複合体形成は、リガンド結合分子がその対応する分子又はレセプターに結合する、あるいはセンス又はアンチセンスオリゴヌクレオチド又はその複合体の細胞への侵入を阻止する能力を実質的に阻害しない。

あるいは、センス又はアンチセンスオリゴヌクレオチドは、WO 90/10448に記載されたように、オリゴヌクレオチド-脂質複合体の形成により標的核酸配列を含む細胞に導入してもよい。センス又はアンチセンスオリゴヌクレオチド-脂質複合体は、好ましくは内因性リパーゼにより細胞内で分解される。

【0118】

アンチセンス又はセンスRNA又はDNA分子は、一般的に少なくとも約5塩基長、約10塩基長、約15塩基長、約20塩基長、約25塩基長、約30塩基長、約35塩基長、約40塩基長、約45塩基長、約50塩基長、約55塩基長、約60塩基長、約65塩基長、約70塩基長、約75塩基長、約80塩基長、約85塩基長、約90塩基長、約95塩基長、約100塩基長、又はそれ以上である。

また、プローブは、PCR技術に用いて、密接に関連したPROコード配列の同定のための配列のプールを作成することができる。

また、PROをコードするヌクレオチド配列は、そのPROをコードする遺伝子のマッピングのため、及び遺伝子疾患を持つ個体の遺伝子分析のためのハイブリッド形成プローブの作成にも用いることができる。ここに提供されるヌクレオチド配列は、インサイツハイブリッド形成、既知の染色体マーカーに対する結合分析、及びライブラリーでのハイブリッド形成スクリーニング等の周知の技術を用いて、染色体及び染色体の特定領域にマッピングすることができる。

PROのコード配列が他のタンパク質に結合するタンパク質をコードする場合(例えば、PROがレセプターである場合)、PROは、結合性相互作用に係る他のタンパク質又

10

20

30

40

50

は分子を同定するアッセイに用いることができる。このような方法により、レセプター/リガンド結合性相互作用のインヒビターを同定することができる。このような結合性相互作用に含まれるタンパク質も、ペプチド又は小分子阻害剤又は結合性相互作用のアゴニストのスクリーニングに用いることができる。また、レセプターPROは関連するリガンドの単離にも使用できる。スクリーニングアッセイは、天然PRO又はPROのレセプターの生物学的活性に似たリード化合物の発見のために設計される。このようなスクリーニングアッセイは、化学的ライブラリーの高スループットスクリーニングにも用いられ、小分子候補薬剤の同定に特に適したものとする。考慮される小分子は、合成有機又は無機化合物を含む。アッセイは、この分野で良く知られ特徴付けられているタンパク質-タンパク質結合アッセイ、生物学的スクリーニングアッセイ、免疫検定及び細胞ベースのアッセイを含む種々の型式で実施される。 10

【0119】

また、PRO又はその任意の修飾型をコードする核酸は、トランスジェニック動物又は「ノックアウト」動物を産生するのにも使用でき、これらは治療的に有用な試薬の開発やスクリーニングに有用である。トランスジェニック動物(例えばマウス又はラット)とは、出生前、例えば胚段階で、その動物又はその動物の祖先に導入された導入遺伝子を含む細胞を有する動物である。導入遺伝子とは、トランスジェニック動物が発生する細胞のゲノムに組み込まれたDNAである。一実施形態では、PROをコードするcDNAは、確立された技術によりPROをコードするゲノムDNAをクローン化するために使用することができる。ゲノム配列を、PROをコードするDNAを発現する細胞を有するトランスジェニック動物を産生するために使用することができる。トランスジェニック動物、特にマウス又はラット等の特定の動物を産生する方法は当該分野において常套的になっており、例えば米国特許第4,736,866号や第4,870,009号に記述されている。典型的には、特定の細胞を組織特異的エンハンサーでのPRO導入遺伝子の導入の標的にする。胚段階で動物の生殖系列に導入されたPROコード化導入遺伝子のコピーを含むトランスジェニック動物はPROをコードするDNAの増大した発現の影響を調べるために使用できる。このような動物は、例えばその過剰発現を伴う病理学的状態に対して保護をもたらすと思われる試薬のテスター動物として使用できる。本発明のこの態様においては、動物を試薬で治療し、導入遺伝子を有する未治療の動物に比べ病理学的状態の発症率が低ければ、病理学的状態に対する治療的処置の可能性が示される。 20 30

あるいは、PROの非ヒト相同体は、動物の胚性幹細胞に導入されたPROをコードする変更ゲノムDNAと、PROをコードする内在性遺伝子との間の相同的組換えによって、PROをコードする欠陥又は変更遺伝子を有するPRO「ノックアウト」動物を作成するために使用できる。例えば、PROをコードするcDNAは、確立された技術に従い、PROをコードするゲノムDNAのクローニングに使用できる。PROをコードするゲノムDNAの一部を欠失したり、組み込みを監視するために使用する選択可能なマーカーをコードする遺伝子等の他の遺伝子で置換することができる。典型的には、ベクターは無変化のフランキングDNA(5'と3'末端の両方)を数千ベース含む[例えば、相同的組換えベクターについてはThomas及びCapecchi, Cell, 51:503(1987)を参照のこと]。ベクターは胚性幹細胞に(例えばエレクトロポレーションによって)導入し、導入されたDNAが内在性DNAと相同的に組換えられた細胞が選択される[例えば、Li等, Cell, 69:915(1992)参照]。選択された細胞は次に動物(例えばマウス又はラット)の胚盤胞内に注入されて集合キメラを形成する[例えば、Bradley, Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach, E. J. Robertson, ed. (IRL, Oxford, 1987), pp. 113-152参照]。その後、キメラ性胚を適切な偽妊娠の雌性乳母に移植し、期間を置いて「ノックアウト」動物をつくり出す。胚細胞に相同的に組換えられたDNAを有する子孫は標準的な技術により同定され、それらを利用して動物の全細胞が相同的に組換えられたDNAを含む動物を繁殖させることができる。ノックアウト動物は、PROポリペプチドが不在であることによるある種の病理学的状態及びその病理学的状態の進行に対する防御能力によって特徴付けられる。 40 50

【 0 1 2 0 】

また、P R Oポリペプチドをコードする核酸は遺伝子治療にも使用できる。遺伝子治療用途においては、例えば欠陥遺伝子を置換するため、治療的有効量の遺伝子産物のインビボ合成を達成するために遺伝子が導入される。「遺伝子治療」とは、1回の処理により継続的効果が達成される従来の遺伝子治療と、治療的に有効なD N A又はm R N Aの1回又は繰り返し投与を含む遺伝子治療薬の投与の両方を含む。アンチセンスR N A及びD N Aは、ある種の遺伝子のインビボ発現を阻止する治療薬として用いることができる。短いアンチセンスオリゴヌクレオチドを、細胞膜による制限された取り込みに起因する低い細胞内濃度にもかかわらず、それが阻害剤として作用する細胞中に移入できることは既に示されている(Zamecnik等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 4143-4146 [1986])。オリゴヌクレオチドは、例えばそれらの負に荷電したリン酸ジエステル基を非荷電基で置換することによって取り込みを促進するように修飾してもよい。

10

生存可能な細胞に核酸を導入するための種々の技術が存在する。これらの技術は、核酸が培養細胞にインビトロで、あるいは意図する宿主の細胞においてインビボで移入されるかに応じて変わる。核酸を哺乳動物細胞にインビトロで移入するのに適した方法は、リポソーム、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、細胞融合、D E A E -デキストラン、リン酸カルシウム沈殿法などを含む。現在好ましいインビボ遺伝子移入技術は、ウイルス(典型的にはレトロウイルス)ベクターでの形質移入及びウイルス被覆タンパク質-リポソーム媒介形質移入である(Dzau等, Trends, in Biotechnology 11, 205-210[1993])。幾つかの状況では、核酸供給源を、細胞表面膜タンパク質又は標的細胞に特異的な抗体、標的細胞上のレセプターに対するリガンド等の標的細胞を標的化する薬剤とともに提供するのが望ましい。リポソームを用いる場合、エンドサイトーシスを伴って細胞表面膜タンパク質に結合するタンパク質、例えば、特定の細胞型向性のカプシドタンパク質又はその断片、サイクルにおいて内部移行を受けるタンパク質に対する抗体、細胞内局在化を標的とし細胞内半減期を向上させるタンパク質が、標的化及び/又は取り込みの促進のために用いられる。レセプター媒介エンドサイトーシスの技術は、例えば、Wu等, J. Biol. Chem. 262, 4429-4432 (1987); 及びWagner等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 3410-3414 (1990)によって記述されている。遺伝子マーキング及び遺伝子治療のプロトコールの概説については、Anderson等, Science 256, 808-813 (1992)を参照のこと。

20

【 0 1 2 1 】

ここに記載したP R Oポリペプチドは、タンパク質電気泳動目的の分子量マーカーとして用いてもよく、単離された核酸配列はそのマーカーを組換え的に発現するために使用してもよい。

30

ここに記載したP R Oポリペプチド又はその断片をコードする核酸分子は染色体同定に有用である。この点において、実際の配列に基づく染色体マーキング試薬は殆ど利用可能ではないため、新規な染色体マーカーの同定の必要性が存在している。本発明の各P R O核酸分子は染色体マーカーとして使用できる。

また本発明のP R Oポリペプチド及び核酸分子は組織タイピングに使用でき、本発明のP R Oポリペプチドは一方の組織で他方に比較して異なる発現をする。P R O核酸分子は、P C R、ノーザン分析、サザン分析及びウェスタン分析のプローブ生成のための用途が見出されるであろう。

40

ここに記載したP R Oポリペプチドは治療薬として用いてもよい。本発明のP R Oポリペプチドは、製薬的に有用な組成物を調製するのに知られた方法に従って製剤され、それにより、このP R O生成物は製薬的に許容される担体媒体と混合される。治療用製剤は、凍結乾燥された製剤又は水性溶液の形態で、任意的な製薬上許容可能なキャリア、賦形剤又は安定剤と、所望の精製度を有する活性成分とを混合することにより(Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, A. Osol, Ed., (1980))、調製され保管される。許容される担体、賦形剤又は安定剤は、用いる投与量及び濃度ではレシipientに対して無毒性であり、リン酸、クエン酸及び他の有機酸等の緩衝液; アスコルビン酸を含む抗酸化剤; 低分子量(残基数10個未満)ポリペプチド; 血清アルブミン、ゼラチン又は免疫グ

50

ロブリン等のタンパク質；ポリビニルピロリドン等の親水性重合体；グリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニン又はリシン等のアミノ酸；グルコース、マンノース又はデキストリン等の単糖類、二糖類又は他の炭水化物；EDTA等のキレート剤；マンニトール又はソルビトール等の糖アルコール類；ナトリウム等の塩形成対イオン；及びノ又はTW EEN^{T M}、PLURONICS^{T M}又はPEG等の非イオン性界面活性剤を含む。

【0122】

インビボ投与に使用される製剤は滅菌されていなくてはならない。これは、凍結乾燥及び再構成の前又は後に、滅菌フィルター膜を通す濾過により容易に達成される。

ここで、治療用組成物は一般に、無菌のアクセスポートを具備する容器、例えば、皮下注射針で貫通可能なストッパーを持つ静脈内バッグ又はバイアル内に配される。

投与経路は周知の方法、例えば、静脈内、腹膜内、脳内、筋肉内、眼内、動脈内又は病巣内経路での注射又は注入、局所投与、又は徐放系による。

本発明の製薬組成物の用量及び望ましい薬物濃度は、意図する特定の用途に応じて変化する。適切な用量又は投与経路の決定は、通常の内科医の技量の範囲内である。動物実験は、ヒト治療のための有効量の決定についての信頼できるガイダンスを提供する。有効量の種間スケールリングは、Toxicokinetics and New Drug Development, Yacobi等、編、Pergamon Press, New York 1989, pp. 42-96のMordenti, J. 及びchappell, W. 「The use of interspecies scaling in toxicokinetics」に記載された原理に従って実施できる。

PROポリペプチド又はそのアゴニスト又はアンタゴニストのインビボ投与が用いられる場合、正常な投与量は、投与経路に応じて、哺乳動物の体重当たり1日に約10ng/kgから100mg/kgまで、好ましくは約1μg/kg/日から10mg/kg/日である。特定の用量及び輸送方法の指針は文献に与えられている；例えば、米国特許第4,657,760号、第5,206,344号、又は第5,225,212号参照。異なる製剤が異なる治療用化合物及び異なる疾患に有効であること、例えば一つの器官又な組織を標的とする投与には他の器官又は組織とは異なる方式で輸送することは必要であることが予想される。

PROポリペプチドの投与を必要とする任意の疾患又は疾病の治療に適した放出特性を持つ製剤でPROポリペプチドの持続放出が望まれる場合、PROポリペプチドのマイクロカプセル化が考えられる。持続放出のための組換えタンパク質のマイクロカプセル化は、ヒト成長ホルモン(rhGH)、インターフェロン(rhIFN-)、インターロイキン-2、及びMNgp120で成功裏に実施されている。Johnson等, Nat. Med., 2: 795-799 (1996); Yasuda, Biomed. Ther., 27: 1221-1223 (1993); Hora等, Bio/Technology, 8: 755-758 (1990); Cleland, 「Design and Production of Single Immunization Vaccines Using Polyactide Polyglycolide Microsphere Systems」Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach, Powell 及び Newman編, (Plenum Press: New York, 1995), p. 439-462; WO 97/03692, WO 96/40072, WO 96/07399; 及び米国特許第5,564,010号。

【0123】

これらのタンパク質の持続放出製剤は、ポリ-乳酸-コグリコール酸(PLGA)ポリマーを用い、その生体適合性及び広範囲の生分解特性に基づいて開発された。PLGAの分解生成物である乳酸及びグリコール酸は、ヒト身体内で即座にクリアされる。さらに、このポリマーの分解性は、分子量及び組成に依存して数ヶ月から数年まで調節できる。Lewis, 「Controlled release of bioactive agents from lactide/glycolide polymer」: M. Chasin及び R. Langer (編), Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems (Marcel Dekker: New York, 1990), pp. 1-41。

本発明は、PROポリペプチドに類似する(アゴニスト)又はPROポリペプチドの効果を阻害する(アンタゴニスト)ものを同定するための化合物のスクリーニング方法も包含する。アンタゴニスト候補薬のスクリーニングアッセイは、ここに同定した遺伝子にコードされるPROポリペプチドと結合又は複合体形成する化合物、又は他にコード化ポリペプチドの他の細胞性タンパク質との相互作用を阻害する化合物を同定するために設計される。このようなスクリーニングアッセイは、それを特に小分子候補薬の同定に適したものに、化学的ライブラリーの高スループットスクリーニングに適用可能なアッセイを含む

10

20

30

40

50

このアッセイは、タンパク質-タンパク質結合アッセイ、生化学的スクリーニングアッセイ、イムノアッセイ、及び細胞ベースのアッセイで、この分野で知られたものを含む種々の方式で実施される。

アンタゴニストについての全てのアッセイは、それらが候補薬をここで同定された核酸にコードされるPROポリペプチドと、これら2つの成分が相互作用するのに十分な条件下及び時間で接触させることを必要とすることにおいて共通する。

【0124】

結合アッセイにおいて、相互作用は結合であり、形成された複合体は単離されるか、又は反応混合物中で検出される。特別な実施態様では、ここに同定された遺伝子にコードされるPROポリペプチド又は候補薬が、共有又は非共有結合により固相、例えばマイクロタイタープレートに固定化される。非共有結合は、一般的に固体表面をポリペプチドの溶液で被覆し乾燥させることにより達成される。あるいは、固定化されるPROポリペプチドに特異的な固定化抗体、例えばモノクローナル抗体を、それを固体表面に固着させるために用いることができる。アッセイは、固定化成分、例えば固着成分を含む被覆表面に、検出可能な標識で標識されていてもよい非固定化成分を添加することにより実施される。反応が完了したとき、未反応成分を例えば洗浄により除去し、固体表面に固着した複合体を検出する。最初の非固定化成分が検出可能な標識を有している場合、表面に固定化された標識の検出は複合体形成が起こったことを示す。最初の非固定化成分が標識を持たない場合は、複合体形成は、例えば、固定化された複合体に特異的に結合する標識抗体によって検出できる。

候補化合物が相互作用するがここに同定した遺伝子にコードされる特定のPROポリペプチドに結合しない場合、そのポリペプチドとの相互作用は、タンパク質-タンパク質相互作用を検出するために良く知られた方法によってアッセイすることができる。そのようなアッセイは、架橋、同時免疫沈降、及び勾配又はクロマトグラフィカラムを通す同時精製などの伝統的な手法を含む。さらに、タンパク質-タンパク質相互作用は、Fields及び共同研究者等 [Fields及びSong, Nature(London) 340, 245-246 (1989); Chien等, Proc.Natl. Acad. Sci. USA 88, 9578-9582 (1991)] に記載された酵母菌ベースの遺伝子系を用いることにより、Chevray及びNathans, Proc.Natl. Acad. Sci. USA 89, 5789-5793 (1991) に開示されている酵母菌ベースの系を用いて監視することができる。酵母菌GAL4などの多くの転写活性化剤は、2つの物理的に別個のモジュラードメインからなり、一方はDNA結合ドメインとして作用し、他方は転写活性化ドメインとして機能する。以前の文献に記載された酵母菌発現系(一般に「2-ハイブリッド系」と呼ばれる)は、この特性の長所を利用して、2つのハイブリッドタンパク質を用い、一方では標的タンパク質がGAL4のDNA結合ドメインに融合し、他方では、候補となる活性化タンパク質が活性化ドメインに融合している。GAL1-1lacZリポーター遺伝子のGAL4活性化プロモーターの制御下での発現は、タンパク質-タンパク質相互作用を介したGAL4活性の再構成に依存する。相互作用するポリペプチドを含むコロニーは、 β -ガラクトシダーゼに対する色素生産性物質で検出される。2-ハイブリッド技術を用いた2つの特定なタンパク質間のタンパク質-タンパク質相互作用を同定するための完全なキット(MATCHMAKERTM)は、Clontechから商業的に入手可能である。この系は、特定のタンパク質相互作用に含まれるタンパク質ドメインのマッピング、並びにこの相互作用にとって重要なアミノ酸残基の特定にも拡張することができる。

【0125】

ここで同定されたPROポリペプチドをコードする遺伝子と細胞内又は細胞外成分との相互作用を阻害する化合物は、次のように試験できる：通常は反応混合物は、遺伝子産物と細胞外又は細胞内成分を、それら2つの生成物が相互作用及び結合する条件下及び時間で含むように調製される。候補化合物が結合を阻害する能力を試験するために、反応は試験化合物の不存在及び存在下で実施される。さらに、プラシーボを第3の反応混合物に添加してポジティブ対照を提供してもよい。混合物中に存在する試験化合物と細胞内又は細胞

10

20

30

40

50

胞外成分との結合(複合体形成)は上記のように監視される。試験化合物を含有する反応混合物ではなく対照反応における複合体の形成は、試験化合物が試験化合物とその結合パートナーとの相互作用を阻害することを示す。

アンタゴニストをアッセイするために、PROポリペプチドを特定の活性についてスクリーニングする化合物とともに添加してよく、PROポリペプチド存在下での関心ある活性を阻害する化合物の能力が化合物がPROポリペプチドのアンタゴニストであることを示す。あるいは、アンタゴニストは、PROポリペプチド及び膜結合PROポリペプチドレセプター又は組換えレセプターを持つ潜在的アンタゴニストを、競合的阻害アッセイに適した条件下で結合させることにより検出してもよい。PROポリペプチドは、放射性等で標識でき、レセプターに結合したPROポリペプチドの数を潜在的アンタゴニストの有効性を決定するのに使用できる。レセプターをコードする遺伝子は、当業者に知られた多くの方法、例えばリガンドパンニング及びFACSソートにより同定できる。Coligan等、*Current Protocols in Immun.*, 1(2): Chapter 5 (1991)。好ましくは、発現クローニングが用いられ、ポリアデニル化RNAがPROポリペプチドに反応性の細胞から調製され、このRNAから生成されたcDNAライブラリーがプールに分配され、COS細胞又はPROポリペプチド反応性でない他の細胞の形質移入に使用される。スライドガラスで成長させた形質移入細胞を標識したPROポリペプチドに暴露する。PROポリペプチドは、ヨウ素化又は部位特異的タンパク質キナーゼの認識部位の包含を含む種々の手段で標識できる。固定及びインキュベーションの後、スライドにオートラジオグラフィ分析を施す。ポジティブプールを同定し、相互作用サブプール化及び再スクリーニング工程を用いてサブプールを調製して再形質移入し、結果的に推定レセプターをコードする単一のクローンを生成する。

【0126】

レセプター同定の代替的方法として、標識PROポリペプチドをレセプター分子を発現する細胞膜又は抽出調製物に光親和性結合させることができる。架橋材料はPAGEに溶解させ、X線フィルムに暴露する。レセプターを含む標識複合体を励起し、ペプチド断片に分離し、タンパク質マイクロ配列決定を施すことができる。マイクロ配列決定から得たアミノ酸配列は、推定レセプターをコードする遺伝子を同定するcDNAライブラリーをスクリーニングする分解性オリゴヌクレオチドプローブの組の設計に用いられる。

アンタゴニストの他の検定では、レセプターを発現する哺乳動物細胞又は膜調製物を、候補化合物の存在下で標識PROポリペプチドとともにインキュベートする。次いで、この相互作用を促進又は阻止する化合物の能力を測定する。

潜在的なアンタゴニストのより特別な例は、免疫グロブリンとPROポリペプチドとの融合体に結合するオリゴヌクレオチド、特に、限られないが、ポリペプチド-及びモノクローナル抗体及び抗体断片、一本鎖抗体、抗-イディオタイプ抗体、及びこれらの抗体又は断片のキメラ又はヒト化形態、並びにヒト抗体及び抗体断片を含む抗体を含んでいる。あるいは、潜在的アンタゴニストは、密接に関連したタンパク質、例えば、レセプターを認識するが効果を与えず、従ってPROポリペプチドの作用を競合的に阻害するPROポリペプチドの変異形態であってもよい。

他の潜在的なPROポリペプチドアンタゴニストは、アンチセンス技術を用いて調製されたアンチセンスRNA又はDNA作成物であり、例えば、アンチセンスRNA又はDNAは、標的mRNAにハイブリッド形成してタンパク質翻訳を妨害することによりmRNAの翻訳を直接阻止するように作用する。アンチセンス技術は、トリプルヘリックス形成又はアンチセンスDNA又はRNAを通して遺伝子発現を制御するのに使用でき、それらの方法はともに、ポリヌクレオチドのDNA又はRNAへの結合に基づく。例えば、ここでの成熟PROポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列の5'コード化部分は、約10から40塩基対長のアンチセンスRNAオリゴヌクレオチドの設計に使用される。DNAオリゴヌクレオチドは、転写に含まれる遺伝子の領域に相補的であるように設計され(トリプルヘリックス - Lee等, *Nucl. Acid Res.*, 6: 3073 (1979); Cooney等, *Science*, 241: 456 (1988); Dervan等, *Science*, 251: 1360 (1991)参照)、それによりPROポ

リペプチドの転写及び生成を防止する。アンチセンスRNAオリゴヌクレオチドはインビボでmRNAにハイブリッド形成してmRNA分子のPROポリペプチドへの翻訳を阻止する(アンチセンス - Okano, Neurochem., 56: 560 (1991); Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression (CRC Press: Boca Raton, FL, 1988))。上記のオリゴヌクレオチドは、細胞に送達され、アンチセンスRNA又はDNAをインビボで発現させて、PROポリペプチドの生産を阻害することもできる。アンチセンスDNAが用いられる場合、翻訳開始部位、例えば標的遺伝子ヌクレオチド配列の-10から+10位置の間から誘導されるオリゴデオキシリボヌクレオチドが好ましい。

【0127】

潜在的アンタゴニストは、PROポリペプチドの活性部位、レセプター結合部位、又は成長因子又は他の関連結合部位に結合し、それによりPROポリペプチドの正常な生物学的活性を阻止する小分子を含む。小分子の例は、これらに限られないが、小型ペプチド又はペプチド様分子、好ましくは可溶性ペプチド、及び合成非ペプチド有機又は無機化合物を含む。

リボザイムは、RNAの特異的切断を触媒できる酵素的RNA分子である。リボザイムは、相補的標的RNAへの配列特異的ハイブリッド形成、次いでヌクレオチド鎖切断的切断により作用する。潜在的RNA標的内の特異的リボザイム切断部位は、既知の技術で同定できる。更なる詳細は、例えば、Rossi, Current Biology 4: 469-471 (1994)及びPCT公報、番号WO 97/33551(1997年9月18日公開)を参照。

転写阻害に用いられるトリプルヘリックス形成における核酸分子は一本鎖でデオキシヌクレオチドからなる。これらのオリゴヌクレオチドの基本組成は、フーグスチン塩基対則を介するトリプルヘリックス形成を促進するように設計され、それは一般に二重鎖の一方の鎖上のプリン又はピリミジンのサイズ変更可能な伸展を必要とする。さらなる詳細は、例えば、PCT公報、番号WO 97/33551, 上掲を参照。

これらの小分子は、上記で議論したスクリーニングアッセイの一又は複数の任意のものにより及び/又は当業者に良く知られた他の任意のスクリーニング技術により同定できる。

ここで開示される分子の用途は、以下に開示し記載するポジティブな機能アッセイの成功に基づいている。そのアッセイの成功に基づく方法もまた本発明に含まれる。

【0128】

F. 抗-PRO抗体

本発明は抗-PRO抗体を更に提供する。抗体の例としては、ポリクローナル、モノクローナル、ヒト化、二重特異性及びヘテロ抱合体抗体が含まれる。

【0129】

1. ポリクローナル抗体

抗-PRO抗体はポリクローナル抗体を含む。ポリクローナル抗体の調製方法は当業者に知られている。哺乳動物においてポリクローナル抗体は、例えば免疫化剤、及び所望するのであればアジュバントを、一又は複数回注射することで発生させることができる。典型的には、免疫化剤及び/又はアジュバントを複数回皮下又は腹腔内注射により、哺乳動物に注射する。免疫化剤は、PROポリペプチド又はその融合タンパク質を含みうる。免疫化剤を免疫化された哺乳動物において免疫原性が知られているタンパク質に抱合させるのが有用である。このような免疫原タンパク質の例は、これらに限られないが、キーホルリンペットヘモシアニン、血清アルブミン、ウシサイログロブリン及び大豆トリプシンインヒビターが含まれる。使用され得るアジュバントの例には、フロイント完全アジュバント及びMPL-TDMアジュバント(モノホスホリル脂質A、合成トレハロースジコリノミコラート)が含まれる。免疫化プロトコールは、過度の実験なく当業者により選択されるであろう。

【0130】

2. モノクローナル抗体

あるいは、抗-PRO抗体はモノクローナル抗体であってもよい。モノクローナル抗体

は、Kohler及びMilstein, Nature, 256:495 (1975)に記載されているようなハイブリドーマ法を使用することで調製することができる。ハイブリドーマ法では、マウス、ハムスター又は他の適切な宿主動物を典型的には免疫化剤により免疫化することで、免疫化剤に特異的に結合する抗体を生成するかあるいは生成可能なリンパ球を誘発する。また、リンパ球をインビトロで免疫化することもできる。

免疫化剤は、典型的にはPROポリペプチド又はその融合タンパク質を含む。一般にヒト由来の細胞が望まれる場合には末梢血リンパ球(「PBL」)が使用され、あるいは非ヒト哺乳動物源が望まれている場合は、脾臓細胞又はリンパ節細胞が使用される。次いで、ポリエチレングリコール等の適当な融合剤を用いてリンパ球を不死化株化細胞と融合させ、ハイブリドーマ細胞を形成する [Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, (1986) pp. 59-103]。不死化株化細胞は、通常は、形質転換した哺乳動物細胞、特に齧歯動物、ウシ、及びヒト由来の骨髓腫細胞である。通常、ラット又はマウスの骨髓腫株化細胞が使用される。ハイブリドーマ細胞は、好ましくは、未融合の不死化細胞の生存又は成長を阻害する一又は複数の物質を含有する適切な培地で培養される。例えば、親細胞が、酵素のヒポキサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ(HGPRT又はHPRT)を欠いていると、ハイブリドーマの培地は、典型的には、ヒポキサンチン、アミノプチリン及びチミジンを含み(「HAT培地」)、この物質がHGPRT欠乏性細胞の増殖を阻止する。

好ましい不死化株化細胞は、効率的に融合し、選択された抗体生成細胞による安定した高レベルの抗体発現を支援し、HAT培地のような培地に対して感受性である。より好ましい不死化株化細胞はマウス骨髓腫株であり、これは例えばカリフォルニア州サンディエゴのSalk Institute Cell Distribution Centerやバージニア州マナッサスのアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションより入手可能である。ヒトモノクローナル抗体を生成するためのヒト骨髓腫及びマウス-ヒト異種骨髓腫株化細胞も開示されている [Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984)、Brodeur等, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, Marcel Dekker, Inc., New York, (1987) pp. 51-63]。

【0131】

次いでハイブリドーマ細胞が培養される培養培地を、PROに対するモノクローナル抗体の存在について検定する。好ましくは、ハイブリドーマ細胞によって生成されたモノクローナル抗体の結合特異性は免疫沈降又はラジオイムノアッセイ(RIA)や酵素結合免疫測定法(ELISA)等のインビトロ結合検定法によって測定する。このような技術及びアッセイは、当該分野において公知である。モノクローナル抗体の結合親和性は、例えばMunson及びPollard, Anal. Biochem., 107:220 (1980)によるスキヤッチャード分析法によって測定することができる。

所望のハイブリドーマ細胞が同定された後、クローンを制限希釈工程によりサブクローニングし、標準的な方法で成長させることができる [Goding, 上掲]。この目的のための適当な培地には、例えば、ダルベッコの改変イーグル培地及びRPMI-1640培地が含まれる。あるいは、ハイブリドーマ細胞は哺乳動物においてインビボで腹水として成長させることもできる。

サブクローンによって分泌されたモノクローナル抗体は、例えばプロテインA-セファロース法、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー法、ゲル電気泳動法、透析法又はアフィニティークロマトグラフィー等の従来の免疫グロブリン精製方法によって培養培地又は腹水液から単離又は精製される。

また、モノクローナル抗体は、組換えDNA法、例えば米国特許第4,816,567号に記載された方法により作成することができる。本発明のモノクローナル抗体をコードするDNAは、常套的な方法を用いて(例えば、マウス抗体の重鎖及び軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合可能なオリゴヌクレオチドプローブを使用して)、容易に単離し配列決定することができる。本発明のハイブリドーマ細胞はそのようなDNAの好ましい供給源となる。ひとたび単離されたら、DNAは発現ベクター内に配することができ、これが宿主細胞、例えばサルCOS細胞、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞、あるいは免疫グ

10

20

30

40

50

ロブリンタンパク質を生成等しない骨髓腫細胞内に形質移入され、組換え宿主細胞内でモノクローナル抗体の合成をすることができる。また、DNAは、例えば相同マウス配列に換えてヒト重鎖及び軽鎖定常ドメインのコード配列を置換することにより[米国特許第4,816,567号; 上掲のMorrison等]、又は免疫グロブリンコード配列に非免疫グロブリンポリペプチドのコード配列の一部又は全部を共有結合することにより修飾することができる。このような非免疫グロブリンポリペプチドは、本発明の抗体の定常ドメインに置換でき、あるいは本発明の抗体の一つの抗原結合部位の可変ドメインに置換でき、キメラ性二価抗体を生成する。

抗体は一価抗体であってもよい。一価抗体の調製方法は当該分野においてよく知られている。例えば、一つの方法は免疫グロブリン軽鎖と修飾重鎖の組換え発現を含む。重鎖は一般的に、重鎖の架橋を防止するようにFc領域の任意の点で切断される。あるいは、関連するシステイン残基を他のアミノ酸残基で置換するか欠失させて架橋を防止する。

一価抗体の調製にはインビトロ法がまた適している。抗体の消化による、その断片、特にFab断片の生成は、当該分野において知られている慣用的技術を使用して達成できる。

【0132】

3. ヒト及びヒト化抗体

本発明の抗-PRO抗体は、さらにヒト化抗体又はヒト抗体を含む。非ヒト(例えばマウス)抗体のヒト化形とは、キメラ免疫グロブリン、免疫グロブリン鎖あるいはその断片(例えばFv、Fab、Fab'、(Fab')₂あるいは抗体の他の抗原結合サブ配列)であって、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小配列を含むものである。ヒト化抗体はレシピエントの相補性決定領域(CDR)の残基が、マウス、ラット又はウサギのような所望の特異性、親和性及び能力を有する非ヒト種(ドナー抗体)のCDRの残基によって置換されたヒト免疫グロブリン(レシピエント抗体)を含む。幾つかの例では、ヒト免疫グロブリンのFvフレームワーク残基は、対応する非ヒト残基によって置換されている。また、ヒト化抗体は、レシピエント抗体にも、移入されたCDRもしくはフレームワーク配列にも見出されない残基を含んでいてもよい。一般に、ヒト化抗体は、全てあるいはほとんど全てのCDR領域が非ヒト免疫グロブリンのものに対応し、全てあるいはほとんど全てのFR領域がヒト免疫グロブリンコンセンサス配列のものである、少なくとも1つ、典型的には2つの可変ドメインの実質的に全てを含む。ヒト化抗体は、最適には免疫グロブリン定常領域(Fc)、典型的にはヒトの免疫グロブリンの定常領域の少なくとも一部を含んでなる[Jones等, Nature, 321:522-525 (1986); Riechmann等, Nature, 332:323-329 (1988); 及びPresta, Curr. Op Struct. Biol., 2:593-596 (1992)]。

非ヒト抗体をヒト化する方法はこの分野でよく知られている。一般的に、ヒト化抗体には非ヒト由来の一又は複数のアミノ酸残基が導入される。これら非ヒトアミノ酸残基は、しばしば、典型的には「移入」可変ドメインから得られる「移入」残基と称される。ヒト化は基本的に、ウィンター(winter)及び共同研究者[Jones等, Nature, 321:522-525 (1986); Riechmann等, Nature, 332:323-327 (1988); Verhoeyen等, Science, 239:1534-1536 (1988)]の方法に従って、齧歯類CDR又はCDR配列をヒト抗体の対応する配列に置換することにより実施される。よって、このような「ヒト化」抗体は、無傷のヒト可変ドメインより実質的に少ない分が非ヒト種由来の対応する配列で置換されたキメラ抗体(米国特許第4,816,567号)である。実際には、ヒト化抗体は典型的には幾つかのCDR残基及び場合によっては幾つかのFR残基が齧歯類抗体の類似する部位からの残基によって置換されたヒト抗体である。

【0133】

また、ヒト抗体は、ファージディスプレイライブラリー[Hoogenboom及びWinter, J. Mol. Biol., 227:381 (1992); Marks等, J. Mol. Biol., 222:581 (1991)]を含むこの分野で知られた種々の方法を用いて作成することもできる。また、Cole等及びBoerner等の技術も、ヒトモノクローナル抗体の調製に利用することができる(Cole等, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p.77(1985)及びBoerner等, J. Immunol.,

10

20

30

40

50

147(1):86-95(1991)]。同様に、ヒト抗体はヒト免疫グロブリン座位をトランスジェニック動物、例えば内在性免疫グロブリン遺伝子は部分的又は完全に不活性化されたマウスに導入することにより産生することができる。投与の際に、遺伝子再配列、組立、及び抗体レパトリーを含むあらゆる観点においてヒトに見られるものに非常に類似しているヒト抗体の生産が観察される。このアプローチは、例えば米国特許第5,545,807号；同第5,545,806号；同第5,569,825号；同第5,625,126号；同第5,633,425号；同第5,661,016号、及び次の科学刊行物：Marks等，Bio/Technology 10, 779-783 (1992)；Lonberg等，Nature 368 856-859 (1994)；Morrison, Nature 368, 812-13 (1994)；Fishwild等，Nature Biotechnology 14, 845-51 (1996)；Neuberger, Nature Biotechnology 14, 826 (1996)；Lonberg及びHuszar, Intern. Rev. Immunol. 13 65-93 (1995)に記載されている。

10

また、抗体は上述した既知の選択及び/又は突然変異誘発法を使用して、親和成熟させてもよい。好ましい親和成熟抗体は、成熟抗体が調製される(一般的にマウス、ヒト化又はヒトの)出発抗体よりも、5倍、より好ましくは10倍、さらに好ましくは20又は30倍の親和性を有する。

【0134】

4. 二重特異性抗体

二重特異性抗体は、少なくとも2つの異なる抗原に対して結合特異性を有するモノクローナル抗体、好ましくはヒトもしくはヒト化抗体である。本発明の場合において、結合特異性の一方はPROに対してであり、他方は任意の他の抗原、好ましくは細胞表面タンパク質又はレセプター又はレセプターサブユニットに対してである。

20

二重特異性抗体を作成する方法は当該技術分野において周知である。伝統的には、二重特異性抗体の組換え生産は、二つの重鎖が異なる特異性を持つ二つの免疫グロブリン重鎖/軽鎖対の同時発現に基づく[Milstein及びCuello, Nature, 305:537-539 (1983)]。免疫グロブリンの重鎖と軽鎖を無作為に取り揃えるため、これらハイブリドーマ(クアドローマ)は10種の異なる抗体分子の潜在的混合物を生成し、その内一種のみが正しい二重特異性構造を有する。正しい分子の精製は、アフィニティークロマトグラフィー工程によって通常達成される。同様の手順が1993年5月13日公開のW093/08829、及びTraunecker等，EMBO J., 10:3655-3656 (1991)に開示されている。

所望の結合特異性(抗体-抗原結合部位)を有する抗体可変ドメインを免疫グロブリン定常ドメイン配列に融合できる。融合は、好ましくは少なくともヒンジ部、CH2及びCH3領域の一部を含む免疫グロブリン重鎖定常ドメインとのものである。少なくとも一つの融合には軽鎖結合に必要な部位を含む第一の重鎖定常領域(CH1)が存在することが望ましい。免疫グロブリン重鎖融合をコードするDNA、及び望むのであれば免疫グロブリン軽鎖を、別々の発現ベクターに挿入し、適当な宿主生物に同時形質移入する。二重特異性抗体を作成するための更なる詳細については、例えばSuresh等，Methods in Enzymology, 121:210(1986)を参照されたい。

30

【0135】

W096/27011に記載された他の方法によれば、一对の抗体分子間の界面を操作して組換え細胞培養から回収される異種二量体の割合を最大にすることができる。好適な界面は抗体定常ドメインのCH3領域の少なくとも一部を含む。この方法では、第1抗体分子の界面からの一又は複数の小さいアミノ酸側鎖がより大きな側鎖(例えばチロシン又はトリプトファン)と置き換えられる。大きな側鎖と同じ又は類似のサイズの相補的「キャピティ」を、大きなアミノ酸側鎖を小さいもの(例えばアラニン又はスレオニン)と置き換えることにより第2の抗体分子の界面に作り出す。これにより、ホモダイマーのような不要の他の最終産物に対してヘテロダイマーの収量を増大させるメカニズムが提供される。

40

二重特異性抗体は、全長抗体又は抗体断片(例えば、F(ab')₂二重特異性抗体)として調製できる。抗体断片から二重特異性抗体を産生する技術もまた文献に記載されている。例えば、化学結合を使用して二重特異性抗体を調製することができる。Brennan等，Science, 229:81(1985)は無傷の抗体をタンパク分解的に切断してF(ab')₂断片を産生する手順を記述している。これらの断片は、ジチオール錯体形成剤亜硫酸ナトリウムの存在

50

下で還元して近接ジチオールを安定化させ、分子間ジスルフィド形成を防止する。産生された F a b ' 断片はついでチオニトロベンゾアート(TNB)誘導体に転換される。F a b ' -TNB 誘導体の一つをついでメルカプトエチルアミンでの還元により F a b ' -チオールに再転換し、他の F a b ' -TNB 誘導体の等モル量と混合して二重特異性抗体を形成する。作られた二重特異性抗体は酵素の選択的固定化用の薬剤として使用することができる。

大腸菌から F a b ' 断片を直接回収でき、これは化学的に結合して二重特異性抗体を形成することができる。Shalaby等, J. Exp. Med., 175:217-225 (1992)は完全にヒト化された二重特異性抗体 F (a b ')₂ 分子の製造を記述している。各 F a b ' 断片は大腸菌から別個に分泌され、インビトロで定方向化学共役を受けて二重特異性抗体を形成する。このようにして形成された二重特異性抗体は、正常なヒト T 細胞及び E r b B 2 レセプターを過剰発現する細胞に結合可能で、ヒト乳房腫瘍標的に対するヒト細胞障害性リンパ球の細胞溶解活性の誘因となる。

10

【0136】

組換え細胞培養から直接的に二重特異性抗体断片を作成し分離する様々な方法もまた記述されている。例えば、二重特異性抗体はロインジッパーを使用して生産されている。Kostelnyら, J. Immunol. 148(5):1547-1553 (1992)。F o s 及び J u n タンパク質からのロインジッパーペプチドを遺伝子融合により二つの異なる抗体の F a b ' 部分に結合させる。抗体ホモダイマーをヒンジ領域で還元してモノマーを形成し、ついで再酸化して抗体ヘテロダイマーを形成する。この方法はまた抗体ホモダイマーの生産に対して使用することができる。Hollingerら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993)により記述された「ダイアボディ」技術は二重特異性抗体断片を作成する別のメカニズムを提供した。断片は、同一鎖上の2つのドメイン間の対形成を可能にするには十分に短いリンカーにより軽鎖可変ドメイン(V_L)に重鎖可変ドメイン(V_H)を結合してなる。従って、一つの断片の V_H 及び V_L ドメインは他の断片の相補的 V_L 及び V_H ドメインと強制的に対形成させられ、2つの抗原結合部位を形成する。単鎖 F v (s F v) ダイマーの使用により二重特異性抗体断片を製造する他の方策もまた報告されている。Gruberら, J. Immunol. 152:5368 (1994)を参照されたい。

20

二価より多い抗体も考えられる。例えば、三重特異性抗体を調製することができる。Tuttら J. Immunol. 147:60(1991)。

例示的な二重特異性抗体は、ここに与えられた P R O ポリペプチドの2つの異なるエピトープに結合しうる。あるいは、抗-P R O ポリペプチドのアームは、特定の P R O ポリペプチド発現細胞に細胞防御メカニズムを集中させるように、T 細胞レセプター分子(例えば C D 2、C D 3、C D 2 8、又は B 7)等の白血球上のトリガー分子、又は F c R I (C D 6 4)、F c R I I (C D 3 2)及び F c R I I I (C D 1 6)等の I g G (F c R) に対する F c レセプターに結合するアームと結合しうる。また、二重特異性抗体は特定の P R O ポリペプチドを発現する細胞に細胞毒性薬を局在化させるためにも使用されうる。これらの抗体は P R O 結合アーム及び細胞毒性薬又は放射性キレート化剤、例えば E O T U B E、D P T A、D O T A、又は T E T A と結合するアームを有する。関心ある他の二重特異性抗体は P R O ポリペプチドに結合し、そしてさらに組織因子(T F)に結合する。

30

40

【0137】

5. ヘテロ抱合体抗体

ヘテロ抱合抗体もまた本発明の範囲に入る。ヘテロ抱合抗体は、2つの共有結合した抗体からなる。このような抗体は、例えば、免疫系細胞を不要な細胞に対してターゲティングさせるため [米国特許第 4,676,980号] 及び H I V 感染の治療のために [W O 91/00360; W O 92/200373; EP 03089] 提案されている。この抗体は、架橋剤に関連したものを含む合成タンパク化学における既知の方法を使用して、インビトロで調製することができると考えられる。例えば、ジスルフィド交換反応を使用するか又はチオエーテル結合を形成することにより、免疫毒素を作成することができる。この目的に対して好適な試薬の例には、イミノチオレート及びメチル-4-メルカプトブチリミデート、及び例えば米国特許第 4,67

50

6,980号に開示されているものが含まれる。

【0138】

6. エフェクター機能の加工

本発明の抗体をエフェクター機能について改変し、例えば癌治療における抗体の有効性を向上させるのが望ましい。例えば、システイン残基をFc領域に導入し、それにより、この領域に鎖間ジスルフィド結合を形成させるようにしてもよい。そのようにして生成された同種二量体抗体は、向上した内部移行能力及び/又は増加した補体媒介細胞殺傷及び抗体-依存性細胞性細胞毒性(ADCC)を有しうる。Caron等, J. Exp. Med. 176: 1191-1195 (1992)及びShopes, J. Immunol. 148: 2918-2922 (1992)を参照。向上した抗腫瘍活性を持つ同種二量体抗体はまた、Wolff等, Cancer Research 53: 2560-2565 (1993)に記載されたような異種二官能性架橋を用いても調製しうる。あるいは、抗体は、2つのFc領域を有するように加工して、それにより補体溶解及びADCC能力を向上させることもできる。Stevenson等, Anti-Cancer Drug Design 3: 219-230 (1989)を参照。

10

【0139】

7. 免疫複合体

本発明はまた、化学治療薬、毒素(例えば、細菌、真菌、植物又は動物由来の酵素活性毒素、又はその断片)などの細胞毒性薬、あるいは放射性同位体(即ち、放射性抱合)に抱合された抗体を含む免疫複合体にも関する。

このような免疫複合体の生成に有用な化学治療薬は上記した。用いることのできる酵素活性毒素及びその断片は、ジフテリアA鎖、ジフテリア毒素の非結合活性断片、(緑膿菌からの)外毒素A鎖、リシンA鎖、アプリンA鎖、モデクシン(modeccin)A鎖、 α -サルシン、アレウリテス・フォーディ(Aleurites fordii)タンパク質、ジアンチン(dianthin)タンパク質、フィトラカ・アメリカーナ(Phytolacca americana)タンパク質(PAPI、PAPII、及びPAP-S)、モモルディカ・チャランチア(momordica charantia)インヒビター、クルシン(curcun)、クロチン(crotin)、サパオナリア・オフィシナリス(sapaonaria officinalis)インヒビター、ゲロニン(gelonin)、マイトゲリン(mitogellin)、レストリクトシン(restrictocin)、フェノマイシン(phenomycin)、エノマイシン(enomycin)及びトリコテセン(tricothecene)を含む。様々な放射性ヌクレオチドが放射性抱合抗体の生成に利用可能である。例として、212Bi、131I、131In、90Y及び186Reを含む。抗体及び細胞毒性薬の複合体は、種々の二官能性タンパク質カップリング剤、例えば、N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオール)プロピオネート(SPDP)、イミノチオラン(IT)、イミドエステルの二官能性誘導体(ジメチルアジピミデートHCL等)、活性エステル(ジスクシンイミジルスベレート等)、アルデヒド(グルタルアルデヒド等)、ビス-アジド化合物(ビス(p-アジドベンゾイル)ヘキサンジアミン等)、ビス-ジアゾニウム誘導体(ビス-(p-ジアゾニウムベンゾイル)-エチレンジアミン等)、ジイソシアネート(トリエン2, 6-ジイソシアネート等)、及びビス-活性フッ素化合物(1, 5-ジフルオロ-2, 4-ジニトロベンゼン等)を用いて作成できる。例えば、リシン免疫毒素は、Vitetta等, Science 238: 1098 (1987)に記載されたように調製することができる。カーボン-14-標識1-イソチオシアナトベンジル-3-メチルジエチレントリアミン五酢酸(MX-DTPA)は、放射性ヌクレオチドの抗体への抱合のためのキレート剤の例である。WO 94/11026参照。

20

30

40

他の実施態様では、腫瘍の予備標的化で使用するために、抗体は「レセプター」(ストレプトアビジン等)に抱合されてもよく、抗体-レセプター複合体は患者に投与され、次いで清澄化剤を用いて未結合複合体を循環から除去し、次に細胞毒性薬(例えば、放射性ヌクレオチド等)に抱合された「リガンド」(アビジン等)を投与する。

【0140】

8. 免疫リポソーム

また、ここに開示する抗体は、免疫リポソームとして調製してもよい。抗体を含むリポソームは、Epstein等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 3688 (1985); Hwang等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 4030 (1980); 及び米国特許第4,485,045号及び第4,544,545

50

号に記載されたような、この分野で知られた方法で調製される。向上した循環時間を持つリポソームは、米国特許第5,013,556号に開示されている。

特に有用なリポソームは、ホスファチジルコリン、コレステロール及びPEG-誘導ホスファチジルエタノールアミン(PEG-PE)を含む脂質組成物での逆相蒸発法によって生成される。リポソームは、所定サイズのフィルターを通して押し出され、所望の径を有するリポソームが生成される。本発明の抗体のFab'断片は、Martin等, J. Biol. Chem. 257: 286-288 (1982)に記載されているように、ジスルフィド交換反応を介してリポソームに抱合され得る。化学治療薬(ドキシソルピシン等)は、場合によってはリポソーム内に包含される。Gabizon等, J. National Cancer Inst. 81(19) 1484 (1989)参照。

【0141】

10

9. 抗体の製薬組成物

ここで同定されるPROポリペプチドに特異的に結合する抗体、並びに上記に開示したスクリーニングアッセイで同定された他の分子は、種々の疾患の治療のために、製薬組成物の形態で投与することができる。

PROポリペプチドが細胞内であり、全抗体が阻害剤として用いられる場合、内在化抗体が好ましい。しかし、リポフェクション又はリポソームも抗体、又は抗体断片を細胞に導入するのに使用できる。抗体断片が用いられる場合、標的タンパク質の結合ドメインに特異的に結合する最小阻害断片が好ましい。例えば、抗体の可変領域配列に基づいて、標的タンパク質配列に結合する能力を保持したペプチド分子が設計できる。このようなペプチドは、化学的に合成でき、及び/又は組換えDNA技術によって生成できる。例えば、Marasco等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 7889-7893 (1993)参照。ここでの製剤は、治療すべき特定の徴候に必要な場合に1以上の活性化化合物、好ましくは互いに悪影響を及ぼさない相補的活性を持つものも含んでよい。あるいは、又はそれに加えて、組成物は、細胞毒性薬、サイトカイン、化学治療薬又は成長阻害剤を含んでもよい。これらの分子は、適切には、意図する目的に有効な量の組み合わせで存在する。

20

また、活性成分は、例えばコアセルベーション技術により又は界面重合により調製されたマイクロカプセル、例えば、各々ヒドロキシメチルセルロース又はゼラチン-マイクロカプセル及びポリ(メタクリル酸メチル)マイクロカプセル中、コロイド状薬物送達系(例えば、リポソーム、アルブミン小球、マイクロエマルジョン、ナノ粒子及びナノカプセル)中、又はマイクロエマルジョン中に包括されていてもよい。これらの技術は上掲のRemington's Pharmaceutical Scienceに開示されている。

30

【0142】

インビボ投与に使用される製剤は無菌でなければならない。これは、滅菌濾過膜を通じた濾過により容易に達成される。

徐放性製剤を調製してもよい。徐放性製剤の好適な例は、抗体を含有する固体疎水性ポリマーの半透性マトリクスを含み、このマトリクスは成形された物品、例えばフィルム、又はマイクロカプセルの形状である。徐放性マトリクスの例は、ポリエステル、ヒドロゲル(例えば、ポリ(2-ヒドロキシエチル-メタクリレート)、又はポリ(ビニルアルコール))、ポリアクチド(米国特許第3,773,919号)、L-グルタミン酸及びγ-エチル-L-グルタメートのコポリマー、非分解性エチレン-酢酸ビニル、LUPRON DEPOT^{T M}(乳酸-グリコール酸コポリマーと酢酸リュプロリドの注射可能な小球)などの分解性乳酸-グリコール酸コポリマー、及びポリ-D-(-)-3-ヒドロキシブチル酸を含む。エチレン-酢酸ビニル及び乳酸-グリコール酸などのポリマーは分子を100日に渡って放出することができるが、ある種のヒドロゲルはより短時間でタンパク質を放出してしまう。カプセル化された抗体が身体内に長時間残ると、それらは37%の水分に露出されることにより変性又は凝集し、その結果、生物学的活性の低下及び起こりうる免疫原性の変化をもたらす。合理的な方法は、含まれる機構に依存する安定化について工夫することができる。例えば、凝集機構がチオ-ジスルフィド交換を通じた分子間S-S結合形成であると発見された場合、安定化はスルフヒドリル残基の修飾、酸性溶液からの凍結乾燥、水分含有量の制御、適切な添加剤の付加、及び特異的ポリマーマトリクス組成物の開発によって達成されうる。

40

50

【 0 1 4 3 】

G . 抗 - P R O 抗体の用途

本発明の抗 - P R O 抗体は様々な有用性を有している。例えば、抗 - P R O 抗体は、P R O の診断アッセイ、例えばその特定細胞、組織、又は血清での発現の検出に用いられる。競合的結合アッセイ、直接又は間接サンドウィッチアッセイ及び不均一又は均一相で行われる免疫沈降アッセイ [Zola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, CRC P r e s s, I n c. (1987) p p. 147-158] 等のこの分野で知られた種々の診断アッセイ技術が使用される。診断アッセイで用いられる抗体は、検出可能な部位で標識される。検出可能な部位は、直接又は間接に、検出可能なシグナルを発生しなければならない。例えば、検出可能な部位は、³H、¹⁴C、³²P、³⁵S又は¹²⁵I等の放射性同位体、フルオレ 10
セインイソチオシアネート、ローダミン又はルシフェリン等の蛍光又は化学発光化合物、あるいはアルカリホスファターゼ、ベータ-ガラクトシダーゼ又はセイヨウワサビペルオキシダーゼ等の酵素であってよい。抗体に検出可能な部位を結合させるためにこの分野で知られた任意の方法が用いられ、それにはHunter等 Nature, 144:945 (1962); David等, Biochemistry, 13: 1014 (1974); Pain等, J. Immunol. Meth., 40:219 (1981); 及びNygren, J. Histochem. and Cytochem., 30:407 (1982)に記載された方法が含まれる。

また、抗 - P R O 抗体は組換え細胞培養又は天然供給源からのP R Oのアフィニティー精製にも有用である。この方法においては、P R Oに対する抗体を、当該分野でよく知られている方法を使用して、セファデックス樹脂や濾紙のような適当な支持体に固定化する。次に、固定化された抗体を、精製するP R Oを含む試料と接触させた後、固定化された 20
抗体に結合したP R O以外の試料中の物質を実質的に全て除去する適当な溶媒で支持体を洗淨する。最後に、P R Oを抗体から脱離させる他の適当な溶媒で支持体を洗淨する。

以下の実施例は例示目的でのみ提供されるものであって、本発明の範囲を決して限定することを意図するものではない。

本明細書で引用した全ての特許及び参考文献の全体を、出典明示によりここに取り込む。

【 0 1 4 4 】

(実施例)

実施例で言及されている全ての市販試薬は、特に示さない限りは製造者の使用説明に従い使用した。A T C C登録番号により以下の実施例及び明細書全体を通して同定されている細胞の供給源はバージニア州マナッサスのアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションである。 30

【 0 1 4 5 】

実施例 1 : 新規なポリペプチド及びそれをコードするc D N Aを同定するための細胞外ドメイン相同性スクリーニング

Swiss-Prot公的データベースからの約950の既知の分泌タンパク質からの細胞外ドメイン(E C D)配列(あれば、分泌シグナル配列を含む)を、E S Tデータベースの検索に使用した。E S Tデータベースは、公的データベース(例えば、Dayhoff、GenBank)及び企業のデータベース(例えば、LIFESEQ^{T M}、Incyte Pharmaceuticals、Palo Alto, CA)を含む。検索は、コンピュータプログラムBLAST又はBLAST-2(Altschul等, Methods in Enzymology 266: 460-480 (1996))を用いて、E C Dタンパク質配列のE S T配列の6フレーム翻訳との比較として実施した。既知のタンパク質をコードせず、BLASTスコア70(90の場合もある)又はそれ以上を持つ比較物は、プログラム「phrap」(Phil Green, University of Washington, Seattle, WA)で集団化してコンセンサスD N A配列に構築した。 40

この細胞外ドメイン相同性スクリーニングを用いて、phrapを用いて他の同定されたE S T配列に対してコンセンサスD N A配列を構築した。さらに、得られたコンセンサスD N A配列を、しばしば(常にではない)BLAST又はBLAST-2及びphrapの繰り返しサイクルを用いて伸長し、コンセンサス配列を上で議論したE S T配列の供給源を用いて可能な限り伸長させた。

上記のように得られたコンセンサス配列に基づいて、オリゴヌクレオチドをついで合成 50

し、PCRにより関心ある配列を含むcDNAライブラリーを同定するため、及びPROポリペプチドの全長コード配列のクローンを単離するプローブとして用いるために使用した。正方向及び逆方向PCRプライマーは一般的に20から30ヌクレオチドの範囲であり、しばしば約100-1000bp長のPCR産物を与えるために設計される。プローブ配列は、典型的に40-55bp長である。或る場合には、コンセンサス配列が約1-1.5kbpより大きいときに付加的なオリゴヌクレオチドが合成される。全長クローンについて幾つかのライブラリーをスクリーニングするために、ライブラリーからのDNAを、Ausubel等、Current Protocols in Molecular Biologyに従って、PCRプライマー対でのPCRによりスクリーニングした。ポジティブライブラリーを、次いで、プローブオリゴヌクレオチド及びプライマー対の一方を用いて関心ある遺伝子をコードするクローンの単離に使用した。 10

cDNAクローンの単離に用いたcDNAライブラリーは、Invitrogen, San Diego, CAからのもの等の市販試薬を用いて標準的な方法によって作成した。cDNAは、NotI部位を含むオリゴdTでプライムし、平滑末端でSalIヘミキナーゼアダプターに結合させ、NotIで切断し、ゲル電気泳動で適切にサイズ分類し、そして適切なクローニングベクター(pRK5B又はpRK5D等；pRK5BはSfiI部位を含まないpRK5Dの前駆体である；Holmes等、Science, 253: 1278-1280 (1991)参照)に、独特のXhoI及びNotI部位において、所定の方向でクローニングした。

【0146】

実施例2：アミラーゼスクリーニングによるcDNAクローンの単離 20

1．オリゴdTプライムcDNAライブラリーの調製

mRNAを関心あるヒト組織からInvitrogen, San Diego, CAからの試薬及びプロトコールを用いて単離した(Fast Track 2)。このRNAを、Life Technologies, Gaithersburg, MD (Super Script Plasmid System)からの試薬及びプロトコールを用いるベクターpRK5DにおけるオリゴdTプライムしたcDNAの生成に使用した。この方法において、二本鎖cDNAは1000bpを越えるサイズ分類し、SalI/NotI結合cDNAをXhoI/NotI切断ベクターにクローニングした。pRK5Dを、sp6転写開始部位、それに続くSfiI制限酵素部位、さらにXhoI/NotIcDNAクローニング部位を持つベクターにクローニングした。

【0147】

2．ランダムプライムcDNAライブラリーの調製

一次cDNAクローンの5'末端を好ましく表現するために二次cDNAライブラリーを作成した。sp6RNAを(上記の)一次ライブラリーから生成し、このRNAを、ベクターpSST-AMY.0におけるLife Technologies (上で参照したSuper Script Plasmid System)からの試薬及びプロトコールを用いたランダムプライムしたcDNAライブラリーの生成に使用した。この方法において、二本鎖cDNAを500-1000bpにサイズ分類し、平滑末端でNotIアダプターに結合させ、SfiI部位で切断し、そしてSfiI/NotI切断ベクターにクローニングした。pSST-AMY.0は、cDNAクローニング部位の前に酵母アルコールデヒドロゲナーゼプロモータ、及びクローニング部位の後にマウスアミラーゼ配列(分泌シグナルを持たない成熟配列)に次いで酵母アルコールデヒドロゲナーゼ転写終結区を有するクローニングベクターである。よって、アミラーゼ配列でフレームに融合するこのベクターにクローニングされたcDNAは、適当に形質移入された酵母コロニーからのアミラーゼの分泌を導く。 40

【0148】

3．形質転換及び検出

上記の段落2に記載したライブラリーからのDNAを氷上で冷却し、それにエレクトロコンピテントDH10B細菌(Life Technologies、20ml)を添加した。細菌及びベクターの混合物は、次いで製造者に推奨されているように電気穿孔した。次いで、SOC培地(Life Technologies、1ml)を添加し、この混合物を37℃で30分間インキュベートした。形質転換体は、次いでアンピシリンを含む20標準150mmLBプレートに蒔 50

き、16時間インキュベートした(37)。ポジティブコロニーをプレートから廃棄し、細菌ペレットから標準的な方法、例えばCsCl-勾配を用いてDNAを単離した。精製DNAは、次いで以下の酵母プロトコールにのせた。

酵母方法は3つの範疇に分けられる：(1)酵母のプラスミド/cDNA結合ベクターでの形質転換；(2)アミラーゼを分泌する酵母クローンの検出及び単離；及び(3)酵母コロニーから直接的な挿入物のPCR増幅及び配列決定及びさらなる分析のためのDNAの精製。

用いた酵母菌株はHD56-5A(ATCC-90785)であった。この株は以下の遺伝子型：MAT、ura3-52、leu2-3、leu2-112、his3-11、his3-15、MAL+、SUC+、GAL+を有する。好ましくは、不完全な翻訳後経路を持つ酵母変異体を用いることができる。このような変異体は、sec71、sec72、sec62に転位不全対立遺伝子を持つが、切断されたsec71が最も好ましい。あるいは、これらの遺伝子の正常な操作を阻害するアンタゴニスト(アンチセンスヌクレオチド及び/又はリガンドを含む)、この翻訳後経路に含まれる他のタンパク質(例えば、SEC61p、SEC72p、SEC62p、SEC63p、TDJ1p又はSSA1p-4p)又はこれらのタンパク質の複合体形成も、アミラーゼ発現酵母と組み合わせて好ましく用いられる。

形質転換は、Gietz等、Nucl. Acid. Res., 20: 1425 (1992)に概略が記されたプロトコールに基づいて実施された。形質転換細胞は、次いで寒天からYEPD複合培地ブロス(100ml)に播種し、30で終夜成長させた。YEPDブロスは、Kaiser等、Methods in Yeast Genetics, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, p. 207 (1994)に記載されているように調製した。終夜培地は、次いで新鮮なYEPDブロス(500ml)中におよそ 2×10^6 細胞/ml(約OD600 = 0.1)に希釈し、 1×10^7 細胞/ml(約OD600 = 0.4-0.5)まで再成長させた。

【0149】

次いで細胞を収穫し、5,000rpmで5分間のSorval GS3ローターのGS3ローターボトルに移し、上清を捨て、次いで無菌水に再懸濁することにより形質転換のために調製し、そして50mlのファルコン管内で、Beckman GS-6KR遠心機において3,500rpmで再度遠心分離した。上清を捨て、細胞をLiAc/TE(10ml, 10mMのトリス-HCl, 1mMのEDTA pH 7.5, 100mMのLi2OOCCH3)で続けて洗浄し、LiAc/TE(2.5ml)中に再懸濁させた。

形質転換は、マイクロチューブ内で、調製した細胞(100 μ l)を新鮮な変性一本鎖サケ精子DNA(Lofstrand Labs, Gaithersburg, MD)及び形質転換DNA(1 μ g vol.<10 μ l)と混合することにより起こした。混合物はボルテックスにより簡単に混合し、次いで40%PEG/TE(600 μ l, 40%のポリエチレングリコール-4000, 10mMのトリス-HCl, 1mMのEDTA, 100mMのLi2OOCCH3, pH 7.5)を添加した。この混合物を緩く攪拌し、30分間攪拌しながら30でインキュベートした。次いで細胞に42で15分間熱衝撃を与え、反応容器をマイクロチューブ内で12,000rpmで5-10秒間遠心分離し、デカント及びTE(500 μ l, 10mMのトリス-HCl, 1mMのEDTA pH 7.5)への再懸濁に次いで遠心分離した。次いで、細胞をTE(1ml)中に希釈し、アリコート(200 μ l)を150mm成長プレート(VWR)に予め調製した選択培地に拡げた。

あるいは、複数の少量反応の代わりに、形質転換を1回の大規模反応で実施したが、試薬の量はしかるべくスケールアップした。

用いた選択培地は、Kaiser等、Methods in Yeast Genetics, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, p. 208-210 (1994)に記載されているように調製したウラシルを欠く合成完全デキストロス寒天(SCD-Ura)であった。形質転換体は30で2-3日成長させた。

アミラーゼを分泌するコロニーの検出は、選択成長培地における赤色デンブンの包含により実施した。Biely等、Anal. Biochem., 172: 176-179 (1988)に記載された方法に従って、デンブンを赤色染料(反応性 Red-120, Sigma)に結合させた。結合したデンブンをS

10

20

30

40

50

C D - U r a 寒天プレートに最終濃度0.15%(w/v)で導入し、リン酸カリウムでpH 7.0に緩衝した(最終濃度50-100mM)。

ポジティブコロニーを拾って新鮮な選択培地(150mmプレート)に画線し、良好に単離され同定可能な単一コロニーを得た。アミラーゼ分泌についてポジティブな良好に単離された単一コロニーは、緩衝S C D - U r a 寒天への赤色デンプンの直接導入により検出した。ポジティブコロニーは、デンプンを分解して、ポジティブコロニーの周囲に直接目視できる量を形成する能力により決定した。

【0150】

4. P C R 増幅によるD N A の単離

ポジティブコロニーが単離された場合、その一部を楊枝で拾い、96ウェルプレートにおいて無菌水(30 μ l)に希釈した。この時点で、ポジティブコロニーは凍結して次の分析のために保存するか、即座に増幅するかのいずれかである。細胞のアリコート(5 μ l)を、0.5 μ lのKlentaq(Clontech, Palo Alto, CA); 4.0 μ lの10mM dNTP(Perkin Elmer-Cetus); 2.5 μ lのKentaqバッファー(Clontech); 0.25 μ lの正方向オリゴ1; 0.25 μ lの逆方向オリゴ2; 12.5 μ lの蒸留水を含む25 μ l容量におけるP C R 反応のテンプレートとして使用した。正方向オリゴヌクレオチド1の配列は:

5' - TGAAAAACGACGGCCAGTTAAATAGACCTGCAATTATTAATCT-3' (配列番号: 1)であった。

逆方向オリゴヌクレオチド2の配列は:

5' - CAGGAAACAGCTATGACCACCTGCACACCTGCAAATCCATT-3' (配列番号: 2)

であった。

次いで、P C R は以下の通り実施した:

- | | | | | | |
|---------------|------|----|---|------|----|
| a . | 変性 | 92 | 、 | 5分間 | |
| b . 3 サイクル: | 変性 | 92 | 、 | 30秒間 | |
| | アニール | 59 | 、 | 30秒間 | |
| | 伸長 | 72 | 、 | 60秒間 | |
| c . 3 サイクル: | 変性 | 92 | 、 | 30秒間 | |
| | アニール | 57 | 、 | 30秒間 | |
| | 伸長 | 72 | 、 | 60秒間 | |
| d . 2 5 サイクル: | 変性 | 92 | 、 | 30秒間 | |
| | アニール | 55 | 、 | 30秒間 | 30 |
| | 伸長 | 72 | 、 | 60秒間 | |
| e . | 保持 | 4 | | | |

オリゴヌクレオチドの下線を施した領域は、各々A D H プロモーター領域及びアミラーゼ領域にアニーリングされ、挿入物が存在しない場合はベクターp S S T - A M Y . 0 からの307bp領域を増幅する。典型的には、これらのオリゴヌクレオチドの5'末端の最初の18ヌクレオチドは、配列プライマーのアニーリング部位を含んでいた。即ち、空のベクターからのP C R 反応の全生成物は343bpであった。しかしながら、シグナル配列融合c D N A は、かなり長いヌクレオチド配列をもたらした。

P C R に続いて、反応のアリコート(5 μ l)を、上掲のSambrook等に記載されたように1%アガロースゲル中でトリス-ボレート-EDTA(TBE)緩衝系を用いたアガロースゲル電気泳動により試験した。400bpより大きな単一で強いP C R 産物をもたらすクローンを、96 Qiaquick PCR 清浄化カラム(Qiagen Inc., Chatsworth, CA)での精製の後にD N A 配列によりさらに分析した。

【0151】

実施例3: シグナルアルゴリズム分析を用いたc D N A クローンの単離

種々のポリペプチド-コード化核酸配列は、ジェネンテック、インク(South San Francisco, CA)によって開発された独自の配列発見アルゴリズムを、公的(例えば、GenBank)及び/又は個人的(LIFESEQ(登録商標), Incyte Pharmaceuticals, Inc., Palo Alto, CA)データベースからのE S T s 並びに集団化及び組み立てられたE S T 断片に適用することにより同定した。シグナル配列アルゴリズムは、考慮している配列又は配列断片の5'-末端の

第1の、場合によっては第2のメチオニンコドン(ATG)を取り囲むDNAヌクレオチドの文字に基づく分泌シグナルスコアを計算する。第1のATGに続くヌクレオチドは、停止コドンを持たない少なくとも35の不明瞭でないアミノ酸をコードしなければならない。第1のATGが必要なアミノ酸を有する場合、第2のものは試験しない。何れも要件を満たさない場合、候補配列にスコアをつけなかった。EST配列が真正のシグナル配列を含むか否かを決定するために、ATGコドンを取り囲むDNA及び対応するアミノ酸配列を、分泌シグナルに関連することが知られた7つのセンサー(評価パラメータ)の組を用いてスコアをつけた。このアルゴリズムの使用により、多くのポリペプチド-コード化核酸配列の同定がなされた。

【0152】

実施例4：PRO196をコードするcDNAクローンの単離

PRO196を、コンピュータプログラムBLAST(Altschul等, Methods in Enzymology 266: 460-480 (1996))を用いて、GenBankデータベースをスクリーニングすることにより同定した。PRO196配列は公知の発現配列タグ(EST)配列T35448、T11442、及びW77823との相同性を示す。公知のEST配列のいずれも全長配列として同定されているものはなく、又はTIEレセプターと結合するリガンドとして記載されているものもない。

その同定に続いて、NL1を、製造者の支持に従って、Clontech, Inc(Palo Alto, CA, USA)、カタログ#6528-1から購入したmRNAから作製されたヒト胎児肺ライブラリーからクローニングした。ライブラリーを、GenBankデータベースに見いだされたESTに基づき、合成オリゴヌクレオチドプローブを用いたハイブリッド形成によりスクリーニングした；

(a) 5'-GCTGACGAACCAAGGCAACTACAACTCCTGGT-3'(配列番号：5)；

(b) 5'-TGCGGCCGGACCAGTCCATGGTCACCAGGAGTTTGTAG-3'(配列番号：6)；

(c) 5'-GGTGGTGAAGTCTTGCCTTGTGCCATGTA-3'(配列番号：7)

PRO196のヌクレオチドとアミノ酸配列を図1(配列番号：3)と図2(配列番号：4)にそれぞれ示す。PRO196はTIE1及びTIE2リガンドと有意な配列同一性を示す。

PRO196のクローンはアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション、10801ユニバーシティ・ブルーバード、マナッサス、ヴァージニア20110-2209、米国(ATCC)に、1997年9月18日に、ブタベスト条約の条項に従って寄託し、寄託番号209280が付与された。

【0153】

実施例5：ヒトPRO444をコードするcDNAクローンの単離

上記の実施例2に記載したように、アミラーゼスクリーニングにおいて単離されたcDNA配列をDNA13121と命名した。この配列に基づいてオリゴヌクレオチドプローブを作成し、上記実施例2の paragraph 1に記載したようにして調製したヒト胎児肺ライブラリー(LIB25)のスクリーニングに使用した。クローニングベクターはpRK5Bであり(pRK5BはSfiI部位を含まないpRK5Dの前駆体である；Holmes等, Science, 253: 1278-1280 (1991)を参照)、切断されたcDNAサイズは2800bp未満であった。

全長クローンが同定され、それは単一のオープンリーディングフレームを含み、ヌクレオチド位置608-610に見かけの翻訳開始部位を持ち、そしてヌクレオチド位置959-961の停止コドンで終端する(図3；配列番号：8)。予測されるポリペプチド前駆体は117アミノ酸長であり、約12,692の計算された分子量及び約7.50の見積もられたpIを有する。図4(配列番号：9)に示した全長PRO444配列の分析は、アミノ酸1から約アミノ酸16にシグナルペプチドの存在を証明した。Dayhoffデータベース(バージョン35.45 SwissProt 35)の分析により、PRO444アミノ酸配列と以下のDayhoff配列：CEF44D12_8, P_R88452, YNE1_CAEEL, A47312, AF009957_1,及びA_06133_1との間の相同性が証明された。

クローンDNA26846-1397は1998年10月27日にATCCに寄託され

10

20

30

40

50

、ATCC 寄託番号 203406 が付された。

【0154】

実施例 6：ヒト PRO183、PRO185、PRO9940、PRO2630 及び PRO6309 をコードする cDNA クローンの単離

添付した図に示す PRO183、PRO185、PRO9940、PRO2630 及び PRO6309 ポリペプチドをコードする DNA 分子は GenBank から得られた。

【0155】

実施例 7：ヒト PRO210 及び PRO217 をコードする cDNA クローンの単離

上記の実施例 1 に記載したように phrap を使用してコンセンサス DNA 配列を組み立てた。いくつかのケースにおいて、このコンセンサス配列を blast 及び phrap の繰り返しサイクルを用いて伸長させ、上記の EST 配列の供給源を用いてコンセンサス配列をできるだけ伸長させた。このコンセンサス配列に基づいて、1) PCR により関心ある配列を含む cDNA ライブラリーを同定するため、及び 2) 全長コード化配列のクローンを単離するプローブとして使用するために、オリゴヌクレオチドを合成した。DNA 32279-1131 を単離するために使用されるライブラリーは胎児腎臓であった。

cDNA クローンは全体を配列決定した。DNA 32279-1131 の全ヌクレオチド配列を図 9 (配列番号：14) に示し、PRO210 のアミノ酸配列を図 10 (配列番号：15) に示す。DNA 33094-1131 の全ヌクレオチド配列を図 13 (配列番号：21) に示し、PRO217 のアミノ酸配列を図 14 (配列番号：22) に示す。

【0156】

実施例 8：ヒト 215 をコードする cDNA クローンの単離

上記の実施例 1 に記載したようにコンセンサス DNA 配列を他の EST 配列に対して構築し、このコンセンサス配列を DNA 28748 と命名した。DNA 28748 コンセンサス配列に基づいて、PCR により関心ある配列を含む cDNA ライブラリーを同定するため、及び PRO215 の全長コード化配列のクローンを単離するプローブとして使用するために、オリゴヌクレオチドを合成した。

PCR プライマー対 (正及び逆) を合成した：

正方向 PCR プライマー：5'-GTGGCTGGCACACAATGAGATC-3' (配列番号：18)；及び

逆方向 PCR プライマー：5'-CCAATGTGTGCAAGCGGTTGTG-3' (配列番号：19)

さらに、合成オリゴヌクレオチドハイブリッド形成プローブは、以下のヌクレオチド配列を持つコンセンサス DNA 28748 配列から作成した。

ハイブリッド形成プローブ：

5'-TCAAGAGCCTGGACCTCAGCCACAATCTCATCTCTGACTTTGCCTGGAGC-3' (配列番号：20)。

全長クローンの供給源について幾つかのライブラリーをスクリーニングするために、ライブラリーからの DNA を上述で同定した PCR プライマー対で PCR 増幅することによりスクリーニングした。次いで、ポジティブライブラリーを、プローブオリゴヌクレオチド及び PCR プライマーの一方を用いて PRO215 遺伝子をコードするクローンを単離するのに使用した。

cDNA ライブラリー作成のための RNA はヒト胎児肺組織から単離した。cDNA クローンの単離に用いた cDNA ライブラリーは、Invitrogen, San Diego, CA からのものである。市販試薬を用いて標準的な方法によって作成した。cDNA は、Not I 部位を含むオリゴ dT でプライムし、平滑末端で Sal I ヘミキナーゼアダプターに結合させ、Not I で切断し、ゲル電気泳動でおよそのサイズ分類し、そして適切なクローニングベクター (pRKB 又は pRK5D 等；pRK5B は Sfi I 部位を含まない pRK5D の前駆体である；Holmes 等, Science, 253: 1278-1280 (1991) 参照) に、独特の Xho I 及び Not I 部位において、所定の方向でクローニングした。

上述のようにして単離されたクローンの DNA 配列決定により、ここで DNA 32288-1132 と命名された PRO215 の全長 DNA 配列及び PRO215 の誘導タンパク質配列が得られた。

DNA 32288-1132 の全ヌクレオチド配列を図 11 (配列番号：16) に示す。

クローンDNA 32288-1132は、単一のオープンリーディングフレームを含み、ヌクレオチド位置308-310に見かけの翻訳開始部位を持ち、そしてヌクレオチド位置1591-1593の停止コドンで終端する(図11、開始及び停止コドンを丸で囲んだ)。予測されるポリペプチド前駆体は428アミノ酸長である(図12)。クローンDNA 32288-1132はATCCに寄託され、ATCC寄託番号209261が付された。

全長PRO215のアミノ酸配列の分析により、それが、ロイシンリッチ反復タンパク質とSLITタンパク質を含む、ロイシンリッチ反復タンパク質スーパーファミリーのメンバーと相同性を有することが示された。

【0157】

実施例9：ヒトPRO242をコードするcDNAクローンの単離

発現配列タグ(EST)DNAデータベース(LIFESEQTM, Incyte Pharmaceuticals, Palo Alto, CA)を検索して、ケモカインと相同性を示したESTを同定した。この配列に基づき、関心ある配列を含むcDNAライブラリーをPCRにより同定するために、またPRO242に対する全長コード配列のクローンを単離するためのプローブとしての使用のために、オリゴヌクレオチドを合成した。

PCRプライマー対(正方向及び逆方向)を合成した：

正方向PCRプライマー 5'-GGATCAGGCAGGAGGAGTTTGGG-3'(配列番号：25)

逆方向PCRプライマー 5'-GGATGGGTACAGACTTTCTTGCC-3'(配列番号：26)

さらに、合成オリゴヌクレオチドハイブリッド形成プローブは、次のヌクレオチド配列

ハイブリッド形成プローブ

5'-ATGATGGGCCTCTCCTTGGCCTCTGCTGTGCTCCTGGCCTCCCTCCTGAG-3'(配列番号：27)

を持つコンセンサスDNA 28709配列から作成した。

全長クローンの供給源に対して数種のライブラリーをスクリーニングするために、ライブラリーからのDNAを、上述で同定したPCRプライマー対でのPCR増幅によりスクリーニングした。次いで、ポジティブライブラリーを、プローブオリゴヌクレオチド及びPCRプライマーの一方を用いてPRO242遺伝子をコードするクローンを単離するために使用した。

cDNAライブラリーの作成のためのRNAはヒト胎児肺組織から単離された。cDNAクローンは全体を配列決定した。DNA 33785-1143の全ヌクレオチド配列を図15(配列番号：23)に示す。クローンDNA 33785-1143は単一のオープンリーディングフレームを含み、ヌクレオチド位置333-335に見かけの翻訳開始部位を持ち、ヌクレオチド位置615-617の停止コドンで終端する(図16；配列番号：24)。予測されるポリペプチド前駆体は94アミノ酸長である(図16)。

全長配列の(ALIGNコンピュータプログラムを用いた)BLAST及びFastA配列アラインメント分析に基づき、PRO242は、ヒトマクロファージ炎症性タンパク質1-アルファ、ウサギマクロファージ炎症性タンパク質1-ベータ、ヒトLD78及びウサギ免疫活性化遺伝子2とのアミノ酸配列同一性を示した。

【0158】

実施例10：ヒトPRO288をコードするcDNAクローンの単離

DcR1 ECD [Sheridanら, 上掲]をコードし、以下の配列：

5'-CATAAAAGTTCCTGCACCATGACCAGAGACACAGTGTGTCAGTGTAAGA-3'(配列番号：30)

を有する配列に基づく合成プローブを使用し、ヒト胎児肺cDNAライブラリーをスクリーニングした。cDNAライブラリーを作製するために、mRNAをヒト胎児肺組織からInvitrogen, San Diego, CAからの試薬及びプロトコールを用いて単離した(Fast Track 2)。このRNAを、Life Technologies, Gaithersburg, MD (Super Script Plasmid system)からの試薬及びプロトコールを用いるベクターpRK5DにおけるオリゴdTプライムしたcDNAの生成に使用した。この方法において、二本鎖cDNAは1000bpを超えるサイズ分類し、SalI/NotI結合cDNAをXhoI/NotI切断ベクター

10

20

30

40

50

にクローニングした。p R K 5 Dを、s p 6 転写開始部位、それに続くS f i I制限酵素部位、さらにX h o I / N o t I c D N Aクローニング部位を持つベクターにクローニングした。

全長クローンを同定し(D N A 3 5 6 6 3 - 1 1 2 9)、これは、単一のオープンリーディングフレームを含み、ヌクレオチド位置1 5 7 - 1 5 9に見かけの翻訳開始部位を持ち、ヌクレオチド位置1 3 1 5 - 1 3 1 7に見出される停止コドンで終端する(図1 7 ; 配列番号 : 2 8)。このクローンはp R K 5 - 3 5 6 6 3と称され、A T C C番号2 0 9 2 0 1として寄託されている。

予測されるポリペプチド前駆体は3 8 6アミノ酸長であり、約4 1 . 8 k D aの算定分子量を有する。配列の解析により、N末端シグナルペプチド(アミノ酸1 - 5 5)、続いてE C D(アミノ酸5 6 - 2 1 2)、膜貫通ドメイン(アミノ酸2 1 3 - 2 3 2)及び細胞内領域(アミノ酸2 3 3 - 3 8 6)が示された(図1 8)。シグナルペプチド切断部位は、P R O 2 8 8 E C DイムノアドヘシンのN末端タンパク質配列分析により確認した(図示せず)。この構造は、P R O 2 8 8がI型の膜貫通タンパク質であることを示唆している。P R O 2 8 8は、アミノ酸位置1 2 7、1 7 1及び1 8 2に3つの潜在的N結合グリコシル化部位を含む(図1 8)。

T N Fレセプターファミリータンパク質は、典型的には、その細胞外領域における複数(通常は4つ)のシステインリッチドメインの存在によって特徴付けられ、各システインリッチドメインは約4 5アミノ酸長であり、約6つの規則的に離間したシステイン残基を含む。I型T N Fレセプターの結晶構造に基づいて、各ドメインのシステインは3つのジスルフィド結合を形成するが、通常は、システイン1と2、3と5、及び4と6とが結合する。D R 4、D R 5及びD c R 1と同様に、P R O 2 8 8は2つの細胞外のシステインリッチシュードリピート(pseudorepeat)を含むが、他の同定された哺乳動物T N F Rファミリーのメンバーは、そのようなドメインを3つ又はそれ以上含んでいる[Smithら, Cell, 76:959 (1994)]。

図1 8(配列番号 : 2 9)に示すP R O 2 8 8配列のアライメント分析に基づくと、P R O 2 8 8は、他のアポトーシス関連レセプター、例えばT N F R 1、F a s / A p o - 1又はD R 3よりも、D R 4、D R 5又はD c R 1のE C Dに対して高い配列同一性を示した。予想されたP R O 2 8 8の細胞内配列も、T N F R 1、F a s又はD R 3に比較して、D R 4又はD R 5の対応する領域に対して高い相同性を示す。P R O 2 8 8の細胞内領域は、D R 4又はD R 5について同定された細胞内領域より約5 0残基短い。現在、P R O 2 8 8は、切断死亡ドメイン(アミノ酸3 4 0 - 3 6 4)を含み、それはD R 4又はD R 5の死亡ドメイン配列のカルボキシ末端部分に相当すると信じられている。T N F R 1によるシグナル伝達に必要であり[Tartagliaら, 上掲]、そしてD R 4及びD R 5に保持又は半保持されている6アミノ酸の中の5つが、P R O 2 8 8には存在していない。

【0 1 5 9】

実施例1 1 : ヒトP R O 3 6 5をコードするc D N Aクローンの単離

上記実施例1に記載したようにphrapを用いて他のE S T配列に対してコンセンサスD N A配列を組み立てた。このコンセンサス配列を、ここでD N A 3 5 6 1 3と命名する。D N A 3 5 6 1 3コンセンサス配列に基づいて、1) P C Rにより関心ある配列を含むc D N Aライブラリーを同定するため、及び2) P R O 3 6 5の全長コード配列のクローンを単離するプローブとして使用するために、オリゴヌクレオチドを合成した。

次のように正方向及び逆方向P C Rプライマーを合成した :

正方向P C Rプライマー 5'-GGCTGGCCTGCAGAGATC-3'(配列番号 : 3 3)

正方向P C Rプライマー 5'-AATGTGACCACTGGACTCCC-3'(配列番号 : 3 4)

正方向P C Rプライマー 5'-AGGCTTGGAACTCCCTTC-3'(配列番号 : 3 5)

逆方向P C Rプライマー 5'-AAGATTCTTGAGCGATTCCAGCTG-3'(配列番号 : 3 6)

さらに、以下のヌクレオチド配列を持つ合成オリゴヌクレオチドハイブリッド形成プローブをコンセンサスD N A 3 5 6 1 3配列から作成した。

ハイブリッド形成プローブ

10

20

30

40

50

5'-AATCCCTGCTCTTCATGGTGACCTATGACGACGGAAGCACAAGACTG-3' (配列番号：37)

全長クローンの供給源について幾つかのライブラリーをスクリーニングするために、ライブラリーからのDNAを上で同定したPCRプライマー対の一つでのPCR増幅によりスクリーニングした。次いで、ポジティブライブラリーを、プロブオリゴヌクレオチドとPCRプライマー対の一つを用いてPRO365遺伝子をコードするクローンを単離するのに使用した。cDNAライブラリー作成のためのRNAは、ヒト胎児腎臓組織から単離した。

上記のように単離したクローンのDNA配列決定により、PRO365の全長DNA配列 [ここではDNA46777-1253と命名] (配列番号：31)及びPRO365の誘導タンパク質配列が得られた。

DNA46777-1253の全ヌクレオチド配列を図19 (配列番号：31)に示す。DNA46777-1253は、単一のオープンリーディングフレームを含み、ヌクレオチド位置15-17に見かけの翻訳開始部位を持ち、ヌクレオチド位置720-722の停止コドンで終端する(図19)。予測されるポリペプチド前駆体は235アミノ酸長である(図20)。クローンDNA46777-1253によりコードされるポリペプチド配列の重要な領域が同定され、それは次のものを含む：アミノ酸1-20に対応するシグナルペプチド、及び複数の潜在的なNグリコシル化部位。クローンDNA46777-1253はATCCに寄託され、ATCC寄託番号209619が付与された。

全長PRO365ポリペプチドのアミノ酸配列の分析により、その部分がヒト2-19プロテインと有意な相同性を有していることが示唆され、PRO365が新規なヒト2-19プロテイン相同体であることを示している。

【0160】

実施例12：ヒトPRO1361をコードするcDNAクローンの単離

上記の実施例3に記載したシグナル配列アルゴリズムの使用により、Incyteクラスター番号10685と命名された、IncyteデータベースからのESTクラスター配列の同定が可能となった。次いでこのESTクラスター配列を、公的ESTデータベース(例えば、GenBank)及び企業のESTDNAデータベース(LIFESEQ(商品名)、Incyte Pharmaceutical s, Palo Alto, CA)を含む種々の発現配列タグ(EST)データベースと比較して、存在する相同性を同定した。相同体検索は、コンピュータプログラムBLAST又はBLAST2(Altschul等, Methods in Enzymology 266: 460-480 (1996))を用いて実施した。既知のタンパク質をコードせず、BLASTスコア70(90の場合もある)又はそれ以上を持つ比較物は、プログラム「phrap」(Phil Green, University of Washington, Seattle, Washington)で集団化してコンセンサスDNA配列を構築した。そこから得られたコンセンサス配列をここでDNA58839と命名する。

DNA58839配列とIncyteESTクローン番号2967927内に含まれるEST配列との間の配列相同性に鑑みて、IncyteESTクローン番号2967927を購入し、cDNA挿入物を得て配列決定した。このcDNA挿入物の配列を図21に示し、ここでDNA60783-1611と命名する。

クローンDNA60783-1611は単一のオープンリーディングフレームを含み、ヌクレオチド位置142-144に見かけの翻訳開始部位を持ち、そしてヌクレオチド位置1132-1134の停止コドンで終端する(図21)。予測されるポリペプチド前駆体は330アミノ酸長である(図22)。図22に示す全長PRO1361タンパク質は、約36,840ダルトンの算定分子量と約4.84のpIを有する。図22(配列番号：39)に示した全長PRO1361配列の分析は、以下のものの存在を明らかにした：約アミノ酸1~約アミノ酸23のシグナルペプチド、約アミノ酸266~約アミノ酸284の膜貫通ドメイン、約アミノ酸155~約アミノ酸176のロイシンジッパーパターン配列、及び約アミノ酸46~約アミノ酸49、約アミノ酸64~約アミノ酸67、約アミノ酸166~約アミノ酸169及び約アミノ酸191~約アミノ酸194の潜在的N-グリコシル化部位。クローンDNA60783-1611は1998年8月18日にATCCに寄託され、ATCC寄託番号203130が付された。

10

20

30

40

50

図 2 2 (配列番号 : 3 9) に示す全長配列の WU-BLAST2 配列アラインメント分析を使用する Dayhoff データベース (バージョン 35.45 SwissProt 35) の分析により、P R O 1 3 6 1 アミノ酸配列と以下の Dayhoff 配列 : I50620、G64876、PMCMMSG102B_2MSG104、HUMIGLVXY_1 及び PH1370 との間の有意な相同性が明らかになった。

【 0 1 6 1 】

実施例 1 3 : ヒト P R O 1 3 0 8 をコードする c D N A クローンの単離

上記実施例 1 に記載したように phrap を用いて他の E S T 配列に対してコンセンサス D N A 配列を組み立てた。コンセンサス配列を、BLAST と phrap の繰り返しサイクルを用いて伸長し、コンセンサス配列を上で議論した E S T 配列の供給源を用いて可能な限り伸長させた。伸長させたコンセンサス配列を、ここで「D N A 3 5 7 2 6」と命名する。D N A 3 5 7 2 6 コンセンサス配列に基づいて、1) P C R により関心ある配列を含む c D N A ライブラリーを同定するため、及び 2) P R O 1 3 0 8 の全長コード配列のクローンを単離するプローブとして使用するために、オリゴヌクレオチドを合成した。

10

次のプライマー (正方向及び逆方向) を合成した :

正方向 P C R プライマー

5'-TCCTGTGAGCACGTGGTGTG-3' (配列番号 : 4 2)
 5'-GGGTGGGATAGACCTGCG-3' (配列番号 : 4 3)
 5'-AAGGCCAAGAAGGCTGCC-3' (配列番号 : 4 4) ; 及び
 5'-CCAGGCCTGCAGACCCAG-3' (配列番号 : 4 5)

逆方向 P C R プライマー

5'-CTTCCTCAGTCCTTCCAGGATATC-3' (配列番号 : 4 6)
 5'-AAGCTGGATATCCTCCGTGTTGTC-3' (配列番号 : 4 7)
 5'-CCTGAAGAGGCATGACTGCTTTTCTCA-3' (配列番号 : 4 8) ; 及び
 5'-GGGGATAAACCTATTAATTATTGCTAC-3' (配列番号 : 4 9)

20

さらに、以下のヌクレオチド配列を持つ合成オリゴヌクレオチドハイブリッド形成プローブを D N A 3 5 7 2 6 コンセンサス配列から作成した。

ハイブリッド形成プローブ :

5'-AACGTCACCTACATCTCCTCGTGCCACATGCGCCAGGCCACCTG-3' (配列番号 : 5 0)

全長クローンの供給源について幾つかのライブラリーをスクリーニングするために、ライブラリーからの D N A を上で同定した P C R プライマー対での P C R 増幅によりスクリーニングした。次いで、ポジティブライブラリーを、プローブオリゴヌクレオチドと P C R プライマー対の一方を用いて P R O 1 3 0 8 遺伝子をコードするクローンを単離するのに使用した。c D N A ライブラリー作成のための R N A は、ヒト S K - L u - 1 腺癌細胞系から単離した。

30

上記のように単離したクローンの D N A 配列決定により、P R O 1 3 0 8 の全長 D N A 配列 (ここでは D N A 6 2 3 0 6 - 1 5 7 0 と命名 [図 2 3、配列番号 : 4 0] 及び P R O 1 3 0 8 の誘導タンパク質配列が得られた。

P R O 1 3 0 8 の全コード配列を図 2 3 (配列番号 : 4 0) に示す。クローン D N A 6 2 3 0 6 - 1 5 7 0 は単一のオープンリーディングフレームを含み、ヌクレオチド位置 1 7 - 1 9 に見かけの翻訳開始部位、ヌクレオチド位置 8 0 6 - 8 0 8 に停止コドンを持つ。予測されるポリペプチド前駆体は 2 6 3 アミノ酸長である。図 2 4 に示す全長 P R O 1 3 0 8 タンパク質は、約 2 7 , 6 6 3 の算定分子量、及び約 6 . 7 7 の p I を有する。さらなる特徴は、約アミノ酸 1 - 2 0 にシグナルペプチド、約アミノ酸 7 3 - 7 6 及び 2 1 5 - 2 1 8 に潜在的な N - グルコシル化部位、及び約アミノ酸 9 7 - 1 2 9 及び 1 6 9 - 2 0 1 にオステオネクチンと相同性を有する領域を含む。

40

図 2 4 (配列番号 : 4 1) に示す全長配列の WU-BLAST2 配列アラインメント分析を使用する Dayhoff データベース (バージョン 35.45 SwissProt 35) の分析により、P R O 1 3 0 8 アミノ酸配列と以下の Dayhoff 配列 S 5 5 3 6 9 との間の有意な相同性が明らかになった。また、P R O 1 3 0 8 アミノ酸配列と以下の Dayhoff 配列 : FAS_HUMAN、P_R20063、CELT 13C2_1、AGRI_RAT、p_W09406、G01639、SC1_RAT、S60062、S51362、及び IOV_CHICK との間

50

の相同性も明らかになった。

クローンDNA 62306-1570はATCCに寄託され、ATCC寄託番号203254が付与された。

【0162】

実施例14：ヒトPRO1183をコードするcDNAクローンの単離

上記の実施例3に記載したシグナル配列アルゴリズムの使用により、IncyteデータベースからのESTクラスター配列の同定が可能となった。次いでこのESTクラスター配列を、公的ESTデータベース(例えば、GenBank)及び企業のESTDNAデータベース(LIFESEQ(商品名)、Incyte Pharmaceuticals、Palo Alto, CA)を含む種々の発現配列タグ(EST)データベースと比較して、存在する相同性を同定した。相同体検索は、コンピュータプログラムBLAST又はBLAST2(Altschul等, Methods in Enzymology 266: 460-480 (1996))を用いて実施した。既知のタンパク質をコードせず、BLASTスコア70(90の場合もある)又はそれ以上を持つ比較物は、プログラム「phrap」(Phil Green, University of Washington, Seattle, Washington)で集団化してコンセンサスDNA配列を構築した。そこから得られたコンセンサス配列をここでDNA56037と命名する。

DNA56037配列と(前立腺腫瘍組織から構築されたライブラリーからの)IncyteEST1645856内に含まれるEST配列との間の配列相同性に鑑みて、EST1645856を購入し、cDNA挿入物を得て配列決定した。このcDNA挿入物の配列を図25に示し、ここでDNA62880-1513と命名する。

図25に示す全長クローンは単一のオープンリーディングフレームを含み、ヌクレオチド位置20-22に見かけの翻訳開始部位を持ち、そしてヌクレオチド位置1535-1537の停止コドンで終端する(図25; 配列番号: 51)。予測されるポリペプチド前駆体(図26、配列番号: 52)は505アミノ酸長である。シグナルペプチドは配列番号: 52の約アミノ酸1-23である。PRO1183は約56,640ダルトンの算定分子量と約6.1の推定pIを有する。クローンDNA62880-1513は1998年8月4日にATCCに寄託され、ATCC寄託番号203097が付された。

図26(配列番号: 52)に示す全長配列のWU-BLAST2配列アラインメント分析を使用するDayhoffデータベース(バージョン35.45 SwissProt 35)の分析により、PRO1183アミノ酸配列と以下のDayhoff配列: MTV010_1、P_W41604、S54021、AOFB_HUMAN、NPAJ4683_1、S74689、GEN13608、ACHC_ACHFU、AB011173_1及びPUO_MICRUとの間の配列同一性が明らかになった。PRO1183又はそのレギュレータの投与により、ある種のオキシダーゼ疾患、例えば多彩性ポルフィリン症を治療できると考えられる。

【0163】

実施例15：ヒトPRO1272をコードするcDNAクローンの単離

上記の実施例3に記載したシグナル配列アルゴリズムの使用により、IncyteデータベースからのESTクラスター配列の同定が可能となった。次いでこのESTクラスター配列を、公的ESTデータベース(例えば、GenBank)及び企業のESTDNAデータベース(LIFESEQ(商品名)、Incyte Pharmaceuticals、Palo Alto, CA)を含む種々の発現配列タグ(EST)データベースと比較して、存在する相同性を同定した。相同体検索は、コンピュータプログラムBLAST又はBLAST2(Altschul等, Methods in Enzymology 266: 460-480 (1996))を用いて実施した。既知のタンパク質をコードせず、BLASTスコア70(90の場合もある)又はそれ以上を持つ比較物は、プログラム「phrap」(Phil Green, University of Washington, Seattle, Washington)で集団化してコンセンサスDNA配列を構築した。そこから得られたコンセンサス配列をここでDNA58753と命名する。

DNA58753配列とEST3049165内に含まれるEST配列との間の配列相同性に鑑みて、EST3049165を含む(肺ライブラリーからの)Incyteクローンを購入し、cDNA挿入物を得て配列決定した。このcDNA挿入物の配列を図27に示し、ここでDNA64896-1539と命名する。

図27に示す全長クローンは単一のオープンリーディングフレームを含み、ヌクレオチド位置58-60に見かけの翻訳開始部位を持ち、そしてヌクレオチド位置556-558

10

20

30

40

50

の停止コドンで終端する(図27; 配列番号: 53)。予測されるポリペプチド前駆体(図28、配列番号: 54)は166アミノ酸長である。シグナルペプチドは配列番号: 54の約アミノ酸1-23である。PRO1272は約19,171ダルトンの算定分子量と約8.26の推定pIを有する。クローンDNA64896-1539は1998年9月9日にATCCに寄託され、ATCC寄託番号203238が付された。

図28(配列番号: 54)に示す全長配列のWU-BLAST2配列アラインメント分析を使用するDayhoffデータベース(バージョン35.45 SwissProt 35)の分析により、PRO1272アミノ酸配列と以下のDayhoff配列(ここで導入されたデータベースからの情報): AF025474_1、D69100、AE000757_10、H69466、CELC50E3_12、XLRANBP1_1、YD67_SCHPO、B69459、H36856、及びFRU40755_1との間の配列同一性が明らかになった。

10

【0164】

実施例16: ヒトPRO1419をコードするcDNAクローンの単離

上記の実施例3に記載したシグナル配列アルゴリズムの使用により、IncyteデータベースからのESTクラスター配列の同定が可能となった。次いでこのESTクラスター配列を、公的ESTデータベース(例えば、GenBank)及び企業のESTDNAデータベース(LIFESEQ(商品名)、Incyte Pharmaceuticals, Palo Alto, CA)を含む種々の発現配列タグ(EST)データベースと比較して、存在する相同性を同定した。一又は複数のESTは発病した扁桃組織ライブラリーから誘導した。相同体検索は、コンピュータプログラムBLAST又はBLAST2(Altschul等, Methods in Enzymology 266: 460-480 (1996))を用いて実施した。既知のタンパク質をコードせず、BLASTスコア70(90の場合もある)又はそれ以上を持つ比較物は、プログラム「phrap」(Phil Green, University of Washington, Seattle, Washington)で集団化してコンセンサスDNA配列を構築した。そこから得られたコンセンサス配列をここでDNA59761と命名する。

20

DNA59761配列とIncyteEST3815008内に含まれるEST配列との間の配列相同性に鑑みて、このESTを含むクローンを購入し、cDNA挿入物を得て配列決定した。このcDNA挿入物の配列を図29に示し、ここでDNA71290-1630と命名する。

図29に示す全長クローンは単一のオープンリーディングフレームを含み、ヌクレオチド位置86-88に見かけの翻訳開始部位を持ち、そしてヌクレオチド位置341-343の停止コドンで終端する(図29; 配列番号: 55)。予測されるポリペプチド前駆体(図30、配列番号: 56)は85アミノ酸長であり、シグナルペプチドは配列番号: 56の約アミノ酸1-17である。PRO1419は約9,700ダルトンの算定分子量と約9.55の推定pIを有する。クローンDNA71290-1630は1998年9月22日にATCCに寄託され、ATCC寄託番号203275が付された。

30

図30(配列番号: 56)に示す全長配列のWU-BLAST2配列アラインメント分析を使用するDayhoffデータベース(バージョン35.45 SwissProt 35)の分析により、PRO1419アミノ酸配列と以下のDayhoff配列(ここで導入されたデータ): S07975(B3-hordein)、C48232、HOR7_HORVU、GEN11764、S14970、AF020312_1、STAJ3220_1、CER07E3_1、CEY37A1B、及びATAC00423810との間の配列同一性が明らかになった。

【0165】

40

実施例17: ヒトPRO4999をコードするcDNAクローンの単離

上記実施例1に記載したようにphrapを用いて他のEST配列に対してコンセンサスDNA配列を組み立てた。コンセンサス配列をここでDNA86634と命名する。DNA86634コンセンサス配列に基づいて、1)PCRにより関心ある配列を含むcDNAライブラリーを同定するため、及び2)PRO4999の全長コード配列のクローンを単離するプローブとして使用するために、オリゴヌクレオチドを合成した。

次のプライマー(正方向及び逆方向)を合成した:

正方向PCRプライマー 5'-CCACTTGCCATGAACATGCCAC-3'(配列番号: 59)

逆方向PCRプライマー 5'-CCTCTTGACAGACATAGCGAGCCAC-3'(配列番号: 60)

さらに、以下のヌクレオチド配列を持つ合成オリゴヌクレオチドハイブリッド形成プローブ

50

ブをDNA86634配列から作成した。

ハイブリッド形成プローブ：

5'-CACTCTTGTCTGTGGGAACACACATCTTGCCACAACCTGTGGC-3'(配列番号：61)

cDNAライブラリー作成のためのRNAはヒト精巣組織から単離した。上述のようにして単離されたクローンのDNA配列決定により、全長PRO4999の全長DNA配列(ここではDNA96031-2664と命名[図31、配列番号：57])及びPRO4999ポリペプチドの誘導タンパク質配列が得られた。

上述にて同定された全長クローンは単一のオープンリーディングフレームを含み、ヌクレオチド位置42-44に見かけの翻訳開始部位、ヌクレオチド位置2283-2285に停止コドンを持つ(図31、配列番号：57)。予測されるポリペプチド前駆体は747アミノ酸長であり、約82,710の算定分子量、及び約6.36の推定pIを有する。図32(配列番号：58)に示す全長PRO4999配列の分析により、図32に示す種々の重要なポリペプチドドメインの存在が証明され、それらの重要なポリペプチドドメインに付与された位置は上述したように概略のものである。クローンDNA96031-2664は1999年6月15日にATCCに寄託され、ATCC寄託番号237-PTAが付与された。

図32(配列番号：58)に示す全長配列のALIGN-2配列アラインメント分析を使用するDayhoffデータベース(バージョン35.45 SwissProt 35)の分析により、PRO4999アミノ酸配列と以下のDayhoff配列：UROM_HUMAN；FBN1_HUMAN；GGU88872_1；S52111；GEN12408；P_R79478；P_W48756；P_R53087；P_R14584；及びS78549間の配列同一性が証明された。

【0166】

実施例18：ヒトPRO7170をコードするcDNAクローンの単離

上記の実施例3に記載したシグナル配列アルゴリズムの使用により、ここでCLU57836と命名する、LIFESEQ(商品名)データベース、Incyte Pharmaceuticals、Palo Alto,からのESTクラスター配列の同定が可能となった。次いでこのESTクラスター配列を、公的ESTデータベース(例えば、GenBank)及び企業のESTDNAデータベース(LIFESEQ(商品名)、Incyte Pharmaceuticals、Palo Alto, CA)を含む種々の発現配列タグ(EST)データベースと比較して、存在する相同性を同定した。相同体検索は、コンピュータプログラムBLAST又はBLAST2(Altschul等, Methods in Enzymology 266: 460-480 (1996))を用いて実施した。既知のタンパク質をコードせず、BLASTスコア70(90の場合もある)又はそれ以上を持つ比較物は、プログラム「phrap」(Phil Green, University of Washington, Seattle, Washington)で集団化してコンセンサスDNA配列を構築した。そこから得られたコンセンサス配列をここでDNA58756と命名する。

DNA58756配列と、LIFESEQ(商品名)データベース、Incyte Pharmaceuticals、Palo Altoからのクローン番号2251462内に含まれるEST配列との間の配列相同性に鑑みて、クローン番号2251462を購入し、cDNA挿入物を得て配列決定した。そのcDNA挿入物が全長タンパク質をコードしていることがここで見出された。このcDNA挿入物の配列を図33に示し、ここでDNA108722-2743と命名する。

クローンDNA108722-2743は単一のオープンリーディングフレームを含み、ヌクレオチド位置60-62に見かけの翻訳開始部位を持ち、そしてヌクレオチド位置1506-1508の停止コドンで終端する(図33)。予測されるポリペプチド前駆体は482アミノ酸長である(図34)。図34に示す全長PRO7170タンパク質は約49,060ダルトンの算定分子量と約4.74のpIを有する。図34(配列番号：63)に示す全長PRO7170配列の分析により、図34に示す種々の重要なポリペプチドドメインの存在が証明され、ここで、それらの重要なポリペプチドドメインに付与された位置は上述した通り概略である。クローンDNA108722-2743は1999年8月17日にATCCに寄託され、ATCC寄託番号552-PTAが付与された。

図34(配列番号：63)に示す全長配列のALIGN-2配列アラインメント分析を使用するDayhoffデータベース(バージョン35.45 SwissProt 35)の分析により、PRO7170アミ

ノ酸配列と以下のDayhoff配列：P_Y12291、I47141、D88733_1、DMC56G7_1、P_Y11606、HW P1_CANAL、HSMUC5BEX_1、HSU78550_1、HSU70136_1、及びSGS3_DROMEとの間の配列同一性が証明された。

【0167】

実施例19：ヒト248をコードするcDNAクローンの単離

上記の実施例1に記載したようにコンセンサスDNA配列を他の同定されたEST配列に対して構築し、ここでこのコンセンサス配列をDNA33481と命名した。DNA33481コンセンサス配列に基づいて、PCRにより関心ある配列を含むcDNAライブラリーを同定するため、及びPRO248の全長コード化配列のクローンを単離するプローブとして使用するために、オリゴヌクレオチドを合成した。特に、次のプライマーを使用した：

正方向プライマー1：(配列番号：66)：5'-GTCTGACAGCCACTCCAGAG-3'

ハイブリッド形成プローブ(配列番号：67)：

5'-TCTCCAATTTCTGGGCTTAGATAAGGCGCCTTCACCCAGAAAGTTCC-3'

逆方向プライマー1(配列番号：68)：5'-GTCCCAGGTTATAGTAAGAATTGG-3'

正方向プライマー2(配列番号：69)：5'-GTGTTGCGGTCAGTCCCATG-3'

正方向プライマー3(配列番号：70)：5'-GCTGTCTCCCATTTCCATGC-3'

逆方向プライマー2(配列番号：71)：5'-CGACTACCATGTCTTCATAATGTC-3'

全長クローンの供給源について幾つかのライブラリーをスクリーニングするために、ライブラリーからのDNAを上述で同定したPCRプライマー対でPCR増幅することによりスクリーニングした。次いで、ポジティブライブラリーを、プローブオリゴヌクレオチド及びPCRプライマーの一方を用いてPRO248遺伝子をコードするクローンを単離するのに使用した。cDNAライブラリー作成のためのRNAはヒト胎児腎臓組織から単離した。

上述のようにして単離されたクローンのDNA配列決定により、PRO248の全長DNA配列[ここでDNA35674-1142と命名]及びPRO248の誘導タンパク質配列が得られた。

DNA35674-1142の全ヌクレオチド配列を図35(配列番号：64)に示す。クローンDNA35674-1142は、単一のオープンリーディングフレームを含み、ヌクレオチド位置66-68に見かけの翻訳開始部位を持ち、そしてヌクレオチド位置1217-1219の停止コドンで終端する(図35；配列番号：64)。予測されるポリペプチド前駆体は364アミノ酸長である(図36)。クローンDNA35674-1142は1997年10月28日にATCCに寄託され、ATCC寄託番号209416が付された。

全長PRO248のアミノ酸配列の分析により、それがヒト及びマウスからの成長分化因子3とある程度のアミノ酸配列同一性を有することが示唆された。

【0168】

実施例20：ヒトPRO353をコードするcDNAクローンの単離

上記実施例1に記載したようにphrapを用いて他のEST配列に対してコンセンサスDNA配列を組み立てた。このコンセンサス配列を、ここでDNA36363と命名する。コンセンサスDNA配列を、BLASTとphrapの繰り返しサイクルを用いて伸長し、コンセンサス配列を上で議論したEST配列の供給源を用いて可能な限り伸長させた。DNA36363コンセンサス配列に基づいて、1)PCRにより関心ある配列を含むcDNAライブラリーを同定するため、及び2)PRO353の全長コード配列のクローンを単離するプローブとして使用するために、オリゴヌクレオチドを合成した。

DNA36363コンセンサス配列に基づいて、次のように正方向及び逆方向PCRプライマーを合成した：

正方向PCRプライマー 5'-TACAGGCCAGTCAGGACCAGGGG-3'(配列番号：74)

逆方向PCRプライマー 5'-CTGAAGAAGTAGAGGCCGGGCACG-3'(配列番号：75)

さらに、以下のヌクレオチド配列を持つ合成オリゴヌクレオチドハイブリッド形成プローブ

10

20

30

40

50

ブをDNA 36363コンセンサス配列から作成した。

ハイブリッド形成プローブ

5'-CCCGGTGCTTGCCTGCTGTGACCCCGGTACCTCCATGTACCCGG-3'(配列番号：76)

全長クローンの供給源について幾つかのライブラリーをスクリーニングするために、ライブラリーからのDNAを上で同定したPCRプライマー対でのPCR増幅によりスクリーニングした。次いで、ポジティブライブラリーを、プローブオリゴヌクレオチドとPCRプライマー対の一方を用いてPRO353遺伝子をコードするクローンを単離するのに使用した。cDNAライブラリー作成のためのRNAは、ヒト胎児腎臓組織から単離した。

上記のように単離したクローンのDNA配列決定により、PRO353の全長DNA配列 [ここではDNA 41234-1242と命名] (配列番号：72)及びPRO353の誘導タンパク質配列が得られた。

DNA 41234-1242の全ヌクレオチド配列を図37(配列番号：72)に示す。クローンDNA 41234-1242は、単一のオープンリーディングフレームを含み、ヌクレオチド位置305-307に見かけの翻訳開始部位を持ち、ヌクレオチド位置1148-1150の停止コドンで終端する(図37)。予測されるポリペプチド前駆体は281アミノ酸長である(図38)。PRO353によりコードされるアミノ酸配列の重要な領域は、アミノ酸1-26に対応するシグナルペプチド、アミノ酸位置27の成熟タンパク質の開始、アミノ酸93-98に対応する潜在的なNグリコシル化部位及びアミノ酸99-281に対応する30kdの含脂肪細胞補体関連タンパク質前駆体と相同性を有する領域を含む。クローンDNA 41234-1242はATCCに寄託され、ATCC寄託番号209618が付与された。

全長PRO353ポリペプチドのアミノ酸配列の分析により、それらの部分がヒト及びマウス補体タンパク質の一部と有意な相同性を有していることが示唆され、PRO353が新規な補体タンパク質であることを示している。

【0169】

実施例21：ヒトPRO1318をコードするcDNAクローンの単離

図39(配列番号：77)に示すDNA 73838-1674に相当するcDNA分子をCuragen, Inc.から得た。

【0170】

実施例22：ヒトPRO1600をコードするcDNAクローンの単離

上記実施例1に記載したようにphrapを用いて他のEST配列に対してコンセンサスDNA配列を組み立てた。このコンセンサス配列を、ここでDNA 75516と命名する。コンセンサスDNA配列を、BLASTとphrapの繰り返しサイクルを用いて伸長し、コンセンサス配列を上で議論したEST配列の供給源を用いて可能な限り伸長させた。DNA 75516コンセンサス配列に基づいて、1)PCRにより関心ある配列を含むcDNAライブラリーを同定するため、及び2)PRO1600の全長コード配列のクローンを単離するプローブとして使用するために、オリゴヌクレオチドを合成した。

DNA 75516コンセンサス配列に基づいて、次のようにオリゴヌクレオチドプライマーを合成した：

5'-AGACATGGCTCAGTCACTGG-3'(配列番号：81)

5'-GACCCCTAAAGGGCCATAG-3'(配列番号：82)

全長クローンの供給源について幾つかのライブラリーをスクリーニングするために、ライブラリーからのDNAを上で同定したプローブを用いてスクリーニングした。cDNAライブラリー作成のためのRNAは、ヒト胎児心臓組織から単離した。

上記のように単離したクローンのDNA配列決定により、PRO1600の全長DNA配列 [ここではDNA 77503-1686と命名] (配列番号：79)及びPRO1600の誘導タンパク質配列が得られた。

DNA 77503-1686の全ヌクレオチド配列を図41(配列番号：79)に示す。クローンDNA 77503-1686は、単一のオープンリーディングフレームを含み、

ヌクレオチド位置 6 - 8 に見かけの翻訳開始部位を持ち、ヌクレオチド位置 4 0 8 - 4 1 0 の停止コドンで終端する (図 4 1)。予測されるポリペプチド前駆体は 1 3 4 アミノ酸長である (図 4 2)。PRO 1 6 0 0 によりコードされるアミノ酸配列の重要な領域を図 4 2 に示す。クローン DNA 7 7 5 0 3 - 1 6 8 6 は A T C C に寄託され、A T C C 寄託番号 2 0 3 3 6 2 が付与された。

【 0 1 7 1 】

実施例 2 3 : ヒト PRO 5 3 3 をコードする c DNA クローンの単離

E S T 配列寄託番号 A F 0 0 7 2 6 8 であるマウス線維芽細胞成長因子 (F G F - 1 5) を様々な公的 E S T データベース (例えば、GenBank, Dayhoff等) を検索するのに使用した。検索は、コンピュータプログラム BLAST 又は BLAST-2 [Altschul 等, Methods in Enzymology 266: 460-480 (1996)] を用いて、E C D タンパク質配列の E S T 配列の 6 フレーム翻訳との比較として実施した。検索の結果 GenBank E S T A A 2 2 0 9 9 4 がヒットし、ストラタジーン N T 2 ニューロン前駆体 9 3 7 2 3 0 として同定された。

GenBank E S T A A 2 2 0 9 9 4 配列に基づいて、1) P C R により関心ある配列を含む c D N A ライブラリーを同定するため、及び 2) 全長コード化配列のクローンを単離するプローブとして使用するために、オリゴヌクレオチドを合成した。正及び逆方向 P C R プライマーは 2 0 ~ 3 0 のヌクレオチド (典型的には約 2 4) の範囲とでき、1 0 0 - 1 0 0 0 b p の長さの P C R 産物が得られるように設計される。プローブ配列は典型的には 4 0 - 5 5 b p (典型的には約 5 0) の長さである。全長クローンの供給源について幾つかのライブラリーをスクリーニングするために、ライブラリーからの DNA を P C R プライマー対で、Ausubel 等, Current Protocols in Molecular Biology に従って、P C R 増幅によりスクリーニングした。次いで、ポジティブライブラリーを、プローブオリゴヌクレオチド及び P C R プライマーの一方を用いて関心ある遺伝子をコードするクローンを単離するのに使用した。

全長クローンの供給源について幾つかのライブラリーをスクリーニングするために、ライブラリーからの DNA を上で同定した P C R プライマー対での P C R 増幅によりスクリーニングした。次いで、ポジティブライブラリーを、プローブオリゴヌクレオチド及び P C R プライマーの一方を用いて P R O 5 3 3 遺伝子をコードするクローンを単離するのに使用した。

c D N A ライブラリーの作成のための R N A はヒト胎児網膜から単離した。c D N A クローンの単離に用いた c D N A ライブラリーは、市販試薬 (例えば Invitrogen, San Diego, CA; Clontech 等々) を用いて標準的な方法によって作成した。c D N A は、N o t I 部位を含むオリゴ d T でプライムし、平滑末端で S a l I ヘミキナーゼアダプターに結合させ、N o t I で切断し、ゲル電気泳動でおよそのサイズ分類し、そして適切なクローニングベクター (例えば p R K B 又は p R K D 等; p R K 5 B は S f i I 部位を含まない p R K 5 D の前駆体である; Holmes 等, Science, 253: 1278-1280 (1991) 参照) に、独特の X h o I 及び N o t I 部位において、所定の方向でクローニングした。

c D N A クローンはその全体を配列決定した。P R O 5 3 3 の全長ヌクレオチド列は図 4 5 (配列番号: 8 5) に示す。クローン DNA 4 9 4 3 5 - 1 2 1 9 は単一のオープンリーディングフレームを含み、ヌクレオチド位置 4 5 9 - 4 6 1 に見かけの翻訳開始部位を持つ (図 4 5; 配列番号: 8 5)。予測されるポリペプチド前駆体は 2 1 6 アミノ酸長である。クローン DNA 4 7 4 1 2 - 1 2 1 9 は A T C C に寄託され、A T C C 寄託番号 2 0 9 4 8 0 が付与された。

全長配列の BLAST-2 及び FastA 配列アラインメント分析に基づくと、P R O 5 3 3 は線維芽細胞成長因子とアミノ酸配列同一性を示す (5 3 %)。上記の手順で使用したオリゴヌクレオチド配列は次のものであった:

FGF15. 正: 5' - ATCCGCCAGATGGCTACAATGTGTA - 3' (配列番号: 8 7);

FGF15. プローブ: 5' - GCCTCCCGGTCTCCCTGAGCAGTGCCAAACAGCGGCAGTGTA - 3' (配列番号: 8 8)

:

FGF15. 逆: 5' - CCAGTCCGGTGACAAGCCCAA - 3' (配列番号: 8 9)。

10

20

30

40

50

【 0 1 7 2 】

実施例 2 4 : ヒト P R O 3 0 1 をコードする c D N A クロンの単離

上記実施例 1 に記載したように、phrapを用いて、ここで D N A 3 5 9 3 6 と命名するコンセンサス D N A 配列を組み立てた。このコンセンサス配列に基づいて、1) P C R により関心ある配列を含む c D N A ライブラリーを同定するため、及び 2) 全長コード化配列のクローンを単離するプローブとして使用するために、オリゴヌクレオチドを合成した。

全長クローンの供給源について幾つかのライブラリーをスクリーニングするために、ライブラリーからの D N A を上で同定した P C R プライマー対での P C R 増幅によりスクリーニングした。次いで、ポジティブライブラリーを、プローブオリゴヌクレオチド及び P C R プライマーの一方を用いて P R O 3 0 1 遺伝子をコードするクローンを単離するのに使用した。

c D N A ライブラリーの作成のための R N A はヒト胎児腎臓から単離した。

c D N A クローンはその全体を配列決定した。天然配列 P R O 3 0 1 の全長ヌクレオチド配列を図 4 7 (配列番号 : 9 0) に示す。クローン D N A 4 0 6 2 8 - 1 2 1 6 は単一のオープンリーディングフレームを含み、ヌクレオチド位置 5 2 - 5 4 に見かけの翻訳開始部位を持つ(図 4 7 ; 配列番号 : 9 0)。予測されるポリペプチド前駆体は 2 9 9 アミノ酸長で、3 2 , 5 8 3 ダルトンの予想分子量と 8 . 2 9 の p I を持つ。クローン D N A 4 0 6 2 8 - 1 2 1 6 は A T C C に寄託され、A T C C 寄託番号 2 0 9 4 3 2 が付与された。

全長配列の BLAST 及び FastA 配列アラインメント分析に基づいて、P R O 3 0 1 は A 3 3 抗原前駆体 (3 0 %) 及びコクサッキー及びアデノウィルスレセプタータンパク質 (2 9 %) とアミノ酸配列同一性を示す。

上記の手順において使用されたオリゴヌクレオチド配列は次の通りであった :

OL12162(35936.f1) 5'-TCGCGGAGCTGTGTTCTGTTTCCC-3'(配列番号 : 9 2)

OL12163(35936.p1)

5'-TGATCGCGATGGGGACAAAGGCGCAAGCTCGAGAGGAACTGTTGTGCCT-3'(配列番号 : 9 3)

OL12164(35936.f2)

5'-ACACCTGGTTCAAAGATGGG-3'(配列番号 : 9 4)

OL12165(35936.r1)

5'-TAGGAAGAGTTGCTGAAGGCACGG-3'(配列番号 : 9 5)

OL12166(35936.f3)

5'-TTGCCTTACTCAGGTGCTAC-3'(配列番号 : 9 6)

OL12167(35936.r2)

5'-ACTCAGCAGTGGTAGGAAAG-3'(配列番号 : 9 7)

【 0 1 7 3 】

実施例 2 5 : ヒト P R O 1 8 7 をコードする c D N A クロンの単離

企業の発現配列タグ (E S T) D N A データベース (L I F E S E Q ^{T M}、Incyte Pharmaceuticals、Palo Alto, CA) を検索して、アンドロゲン誘発成長因子としても知られている線維芽細胞成長因子 (F G F - 8) と相同性を示した E S T (# 8 4 3 1 9 3) を同定した。m R N A は Invitrogen, San Diego, CA からの試薬とプロトコールを使用してヒト胎児肺組織から単離した (Fast Track2)。c D N A クローンを単離するために使用した c D N A ライブラリーは、商業的に入手できる試薬 (例えば、Invitrogen, San Diego, CA, Life Technologies, Gaithersburg, MD) を使用する標準的な方法により作成した。c D N A は、N o t I 部位を含むオリゴ d T でプライムし、平滑末端で S a l I ヘミキナーゼアダプターに結合させ、N o t I で切断し、ゲル電気泳動で適当にサイズ分類し、そして Life Technologies, Gaithersburg, MD からの試薬とプロトコール (Super Script Plasmid System) を使用してクローニングベクター p R K 5 D に定まった方向でクローニングした。二本鎖 c D N A を 1 0 0 0 b p より大きくなるようにサイズ調整し、S a l I / N o t I 結合 c D N A を X h o I / N o t I 切断ベクター中にクローニングした。p R K 5 D は s p 6 転写開始部位に続いて S f i I 制限酵素部位と続いて X h o I / N o t I c D N A クローニング部位

があるクローニングベクターである。

様々な組織供給源からの幾つかのライブラリーを次のオリゴヌクレオチドプローブでのPCR増幅によりスクリーニングした：

IN843193.f(OLI 315)(配列番号：100)

5'-CAGTACGTGAGGGACCAGGGCGCCATGA-3'

IN843193.r(OLI 317)(配列番号：101)

5'-CCGGTGACCTGCACGTGCTTGCCA-3'

次いで、ポジティブライブラリーを、上記のオリゴヌクレオチドの一方と次のオリゴヌクレオチドプローブを用いてPRO187遺伝子をコードするクローンを単離するのに使用した。

IN843193.p(OLI 316)(配列番号：102)

5'-GCGGATCTGCCGCTGCTCANCTGGTCGGTCATGGCGCCCT-3'

cDNAクローンはその全体を配列決定した。PRO187(DNA27864-1155)の全ヌクレオチド配列を図49(配列番号：98)に示す。クローンDNA27864-1155は単一のオープンリーディングフレームを含み、ヌクレオチド位置1に見かけの翻訳開始部位を持つ(図49；配列番号：98)。予測されるポリペプチドは205アミノ酸長である。クローンDNA27864-1155はATCCに寄託され(命名：DNA27864-1155)、ATCC寄託番号209375が付与された。

全長配列の(ALIGNコンピュータプログラムを使用する)BLAST及びFastA配列アラインメント分析法に基づいて、PRO187は、ヒト線維芽細胞成長因子-8(アンドロゲン誘発成長因子)と74%のアミノ酸配列同一性(Blastスコア310)を示した。

【0174】

実施例26：ヒトPRO337をコードするcDNAクローンの単離

上記実施例2に記載したようなアミラーゼスクリーニングで単離されたcDNAを、ここでDNA42301と命名する。上記実施例1に記載したようにphrapを用いてDNA42301配列を他のEST配列と比較し、ここでDNA28761と命名するコンセンサス配列を同定した。このコンセンサス配列に基づいて、1)PCRにより関心ある配列を含むcDNAライブラリーを同定するため、及び2)全長コード化配列のクローンを単離するプローブとして使用するために、オリゴヌクレオチドを合成した。全長クローンの供給源について幾つかのライブラリーをスクリーニングするために、ライブラリーからのDNAを上で同定したPCRプライマー対でPCR増幅することによりスクリーニングした。次いで、ポジティブライブラリーを、プローブオリゴヌクレオチド及びPCRプライマー対の一方を用いてPRO337遺伝子をコードするクローンを単離するのに使用した。cDNAライブラリー作成のためのRNAは、ヒト胎児脳から単離した。

cDNAクローンは、その全体を配列決定した。DNA43316-1237の全長ヌクレオチド配列を図51(配列番号：103)に示す。クローンDNA43316-1237は、単一のオープンリーディングフレームを含み、ヌクレオチド位置134-136に見かけの翻訳開始部位を持つ(図51；配列番号：103)。予測されるポリペプチド前駆体は344アミノ酸長である。クローンDNA43316-1237はATCCに寄託され、ATCC寄託番号209487が付与された。

全長配列のBLAST-2及びFastA配列アラインメント分析に基づいて、PRO337はラットニューロトリンとアミノ酸配列同一性(97%)を示す。

【0175】

実施例27：ヒトPRO1411をコードするcDNAクローンの単離

上記の実施例3に記載したシグナル配列アルゴリズムの使用により、IncyteデータベースからのESTクラスター配列の同定が可能となった。次いでこのESTクラスター配列を、公的ESTデータベース(例えば、GenBank)及び企業のESTDNAデータベース(LIFESEQ(商品名)、Incyte Pharmaceuticals、Palo Alto, CA)を含む種々の発現配列タグ(EST)データベースと比較して、存在する相同性を同定した。一又は複数のESTは甲状腺組織ライブラリーから誘導した。相同体検索は、コンピュータプログラムBLAST又はBLA

10

20

30

40

50

ST2(Altschul等, Methods in Enzymology 266: 460-480 (1996))を用いて実施した。既知のタンパク質をコードせず、BLASTスコア70(90の場合もある)又はそれ以上を持つ比較物は、プログラム「phrap」(Phil Green, University of Washington, Seattle, Washington)で集団化してコンセンサスDNA配列を構築した。そこから得られたコンセンサス配列を、ここでDNA56013と命名する。

DNA56013配列とIncyteEST1444225に含まれるEST配列との間の配列相同性に鑑みて、このESTを含むクローンを購入し、cDNA挿入物を得て配列決定した。このcDNA挿入物の配列を図53に示し、ここでDNA59212-1627と命名する。

図53に示した全長クローンは単一のオープンリーディングフレームを含み、ヌクレオチド位置184-186に見かけの翻訳開始部位を持ち、そしてヌクレオチド位置1504-1506の停止コドンで終端する(図53;配列番号:105)。予測されるポリペプチド前駆体(図54、配列番号:106)は440アミノ酸長である。シグナルペプチドは配列番号:106の約アミノ酸1-21にあり、細胞付着部位は約アミノ酸301-303にある。PRO1411は約42,208ダルトンの算定分子量及び約6.36の推定pIを有する。クローンDNA59212-1627は1998年9月9日にATCCに寄託され、ATCC寄託番号203245が付与された。

図54(配列番号:106)に示した全長配列のWU-BLAST2配列アラインメント分析を使用しての、Dayhoffデータベース(バージョン35.45 SwissProt 35)の分析により、PRO1411のアミノ酸配列と以下のDayhoff配列(ここに取り込んだデータベースからのデータ):MTV023_19, P_R05307, P_W26348, P_P82962, AF000949_1, EBN1_EBV, P_R95107, GRP2_PHAVU, P_R81318, 及びS74439_1との間の配列同一性が明らかにされた。

【0176】

実施例28:ヒトPRO4356をコードするcDNAクローンの単離

上記実施例1に記載したようにphrapを用いて他のEST配列に対してコンセンサスDNA配列を組み立てた。このコンセンサス配列を、ここで「DNA80200」と命名する。DNA80200コンセンサス配列とMerck ESTクローン248287内に含まれるEST配列との間に観察される相同性に基づき、Merck ESTクローン248287を購入し、その挿入物を得て配列決定し、よってDNA86576-2595を提供した。

PRO4356の全コード配列を図55(配列番号:107)に示す。クローンDNA86576-2595は、単一のオープンリーディングフレームを含み、ヌクレオチド位置55-57に見かけの翻訳開始部位と、ヌクレオチド位置808-810に見かけの停止コドンを持つ。予測されるポリペプチド前駆体は251アミノ酸長である。クローンDNA86576-2595はATCCに寄託され、ATCC寄託番号203868が付与された。図56に示す全長PRO4356タンパク質は約26,935ダルトンの算定分子量と、約7.42のpIを有する。

図56(配列番号:108)に示す全長配列のWU-BLAST2配列アラインメント分析を使用するDayhoffデータベース(バージョン35.45 SwissProt 35)の分析により、PRO4356アミノ酸配列とここに導入される以下のDayhoff配列:RNMAGPIAN_1, UPAR_BOVIN, S42152, AF007789_1, UPAR_RAT, UPAR_MOUSE, P_W31165, P_W31168, P_R44423及びP_W26359との間の相同性が明らかになった。

【0177】

実施例29:ヒトPRO246をコードするcDNAクローンの単離

上記実施例1に記載したように、phrapを用いて他のESTに対してコンセンサスDNA配列を組み立てた。このコンセンサス配列を、ここでDNA30955と命名する。DNA30955コンセンサス配列に基づいて、1)PCRにより関心ある配列を含むcDNAライブラリーを同定するため、及び2)PRO246の全長コード化配列のクローンを単離するプローブとして使用するために、オリゴヌクレオチドを合成した。

一対のPCRプライマー(正方向及び逆方向)を合成した:

正方向PCRプライマー 5'-AGGGTCTCCAGGAGAAAGACTC-3'(配列番号:111)

逆方向 P C R プライマー 5'-ATTGTGGGCCTTGCAGACATAGAC-3' (配列番号 : 1 1 2)

また、合成オリゴヌクレオチドハイブリッド形成プローブを、次のヌクレオチド配列を持つコンセンサス D N A 3 0 9 5 5 配列から作成した。

ハイブリッド形成プローブ

5'-GGCCACAGCATCAAAACCTTAGAACTCAATGTACTGGTTCCTCCAGCTCC-3' (配列番号 : 1 1 3)

全長クローンの供給源について幾つかのライブラリーをスクリーニングするために、ライブラリーからの D N A を上で同定した P C R プライマー対での P C R 増幅によりスクリーニングした。次いで、ポジティブライブラリーを、プローブオリゴヌクレオチド及び P C R プライマーの一方を用いて P R O 2 4 6 遺伝子をコードするクローンを単離するのに使用した。

c D N A ライブラリーの作成のための R N A はヒト胎児肝臓組織から単離した。上記のように単離したクローンの D N A 配列決定により、P R O 2 4 6 に対する全長 D N A 配列 [ここで D N A 3 5 6 3 9 - 1 1 7 2 と命名] (配列番号 : 1 0 9) 及び P R O 2 4 6 の誘導タンパク質配列が得られた。

D N A 3 5 6 3 9 - 1 1 7 2 の全ヌクレオチド配列を図 5 7 (配列番号 : 1 0 9) に示す。クローン D N A 3 5 6 3 9 - 1 1 7 2 は、単一のオープンリーディングフレームを含み、ヌクレオチド位置 1 2 6 - 1 2 8 に見かけの翻訳開始部位を持ち、そしてヌクレオチド位置 1 2 9 6 - 1 2 9 8 の停止コドンで終端する (図 5 7)。予測されるポリペプチド前駆体は 3 9 0 アミノ酸長である (図 5 8)。クローン D N A 3 5 6 3 9 - 1 1 7 2 は A T C C に寄託され、A T C C 寄託番号 2 0 9 3 9 6 が付与された。

全長 P R O 2 4 6 ポリペプチドのアミノ酸配列の分析により、それがヒトの細胞表面タンパク質 H C A R と有意な相同性を有しており、よって P R O 2 4 6 は新規な細胞表面ウイルスレセプターでありうることを示される。

【 0 1 7 8 】

実施例 3 0 : ヒト P R O 2 6 5 をコードする c D N A クローンの単離

上記実施例 1 に記載したように、phrapを用いて他の E S T に対してコンセンサス D N A 配列を組み立てた。このコンセンサス配列を、ここで D N A 3 3 6 7 9 と命名する。D N A 3 3 6 7 9 コンセンサス配列に基づいて、1) P C R により関心ある配列を含む c D N A ライブラリーを同定するため、及び 2) P R O 2 6 5 の全長コード化配列のクローンを単離するプローブとして使用するために、オリゴヌクレオチドを合成した。

P C R プライマー (2 つの正方向及び一つの逆方向) を合成した :

正方向 P C R プライマー A : 5'-CGGTCTACCTGTATGGCAACC-3' (配列番号 : 1 1 6)

正方向 P C R プライマー B : 5'-GCAGGACAACCAGATAAACCAC-3' (配列番号 : 1 1 7)

逆方向 P C R プライマー 5'-ACGCAGATTTGAGAAGGCTGTC-3' (配列番号 : 1 1 8)

また、合成オリゴヌクレオチドハイブリッド形成プローブを、次のヌクレオチド配列を持つコンセンサス D N A 3 3 6 7 9 配列から作成した。

ハイブリッド形成プローブ

5'-TTCACGGGCTGCTCTTGGCCAGCTCTTGAAGCTTGAAGAGCTGCAC-3' (配列番号 : 1 1 9)

全長クローンの供給源について幾つかのライブラリーをスクリーニングするために、ライブラリーからの D N A を上で同定した P C R プライマー対での P C R 増幅によりスクリーニングした。次いで、ポジティブライブラリーを、プローブオリゴヌクレオチド及び P C R プライマーの一方を用いて P R O 2 6 5 遺伝子をコードするクローンを単離するのに使用した。

c D N A ライブラリーの作成のための R N A はヒト胎児脳ライブラリーから単離した。

上記のように単離したクローンの D N A 配列決定により、P R O 2 6 5 に対する全長 D N A 配列 [ここで D N A 3 6 3 5 0 - 1 1 5 8 と命名] (配列番号 : 1 1 4) 及び P R O 2 6 5 の誘導タンパク質配列が得られた。

D N A 3 6 3 5 0 - 1 1 5 8 の全ヌクレオチド配列を図 5 9 (配列番号 : 1 1 4) に示す。クローン D N A 3 6 3 5 0 - 1 1 5 8 は、単一のオープンリーディングフレームを含み、ヌクレオチド位置 3 5 2 - 3 5 4 に見かけの翻訳開始部位を持ち、そして位置 2 3 3 2 -

10

20

30

40

50

2334の停止コドンで終端する(図59)。予測されるポリペプチド前駆体は660アミノ酸長である(図60)。クローンDNA36350-1158はATCCに寄託され、ATCC寄託番号209378が付与された。

全長PRO265ポリペプチドのアミノ酸配列の分析により、その部分がフィブロモジュリン及びフィブロモジュリン前駆体に対して有意な相同性を有しており、よってPRO265を、特にフィブロモジュリンに関するロイシンリッチ反復ファミリーの新規なメンバーでありうることを示していることが示唆される。

【0179】

実施例31：ヒトPRO941をコードするcDNAクローンの単離

上記実施例1に記載したように種々のEST配列に対してコンセンサス配列が得られ、得られたコンセンサス配列は、ここにDNA35941と命名される。DNA35941コンセンサス配列に基づいて、1)PCRにより関心ある配列を含むcDNAライブラリーを同定するため、及び2)PRO941の全長コード化配列のクローンを単離するプローブとして使用するために、オリゴヌクレオチドを合成した。

PCRプライマーの対(正方向及び逆方向)を合成した：

正方向PCRプライマー 5'-CTTGACTGTCTCTGAATCTGCACCC-3'(配列番号：122)

逆方向PCRプライマー 5'-AAGTGGTGAAGCCTCCAGTGTGG-3'(配列番号：123)

さらに、合成オリゴヌクレオチドハイブリッド形成プローブは、以下のヌクレオチド配列を持つコンセンサスDNA35941配列から作成した。

ハイブリッド形成プローブ

5'-CCACTACGGTATTAGAGCAAAAAGTTAAAAACCATCATGGTTCCTGGAGCAGC-3'(配列番号：124)

全長クローンの供給源について幾つかのライブラリーをスクリーニングするために、ライブラリーからのDNAを上で同定したPCRプライマー対でPCR増幅してスクリーニングした。次いで、ポジティブライブラリーを、プローブオリゴヌクレオチド及びPCRプライマー対の一方を用いてPRO941遺伝子をコードするクローンを単離するのに使用した。cDNAライブラリー作成のためのRNAは、ヒト胎児腎臓組織(LIB227)から単離した。

上記のように単離したクローンのDNA配列は、PRO941の全長DNA配列[ここで、DNA53906-1368と命名される](配列番号：120)及びPRO941の誘導タンパク質配列を与えた。

DNA53906-1368の全ヌクレオチド配列を図61(配列番号：120)に示す。クローンDNA53906-1368は、単一のオープンリーディングフレームを含み、ヌクレオチド位置37-39に見かけの翻訳開始部位を持ち、そしてヌクレオチド位置2353-2355の停止コドンで終端する(図61)。予測されるポリペプチド前駆体は772アミノ酸長である(図62)。図62に示した全長PRO941タンパク質は、約87,002ダルトンの算定分子量及び約4.64のpIを有する。図62(配列番号：121)に示した全長PRO941配列の分析は、以下のものの存在を明示している：約アミノ酸1～約アミノ酸21のシグナルペプチド、約アミノ酸57～約アミノ酸60、約アミノ酸74～約アミノ酸77、約アミノ酸419～約アミノ酸422、約アミノ酸437～約アミノ酸440、約アミノ酸508～約アミノ酸511、約アミノ酸515～約アミノ酸518、約アミノ酸516～約アミノ酸519及び約アミノ酸534～約アミノ酸537の潜在的N-グリコシル化部位、約アミノ酸136～約アミノ酸146及び約アミノ酸244～約アミノ酸254のカドヘリン細胞外繰り返しドメインシグネチャー配列。クローンDNA53906-1368は、1998年4月7日にATCCに寄託され、ATCC寄託番号209747が付与されている。

全長PRO941ポリペプチドのアミノ酸配列の分析は、それがカドヘリンタンパク質と有意な配列類似性を有することを示唆し、それによりPRO941が新規なカドヘリンタンパク質ファミリーメンバーとなりうることを示されている。より詳細には、Dayhoffデータベース(version 35.45 SwissProt 35)は、PRO941アミノ酸配列と以下のDayhoff配列、I50180, CADA_CHICK, I50178, GEN12782, CADC_HUMAN, P_W25637, A38992, P_R

10

20

30

40

50

49731, D38992及びG02678との間の有意な相同性を明らかにした。

【0180】

実施例32：ヒトPRO10096をコードするcDNAクローンの単離

上記の実施例3に記載したシグナル配列アルゴリズムの使用により、ここで5086173H1と命名された、IncyteデータベースからのESTクラスター配列の同定が可能となった。次いでこのESTクラスター配列を、公的ESTデータベース(例えば、GenBank)及び企業のESTDNAデータベース(LIFESEQ(商品名)、Incyte Pharmaceuticals、Pal o Alto, CA)を含む種々の発現配列タグ(EST)データベースと比較して、存在する相同性を同定した。相同体検索は、コンピュータプログラムBLAST又はBLAST2(Altschul等, Methods in Enzymology 266: 460-480 (1996))を用いて実施した。既知のタンパク質をコードせず、BLASTスコア70(90の場合もある)又はそれ以上を持つ比較物は、プログラム「phrap」(Phil Green, University of Washington, Seattle, Washington)で集団化してコンセンサスDNA配列を構築した。そこから得られたコンセンサス配列をここでDNA110880と命名する。

DNA110880配列と、Incyteデータベースからのクローン番号5088384内に含まれるEST配列との間の配列相同性に鑑みて、クローン番号5088384を購入し、cDNA挿入物を得て配列決定した。cDNA挿入物は全長タンパク質をコードすることがここで見出された。このcDNA挿入物の配列を図63に示し、ここでDNA125185-2506と命名する。

クローンDNA125185-2506は単一のオープンリーディングフレームを含み、ヌクレオチド位置58-60に見かけの翻訳開始部位を持ち、そしてヌクレオチド位置595-597の停止コドンで終端する(図63)。予測されるポリペプチド前駆体は179アミノ酸長である(図64)。図64に示す全長PRO10096タンパク質は、約20,011ダルトンの算定分子量と約8.10のpIを有する。図64(配列番号:126)に示した全長PRO10096配列の分析により、図64に示す種々の重要なポリペプチドドメインの存在が証明され、ここで、それらの重要なポリペプチドドメインに付与された位置は上述した通り概略である。クローンDNA125185-2506は1999年12月7日にATCCに寄託され、ATCC寄託番号1031-PTAが付与された。

【0181】

実施例33：ヒトPRO6003をコードするcDNAクローンの単離

天然ヒトPRO6003ポリペプチドをコードするcDNAクローン(DNA83568-2692)を、一次cDNAクローンの5'末端を優勢に示すヒト胎児腎臓cDNAライブラリーにおいて、酵母スクリーニングを使用して同定した。

クローンDNA83568-2692は単一のオープンリーディングフレームを含み、ヌクレオチド位置638-640に見かけの翻訳開始部位を持ち、そしてヌクレオチド位置2225-2227の停止コドンで終端する(図65)。予測されるポリペプチド前駆体は529アミノ酸長である(図66)。図66に示す全長PRO6003タンパク質は、約59,583の算定分子量及び約6.36の推定pIを有する。図66(配列番号:128)に示す全長PRO6003配列の分析により、図66に示す種々の重要なポリペプチドドメインの存在が証明され、ここで、それらの重要なポリペプチドドメインに付与された位置は上述した通り概略である。クローンDNA83568-2692は1999年7月20日にATCCに寄託され、ATCC寄託番号386-PTAが付与された。

図66(配列番号:128)に示す全長配列のALIGN-2配列アラインメント分析を使用するDayhoffデータベース(バージョン35.45 SwissProt 35)の分析により、PRO6003アミノ酸配列と以下のDayhoff配列:P_W58986、PTND7_1、YKZ3_YEAST、CEK04B12_1、AB014464_1、PCU07059_1、S31213、CELF25E2_2、AF036408_1、及びAB007932_1との間の配列同一性が証明された。

【0182】

実施例34：ヒトPRO6004をコードするcDNAクローンの単離

上記実施例1に記載したように種々のEST配列に対してコンセンサス配列が得られ、

得られたコンセンサス配列は、ここにDNA85042と命名される。DNA85402コンセンサス配列と、IncyteESTクローン番号3078492内に含まれるEST配列との間に見られる相同性に基づいて、クローンを購入し、その挿入物を得て配列決定した。挿入物の配列をここでDNA92259と命名し、図67A-B(配列番号:129)に示す。

クローンDNA92259は、単一のオープンリーディングフレームを含み、ヌクレオチド位置16-18に見かけの翻訳開始部位を持ち、そしてヌクレオチド位置1078-1080の停止コドンで終端する(図67A-B)。予測されるポリペプチド前駆体は354アミノ酸長である(図68)。図68に示した全長PRO6004タンパク質は、約38,719ダルトンの算定分子量及び約6.12のpIを有する。図68(配列番号:130)に示した全長PRO6004配列の分析により、図68に示す種々の重要なポリペプチドドメインの存在が証明され、ここで、それらの重要なポリペプチドドメインに付与された位置は上述した通り概略である。

図68(配列番号:130)に示す全長配列のALIGN-2配列アラインメント分析を使用するDayhoffデータベース(バージョン35.45 SwissProt 35)の分析により、PRO6003アミノ酸配列と以下のDayhoff配列:P_W05152、LAMP_HUMAN、P_W05157、P_W05155、I56551、OPCM_RAT、AMAL_DROME、DMU78177_1、I37246及びNCA1_HUMANとの間の配列同一性が証明された。

【0183】

実施例35: ヒトPRO350をコードするcDNAクローンの単離

上記実施例1に記載したように種々のEST配列に対してコンセンサス配列が得られ、得られたコンセンサス配列は、ここにDNA39493と命名される。DNA39493コンセンサス配列に基づいて、1)PCRにより関心ある配列を含むcDNAライブラリーを同定するため、及び2)PRO350の全長コード配列のクローンを単離するプローブとして使用するために、オリゴヌクレオチドを合成した。

PCRプライマー対(正方向及び逆方向)を合成した:

正方向PCRプライマー 5'-TCAGGGCTGCCAGGAAGGAAGAGC-3'(配列番号:133)

逆方向PCRプライマー 5'-GCAGGAGGAGAAGGTCTTCCAGAAGAAG-3'(配列番号:134)

さらに、以下のヌクレオチド配列を持つ合成オリゴヌクレオチドハイブリッド形成プローブをコンセンサスDNA39493配列から作成した。

ハイブリッド形成プローブ

5'-AGAAGTTCCAGTCAGCCCACAAGATGCCATTGTCCCCGGCCTCC-3'(配列番号:135)

全長クローンの供給源について幾つかのライブラリーをスクリーニングするために、ライブラリーからのDNAを上で同定したPCRプライマー対の一つでのPCR増幅によりスクリーニングした。次いで、ポジティブライブラリーを、プローブオリゴヌクレオチドとPCRプライマー対の一つを用いてPRO350遺伝子をコードするクローンを単離するのに使用した。cDNAライブラリー作成のためのRNAは、ヒト胎児腎臓組織から単離した。

上記のように単離したクローンのDNA配列決定により、PRO350の全長DNA配列[ここではDNA44175-1314と命名](配列番号:131)及びPRO350の誘導タンパク質配列が得られた。

DNA44175-1314の全ヌクレオチド配列を図69(配列番号:131)に示す。DNA44175-1314は、単一のオープンリーディングフレームを含み、ヌクレオチド位置356-358に見かけの翻訳開始部位を持ち、ヌクレオチド位置821-823の停止コドンで終端する(図69)。予測されるポリペプチド前駆体は155アミノ酸長である(図70)。図70に示す全長PRO350タンパク質は約17,194ダルトンの算定分子量及び約10.44のpIを有する。図70(配列番号:132)に示した全長PRO350配列の分析により、図70に示す種々の重要なポリペプチドドメインの存在が証明された。

【0184】

10

20

30

40

50

実施例 36 : ハイブリッド形成プローブとしての P R O の使用

以下の方法は、P R O をコードするヌクレオチド配列のハイブリッド形成プローブとしての使用を記載する。

ここに開示する全長又は成熟 P R O のコード配列を含む D N A は、ヒト組織 c D N A ライブラリー又はヒト組織ゲノムライブラリーにおける相同性 D N A 類 (P R O の天然に生じる変異体をコードするものなど) のスクリーニングのためのプローブとして用いられる。

いずれかのライブラリー D N A を含むフィルターのハイブリッド形成及び洗浄は、以下の高緊縮条件で実施した。放射標識 P R O 誘導プローブのフィルターへのハイブリッド形成は、50%ホルムアミド、5x S S C、0.1% S D S、0.1%ピロリン酸ナトリウム、50mMリン酸ナトリウム、pH6.8、2xデンハート液、及び10%デキストラン硫酸の溶液中で、42 において20時間行った。フィルターの洗浄は、0.1x S S C 及び0.1% S D S の水溶液中、42 で行った。

次いで、全長天然配列 P R O をコードする D N A と所望の配列同一性を有する D N A は、この分野で知られた標準的な方法を用いて同定できる。

【 0 1 8 5 】

実施例 37 : 大腸菌における P R O の発現

この実施例は、大腸菌における組み換え発現による P R O の非グリコシル化形態の調製を例示する。

P R O をコードする D N A 配列は、選択された P C R プライマーを用いて最初に増幅した。プライマーは、選択された発現ベクターの制限酵素部位に対応する制限酵素部位を持たなければならない。種々の発現ベクターを用いることができる。好適なベクターの例は、p B R 3 2 2 (大腸菌から誘導されたもの; Bolivar等, Gene, 2:95 (1977)を参照)であり、アンピシリン及びテトラサイクリン耐性についての遺伝子を含む。ベクターは、制限酵素で消化され、脱リン酸化される。P C R 増幅した配列は、次いで、ベクターに結合させる。ベクターは、好ましくは抗生物質耐性遺伝子、t r p プロモーター、p o l y h i s リーダー(最初の6つの S T I I コドン、p o l y h i s 配列、及びエンテロキナーゼ切断部位を含む)、P R O コード化領域、ラムダ転写終結区、及び a r g U 遺伝子を含む。

ライゲーション混合物は、次いで、上掲の Sambrook 等に記載された方法を用いた選択した大腸菌株の形質転換に使用される。形質転換体は、それらの L B プレートで成長する能力により同定され、次いで抗生物質耐性クローンが選択される。プラスミド D N A が単離され、制限分析及び D N A 配列分析で確認される。

選択されたクローンは、抗生物質を添加した L B ブロスなどの液体培地で終夜成長させることができる。終夜培養は、続いて大規模培養の播種に用いられる。次に細胞を最適光学密度まで成長させ、その間に発現プロモーターが作動する。

更に数時間の細胞培養の後、細胞を遠心分離により採集する。遠心分離で得られた細胞ペレットは、この分野で知られた種々の試薬を用いて可溶化され、次いで可溶化 P R O タンパク質を金属キレート化カラムを用いてタンパク質を緊密に結合させる条件下で精製することができる。

以下の手法を用いて、大腸菌においてポリ H i s タグ形態で P R O を発現させてもよい。P R O をコードする D N A を選択した P C R プライマーを用いて最初に増幅する。プライマーは、選択された発現ベクターの制限酵素部位に対応する制限酵素部位、及び効率性で信頼性のある翻訳開始、金属キレートカラムでの迅速な精製、及びエンテロキナーゼでのタンパク質分解的除去を与える他の有用な配列を含む。次いで P C R 増幅された、ポリ-H i s タグ配列を発現ベクターに結合させ、それを株 5 2 (W3110 fuhA(tonA) lon galE rpoHts(htpRts) clpP(lacIq)) に基づく大腸菌宿主の形質転換に使用した。形質転換体は、最初に50mg/mlのカルベニシリンを含有する L B 中、30 で振盪しながら3-5の O . D . 6 0 0 に達するまで成長させた。ついで培養を C R A P 培地(3.57gの(N H 4) 2 S O 4、0.71gのクエン酸ナトリウム・2H₂O、1.07gの K C l、5.36gの Difco 酵母抽出物、500mL水

10

20

30

40

50

中の5.36gのSheffield hycase SF、並びに110mMのM P O S、pH7.3、0.55%(w/v)のグルコース及び7mMのM g S O 4の混合で調製)中に50-100倍希釈し、30 で振盪させながら約20-30時間成長させた。試料を取り出してS D S - P A G E分析により発現を確認し、バルク培養を遠心分離して細胞をペレット化した。細胞ペレットを精製及び再折りたたみまで凍結させた。

【0186】

0.5から1Lの発酵(6-10gペレット)からの大腸菌ペーストを、7Mのグアニジン、20mMのトリス、pH8バッファー中で10容量(w/v)で再懸濁させた。固体硫酸ナトリウム及びテトラチオン酸ナトリウムを添加して最終濃度を各々0.1M及び0.02Mとし、溶液を4 で終夜撹拌した。この工程により、亜硫酸化によりブロックされた全てのシステイン残基を持つ変性タンパク質がもたらされた。溶液をBeckman Ultracentrifuge中で40,000rpmで30分間遠心分離した。上清を金属キレートカラムバッファー(6Mのグアニジン、20mMのトリス、pH7.4)の3-5容量で希釈し、0.22ミクロンフィルターを通して濾過して透明化した。透明化抽出物を、金属キレートカラムバッファーで平衡化させた5mlのQiagen Ni-NTA金属キレートカラムに充填した。カラムを50mMのイミダゾール(Calbiochem, Utrol grade)を含む添加バッファー、pH7.4で洗浄した。タンパク質を250mMのイミダゾールを含有するバッファーで溶離した。所望のタンパク質を含有する画分をプールし、4 で保存した。タンパク質濃度は、そのアミノ酸配列に基づいて計算した吸光係数を用いて280nmにおけるその吸収により見積もった。

試料を、20mMのトリス、pH8.6、0.3MのN a C l、2.5Mの尿素、5mMのシステイン、20 mMのグリシン及び1mMのE D T Aからなる新たに調製した再折りたたみバッファー中に徐々に希釈することによりタンパク質を再折りたたみさせた。リフォールディング容量は、最終的なタンパク質濃度が50~100マイクログラム/mlとなるように選択した。リフォールディング溶液を4 で12-36時間ゆっくり撹拌した。リフォールディング反応はT F Aを最終濃度0.4%(約3のpH)で添加することにより停止させた。タンパク質をさらに精製する前に、溶液を0.22ミクロンフィルターを通して濾過し、アセトニトリルを最終濃度2-10%になるまで添加した。再折りたたみされたタンパク質を、Poros R1/H逆相カラムで、0.1% T F Aの移動バッファーと10~80%のアセトニトリル勾配での溶離を用いてクロマトグラフにかけた。A280吸収を持つ画分のアリコートでS D S ポリアクリルアミドゲルで分析し、相同な再折りたたみされたタンパク質を含有する画分をプールした。一般的に、殆どのタンパク質の正しく再折りたたみされた種は、これらの種が最もコンパクトであり、その疎水性内面が逆相樹脂との相互作用から遮蔽されているので、アセトニトリルの最低濃度で溶離される。凝集した種は通常、より高いアセトニトリル濃度で溶離される。タンパク質の誤って折りたたまれた形態を所望の形態から除くのに加えて、逆相工程は試料からエンドトキシンも除去する。

所望の折りたたまれたP R Oポリペプチドを含有する画分をプールし、溶液に向けた窒素の弱い気流を用いてアセトニトリルを除去した。タンパク質を、透析又は調製バッファーで平衡化したG25 Superfine(Pharmacia)樹脂でのゲル濾過及び滅菌濾過により、0.14Mの塩化ナトリウム及び4%のマンニトールを含む20mMのH e p e s、pH6.8に処方した。

ここに開示した多くのP R Oポリペプチドが上記のようにして成功裏に発現された。

【0187】

実施例38：哺乳動物細胞でのP R Oの発現

この実施例は、哺乳動物細胞における組み換え発現による潜在的にグリコシル化した形態のP R Oの調製を例示する。

発現ベクターとしてベクターp R K 5(1989年3月15日公開のEP 307,247参照)を用いた。場合によっては、P R O D N Aを選択した制限酵素を持つp R K 5に結合させ、上掲のSambrook等に記載されたようなライゲーション方法を用いてP R O D N Aを挿入させることができる。得られたベクターは、p R K 5 - P R Oと呼ばれる。

一実施態様では、選択された宿主細胞は293細胞とすることができる。ヒト293細胞(ATCC CCL 1573)は、ウシ胎児血清及び場合によっては滋養成分及び/又は抗生物質を

10

20

30

40

50

添加したDME Mなどの培地中で組織培養プレートにおいて成長させて集密化した。約10 μ gのpRK5-PRO DNAを約1 μ gのVA RNA遺伝子コード化DNA [Thimmappaya等, Cell, 31:543 (1982)]と混合し、500 μ lの1mMトリス-HCl、0.1mMEDTA、0.227M CaCl₂に溶解させた。この混合物に、滴状の、500 μ lの50mMHES (pH7.35)、280mMのNaCl、1.5mMのNaPO₄を添加し、25℃で10分間析出物を形成させた。析出物を懸濁し、293細胞に加えて37℃で約4時間定着させた。培地を吸引し、PBS中2mlの20%グリセロールを30秒間添加した。293細胞は、次いで無血清培地で洗浄し、新鮮な培地を添加し、細胞を約5日間インキュベートした。

形質移入の約24時間後、培地を除去し、培地(のみ)又は200 μ Ci/ml 35S-システイン及び200 μ Ci/ml 35S-メチオニンを含む培地で置換した。12時間のインキュベーションの後、条件培地を回収し、スピンフィルターで濃縮し、15%SDSゲルに添加した。処理したゲルを乾燥させ、PROポリペプチドの存在を現す選択された時間にわたってフィルムにさらした。形質転換した細胞を含む培地に、更なるインキュベーションを施し(無血清培地で)、培地を選択されたバイオアッセイで試験した。

これに換わる技術において、PROは、Sompanyac等, Proc. Natl. Acad. Sci., 12:7575 (1981)に記載されたデキストラン硫酸法を用いて293細胞に一過的に導入される。293細胞は、スピナーフラスコ内で最大密度まで成長させ、700 μ gのpRK5-PRO DNAを添加する。細胞は、まずスピナーフラスコから遠心分離によって濃縮し、PBSで洗浄した。DNA-デキストラン沈殿物を細胞ペレット上で4時間インキュベートした。細胞を20%グリセロールで90秒間処理し、組織培地で洗浄し、組織培地、5 μ g/mlウシインシュリン及び0.1 μ g/mlウシトランスフェリンを含むスピナーフラスコに再度導入した。約4日後に、条件培地を遠心分離して濾過し、細胞及び細胞片を除去した。次いで発現されたPROを含む試料を濃縮し、透析及び/又はカラムクロマトグラフィー等の選択した方法によって精製した。

他の実施態様では、PROをCHO細胞で発現させることができる。pRK5-PROは、CaPO₄又はDEAE-デキストランなどの公知の試薬を用いてCHO細胞に形質移入することができる。上記したように、細胞培地をインキュベートし、培地を培養培地(のみ)又は35S-メチオニン等の放射性標識を含む培地に置換することができる。PROポリペプチドの存在を同定した後、培地を無血清培地に置換してもよい。好ましくは、培地を約6日間インキュベートし、次いで条件培地を収集する。次いで、発現されたPROを含む培地を濃縮して、任意の選択した方法によって精製することができる。

また、エピトープタグPROは、宿主CHO細胞において発現させてもよい。PROはpRK5ベクターからサブクローニングしてもよい。サブクローン挿入物は、PCRを施してバキュロウイルス発現ベクター中のポリ-hisタグ等の選択されたエピトープタグを持つ枠に融合できる。ポリ-hisタグPRO挿入物は、次いで、安定なクローンの選択のためのDHFR等の選択マーカーを含むSV40誘導ベクターにサブクローニングできる。最後に、CHO細胞をSV40誘導ベクターで(上記のように)形質移入した。発現を確認するために、上記のように標識化を行ってもよい。発現されたポリ-HisタグPROを含む培地は、次いで濃縮し、Ni²⁺-キレートアフィニティクロマトグラフィー等の選択された方法により精製できる。

またPROは、一過性発現法によりCHO及び/又はCOS細胞で、他の安定な発現方法によりCHO細胞で発現させてもよい。

【0188】

CHO細胞における安定な発現は以下の方法を用いて実施された。タンパク質は、それぞれのタンパク質の可溶化形態のコード配列(例えば、細胞外ドメイン)がヒンジ、CH₂及びCH₂ドメインを含むIgG1定常領域配列に融合したIgG作成物(イムノアドヘンシ)、及び/又はポリ-Hisタグ形態として発現された。

PCR増幅に続いて、それぞれのDNAを、Ausubel等, Current Protocols of Molecular Biology, Unit 3.16, John Wiley and Sons (1997)に記載されたような標準的技術を用いてCHO発現ベクターにサブクローニングした。CHO発現ベクターは、関心あるD

10

20

30

40

50

N A の 5 ' 及び 3 ' に適合する制限部位を有し、c D N A の便利なシャトル化ができるように作成される。ベクターは、Lucas等、Nucl. Acids res. 24: 9, 1774-1779 (1996)に記載されたようにC H O細胞での発現を用い、関心あるc D N A及びジヒドロフォレートレダクターゼ(D H F R)の発現の制御にS V 4 0初期プロモーター/エンハンサーを用いる。D H F R発現は、形質移入に続くプラスミドの安定な維持のための選択を可能にする。

所望のプラスミドD N Aの12マイクログラムを、市販の形質移入試薬Superfect(登録商標)(Quiagen), Dospier(登録商標)及びFugene(登録商標)(Boehringer Mannheim)を使用し約一千万のC H O細胞に導入する。細胞は、上掲のLucas等に記載されているように成長させた。約 3×10^{-7} 細胞を、下記のような更なる成長及び生産のためにアンプル中で凍結させた。

プラスミドD N Aを含むアンプルを水槽に配して解凍し、ボルテックスにより混合した。内容物を10mLの媒質を含む遠心管にピペットして、1000rpmで5分間遠心分離した。上清を吸引して細胞を10mLの選択培地(0.2 μ m濾過P S 2 0、5%の0.2 μ m透析濾過ウシ胎児血清)中に懸濁させた。次いで細胞を90mLの選択培地を含む100mlスピナーに分ける。1-2日後、細胞を150mLの選択培地を満たした250mLスピナーに移し、37 $^{\circ}$ Cでインキュベートする。さらに2-3日後、250mL、500mL及び2000mLのスピナーを 3×10^5 細胞/mLで播種した。細胞培地を遠心分離により新鮮培地に交換し、生産培地に再懸濁させた。任意の適切なC H O培地を用いてもよいが、実際には1992年6月16日に発行された米国特許第5,122,469号に記載された生産培地を使用した。3Lの生産スピナーを 1.2×10^6 細胞/mLで播種した。0日目に、細胞数とp Hを測定した。1日目に、スピナーをサンプルし、濾過空気での散布を実施した。2日目に、スピナーをサンプルし、温度を33 $^{\circ}$ Cに変え、500g/Lのグルコース及び0.6mLの10%消泡剤(例えば35%ポリジメチルシロキサンエマルジョン、Dow Corning 365 Medical Grade Emulsion)の30mLとした。生産を通して、p Hは7.2近傍に調節し維持した。10日後、又は生存率が70%を下回るまで、細胞培地を遠心分離で回収して0.22 μ mフィルターを通して濾過した。濾過物は、4 $^{\circ}$ Cで貯蔵するか、即座に精製用カラムに充填した。

【0189】

ポリ-H i s タグ作成物について、タンパク質はNi-NTAカラム(Qiagen)を用いて精製する。精製の前に、イミダゾールを条件培地に5mMの濃度まで添加した。条件培地を、0.3MのN a C l及び5mMイミダゾールを含む20mMのH e p e s、pH7.4バッファーで平衡化した6mlのNi-NTAカラムに4-5ml/分の流速で4 $^{\circ}$ Cにおいてポンプ供給した。充填後、カラムをさらに平衡バッファーで洗浄し、タンパク質を0.25Mイミダゾールを含む平衡バッファーで溶離した。高度に精製されたタンパク質は、続いて10mMのH e p e s、0.14MのN a C l及び4%のマニトールを含む貯蔵バッファー中で25mlのG25 Superfine(Pharmacia)を用いて脱塩し、-80 $^{\circ}$ Cで貯蔵した。

イムノアドヘシン(F c含有)作成物を以下のようにして条件培地から精製した。条件培地を、20mMのリン酸ナトリウムバッファー、pH6.8で平衡化した5mlのプロテインAカラム(Pharmacia)に汲み上げた。充填後、カラムを平衡バッファーで強く洗浄した後、100mMのクエン酸、pH3.5で溶離した。溶離したタンパク質は、1mlの画分を275 μ lの1Mトリスバッファー、pH9を含む管に回収することにより即座に中性化した。高度に精製されたタンパク質は、続いてポリ-H i s タグタンパク質について上記した貯蔵バッファー中で脱塩した。均一性はS D S ポリアクリルアミドゲルとエドマン(Edman)分解によるN-末端アミノ酸配列決定により評価した。

ここに開示したP R Oポリペプチドの多くが上記のようにして成功裏に発現された。

【0190】

実施例39：酵母菌でのP R Oの発現

以下の方法は、酵母菌中でのP R Oの組換え発現を記載する。

第1に、A D H 2 / G A P D HプロモーターからのP R Oの細胞内生産又は分泌のための酵母菌発現ベクターを作成する。P R OをコードするD N A及びプロモーターを選択したプラスミドの適当な制限酵素部位に挿入してP R Oの細胞内発現を指示する。分泌のた

10

20

30

40

50

めに、PROをコードするDNAを選択したプラスミドに、ADH2/GAPDHプロモーターをコードするDNA、天然PROシグナルペプチド又は他の哺乳動物シグナルペプチド、又は、例えば酵母菌因子又はインペルターゼ分泌シグナル/リーダー配列、及び(必要ならば)PROの発現のためのリンカー配列とともにクローニングすることができる。

酵母菌株AB110等の酵母菌は、次いで上記の発現プラスミドで形質転換し、選択された発酵培地中で培養できる。形質転換した酵母菌上清は、10%トリクロロ酢酸での沈降及びSDS-PAGEによる分離で分析し、次いでクマシーブルー染色でゲルの染色をすることができる。

続いて組換えPROは、発酵培地から遠心分離により酵母菌細胞を除去し、次いで選択されたカートリッジフィルターを用いて培地を濃縮することによって単離及び精製できる。PROを含む濃縮物は、選択されたカラムクロマトグラフィー樹脂を用いてさらに精製してもよい。

ここに開示したPROポリペプチドの多くが上記のようにして成功裏に発現された。

【0191】

実施例40：バキュロウイルス感染昆虫細胞でのPROの発現

以下の方法は、バキュロウイルス感染昆虫細胞中におけるPROの組換え発現を記載する。

PROコードする配列を、バキュロウイルス発現ベクターに含まれるエピトープタグの上流に融合させた。このようなエピトープタグは、ポリ-hisタグ及び免疫グロブリンタグ(IgGのFc領域など)を含む。pVL1393(Navogen)などの市販されているプラスミドから誘導されるプラスミドを含む種々のプラスミドを用いることができる。簡単には、PRO又はPROコード配列の所望の部分、例えば膜貫通タンパク質の細胞外ドメインをコードする配列又はタンパク質が細胞外である場合の成熟タンパク質をコードする配列などが、5'及び3'領域に相補的なプライマーでのPCRにより増幅される。5'プライマーは、隣接する(選択された)制限酵素部位を包含していてもよい。生産物は、次いで、選択された制限酵素で消化され、発現ベクターにサブクローニングされる。

組換えバキュロウイルスは、上記のプラスミド及びBaculoGold(商品名)ウイルスDNA(PharMingen)を、*Spodoptera frugiperda*(「Sf9」)細胞(ATCC CRL 1711)中にリポフェクチン(GIBCO-BRLから市販)を用いて同時形質移入することにより作成される。28℃で4-5日インキュベートした後、放出されたウイルスを回収し、更なる増幅に用いた。ウイルス感染及びタンパク質発現は、O'Reilly等, *Baculovirus expression vectors: A laboratory Manual*, Oxford: Oxford University Press (1994)に記載されているように実施した。

次に、発現されたポリ-hisタグPROは、例えばNi²⁺-キレートアフィニティークロマトグラフィーにより次のように精製される。抽出は、Rupert等, *Nature*, 362:175-179 (1993)に記載されているように、ウイルス感染した組み換えSf9細胞から調製した。簡単には、Sf9細胞を洗浄し、超音波処理用バッファー(25mMのHepes, pH7.9; 12.5mMのMgCl₂; 0.1mM EDTA; 10%グリセロール; 0.1%のNP-40; 0.4MのKCl)中に再懸濁し、氷上で2回20秒間超音波処理した。超音波処理物を遠心分離で透明化し、上清を負荷バッファー(50mMリン酸塩、300mMのNaCl、10%グリセロール、pH7.8)で50倍希釈し、0.45µmフィルターで濾過した。Ni²⁺-NTAアガロースカラム(Qiagenから市販)を5mLの総容積で調製し、25mLの水で洗浄し、25mLの負荷バッファーで平衡させた。濾過した細胞抽出物は、毎分0.5mLでカラムに負荷した。カラムを、分画回収が始まる点であるA280のベースラインまで負荷バッファーで洗浄した。次に、カラムを、結合タンパク質を非特異的に溶離する二次洗浄バッファー(50mMリン酸塩; 300mMのNaCl、10%グリセロール、pH6.0)で洗浄した。A280のベースラインに再度到達した後、カラムを二次洗浄バッファー中で0から500mMイミダゾール勾配で展開した。1mLの分画を回収し、SDS-PAGE及び銀染色又はアルカリホスファターゼ(Qiagen)に複合したNi²⁺-NTAでのウェスタンブロットで分析した。溶離したHis10-タグPROを

10

20

30

40

50

含む画分をプールして負荷バッファーで透析した。

あるいは、I g G タグ(又はF c タグ)P R Oの精製は、例えば、プロテインA又はプロテインGカラムクロマトグラフィーを含む公知のクロマトグラフィー技術を用いて実施できる。

ここに開示したP R Oポリペプチドの多くが上記のようにして成功裏に発現された。

【0192】

実施例41：P R Oに結合する抗体の調製

この実施例は、P R Oに特異的に結合できるモノクローナル抗体の調製を例示する。

モノクローナル抗体の生産のための技術は、この分野で知られており、例えば、上掲のGodingに記載されている。用いられ得る免疫原は、精製P R O、P R Oを含む融合タンパク質、細胞表面に組換えP R Oを発現する細胞を含む。免疫原の選択は、当業者が過度の実験をすることなくすることができる。

B a l b / c等のマウスを、完全フロイントアジュバントに乳化して皮下又は腹腔内に1-100マイクログラムで注入したP R O免疫原で免疫化する。あるいは、免疫原をM P L - T D Mアジュバント(Ribi Immunochemical Research, Hamilton, MT)に乳化し、動物の後足蹠に注入してもよい。免疫化したマウスは、次いで10から12日後に、選択したアジュバント中に乳化した付加的免疫源で追加免疫する。その後、数週間、マウスをさらなる免疫化注射で追加免疫する。抗-P R O抗体の検出のためのE L I S Aアッセイで試験するために、レトロオービタル出血からの血清試料をマウスから周期的に採取してもよい。

適当な抗体力価が検出された後、抗体に「ポジティブ(陽性)」な動物に、P R O静脈内注射の最後の注入をすることができる。3から4日後、マウスを屠殺し、脾臓細胞を取り出した。次いで脾臓細胞を(35%ポリエチレングリコールを用いて)、A C T Tから番号C R L 1 5 9 7で入手可能なP 3 X 6 3 A g U . 1等の選択されたマウス骨髄腫株化細胞に融合させた。融合によりハイブリドーマ細胞が生成され、次いで、H A T(ヒポキサンチン、アミノプテリン、及びチミジン)培地を含む96ウェル組織培養プレートに蒔き、非融合細胞、骨髄腫ハイブリッド、及び脾臓細胞ハイブリッドの増殖を阻害した。

ハイブリドーマ細胞は、P R Oに対する反応性についてのE L I S Aでスクリーニングされる。P R Oに対する所望のモノクローナル抗体を分泌する「ポジティブ(陽性)」ハイブリドーマ細胞の決定は、技術常識の範囲内である。

陽性ハイブリドーマ細胞を同系のB a l b / cマウスに腹腔内注入し、抗-P R Oモノクローナル抗体を含む腹水を生成させる。あるいは、ハイブリドーマ細胞を、組織培養フラスコ又はローラーボトルで成長させることもできる。腹水中に生成されたモノクローナル抗体の精製は、硫酸アンモニウム沈降、それに続くゲル排除クロマトグラフィーを用いて行うことができる。あるいは、抗体のプロテインA又はプロテインGへの親和性に基づくアフィニティークロマトグラフィーを用いることもできる。

【0193】

実施例43：特異的抗体を用いたP R Oポリペプチドの精製

天然又は組換えP R Oポリペプチドは、この分野の種々の標準的なタンパク質精製方法によって精製できる。例えば、プロ-P R Oポリペプチド、成熟ポリペプチド、又はプレ-P R Oポリペプチドは、関心あるP R Oポリペプチドに特異的な抗体を用いた免疫親和性クロマトグラフィーによって精製される。一般に、免疫親和性カラムは抗-P R Oポリペプチド抗体を活性化クロマトグラフィー樹脂に共有結合させて作成される。

ポリクローナル免疫グロブリンは、硫酸アンモニウムでの沈殿又は固定化プロテインA(Pharmacia LKB Biotechnology, Piscataway, N.J.)での精製のいずれかにより免疫血清から調製される。同様に、モノクローナル抗体は、硫酸アンモニウム沈殿又は固定化プロテインAでのクロマトグラフィーによりマウス腹水液から調製される。部分的に精製された免疫グロブリンは、C n B r -活性化セファロースTM(Pharmacia LKB Biotechnology)等のクロマトグラフィー樹脂に共有結合される。抗体が樹脂に結合され、樹脂がブロックされ、誘導体樹脂は製造者の指示に従って洗浄される。

このような免疫親和性カラムは、可溶化形態のP R Oポリペプチドを含有する細胞から

10

20

30

40

50

の画分を調製することによるPROポリペプチドの精製において利用される。この調製物は、洗浄剤の添加又はこの分野で公知の方法により微分遠心分離を介して得られる全細胞又は細胞成分画分の可溶化により誘導される。あるいは、シグナル配列を含む可溶化PROポリペプチドは、細胞が成長する培地中に有用な量で分泌される。

可溶化PROポリペプチド含有調製物は、免疫親和性カラムを通され、カラムはPROポリペプチドの好ましい吸着をさせる条件下(例えば、洗浄剤存在下の高イオン強度バッファー)で洗浄される。次いで、カラムは、抗体/PROポリペプチド結合を分解する条件下(例えば、約2-3といった低pH、高濃度の尿素又はチオシアン酸イオン等のカオトロップ)で溶離され、PROポリペプチドが回収される。

【0194】

10

実施例44：薬物スクリーニング

本発明は、PROポリペプチド又はその結合断片を種々の薬物スクリーニング技術において使用することによる化合物のスクリーニングに特に有用である。そのような試験に用いられるPROポリペプチド又は断片は、溶液中の遊離状態でも、固体支持体に固定されても、細胞表面に担持されていても、細胞内に位置していてもよい。薬剤スクリーニングの一つの方法は、PROポリペプチド又は断片を発現する組換え核酸で安定に形質移入される真核生物又は原核生物宿主細胞を利用する。薬剤は、そのような形質移入細胞に対して、競合的結合アッセイにおいてスクリーニングされる。そのような細胞は、生存可能又は固定化形態のいずれかにおいて、標準的な結合アッセイに使用できる。例えば、PROポリペプチド又は断片と試験される試薬の間での複合体の形成を測定してよい。あるいは

20

、試験する試薬によって生ずるPROポリペプチドとその標的細胞との間の複合体形成における減少を試験することもできる。

しかして、本発明は、PROポリペプチド関連疾患又は障害に影響を与えうる薬剤又は任意の他の試薬のスクリーニング方法を提供する。これらの方法は、その試薬をPROポリペプチド又は断片に接触させ、(i)試薬とPROポリペプチド又は断片との間の複合体の存在について、又は(ii)PROポリペプチド又は断片と細胞との間の複合体の存在について、当該技術でよく知られた方法でアッセイすることを含む。これらの競合結合アッセイでは、PROポリペプチド又は断片が典型的には標識される。適切なインキュベーションの後、自由なPROポリペプチド又は断片を結合形態のものから分離し、自由又は未複合の標識の量が、特定の試薬がPROポリペプチドに結合する又はPROポリペプチド

30

細胞複合体を阻害する能力の尺度となる。

薬剤スクリーニングのための他の技術は、ポリペプチドに対して適当な結合親和性を持つ化合物についての高スループットスクリーニングを提供し、1984年9月13日に公開されたWO 84/03564に詳細に記載されている。簡単に述べれば、多数の異なる小型ペプチド試験化合物が、プラスチックピン等の固体支持体又は幾つかの他の表面上で合成される。PROポリペプチドに適用すると、ペプチド試験化合物はPROポリペプチドと反応して洗浄される。結合したPROポリペプチドはこの分野で良く知られた方法により検出される。精製したPROポリペプチドは、上記の薬剤スクリーニング技術に使用するためにプレート上に直接被覆することもできる。さらに、非中和抗体は、ペプチドを捕捉し、それを固体支持体上に固定化するのに使用できる。

40

また、本発明は、PROポリペプチドに結合可能な中和抗体がPROポリペプチド又はその断片について試験化合物と特異的に競合する競合薬剤スクリーニングアッセイも考慮する。この方法において、抗体は、PROポリペプチドで、一又は複数の抗原決定基を持つ任意のペプチドの存在を検出するのに使用できる。

【0195】

実施例45：合理的薬物設計

合理的薬物設計の目的は、関心ある生物学的活性ポリペプチド(例えば、PROポリペプチド)又はそれらが相互作用する小分子、例えばアゴニスト、アンタゴニスト、又はインヒビターの構造的類似物を製造することである。これらの例の任意のものが、PROポリペプチドのより活性で安定な形態又はインビボでPROポリペプチドの機能を向上又は

50

阻害する薬物の創作に使用できる(参考、Hodgson, Bio/Technology, 9: 19-21 (1991))。

一つの方法において、PROポリペプチド、又はPROポリペプチド-インヒビター複合体の三次元構造が、X線結晶学により、コンピュータモデル化により、最も典型的には2つの方法の組み合わせにより決定される。分子の構造を解明し活性部位を決定するためには、PROポリペプチドの形状及び電荷の両方が確認されなければならない。数は少ないが、PROポリペプチドの構造に関する有用な情報が相同タンパク質の構造に基づいたモデル化によって得られることもある。両方の場合において、関連する構造情報は、類似PROポリペプチド様分子の設計又は効果的なインヒビターの同定に使用される。合理的な薬剤設計の有用な例は、Braxton及びWells, Biochemistry, 31: 7796-7801 (1992)に示されているような向上した活性又は安定性を持つ分子、又はAthauda等, J. Biochem., 113: 742-746 (1993)に示されているような天然ペプチドのインヒビター、アゴニスト、又はアンタゴニストとして作用する分子を含む。

また、上記のような機能アッセイによって選択された標的特異的な抗体を単離しその結晶構造を解明することもできる。この方法は、原理的には、それに続く薬剤設計が基礎をおくことのできるファーマコア(pharmacore)を生成する。機能的な薬理学的に活性な抗体に対する抗-イディオタイプ抗体(抗-ids)を生成することにより、タンパク質結晶学をバイパスすることができる。鏡像の鏡像として、抗-idsの結合部位は最初のレセプターの類似物であると予測できる。抗-idは、次いで、化学的又は生物学的に製造したペプチドのバンクからペプチドを同定及び単離するのに使用できる。単離されたペプチドは、ファーマコアとして機能するであろう。

本発明により、十分な量のPROポリペプチドがX線結晶学などの分析実験を実施するために入手可能である。さらに、ここに提供したPROポリペプチドアミノ酸配列の知識は、X線結晶学に換える、又はそれに加えるコンピュータモデル化技術で用いられる指針を提供する。

【0196】

実施例46: マウス腎臓メサンギウム細胞増殖アッセイ(アッセイ92)

このアッセイでは本発明のあるポリペプチドが哺乳動物の腎臓メサンギウム細胞増殖を誘導する働きをし、及び、従って、例えばパーガ病のようなメサンギウム細胞機能の低下に関する腎障害、又はシェーンライン-ヘーノホ紫斑病、セリアック病、疱疹状皮膚炎又はクローン病に関連するその他ネフロパシーの治療に利用できることが示される。アッセイは次のように実施される。1日目、マウス腎臓メサンギウム細胞が成長培地(ダルベッコ修飾イーグル培地とヘムF12培地の3:1の混合物、95%のウシ胎仔血清、5%の14mM HEPES)で96ウェルプレート上に蒔かれ、一晚育成する。2日目、PROポリペプチドは無血清の培地において2種の濃度に希釈され(1%と0.1%)、細胞に加えられる。コントロールサンプルは血清の培地のみである。4日目、Cell Titer 96 Aqueous 1液試薬(Progema) 20 μ l がそれぞれのウェルに加えられ、発色反応が2時間進められる。ついで吸光度(OD)が490nmで測定される。アッセイにおけるポジティブはコントロールの読みの少なくとも15%を越える吸光度の読みを与えるものである。

次のポリペプチドはこのアッセイにおいてポジティブと検定された: PRO1272

【0197】

実施例47: 一次ラット含脂肪細胞によるグルコース又はFFAの取込みに影響を及ぼすPROポリペプチドの検出(アッセイ94)

このアッセイは、PROポリペプチドが含脂肪細胞によるグルコース又はFFAの取込みに影響を及ぼす能力を示すか否かを決定するために設計された。このアッセイにおいてポジティブであると検定されるPROポリペプチドは、例えば肥満、糖尿病、高-又は低-インシュリン血症を含む、含脂肪細胞によるグルコースの取込みの刺激又は阻害のいずれかが有益であるとされる疾患の治療に有用であることが予想される。

96ウェル型において、アッセイされるPROポリペプチドを一次ラット含脂肪細胞に添加し、終夜インキュベートした。試料を4時間及び16時間で取り出し、グリセロール、グルコース及びFFAの取込についてアッセイした。16時間のインキュベート後、イ

ンシュリンを培地に添加し、4時間インキュベートした。この時点で、試料を取り出し、グリセロール、グルコース及びFFAの取込みを測定した。PROポリペプチドを含有せずインシュリンを含有する培地をポジティブの基準対照として使用した。試験したPROポリペプチドがグルコース又はFFAの取込みを刺激又は阻害する場合、インシュリン対照の1.5倍以上又は0.5倍未満であるならば、結果はこのアッセイにおいてポジティブであるとスコアされる。

次のPROポリペプチドが、このアッセイにおいてグルコース及び/又はFFAの取込みの刺激剤又は阻害剤としてポジティブであると検定された：PRO196、PRO185、PRO210、PRO215、PRO242、PRO288、PRO1183、PRO1419、PRO9940、PRO301、PRO337及びPRO265。

10

【0198】

実施例48：成人心臓肥大の刺激(アッセイ2)

このアッセイは成人心臓の肥大を刺激する様々なPROポリペプチドの能力を測定するように設計された。このアッセイにおいてポジティブであると検定されたPROポリペプチドは、種々の心臓の機能不全疾患の治療に有用であることが予期される。

成体(250g)Sprague Dawleyラットから新たに単離した心室筋細胞を2000細胞/180 μ lウェル容積でプレーティングした。細胞を単離し、1日目にプレーティングし、PROポリペプチド含有試験試料又は成長培地のみ(負の対照)(20 μ l容積)を2日目に添加し、ついで細胞を固定し、5日目に染色した。染色後、細胞サイズを可視化し、対照細胞と比較して成長亢進のない細胞に0.0の値を与え、対照細胞と比較して小から中程度の成長亢進を示す細胞に0.1の値を与え、対照細胞と比較して大きな成長亢進を示す細胞に2.0の値を与える。負の対照細胞と比較した成長増強のあらゆる度合いがアッセイではポジティブと考えられる。

20

次のPROポリペプチドがこのアッセイにおいてポジティブであると検定された：PRO301。

【0199】

実施例49：血管内皮成長因子(VEGF)刺激の内皮細胞成長の増殖阻害(アッセイ9)

VEGFに刺激された内皮細胞の増殖を阻害する種々のPROポリペプチドの能力を試験した。このアッセイにおいてポリペプチド試験がポジティブであると哺乳動物の内皮細胞の阻害に有用であり、このような効果は、例えば腫瘍成長の阻害する等の恩恵となる。

30

特に、ウシ副腎皮質性毛細管内皮(ACE)細胞(一次培地から、最大12-14継代)を96-ウェルの100マイクロタイタープレートに500細胞/ウェルで蒔いた。アッセイ用培地は、低グルコースDMM、10%のウシ血清、2mMのグルタミン、1xペニシリン/ストレプトマイシン/フングゾンを含有する。対照ウェルは次のものを含む：(1)ACE細胞を添加しないもの；(2)ACE細胞単独；(3)ACE細胞プラス5ng/mlのFGF；(4)ACE細胞プラス3ng/mlのVEGF；(5)ACE細胞プラス3ng/mlのVEGFプラス1ng/mlのTGF- β ；及び(6)ACE細胞プラス3ng/mlのVEGFプラス5ng/mlのLIF。ついで、試験用試料であるポリ-hisタグPROポリペプチド(100マイクロタイター容量中)をウェル(それぞれ1%、0.1%及び0.001%に希釈)の添加した。細胞を37/5%のCO₂で6-7日インキュベートした。インキュベート後、ウェルの培地を吸引し、細胞を1xPBSで洗浄した。酸ホスファターゼ反応混合物(100マイクロタイター、0.1Mの酢酸ナトリウム、pH5.5、0.1%のトリトンX-100、10mMのp-ニトロフェニルホスフェート)を各ウェルに添加した。37で2時間インキュベートした後、10マイクロタイターの1NのNaOHの添加で反応を停止した。光学密度(OD)をマイクロプレートリーダーで405nmにおいて測定した。

40

PROポリペプチドの活性を、刺激無しの細胞に対するVEGF(3ng/ml)刺激増殖のパーセント阻害(OD405nmにおける酸ホスファターゼ活性を測定することにより決定)として算出した。TGF- β はVEGF刺激ACE細胞増殖を70-90%阻止するので、1ng/mlで活性参照として使用した。結果は、PROポリペプチドの癌治療、特に腫瘍新脈管形成の阻害における有用性を示している。数値(相対阻害度)は刺激なし細胞に対するPRO

50

ポリペプチドによるVEGF刺激増殖のパーセント阻害を算出し、ついで1ng/ml濃度でのTGF- β が、VEGF刺激細胞増殖を70-90%阻止することが知られていることで得られたパーセント阻害をパーセンテージに除することで決定される。結果は、PROポリペプチドが内皮細胞成長のVEGF刺激を30%又はそれ以上(相対阻害度30%又はそれ以上)を阻害したときにポジティブと考える。

以下の試験ポリペプチドがこのアッセイにおいてポジティブであった：PRO301、PRO187及びPRO246。

【0200】

実施例50：混合リンパ球反応(MLR)における刺激活性アッセイ(アッセイ24)

この実施例は、本発明のあるポリペプチドが刺激されたTリンパ球の増殖刺激剤として活性であることを示す。リンパ球の増殖を刺激する化合物は、免疫反応の向上が好ましい治療において有用である。治療剤は本発明のポリペプチドのアンタゴニストの形態、例えばポリペプチドのマウス-ヒトキメラ、ヒト化又はヒト抗体であり得る。

このアッセイの基本的プロトコールは、Current Protocol in Immunology, unit3.12; J E Coligan, A M Kruisbeek, D H Marglies, E M Shevach, W Strober編, 国立衛生研究所, John Wiley & Sons, Incから出版に記載されている。

特に、このアッセイの一変形例では、末梢血液単核細胞(PBMC)を個々の哺乳動物、例えばヒトのボランティアからロイコフェレーシスにより単離する(一人のドナーには刺激物PBMCを供給し、他のドナーにはレスポンダーPBMCを供給する)。所望するならば、単離後に、細胞をウシ胎児血清及びDMSO中で凍結する。凍結細胞をアッセイ用培地(37 $^{\circ}$ C、5%CO $_2$)で一晩解凍し、ついで洗浄し、アッセイ用培地(RPMI; 10%ウシ胎児血清、1%ペニシリン/ストレプトマイシン、1%グルタミン、1%HEPES、1%非必須アミノ酸、1%ピルパート)に3X10 6 細胞/mlに再懸濁させる。刺激物PBMCは細胞を光にさらす(約300ラド)ことにより調製される。

このアッセイは混合物：

100:1の1%又は0.1%に希釈された試験料試料、

50:1の光にさらされた刺激物細胞、及び

50:1のレスポンダーPBMC細胞、

を三重ウェルに蒔くことにより調製される。100マイクロタイターの細胞培養培地又は100マイクロタイターのCD4-IGを対照体として使用する。ついで、ウェルを37 $^{\circ}$ C、5%CO $_2$ で4日間インキュベートする。5日目、各ウェルにトリチウム化チミジン(1.0mCi/ウェル; Amersham)を適用する。6時間後、細胞を3回洗浄し、ついで標識の取込を評価する。

このアッセイの他の変形例では、PBMCをBalb/cマウス及びC57B6マウスの脾臓から単離する。細胞を、アッセイ用培地(RPMI; 10%ウシ胎児血清、1%ペニシリン/ストレプトマイシン、1%グルタミン、1%HEPES、1%非必須アミノ酸、1%ピルパート)において新たに回収された脾臓から顕微鏡検査用に細かく切断し、リンパライト(Lympholyte)M(Organon Teknika)上にこれらの細胞をオーバーレイすることによりPMBCを単離し、2000rpmで20分間遠心分離し、集め、アッセイ用培地における単核細胞層を洗浄し、アッセイ用培地に1X10 7 細胞/mlになるように細胞を再懸濁させる。ついで、このアッセイは上記のように行われる。

ポジティブとは対照体よりも増加することであり、増加することはポジティブであると考えられ、180%以上の増加が好ましい。しかしながら、任意の値が対照体以上であるなら、試験用タンパク質について刺激効果を示す。

次のPROポリペプチドがこのアッセイでポジティブであった：PRO533及びPRO301。

【0201】

実施例51：PDB12細胞の増殖(アッセイ29)

この実施例は、様々なPROポリペプチドがPDB12膵管細胞の増殖を誘導する効能を有していることを示すもので、よって糖尿病等を含む、膵臓によるタンパク質分泌に係る疾

10

20

30

40

50

患の治療に有用である。

PDB12腓骨細胞を、100 μ L/180 μ L成長培地中にウェル当り1.5x10³細胞で、フィブロネクチンをコートした96ウェルプレート上にプレATINGした。PROポリペプチド試験試料又はPROポリペプチドを欠く負の対照を有する100 μ Lの成長培地をついで最終容積200 μ Lになるまでウェルに添加した。対照はこのアッセイにおいて不活性であることが知られているタンパク質を含む成長培地を含む。細胞を37 $^{\circ}$ Cで4日間インキュベートした。ついで、20 μ Lのアラマブルー染料(AB)を各ウェルに添加し、蛍光読みとりを、530nm励起及び590nm発光にてマイクロタイタープレートリーダーでAB添加後4時間で測定した。用いた標準はウシ下垂体抽出物(BPE)なしの細胞と様々な濃度のBPEの細胞である。未知のバッファー又は成長培地のみ対照は各96ウェルプレートで2回なされる。

10

タンパク生産の増加パーセントが、負の対照細胞により生産されたアラマブルー染料による算定タンパク質濃度と、PROポリペプチド処理細胞により生産されたアラマブルー染料による算定タンパク質濃度を比較することにより算定されている。負の対照細胞と比較して25%以上のタンパク質生産の増加パーセントがポジティブと考えられる。

次のPROポリペプチドがこのアッセイにおいてポジティブであると検定された：PRO301。

【0202】

実施例52：モルモット血管漏洩(アッセイ32)

このアッセイは本発明のPROポリペプチドが血管透過性を誘導する能力を示すかどうかを決定するためのものである。このアッセイでポジティブであると検定されたポリペプチドは、例えば局部的に免疫系細胞浸潤を向上させることが有益である状態を含む、血管透過性を向上させることが有益な病状の治療に有用であることが予想される。

20

350g又はそれ以上の無毛モルモットにケタミン(75-80mg/kg)と5mg/kgのキシラジンを筋肉内投与して麻酔をかけた。RO302ポリペプチド又は試験ポリペプチドを含まない生理緩衝液を含む試験試料を、注射部位当たり100 μ Lで試験動物の背の皮膚に皮内注射した。動物当たりおよそ16-24の注射部位があった。ついで1mLのエバンスブルー染料(PBS中1%)を心臓内注射した。化合物に対する皮膚血管透過性応答(すなわち、注射部位の斑点)について、試験動物の投与1及び6時間後に注射部位からの青色の漏出の直径(mm)を測定することで視覚によりスコアをつけた。注射部位の青さのmm直径を観察し、血管漏出の重症度と共に記録した。少なくとも5mmの直径の斑点は、精製タンパク質を試験する場合はアッセイでは正であると考えられ、血管漏出又は透過性を誘導する能力を示している。7mm直径を超える反応の場合に、条件媒体試料に対してポジティブであると考えられる。0.1 μ g/100 μ LのヒトVEGFが正の対照として使用され、4-8mm直径の応答を誘導した。

30

次のPROポリペプチドがこのアッセイにおいてポジティブであると検定された：PRO533。

【0203】

実施例53：網膜ニューロン生存(アッセイ52)

この実施例はあるPROポリペプチドが網膜ニューロン細胞の生存の促進において有効性を有することを示し、よって、例えば色素性網膜症、AMD等による哺乳動物の視力喪失の治療を含む、網膜疾患又は損傷の治療に有用である。

40

妊娠7日のSprague Dawleyラット胎児(混合集団：グリア及び網膜ニューロン型)をCO₂麻酔に続いて断頭により屠殺し、無菌条件下で眼を取り出した。神経網膜を色素上皮から切除し、他の眼組織をCa²⁺、Mg²⁺無しのPBS中の0.25%トリプシンを用いて単細胞懸濁物中に解離させた。網膜を37 $^{\circ}$ Cで7-10分間インキュベートし、その後1mLのダイズトリプシンインヒビターを添加することによりトリプシンを不活性化した。細胞を、N2を添加し、特異的な試験PROポリペプチド有り又は無しのDMEM/F12中、96-ウェルプレートにウェル当たり100,000細胞で蒔いた。全ての実験について、細胞は5%CO₂の水飽和雰囲気下、37 $^{\circ}$ Cで成長させた。培地中で2-3日後に細胞をカルセインAMで染色し、次いで4%のパラホルムアルデヒドで固定し、全細胞カウントの測定

50

のためにD A P Iで染色した。全細胞(蛍光)は、C C Dカメラ及びMacIntosh用N I H画像ソフトウェアを用いて20X対物倍率で定量化した。ウェルの視野は無作為に選択した。

種々の濃度のP R Oポリペプチドの効果は、培地中2 - 3日でのカルセインA Mポジティブ細胞の合計数を、培地中2 - 3日のD A P I標識細胞の合計数で除することにより計算した。30%を超える生存をポジティブと考える。

以下のP R Oポリペプチドが、0.01% ~ 1.0%の範囲内のポリペプチド濃度で使用するこのアッセイでポジティブであると検定された：P R O 3 5 0。

【0204】

実施例54：ラット小囊支持細胞の増殖(アッセイ54)

このアッセイは本発明のあるポリペプチドが聴覚毛細胞前駆体である内耳支持細胞の有糸分裂促進剤として作用し、したがって哺乳動物における聴覚毛細胞の再生誘発と軟調の治療に利用できることを示す。アッセイは次のように実施される。ラットU E C - 4小囊上皮細胞が33、200 μ lの血清添加培地で密度3000細胞/ウェルで96ウェルプレートに等分される。細胞は一晩培養され、ついで37で無血清培地に移される。ついで様々な希釈率のP R Oポリペプチド(又はコントロールには不含有)が培地に加えられ、ついで細胞は24時間インキュベートされる。24時間のインキュベーションの後、3H - チミジン(1 μ Ci/ウェル)が加えられ、ついでさらに24時間培養される。次に培地は組み込まれなかった放射能標識を取り除くために洗浄され、細胞を取り出し、1ウェルあたりのCpmが決定される。コントロール培地と比較してP R Oポリペプチドで処置した培地で少なくとも30%又はそれ以上のC p mであった場合にはアッセイでポジティブと判断される。

次のポリペプチドがこのアッセイにおいてポジティブであると検定された：P R O 3 3 7。

【0205】

実施例55：杆状体光受容体細胞の生存(アッセイ56)

このアッセイは、本発明のあるポリペプチドが杆状体光受容体細胞の生存/増殖を高めるように作用し、よって、例えば色素性網膜炎、A M D等による哺乳動物の視力喪失の治療を含む網膜疾患又は損傷の治療的処置に有用であることを示す。

妊娠7日のSprague Dawleyラット胎児(混合集団：グリア及び網膜ニューロン細胞型)をC O 2麻酔に続いて断頭により屠殺し、無菌条件下で眼を取り出した。神経網膜を色素上皮及び他の眼組織から切除し、ついでC a 2 +、M g 2 +無しのP B S中の0.25%トリプシンを用いて単細胞懸濁物中に解離させた。網膜を37で7 - 10分間インキュベートし、その後1mlのダイズトリプシンインヒビターを添加することによりトリプシンを不活性化した。細胞を、N 2を添加したD M E M / F 1 2中、96 - ウェルプレートにウェル当たり100,000細胞で蒔いた。全ての実験について、細胞は5%C O 2の水飽和雰囲気下、37で成長させた。培地中で2 - 3日後に細胞を4%のパラホルムアルデヒドで固定し、次いでセルトラッカーグリーンC M F D A染色した。Rho 4D2(腹水又はI g G 1:100)、可視色素ロドプシンに対するモノクローナル抗体を、間接的免疫蛍光法による杆状体光受容体の検出に使用した。結果は%生存：培地中2 - 3日のカルセイン - ロドプシンポジティブ細胞の全数を、培地中2 - 3日でのロドプシンポジティブ細胞の全数で除するものとして計算する。全細胞(蛍光)は、C C Dカメラ及びMacIntosh用N I H画像ソフトウェアを用いて20X対物倍率で定量化した。ウェルの視野は無作為に選択した。

次のポリペプチドがこのアッセイにおいてポジティブであると検定された：P R O 3 5 0。

【0206】

実施例56：皮膚血管透過性アッセイ(アッセイ64)

このアッセイは本発明のあるポリペプチドが動物の注入部位での単核細胞、好酸球及びP M N浸潤を誘発することにより免疫反応を促進及び炎症反応を誘発することを示す。免疫反応を刺激する化合物は免疫反応の刺激が有用な治療に利用可能である。この皮膚血管透過性アッセイは次のように実施される。体重が350グラム又はそれ以上の毛の無いモ

ルモットをケタミン(75 - 80 mg/Kg)及び5 mg/Kgキシラジンの筋肉注射(IM)をして麻酔をかけた。精製された本発明のポリペプチドの試料又は条件培地試験試料が、注入部位あたり100 µlを試験動物の背中に皮内注入される。動物あたり約10 - 30、好ましくは約16 - 24箇所部位に注入が可能である。エバンスブルー色素(1%に生理的食塩水で緩衝)の1 µlが心臓内に注入される。ついで注入部位における斑点が注入後1時間と6時間で測定(直径mm)される。動物は注入後6時間で屠殺される。それぞれの皮膚注入部位は生体組織検査され、ホルマリンで固定される。ついで皮膚は組織病理学検査用に調製される。それぞれ部位は皮膚への炎症細胞浸潤を検査される。可視的な炎症細胞の炎症を有する部位はポジティブとして記録される。炎症細胞は好中球、好酸球、単球、リンパ球であり得る。少なくとも注入部位での最小血管周囲の浸潤はポジティブとして記録され、注入部位で浸潤のなかった場合にはネガティブとして記録される。

10

次のポリペプチドがこのアッセイにおいてポジティブであると検定された：PRO301。

【0207】

実施例57：内皮細胞アポトーシスの誘導(アッセイ73)

内皮細胞においてアポトーシスを誘導するPROポリペプチドの能力を、ヒト静脈の臍静脈内皮細胞(HUVEC, Cell Systems)中で試験した。このアッセイでポジティブであると、内皮細胞のアポトーシスの誘発が有益である腫瘍並びに血管疾患の治療にポリペプチドが有用であることを示している。

細胞を96ウェルマイクロタタープレート(Amersham Life Science, cytostar-Tシチレーティングマイクロプレート、RPNQ160、無菌、組織培地処理、個々にラッピング)で10%の血清(CSG-媒体、Cell Systems)中、ウェル当たり2x10⁴細胞の密度で全容量100 µlでプレATINGした。2日目に、PROポリペプチドを含有する試験試料を1%、0.33%及び0.11%希釈の3段階で添加した。細胞無しウェルをブランクとして用い、細胞のみウェルをネガティブ対照として用いた。ポジティブ対照としてスタウロスポリンの3xストックの1:3連続希釈50 µlを用いた。PROポリペプチドのアポトーシスを誘導する能力は、カルシウム及びリン脂質結合タンパク質のメンバーであるアネキシンVの検出のために96ウェルをプロセッシングしてアポトーシスを検出することにより決定した。

20

0.2mlのアネキシンV-ビオチンのストック溶液(100 µg/ml)を、4.6mlの2 x Ca²⁺ + 結合バッファー及び2.5%BSA中に希釈した(1:25希釈)。50 µlの希釈アネキシンV-ビオチン液を、1.0 µg/mlの最終濃度になるまで各ウェル(対照を除く)に添加した。試料を35S-ストレプトアビジンの直接添加の前にアネキシン-ビオチンと共に10-15分間インキュベートした。35S-ストレプトアビジンは2 x Ca²⁺ + 結合バッファー、2.5%BSA中に希釈し、最終濃度が3 x 10⁴cpm/ウェルになるまで全てのウェルに添加した。次いでプレートを密封し、1000rpmで15分間遠心分離し、2時間の間、軌道シェイカー上に配した。分析は1450 Microbeta Trilux (Wallac)で実施した。バックグラウンドを越えるパーセントがネガティブ対照を越える毎分当たりのカウントのパーセントを表す。バックグラウンドを越えるパーセントが30%以上のものがポジティブであると考えられる。

30

次のPROポリペプチドがこのアッセイにおいてポジティブであると検定された：PRO301。

40

【0208】

実施例58：皮質ニューロンにおけるc-fosの誘発(アッセイ83)

このアッセイは、PROポリペプチドが皮質ニューロンにおいてc-fosを誘発する能力を示すか否かを決定するために設計される。このアッセイでポジティブであると検定されるPROポリペプチドは、ニューロン増殖が有益であろう神経系疾患及び損傷の治療に有用であることが予想される。

皮質ニューロンを分離し、96ウェルのプレートに1ウェル当たり10,000細胞で成長培地にプレATINGした。およそ2の細胞分割後、細胞をPROポリペプチドで30分間処理するか、又はしなかった(負の対照)。次いで、細胞を5分間、冷メタノールで固定し、ホスホリル化CREBに対する抗体で染色した。mRNAのレベルを化学ルミネセンス法

50

を使用して計算した。このアッセイでポジティブであると、負の対照と比較して、c-fosメッセージが少なくとも2倍増加する結果になる因子である。

次のPROポリペプチドがこのアッセイにおいてポジティブであると検定された：PRO288。

【0209】

実施例59：膵臓 -細胞前駆体分化の誘発(アッセイ89)

このアッセイは本発明のあるポリペプチドが膵臓 -細胞前駆体から成熟した膵臓 -細胞への分化を誘発する働きをし、したがって、真正糖尿病を含む哺乳動物における様々なインシュリン不全段階の治療に利用できることを示す。アッセイは次のように実施される。アッセイはマウス胎児膵臓細胞の初代培養を使用し、初期測定は -細胞前駆体又は成熟した -細胞のどちらかに相当するマーカーの発現の変化である。マーカー発現はリアルタイム定量的PCR(RTQ-PCR)で測定され；ここで評価されるマーカーはインシュリンである。

10

膵臓はE14胚(CD1マウス)から取り出される。ついで膵臓は37℃で40から60分、F12/DMEM中のコラゲナーゼ/ディスパーゼで消化される(コラゲナーゼ/ディスパーゼ、1.37mg/ml、Boehringer Mannheim、#1097113)。ついで消化は同容量の5%BSAで中和され、細胞は一度RPMI1640で洗浄される。1日目、細胞は12ウェル組織培養プレートに蒔かれる(PBS中で20μ/mlのラミニンでプレ被覆される、Boehringer Mannheim、#124317)。1-2胚の膵臓由来の細胞はウェル当たり分配される。この初代培養の培地は14F/1640である。2日目、培地は取り除かれ、付着した細胞はRPMI/1640で洗浄される。試験されるタンパク質に加えて、2mlの最小培地が加えられる。4日目、培地は取り除かれ、細胞からRNAが調製され、リアルタイム定量的RT-PCRによってマーカー発現が分析される。未処置対照に比べ、関連した -細胞マーカーの発現が増加した場合には、タンパク質はアッセイにおいて活性であると考えられる。

20

14F/1640はRPMI1640(Gibco)に次のものを加えたものである：

グループA 1:1000

グループB 1:1000

組み換えヒトインシュリン 10μg/ml

アプロチニン(50μg/ml)1:2000(Boehringer manhein #981532)

30

ウシ下垂体エキス(BPE)60μg/ml

ゲンタマイシン 100ng/ml

グループA:(10mlPBS中)

トランスフェリン、100mg(シグマ T2252)

上皮成長因子、100μg(BRL100004)

トリヨードチロニン、5x10⁻⁶Mの10μl(シグマ T5516)

エタノールアミン、10⁻¹Mの100μl(シグマE0135)

ホスホエタノールアミン、10⁻¹Mの100μl(シグマP0503)

セレンウム、10⁻¹Mの4μl(Aesar#12574)

グループC:(10mlの100%エタノール中)

40

ヒドロコルチゾン、5x10⁻³Mの2μl(シグマ#H0135)

プロゲステロン、1x10⁻³Mの100μl(シグマ#P6149)

フォルスコリン、20mMの500μl(Calbiochem#344270)

最小培地：

RPMI1640にトランスフェリン(10μ/ml)、インシュリン(1μg/ml)、ゲンタマイシン(100ng/ml)、アプロチニン(50μg/ml)及びBPE(15μg/ml)を加える。

定まった培地：

RPMI1640にトランスフェリン(10μ/ml)、インシュリン(1μg/ml)、ゲンタマイシン(100ng/ml)及びアプロチニン(50μg/ml)を加える。

次のポリペプチドはこのアッセイで活性であった：PRO11361、PRO1308

50

、 P R O 1 6 0 0 及び P R O 4 3 5 6 。

【 0 2 1 0 】

実施例 6 0 : 周皮細胞 c - f o s の誘発 (アッセイ 9 3)

このアッセイは、本発明のあるポリペプチドが周皮細胞において c - f o s の発現を誘発するように作用し、よって特定の種類の周皮細胞結合腫瘍の診断用マーカーとして有用であるばかりでなく、周皮細胞関連腫瘍の治療的処置に有用であると予想されるアンタゴニストを生じること示す。周皮細胞における c - f o s の発現の誘発はまた血管形成が誘発されたことを示し、よって、c - f o s の発現を誘発可能な P R O ポリペプチドが、例えば創傷治癒等を含む、血管形成の誘発が有益である病状の治療に有用であることが予想される。特に 1 日目に、周皮細胞を VEC Technologies から得、5 ml の培地以外をプラスチックから取り出した。2 日目に周皮細胞をトリプシン化し、洗浄し、スピンさせ、ついで 9 6 ウェルプレートに蒔いた。7 日目に培地を取り出し、周皮細胞を 100 μ l の P R O ポリペプチドテスト用試料及び対照体 (ポジティブ対照体 = D E M + 5% 血清 + / - 500ng/ml の P D G F ; ネガティブ対照体 = プロテイン 3 2) で処理した。複製を平均し、S D / C V を決定した。化学ルミネセンス単位 (R L U) 照度計リーディングバース頻度により示されたプロテイン 3 2 値を越える折り畳み増加 (バッファー対照) をヒストグラム上にプロットする。上記のプロテイン 3 2 値を 2 倍越えると、アッセイについてポジティブであると考えられる。A S Y マトリックス : 成長培地 = 低グルコース D M E M = 20% F B S + 1x ペンストレップ (pen strep) + 1x フンギゾン (fungizone)。アッセイ用培地 = 低グルコース D M E M + 5% F B S 。

10

20

次のポリペプチドがこのアッセイにおいてポジティブであると検定された : P R O 4 4 4 及び P R O 2 1 7 。

【 0 2 1 1 】

実施例 6 1 : 骨格筋におけるグルコース又は F F A の取込みに影響を及ぼす P R O ポリペプチドの検出 (アッセイ 1 0 6)

このアッセイは、P R O ポリペプチドが骨格筋細胞によるグルコース又は F F A の取込みに影響を及ぼす能力を示すか否かを決定するために設計された。このアッセイにおいてポジティブであると検定された P R O ポリペプチドは、例えば糖尿病、高-又は低-インシュリン血症を含む、骨格筋によるグルコースの取込みの刺激又は阻害のいずれかが有益であるとされる疾患の治療に有用であることが予想される。

30

9 6 ウェル型において、アッセイされる P R O ポリペプチドを一次ラット分化骨格筋に添加し、終夜インキュベートした。次に、P R O ポリペプチド及び + / - インシュリンを含む新鮮な培地をウェルに添加した。ついで、試料培地を監視して、骨格筋細胞によるグルコース及び F F A の取込みを測定した。インシュリンは骨格筋によるグルコース及び F F A の取込みを刺激し、P R O ポリペプチドを含有しない培地中のインシュリンをポジティブな対照とし、スコアの限界値として使用した。試験した P R O ポリペプチドがグルコース又は F F A の取込みを刺激又は阻害する場合、インシュリン対照の 1 . 5 倍以上か、0 . 5 倍未満であるならば、結果はこのアッセイにおいてポジティブであるとスコアされる。

次の P R O ポリペプチドが、このアッセイにおいてグルコース及び / 又は F F A の取込みの刺激剤又は阻害剤としてポジティブであると検定された : P R O 1 9 6 、 P R O 1 8 3 、 P R O 1 8 5 、 P R O 2 1 5 、 P R O 2 8 8 、 P R O 1 3 6 1 、 P R O 1 6 0 0 、 P R O 4 9 9 9 、 P R O 7 1 7 0 、 P R O 5 3 3 及び P R O 1 8 7 。

40

【 0 2 1 2 】

実施例 6 2 : 赤芽球細胞系における胎児ヘモグロビン誘発 (アッセイ 1 0 7)

このアッセイは、成人のヘモグロビンから赤芽球細胞系における胎児ヘモグロビンへの切替を誘発する、P R O ポリペプチドの能力をスクリーニングするのに有用である。このアッセイにおいてポジティブであると検定された分子は、種々のサラセミア等の、多様な哺乳動物ヘモグロビン関連疾患を治療的に処置するのに有用であることが期待される。このアッセイは以下のようにして行われる。赤芽球細胞を標準的成長培地において、9 6 ウ

50

エルフォーマットに1000細胞/ウェルで蒔く。0.2%又は2%の濃度でPROポリペプチドを成長培地に添加し、細胞を37℃で5日間インキュベートする。ポジティブ対照体として、細胞を100µMのヘミンで処理し、ネガティブ対照として、細胞を処理しない。5日後、細胞溶解物を調製し、ガンマグロブリンの発現について分析した(胎児用マーカー)。このアッセイにおいてポジティブとは、ガンマグロブリンレベルがネガティブ対照体の少なくとも2倍であることである。

次のポリペプチドがこのアッセイにおいてポジティブであると検定された：PRO1419。

【0213】

実施例63：軟骨細胞再分化アッセイ(アッセイ110)

10

このアッセイは、本発明のあるポリペプチドが軟骨細胞の再分化を誘導する働きをし、従って、例えばスポーツ障害や関節炎のような様々な骨及び/又は軟骨の障害の治療に役立つことが期待されることが示される。アッセイは次のように実施される。ブタの軟骨細胞が4-6月齢の雌ブタの中手指節関節の関節軟骨を一晩コラゲナーゼ消化することによって単離される。ついで単離された細胞はFBSを10%とゲンタマイシンを4µg/ml含有するDMEMに25,000細胞/cm²で蒔かれる。培地は3日ごとに替えられ、次いで血清なしの100µlの同培地中に、5,000細胞/ウェルで96ウェルに蒔かれ、100µl試験PROポリペプチド5nMのスタウロスポリン(ポジティブ対照体)または培地のみ(ネガティブ対照体)が最終的な総量が200µl/ウェルになるように加えられる。37℃でインキュベーションして5日後、それぞれのウェルの写真が撮られ、軟骨細胞の分化状態が決定される。アッセイにおけるポジティブの結果は軟骨細胞の再分化がネガティブ対照体よりもポジティブ対照体に、より類似していると決定された時である。

20

次のポリペプチドがこのアッセイにおいてポジティブであると検定された：PRO215、PRO353、PRO365、PRO1272、PRO301及びPRO337。

【0214】

実施例64：軟骨細胞増殖アッセイ(アッセイ111)

このアッセイは、本発明のPROポリペプチドが培養中に軟骨細胞の増殖及び/又は再分化を誘導する能力を示すか否かを決定するために設計された。このアッセイにおいてポジティブであると検定されると、例えばスポーツ障害や関節炎のような様々な骨及び/又は軟骨疾患の治療に役立つことが期待される。アッセイは次のように実施される。

30

ブタの軟骨細胞が4-6月齢の雌ブタの中手指節関節の関節軟骨を一晩コラゲナーゼ消化することによって単離される。ついで単離された細胞はFBSを10%とゲンタマイシンを4µg/ml含有するDMEMに25,000細胞/cm²で蒔かれる。培地は3日ごとに替えられ、5日ごとに25,000細胞/cm²が再度蒔かれる。12日目に、血清なしの100µlの同培地中に、5,000細胞/ウェルで96ウェルに蒔かれ、100µlの血清なし培地(ネガティブ対照)、スタウロスポリン(最終濃度5nM;ポジティブ対照)または試験PROポリペプチド(ネガティブ対照)が最終的な総量が200µl/ウェルになるように加えられる。37℃でインキュベーションして5日後、20µlのアラマブルーを各ウェルに添加し、37℃でさらに3時間、プレートをインキュベートした。次に各ウェルの蛍光を測定した(励起：530nm;発光：590nm)。200µlの無血清培地を含むプレートの蛍光を測定し、バックグラウンドを得た。アッセイにおいてポジティブな結果は、PROポリペプチドで処理された試料の蛍光がネガティブ対照よりもポジティブ対照のものにより近い場合に得られる。

40

次のPROポリペプチドがこのアッセイにおいてポジティブであると検定された：PRO215、PRO217、PRO248、PRO1361、PRO1419、PRO533及びPRO265。

【0215】

実施例65：マウスメセンギアル細胞阻害アッセイ(アッセイ114)

このアッセイでは本発明のPROポリペプチドが培養中のマウスメセンギアル(mesengial)細胞の増殖を阻害する能力を示すか否かを決定するために設計された。このアッセイ

50

でポジティブであると検定された P R O ポリペプチドは、例えば嚢胞性腎臓形成異常、多嚢胞性腎臓病、又はメセンギアル細胞の異常増殖に関連する他の腎臓病、腎腫瘍等のような、メセンギアル細胞の増殖を阻害することが有益な病気又は症状の治療に有用であることが予想される。

1 日目、マウスメセンギアル細胞が成長培地(ダルベッコ変性イーグル培地とヘム F 1 2 培地、95% ; ウシ胎仔血清、5% ; 14mM HEPESが3 : 1の混合物)で96 ウェルプレート上に蒔かれ、一晚育成する。2 日目、P R O ポリペプチドは無血清の培地において2種の濃度に希釈され(1%と0.1%)、細胞に加えらる。ネガティブ対照体はP R O ポリペプチドを添加しない成長培地である。細胞を48時間インキュベートした後、Cell Titer 96 Aqueous 1 液試薬(Progema) 20 μ l がそれぞれのウェルに加えられ、発色反応が2時間進められる。ついで吸光度(O D)が490 nmで測定される。アッセイにおけるポジティブはネガティブ対照の少なくとも10%を越える吸光度の読みを与えるものである。

10

次のP R O ポリペプチドがこのアッセイにおいてポジティブであると検定された : P R O 1 3 1 8。

【0216】

実施例66 : 膵臓 -細胞前駆体増殖の誘発(アッセイ117)

このアッセイは本発明のあるポリペプチドが多数の膵臓 -細胞前駆細胞の増加を誘発する働きをし、したがって、真正糖尿病を含む哺乳動物における様々なインシュリン不全段階の治療に利用できることを示す。アッセイは次のように実施される。アッセイはマウス胎児膵臓細胞の初代培養を使用し、初期測定は -細胞前駆体又は成熟した -細胞のどちらかに相当するマーカーの発現の変化である。マーカー発現はリアルタイム定量的P C R (R T Q - P C R)で測定され ; ここで評価されるマーカーはP d x 1と呼ばれる転写因子である。

20

膵臓はE 1 4 胚(C D 1 マウス)から取り出される。ついで膵臓は37 で40から60分、F 1 2 / D M E M 中でコラゲナーゼ/ディスパーゼで消化される(コラゲナーゼ/ディスパーゼ、1.37mg/ml、Boehringer Mannheim、# 1097113)。ついで消化は同容量の5% B S A で中和され、細胞は一度R P M I 1 6 4 0 で洗浄される。1 日目、細胞は12ウェル組織培養プレートに蒔かれる(PBSで20 μ /mlのラミニンで前もってコートされる、Boehringer Mannheim、# 124317)。1 - 2 胚の膵臓由来の細胞が1ウェル当たり分配される。この初代培養の培地は14 F / 1 6 4 0 である。2 日目、培地が取り除かれ、付着した細胞はR P M I / 1 6 4 0 で洗浄される。試験されるタンパク質に加えて、2 mlの最小培地が加えられる。4 日目、培地は取り除かれ、細胞からR N A が調製され、リアルタイム定量的R T - P C R によってマーカー発現が分析される。未処理のコントロールに比べ、関連した -細胞マーカーの発現を増加させている場合には、タンパク質はアッセイにおいて活性であると考えられる。

30

14 F / 1 6 4 0 はR P M I 1 6 4 0 (Gibco)に次のものを加えたものである :

グループ A 1 : 1000

グループ B 1 : 1000

組み換えヒトインシュリン 10 μ g / ml

アプロチニン(50 μ g / ml)1 : 2000(Boehringer manhein #981532)

40

ウシ下垂体エキス(B P E)60 μ g / ml

ゲンタマイシン 100ng / ml

グループ A : (10ml P B S 中)

トランスフェリン、100mg(シグマT2252)

上皮成長因子、100 μ g(BRL100004)

トリヨードチロニン、5x10⁻⁶Mの10 μ l(シグマT5516)

エタノールアミン、10⁻¹ Mの100 μ l(シグマE0135)

ホスホエタノールアミン、10⁻¹ Mの100 μ l(シグマP0503)

セレンウム、10⁻¹ Mの4 μ l(Aesar#12574)

グループ C : (10mlの100%エタノール中)

50

ヒドロコルチゾン、 5×10^{-3} Mの $2 \mu\text{l}$ (シグマ#H0135)

プロゲステロン、 1×10^{-3} Mの $100 \mu\text{l}$ (シグマ#P6149)

フォルスコリン、20mMの $500 \mu\text{l}$ (Calbiochem#344270)

最小培地：

RPMI 1640 にトランスフェリン($10 \mu\text{g/ml}$)、インシュリン($1 \mu\text{g/ml}$)、ゲンタマイシン(100ng/ml)、アプロチニン($50 \mu\text{g/ml}$)及びBPE($15 \mu\text{g/ml}$)を加える。

定まった培地：

RPMI 1640 にトランスフェリン($10 \mu\text{g/ml}$)、インシュリン($1 \mu\text{g/ml}$)、ゲンタマイシン(100ng/ml)及びアプロチニン($50 \mu\text{g/ml}$)を加える。

次のポリペプチドはこのアッセイにおいてポジティブであると検定された：PRO183、PRO185、PRO288。 10

【0217】

実施例67：インビトロ抗腫瘍アッセイ(アッセイ161)

種々のPROポリペプチドの抗増殖活性を、本質的にSkehan等, J. Natl. Cancer Inst. 82: 1107-1112 (1990)に記載されたスルホローダミンB(SRB)染料結合アッセイを用いる国立癌研究所(NCI)の実験的、疾患指向的インビトロ抗腫瘍発見アッセイにおいて測定した。このアッセイで用いた60の腫瘍細胞系(「NCIパネル」)、並びにそれらの維持およびインビトロ培養の条件は、Monks等, J. Natl. Cancer Inst. 83: 757-766 (1991)に記載されている。このスクリーニングの目的は、異なる型の腫瘍に対する試験化合物の細胞毒性及び/又は細胞分裂停止活性を最初に評価することである(Monks等, 上掲; 20 Boyd, Cancer: Princ. Pract. Oncol. Update 3(10): 1-12[1989])。

約60のヒト腫瘍細胞系からの細胞をトリプシン/EDTA(Gibco)で回収し、1回洗浄し、IMEM中に再懸濁し、それらの生存を測定した。細胞懸濁物をピペット($100 \mu\text{L}$ 容量)で別の96-ウェルマイクロタイタープレートに添加した。6日インキュベーションの細胞密度は2日インキュベーションより小さく過剰成長は防止された。播種後、安定化のために37°Cで24時間プレインキュベーションした。目的とする試験濃度の2倍希釈をゼロ時に $100 \mu\text{l}$ のアリコートにマイクロタイタープレートウェルに添加した(1:2希釈)。試験化合物を2分の5 log希釈(1000~100,000倍)で評価した。インキュベーションは5% CO₂ 雰囲気および100%湿度で2日および6日実施した。

インキュベーション後、培地を除去し、細胞を10%トリクロロ酢酸の0.1mlで40°Cにおいて固定した。プレートを脱イオン水で5回洗浄し、乾燥させ、1%酢酸に溶解した0.4%スルホローダミンB染料(Sigma)の0.1mlで30分間染色し、1%酢酸で4回洗浄して非結合染料を除去し、乾燥させ、染色物を10mMトリス塩基[トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン], pH10.5の0.1mlで5分間抽出した。スルホローダミンBの492nmにおける吸収(OD)を、コンピュータ接続96-ウェルマイクロタイタープレートリーダーを使用して測定した。 30

試験試料は、一又は複数の濃度で少なくとも50%の成長阻害を示すときにポジティブと考える。ポジティブな結果を以下の表7に示す。

表7

化合物	腫瘍タイプ	表示	
PRO301	NSCL	NCI-H322M	
PRO301	白血病	MOLT-4; SR	
PRO301	NSCL	A549/ATCC; EKVX;	
PRO301	NSCL	NCI-H23; NCI-460; NCI-H226	
PRO301	結腸	COLO 205; HCC-2998;	
PRO301	結腸	HCT-15; KM12; HT29;	
PRO301	結腸	HCT-116	
PRO301	CNS	SF-268; SF-295; SNB-19	
PRO301	黒色腫	MALME-3M; SK-MEL-2;	
PRO301	黒色腫	SK-MEL-5; UACC-257	10
PRO301	黒色腫	UACC-62	
PRO301	卵巣	IGROV1; OVCAR-4	
PRO301	卵巣	OVCAR-5	
PRO301	卵巣	OVCAR-8; SKOV3	
PRO301	腎臓	ACHN; CAKI-1; TK-10; UO-31	
PRO301	前立腺	PC-3; DU-145	
PRO301	乳房	NCI/ADR-RES; HS 578T	
PRO301	乳房	MDA-MB-435; MDA-N; T-47D	
PRO301	黒色腫	M14	
PRO301	白血病	CCRF-CEM; HL-60(TB); K-562	
PRO301	白血病	RPMI-8226	
PRO301	黒色腫	LOX IMVI	
PRO301	腎臓	786-0; SN12C	
PRO301	乳房	MCF7; MDA-MB-231/ATCC	20
PRO301	乳房	BT-549	
PRO301	NSCL	HOP-62	
PRO301	CNS	SF-539	
PRO301	卵巣	OVCAR-3	

これらのアッセイの結果には、PROポリペプチドが多くの異なる細胞系の新生物成長の阻害に有用であり、治療的に使用できることが示されている。これらのPROポリペプチドに対する抗体は、この有用なポリペプチドの親和増殖に有用である。これらのPROポリペプチドをコードする核酸はこれらのポリペプチドの組換え調製に有用である。

【0218】

実施例68：腫瘍における遺伝子増幅

30

この実施例は、あるPROポリペプチドコード化遺伝子が、ある種のヒト肺、結腸及び/又は乳癌及び/又は細胞系のゲノムで増幅されることを示す。増幅は遺伝子産物の過剰発現を伴い、ポリペプチドが結腸、肺、乳及び他の癌等の或る種の癌において治療的処置、及びこれらある癌の存在性を診断決定するのに有用な標的であることを示している。治療薬は、PROポリペプチドのアンタゴニスト、例えばPROポリペプチドに対するマウス-ヒトキメラ、ヒト化又はヒト抗体を形成し得る。

スクリーニングの出発物質は種々の癌から単離したゲノムDNAである。DNAは、正確に定量され、例えば蛍光的に定量される。ネガティブ対照として、DNAを10の正常な健常個体の細胞からDNAを単離し、それをプールして健常個体における遺伝子コピーのアッセイ対照として使用した(示さず)。5'ヌクレアーゼアッセイ(例えばTaqMan^{T M})及び実時間定量的PCR(例えば、ABI Prizm 7700 Sequence Detection System(商品名)(Perkin Elmer, Applied Biosystems Division, Foster City, CA))を、或る種の癌で潜在的に増幅される遺伝子の発見に使用した。結果を、PROポリペプチドをコードするDNAがスクリーニングされた一次肺又は大腸癌又は癌細胞系又は乳癌細胞系の何れかで過剰表現されるか否かを決定するために用いた。一次肺癌は、表8に示した型及び段階の腫瘍を持つ個体から得た。表8に列挙した一次腫瘍及びこの実施例を通して参照される一次腫瘍及び細胞系の表示に使用した略語の説明は以下に示す。

40

【0219】

TaqMan^{T M}の結果はデルタ()Ct単位で報告した。1単位は1PCRサイクル又は正常に対して約2倍の増幅に相当し、2単位は4倍、3単位は8倍増幅等々に相当する。定

50

量はプライマー及びP R Oポリペプチド-コード化遺伝子から誘導したTaqMan^{T M} 蛍光プローブを用いて得た。独特の核酸配列を含む可能性が高く、イントロンをスプライシングしている可能性が少ないと思われるP R Oポリペプチド-コード化遺伝子の領域がプライマー及びプローブ誘導に好適であり、例えば3-非翻訳領域である。P R Oポリペプチド遺伝子増幅分析に使用したプライマー及びプローブ(正方向、逆方向及びプローブ)の配列は次の通りである：

P R O 5 3 3 (D N A 4 9 4 3 5 - 1 2 1 9)

正方向 : 5'-GGGACGTGCTTCTACAAGAACAG-3' (配列番号 : 1 4 0)

逆方向 : 5'-CAGGCTTACAATGTTATGATCAGACA-3' (配列番号 : 1 4 1)

プローブ : 5'-TATTCAGAGTTTTCCATTGGCAGTGCCAGTT-3' (配列番号 : 1 4 2)

P R O 1 8 7 (D N A 2 7 8 6 4 - 1 1 5 5)

正方向 : 5'-GGCCTTGCAGACAACCGT-3' (配列番号 : 1 4 3)

逆方向 : 5'-CAGACTGAGGGAGATCCGAGA-3' (配列番号 : 1 4 4)

プローブ : 5'-GCAGATTTTGAGGACAGCCACCTCCA-3' (配列番号 : 1 4 5)

正方向2 : 5'-CATCAAGCGCCTCTACCA-3' (配列番号 : 1 4 6)

逆方向2 : 5'-CACAACTCGAACTGCTTCTG-3' (配列番号 : 1 4 7)

プローブ2 : 5'-CAGCTGCCCTTCCCAACCA-3' (配列番号 : 1 4 8)

P R O 2 4 6 (D N A 3 5 6 3 9 - 1 1 7 2)

正方向 : 5'-GGCAGAGACTTCCAGTCACTGA-3' (配列番号 : 1 4 9)

逆方向 : 5'-GCCAAGGGTGGTGTAGATAGG-3' (配列番号 : 1 5 0)

プローブ : 5'-CAGGCCCTTGATCTGTACCCA-3' (配列番号 : 1 5 1)

【 0 2 2 0 】

5'ヌクレアーゼアッセイ反応は蛍光PCRベースの技術であり、実時間での増幅監視のためのTaqDNAポリメラーゼ酵素の5'エキソヌクレアーゼ活性を使用する。PCR反応に典型的なアプライコンの生成に2つのオリゴヌクレオチドプライマーを使用する(正方向[.f]及び逆方向[.r])。第3のオリゴヌクレオチド、又はプローブ(.p)は、2つのPCRプライマーの間に位置するヌクレオチド配列を検出するために設計された。プローブはTaqDNAポリメラーゼ酵素により非伸展性であり、レポーター蛍光染料及びクエンチャー蛍光染料で標識される。2つの染料がプローブ上に接近して位置する場合、レポーター染料からのレーザー誘導発光は消光染料によって消光される。増幅反応の間、プローブはTAQ DNAポリメラーゼ酵素によりテンプレートに依存する形で切断される。得られたプローブ断片は溶液中に解離し、放出されたレポーター染料からのシグナルは第2のフルオロホアからの消光効果を受けない。レポーター染料の一分子は、新たに合成された各分子に対して遊離せしめられ、非消光レポーター染料の検出がデータの定量的解釈の基礎を提供する。

5'ヌクレアーゼ法は、ABI Prism 7700TM配列検出などの実時間定量的PCR装置で実施される。系は温度サイクル器、レーザー、電荷結合素子(CCD)カメラ及びコンピュータからなる。系は温度サイクル器上で96-ウェルでの試料を増幅させる。増幅中に、レーザー誘導蛍光シグナルは、実時間で、光ファイバーケーブルで96ウェルに集められ、CCDで検出される。系は装置の実行及びデータの分析のためのソフトウェアを含む。

5'ヌクレアーゼアッセイデータは、最初はCt又は境界サイクルで表される。これは、レポーターシグナルが蛍光のバックグラウンドを越えて蓄積されるサイクルとして定義される。正常なヒトDNAの結果を癌DNAの結果と比較する場合に、Ct値を核酸試料における特定の標的配列の出発コピー相対数の定量的尺度として使用した。

表8は、本発明のP R Oポリペプチド化合物のスクリーニングに用いた種々の一次腫瘍の段階、T段階及びN段階を記載する。

表8
原発性肺及び大腸腫瘍の特徴

原発性腫瘍の段階	段階	他の段階	デューク段階	T段階	N段階
ヒト 肺 腫瘍 AdenoCa (SRCC724) [LT1]	IIA			T1	N1
ヒト 肺 腫瘍 SqCCa (SRCC725) [LT1a]	IIB			T3	N0
ヒト 肺 腫瘍 AdenoCa (SRCC726) [LT2]	IB			T2	N0
ヒト 肺 腫瘍 AdenoCa (SRCC727) [LT3]	IIIA			T1	N2
ヒト 肺 腫瘍 AdenoCa (SRCC728) [LT4]	IB			T2	N0
ヒト 肺 腫瘍 SqCCa (SRCC729) [LT6]	IB			T2	N0
ヒト 肺 腫瘍 Aden/SqCCa (SRCC730) [LT7]	IA			T1	N0
ヒト 肺 腫瘍 AdenoCa (SRCC731) [LT9]	IB			T2	N0
ヒト 肺 腫瘍 SqCCa (SRCC732) [LT10]	IIB			T2	N1
ヒト 肺 腫瘍 SqCCa (SRCC733) [LT11]	IIA			T1	N1
ヒト 肺 腫瘍 AdenoCa (SRCC734) [LT12]	IV			T2	N0
ヒト 肺 腫瘍 AdenoSqCCa (SRCC735)[LT13]	IB			T2	N0
ヒト 肺 腫瘍 SqCCa (SRCC736) [LT15]	IB			T2	N0
ヒト 肺 腫瘍 SqCCa (SRCC737) [LT16]	IB			T2	N0
ヒト 肺 腫瘍 SqCCa (SRCC738) [LT17]	IIB			T2	N1
ヒト 肺 腫瘍 SqCCa (SRCC739) [LT18]	IB			T2	N0
ヒト 肺 腫瘍 SqCCa (SRCC740) [LT19]	IB			T2	N0
ヒト 肺 腫瘍 LCCa (SRCC741) [LT21]	IIB			T3	N1
ヒト 肺 AdenoCa (SRCC811) [LT22]	IA			T1	N0
ヒト 結腸 AdenoCa (SRCC742) [CT2]	M1	D	pT4	N0	
ヒト 結腸 AdenoCa (SRCC743) [CT3]			B	pT3	N0
ヒト 結腸 AdenoCa (SRCC744) [CT8]			B	T3	N0
ヒト 結腸 AdenoCa (SRCC745) [CT10]			A	pT2	N0
ヒト 結腸 AdenoCa (SRCC746) [CT12]		MO, R1	B	T3	N0
ヒト 結腸 AdenoCa (SRCC747) [CT14]		pMO, RO	B	pT3	pN0
ヒト 結腸 AdenoCa (SRCC748) [CT15]		M1, R2	D	T4	N2
ヒト 結腸 AdenoCa (SRCC749) [CT16]		pMO	B	pT3	pN0
ヒト 結腸 AdenoCa (SRCC750) [CT17]			C1	pT3	pN1
ヒト 結腸 AdenoCa (SRCC751) [CT1]		MO, R1	B	pT3	N0
ヒト 結腸 AdenoCa (SRCC752) [CT4]			B	pT3	M0
ヒト 結腸 AdenoCa (SRCC753) [CT5]		G2	C1	pT3	pN0
ヒト 結腸 AdenoCa (SRCC754) [CT6]		pMO, RO	B	pT3	pN0
ヒト 結腸 AdenoCa (SRCC755) [CT7]		G1	A	pT2	pN0
ヒト 結腸 AdenoCa (SRCC756) [CT9]		G3	D	pT4	pN2
ヒト 結腸 AdenoCa (SRCC757) [CT11]			B	T3	N0
ヒト 結腸 AdenoCa (SRCC758) [CT18]		MO, RO	B	pT3	pN0

【 0 2 2 1 】

DNA 調製 :

DNA は培養した細胞系、一次腫瘍、正常ヒト血液から調製した。単離は、全てQuiagenからの、精製キット、バッファーセット及びプロテアーゼを用い、製造者の指示と下記に従って実施した。

細胞培養溶解 :

細胞を洗浄し、チップ当たり 7.5×10^8 の濃度でトリプシン化し、4 で5分間1000rpmで遠心分離してペレット化し、次いで1/2容量のPBS再遠心で洗浄した。ペレットを3回洗浄し、懸濁細胞を回収して2xPBSで洗浄した。次いで細胞を10mLのPBSに懸濁させた。バッファーC1を4 で平衡化させた。Quiagenプロテアーゼ#19155を6.25mLの冷ddH2Oで最終濃度20mg/mlまで希釈して4 で平衡化させた。10mLのG2バッファーを、QuiagenRNAsEASTOCK(100mg/ml)を200µg/mlの最終濃度まで希釈して調製した。

バッファーC1(10mL、4)及びddH2O(40mL、4)を、次いで10mLの細胞懸濁物に添加し、反転させて混合し、氷上で10分間インキュベートした。細胞核をBeckmanスイングバケットロータで4 において2500rpmで15分間遠心分離することによりペレット化した。上清を捨て、核をボルテックスしながら2mLのバッファーC1(4)及び6mLのddH2Oに懸濁し、4 において2500rpmで15分間2回目の遠心分離をした。次いで核を残りのバッファー中にチップ当たり200µlを用いて再懸濁した。G2バッファー(10m

10

20

30

40

50

1)を懸濁した核に添加しながら緩いボルテックスを適用した。バッファー添加が完了したら、強いボルテックスを30秒間適用した。Quiagenプロテアーゼ(200 μ l、上記のように調製)を添加し、50 $^{\circ}$ Cで60分間インキュベートした。インキュベーション及び遠心分離を、溶解物が透明になるまで繰り返した(例えば、さらに30-60分間インキュベートし、4 $^{\circ}$ Cで10分間3000xgでペレット化する)。

【0222】

固体ヒト腫瘍試料の調製及び溶解：

腫瘍試料を秤量し50mlのコニカル管に配して氷上に保持した。加工は調製当たり250mgの組織未満に制限した(1チップ/調製)。プロテアーゼ溶液を6.25mlの冷d d H 2 O中に最終濃度20mg/mlまで希釈することにより新たに調製して4 $^{\circ}$ Cで貯蔵した。DNAse Aを最終濃度200mg/mlまで希釈することによりG2バッファー(20ml)を調製した(100mg/mlのストックから)。エアロゾルの吸入を避けるために層流TCフード内でポリトロンの大さなチップを用いて、腫瘍組織を19mlのG2バッファー中で60秒間均一化し、室温に保持した。試料間で、各々2Lのd d H 2 Oで2x30秒間、次いでG2バッファー(50ml)でスピンのことによりポリトロンを清浄化した。組織がジェネレータチップ上に存在する場合は、装置を分解して清浄化した。

Quiagenプロテアーゼ(上記のように調製、1.0ml)を添加し、次いでボルテックスして50 $^{\circ}$ Cで3時間インキュベートした。インキュベーション及び遠心分離を、溶解物が透明になるまで繰り返した(例えば、さらに30-60分間インキュベートし、4 $^{\circ}$ Cで10分間3000xgでペレット化する)。

ヒト血液調製及び溶解：

健常なボランティアから標準的な感染剤プロトコールを用いて血液を採りだし、チップ当たり10mlの試料にクエン酸化した。Quiagenプロテアーゼを6.25mlの冷d d H 2 O中に最終濃度20mg/mlまで希釈することにより新たに調製して4 $^{\circ}$ Cで貯蔵した。DNAse Aを100mg/mlのストックから最終濃度200 μ g/mlまで希釈することによりG2バッファーを調製した。血液(10ml)を50mlのコニカル管に配し、10mlのC1バッファー及び30mlのd d H 2 O(ともに予め4 $^{\circ}$ Cで平衡化したもの)を添加し、反転させて成分を混合して氷上に10分間保持した。Beckmanスイングパケットローターで、4 $^{\circ}$ Cにおいて2500rpmで15分間核をペレット化し、上清を捨てた。ボルテックスしながら、核を2mlのC1バッファー(4 $^{\circ}$ C)及び6mlのd d H 2 O(4 $^{\circ}$ C)中に懸濁させた。ボルテックスはペレットが白くなるまで繰り返した。次いで核を残りのバッファー中に200 μ lチップを用いて懸濁させた。G2バッファー(10ml)を懸濁核に添加しながら緩くボルテックスし、次いで30秒間強くボルテックスした。Quiagenプロテアーゼを添加(200 μ l)し、50 $^{\circ}$ Cで60分間インキュベートした。インキュベーション及び遠心分離を、溶解物が透明になるまで繰り返した(例えば、さらに30-60分間インキュベートし、4 $^{\circ}$ Cで10分間3000xgでペレット化する)。

【0223】

透明化溶解物の精製：

(1)ゲノムDNAの単離：

ゲノムDNAを10mlのQBTバッファーで平衡化した(マキシチップ調製当たり1試料)。QF溶離バッファーを50 $^{\circ}$ Cで平衡化した。試料を30秒間ボルテックスし、次いで平衡化チップに負荷して重力により排液した。チップを2x15mlのQCバッファーで洗浄した。DNAを、30mlのシラン化し、オートクレーブした30mlCortex管に15mlのQFバッファー(50 $^{\circ}$ C)で溶離した。イソプロパノール(10.5ml)を各試料に添加し、管をパラフィンで被覆し、DNAが沈殿するまで繰り返し反転させて混合した。試料を、SS-34ローターで4 $^{\circ}$ Cにおいて15,000rpmで10分間遠心分離してペレット化した。ペレット位置をマークして上清を捨て、10mlの70%エタノール(4 $^{\circ}$ C)を添加した。試料を、SS-34ローターで4 $^{\circ}$ Cにおいて10,000rpmで10分間遠心分離して再度ペレット化した。ペレット位置をマークして上清を捨てた。次いで管を乾燥棚に横にして置き、37 $^{\circ}$ Cで10分間乾燥させたが、試料の過剰乾燥には注意した。

乾燥後、ペレットを1.0mlのTE(pH8.5)に溶解し、50 $^{\circ}$ Cに1-2時間置いた。試料を

4 に終夜保持して溶解を続けた。次いでDNA溶液を、ツベルクリンシリンジ上に26ゲージの針を具備する1.5ml管に移した。DNAを剪断するために移行を5×繰り返した。次いで試料を50に1-2時間置いた。

【0224】

(2)ゲノムDNAの定量及び遺伝子増幅アッセイのための調製：

各管のDNAレベルを1:20希釈(5μl DNA + 95μl ddH₂O)での標準的なA₂₆₀、A₂₈₀スペクトルにより、Beckman DU640分光光度計の0.1ml石英キュベットを用いて定量した。A₂₆₀/A₂₈₀比率は1.8-1.9の範囲であった。次いで各DNA試料をTE (pH8.5)中に約200ng/mlまで希釈した。最初の材料が高濃度(約700ng/μl)である場合、材料を50に再懸濁するまで数時間置いた。

10

次いで、希釈した材料(20-600ng/ml)に対して、製造者の指示を以下のように改変して蛍光DNA定量を実施した。これは、Hoeffer DyNA Quant 200蛍光計を約15分間暖めて実施した。Hoechst染料作業溶液(#H33258、10μl、使用の12時間以内に調製)を100mlの1xTNEバッファーに希釈した。2mlキュベットを蛍光計溶液で満たし、機械に配し、機械をゼロ調節した。pGEM3Zf(+)(2μl、ロット#360851026)を2mlの蛍光計溶液に添加して200単位で校正した。次いで、さらに2μlのpGEM3Zf(+)DNAを試験し、400+/-10単位で読みを確認した。次いで各試料を少なくとも3回読んだ。3試料が互いに10%以内であることが見られたとき、それらの平均をとり、この値を定量化値として用いた。

次いで、蛍光測定で決定した濃度を、各試料をddH₂O中に10ng/μlまで希釈するのに用いた。これは、1回のTaqManプレートアッセイについて全てのテンプレート試料について同時に行い、500-1000アッセイを実施するのに十分な材料で行った。試料は、TaqmanTMプライマー及びプローブで、B-アクチン及びGAPDHともに、正常なヒトDNAとテンプレート対照を持たない単一のプレート上で3回試験した。試験DNAから減算した正常ヒトDNAのCt値が+/-1Ctであったときに希釈試料を用いた。希釈した、ロット定性化したゲノムDNAを、1.0mlアリコートで-80において保存した。続いて遺伝子増幅アッセイに使用するアリコートは、4で保存した。各1mlのアリコートが、8-9プレート又は64の試験に十分である。

20

遺伝子増幅アッセイ：

本発明のPROポリペプチド化合物を以下の一次腫瘍でスクリーニングし、0.1以上の得られたCt値を以下の表9に報告する。

30

【0225】

表9

肺及び結腸原発性腫瘍及び細胞系モデルにおける ΔCt 値

原発性腫瘍又は 細胞系列	PRO187	PRO533	PRO246	
LT7		1.04		
LT13	2.74 2.98 2.44		1.63 1.68	
LT3			1.06	10
LT12	2.70 2.90 2.27		2.47 1.74	
LT30	1.67			
LT21			1.50	
LT-1a		1.02		
LT10			1.07	
LT11		1.09	3.43 1.41	20
LT15	3.75 3.92 3.49		2.11 1.56	
LT16	2.10	1.66		
LT17		1.32	2.68 1.69	
LT19	4.05 3.99	1.67	1.91 1.68 1.16	30
CT2	3.56			
CT8	1.01			
CT10	1.81			
CT14	1.82			
CT1	1.24 1.34			
CT5	2.96 2.99		1.33 2.39	40

表9(続き)
肺及び結腸原発性腫瘍及び細胞系モデルにおける Δ Ct1値

原発性腫瘍又は細胞系	PRO187	PRO533	PRO246
CT6	1.10		
CT7	1.40		
CT9	1.39		1.09
CT11	2.22		1.48
	2.26		1.12

10

20

30

40

50

上述した種々のDNAの増幅は種々のヒト組織から誘導された種々の癌腫瘍及び腫瘍細胞系で起こるので、これらの分子は腫瘍形成及び/又は成長において有意な役割を果たすと思われる。結果として、これらの分子の増幅及び/又は向上した発現により、個々の腫瘍の存在を検出するための診断を行うことが可能で、上述したDNA分子にコードされるタンパク質に対して指向するアンタゴニスト(例えば抗体)は、癌治療における有用性を持つと予測される。

【0226】

実施例69：ウシ周皮細胞における遺伝子発現(アッセイ105)

このアッセイは、上述したアッセイ96におけるヒットによって誘発された周皮細胞の遺伝子発現パターンを特定するために設計された。ウシ周皮細胞を1週間、成長培地において60mm培養皿に蒔いた。1日目、種々のポリペプチドを希釈し(1%)、1、4及び24時間の間、周皮細胞と共にインキュベートした。細胞を収集し、含まれていた使用説明書に従い、TRI-試薬を使用してRNAを単離した。次に、RNAを、分光光度計を使用し、260/280ODを読みとることにより定量した。Perkin Elmer試薬と、特に設計されたウシプロンプ及びプライマーを使用し、TaqMan反応により遺伝子発現分析を行った。次の遺伝子の発現を分析した：GAPDH、ベータ-インテグリン、結合組織成長因子-ベータ(CTGF)、ICAM-1、単球化学誘引物質タンパク-1(MCP-1)、オステオポンチン、トランスフォーミング成長因子-ベータ(TGF-ベータ)、TGF-ベータレセプター、メタロプロテイナーゼの組織インヒビター(TIMP)、組織因子(TF)、VEGF-、トロンボスポンジン、VEGF-、アンジオポエチン-2、及びコラゲナーゼ。複製を平均し、SDを決定した。次に遺伝子発現レベルをGAPDHに標準化した。ついで、これらを、未処理の対照と比較したときにウシ周皮細胞に遺伝子発現を有意には誘発しないタンパク質(PIN32)で得られた発現レベルに標準化した。PIN32対照よりも2倍以上の遺伝子発現を生じさせた全てのPROポリペプチドがポジティブであるとみなされる。

次のPROポリペプチドがこのアッセイにおいてポジティブであると検定された：PRO217。

【0227】

実施例70：サイトカイン放出アッセイ(アッセイ120)

このアッセイは、本発明のPROポリペプチドが末梢血液単核細胞(PBMCs)からサイトカインの放出を誘発することができるか否かを決定するために設計された。PBMCsからサイトカインの放出を誘発可能なPROポリペプチドは、サイトカインの放出を高めることが有益な病状の治療に有用であり、当業者により容易に明らかになるであろう。特に、 1×10^6 細胞/mlの末梢血液単核細胞(PBMC)を1%のPROポリペプチドと共に、完全RPMI培地で3日間培養した。次に上清を回収し、ヒトIgG処理対照と比較し、ELISAにより種々のサイトカインの濃度の増加度合いを検定した。アッセイにおいて

ポジティブとは、ヒト I g G 処理対照と比較して、P R O ポリペプチド処理試料のサイトカイン濃度が 10 倍以上増加したものである。

次のポリペプチドがこのアッセイにおいてポジティブであると検定された：P R O 9 9 4 0。

【 0 2 2 8 】

実施例 7 1：周皮細胞を活性化させる P R O ポリペプチドの同定(アッセイ 1 2 5)

このアッセイは、本発明のあるポリペプチドが周皮細胞の増殖を活性化するように作用し、よって周皮細胞関連腫瘍の特定のタイプの診断用マーカーとしてだけでなく、周皮細胞関連腫瘍の治療に有用であることが予想されるアンタゴニストの生成にも有用であることを示すものである。また、周皮細胞増殖の活性化は血管形成の誘発にも関連しており、よって、周皮細胞の増殖を誘発可能な P R O ポリペプチドは、例えば創傷治癒等を含む、血管形成の誘発が有益である病状の治療に有用であることが予想される。特に、1 日目に、周皮細胞を VEC Technologies から取得し、5 ml の培地以外をフラスコから取り出した。2 日目に周皮細胞をトリプシン化し、洗浄し、スピンさせ、ついで 9 6 ウェルプレートに蒔いた。7 日目に培地を取り出し、周皮細胞を 100 μ l の特定の P R O ポリペプチド又は対照処理体(ポジティブ対照 = D E M + 5% + / - P D G F @ 500ng/ml ; ネガティブ対照 = P I N 3 2、周皮細胞の増殖において何ら有意な影響がないと決定されたポリペプチド)で処理した。次に C - f o s 及び G A P D H 遺伝子発現レベルを測定し、複製を平均し、S D を決定した。c - f o s 値を G A P D H に標準化し、結果を P I N 2 に対する増加倍数として表す。ネガティブ対照と比較して少なくとも 2 倍以上の反応があるならば、アッセイにおいてポジティブとみなされる。

10

20

次のポリペプチドがこのアッセイにおいてポジティブであると検定された：P R O 2 1 7。

【 0 2 2 9 】

実施例 7 2：レセプター/リガンド相互作用の同定

このアッセイでは、様々なポリペプチドが、レセプター/リガンド相互作用を同定する目的で、潜在的レセプター又はリガンド分子のパネルに結合する能力について検定される。既知のレセプターに対するリガンド、既知のリガンドに対するレセプター又は新規のレセプター/リガンド対の同定は、例えばレセプター又はリガンドを発現することが知られている細胞に対する(リガンド又はレセプターに結合した)生物活性分子の標的化、それらを含むと思われる組成物で、ここで組成物はリガンド又はレセプターを発現する疑いのある細胞を含むものの中のレセプター又はリガンドの存在を検出するための試薬としてのレセプター又はリガンドの使用、レセプター又はリガンドを発現することが知られている細胞の成長又はその他の生物学的又は免疫学的活性の変調、レセプター又はリガンドを発現する細胞の又は細胞に対する免疫反応の変調、レセプター又はリガンドを発現する細胞の成長、又は生物学的又は免疫学的活性を変調するレセプター又はリガンドに対するアゴニスト、アンタゴニスト及び/又は抗体の調製、及び当業者により直ぐに明らかになるであろう様々な他の適応を含む様々な適応に対して有用である。

30

このアッセイは次のようにして実施される。レセプターに対するリガンドであると思われる本発明の P R O ポリペプチドをヒト I g G の F c 領域を含む融合タンパク質(イムノアドヘシン)として発現される。レセプター-リガンド結合は、イムノアドヘシンポリペプチドと候補 P R O ポリペプチドレセプターを発現する細胞(例えば C o s 細胞)と相互作用させ、F c 融合ドメインに対する蛍光試薬で結合イムノアドヘシンを可視化し、顕微鏡で検査することにより検出される。候補レセプターを発現する細胞を、レセプター分子として機能しうる P R O ポリペプチドをコードする c D N A 発現ベクターのライブラリーの所定のサブセットの平行した一過性形質移入により作製する。次に、細胞を、レセプター結合可能性を検定している P R O ポリペプチドイムノアドヘシンの存在下で 1 時間インキュベートする。次に細胞を洗浄し、パラホルムアルデヒドで固定した。次に、細胞を、P R O ポリペプチドイムノアドヘシンの F c 部分に対する蛍光抱合抗体(例えば、F I T C 抱合ヤギ抗ヒト F c 抗体)と共にインキュベートした。次いで細胞を再度洗浄し、顕微鏡で

40

50

検査した。ポジティブな相互作用は、特定のPROポリペプチドレセプター又はレセプタープールをコードするcDNAで形質移入された細胞の蛍光標識の存在、及び他のcDNA又はcDNAプールで形質移入された同様の調製細胞の同様の蛍光標識の不在により判断される。cDNA発現ベクターの所定のプールが、PROポリペプチドイムノアドヘシンの相互作用がポジティブであると判断されたならば、そのプールを含む個々のcDNA種は個々に検定されて(プールは「壊される」)、PROポリペプチドイムノアドヘシンの相互作用が可能なレセプターをコードする特異的なcDNAが決定される。

このアッセイにおける他の実施態様では、エピトープタグ潜在的リガンドPROポリペプチド(例えば、ヒスチジン「His」タグ)を、ヒトIgG(イムノアドヘシン)のFcドメインとの融合物として発現された潜在的レセプターPROポリペプチド分子のパネルと相互作用させることができる。エピトープタグPROポリペプチドとの1時間の共インキュベーションに続いて、候補レセプターをプロテインAビーズでそれぞれ免疫沈降させ、ビーズを洗浄した。潜在的リガンド相互作用を、エピトープタグに対する抗体を用いた免疫沈降複合体のウエスタンブロット分析により決定した。エピトープタグタンパク質の予想される分子量のバンドが、候補レセプターを用いたウエスタンブロット分析で見出され、潜在的レセプターのパネルの他のメンバーとの間に生じることが見出されなかった場合は、相互作用が生じたと判断される。

これらのアッセイを使用して、次のレセプター/リガンド相互作用をここで同定した：

(1) PRO533は線維芽成長因子レセプター-4(FGFR-4; Partanenら, EMBO J. 10(6):1347-1354(1991)を参照)に結合する。

(2) PRO301はそれ自体に結合し、よって接着分子として機能する。

(3) PRO187は、高親和性で線維芽成長因子レセプター-3(FGFR-3; Keeganら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:1095-1099(1991)を参照)、低親和性でFGFR-1、2及び4(それぞれ、Isacchiら, Nuc. Acids. Res. 18(7):1906(1990)、Dionneら, EMBO J. 9(9):2685-2692(1990)及びPartanenら, EMBO J. 10(6):1347-1354(1991)を参照)に結合する。

(4) PRO337はPRO6004に結合する。

(5) PRO1411はPRO4356に結合する。

(6) PRO10096はPRO2630に結合する。

(7) PRO246はそれ自体に結合し、よって付着分子として機能する。

(8) PRO6307はPRO265に結合する。

(9) PRO6003はPRO941に結合する。

【0230】

材料の寄託

次の材料をアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション, 10801 ユニバーシティブルバード, マナッサス, ヴァージニア20110-2209, 米国(ATCC)に寄託した：

表10

材料	ATCC寄託番号	寄託日
DNA22779-1130	209280	1997年9月18日
DNA26846-1397	203406	1998年10月27日
DNA32279-1131	209259	1997年9月16日
DNA32288-1132	209261	1997年9月16日
DNA33094-1131	209256	1997年9月16日
DNA33785-1143	209417	1997年10月28日
DNA35663-1129	209201	1997年6月18日
DNA46777-1253	209619	1998年2月5日
DNA60783-1611	203130	1998年8月18日
DNA62306-1570	203254	1998年9月9日
DNA62880-1513	203097	1998年8月4日
DNA64896-1539	203238	1998年9月9日

10

20

30

40

50

DNA71290-1630	203275	1998年9月22日
DNA96031-2664	PTA-237	1999年6月15日
DNA108722-2743	PTA-552	1999年8月17日
DNA35674-1142	209416	1997年10月28日
DNA41234	209618	1998年2月5日
DNA77503-1686	203362	1998年10月20日
DNA49435-1219	209480	1997年11月21日
DNA40628-1216	209432	1997年11月7日
DNA27864-1155	209375	1997年10月16日
DNA43316-1237	209487	1997年11月21日
DNA59212-1627	203245	1998年9月9日
DNA86576-2595	203868	1999年3月23日
DNA35639-1172	209396	1997年10月17日
DNA36350-1158	209378	1997年10月16日
DNA53906-1368	209747	1998年4月7日
DNA125185-2806	PTA-1031	1999年12月7日
DNA83568-2692	PTA-386	1999年7月20日

10

【0231】

これらの寄託は、特許手続き上の微生物の寄託の国際的承認に関するブダペスト条約及びその規則(ブダペスト条約)の規定に従って行われた。これは、寄託の日付から30年間、寄託の生存可能な培養が維持されることを保証するものである。寄託物はブダペスト条約の条項に従い、またジェネンテク社とATCCとの間の合意に従い、ATCCから入手することができ、これは、どれが最初であるうとも、関連した米国特許の発行時又は任意の米国又は外国特許出願の公開時に、寄託培養物の後代を永久かつ非制限的に入手可能とすることを保証し、米国特許法第122条及びそれに従う特許庁長官規則(特に参照番号886OG638の37CFR第1.14条を含む)に従って権利を有すると米国特許庁長官が決定した者に子孫を入手可能とすることを保証するものである。

20

本出願の譲受人は、寄託した培養物が、適切な条件下で培養されていた場合に死亡もしくは損失又は破壊されたならば、材料は通知時に同一の他のものと即座に取り替えることに同意する。寄託物質の入手可能性は、特許法に従いあらゆる政府の権限下で認められた権利に違反して、本発明を実施するライセンスであるとみなされるものではない。

30

上記の文書による明細書は、当業者に本発明を実施できるようにするために十分であると考えられる。寄託した態様は、本発明のある側面の一つの説明として意図されており、機能的に等価なあらゆる作成物がこの発明の範囲内にあるため、寄託された作成物により、本発明の範囲が限定されるものではない。ここでの物質の寄託は、ここに含まれる文書による説明が、そのベストモードを含む、本発明の任意の側面の実施を可能にするために不十分であることを認めるものではないし、それが表す特定の例証に対して請求の範囲を制限するものと解釈されるものでもない。実際、ここに示し記載したものに加えて、本発明を様々に改変することは、前記の記載から当業者にとっては明らかなものであり、添付の請求の範囲内に入るものである。

40

【図面の簡単な説明】

【0232】

【図1】天然配列PRO196cDNAのヌクレオチド配列(配列番号:3)を示し、配列番号:3は、ここで「DNA22779-1130」と命名されるクローンである。

【図2】図1に示した配列番号:3のコード配列から誘導されたアミノ酸配列(配列番号:4)を示す。

【図3】天然配列PRO444cDNAのヌクレオチド配列(配列番号:8)を示し、配列番号:8は、ここで「DNA26846-1397」と命名されるクローンである。

【図4】図3に示した配列番号:8のコード配列から誘導されたアミノ酸配列(配列番号:9)を示す。

50

【図5】天然配列PRO183 cDNAのヌクレオチド配列(配列番号：10)を示し、配列番号：10は、ここで「DNA28498」と命名されるクローンである。

【図6】図5に示した配列番号：10のコード配列から誘導されたアミノ酸配列(配列番号：11)を示す。

【図7】天然配列PRO185 cDNAのヌクレオチド配列(配列番号：12)を示し、配列番号：12は、ここで「DNA28503」と命名されるクローンである。

【図8】図7に示した配列番号：12のコード配列から誘導されたアミノ酸配列(配列番号：13)を示す。

【図9】天然配列PRO210 cDNAのヌクレオチド配列(配列番号：14)を示し、配列番号：14は、ここで「DNA32279-1131」と命名されるクローンである。

【図10】図9に示した配列番号：14のコード配列から誘導されたアミノ酸配列(配列番号：15)を示す。

【図11】天然配列PRO215 cDNAのヌクレオチド配列(配列番号：16)を示し、配列番号：16は、ここで「DNA32288-1132」と命名されるクローンである。

【図12】図11に示した配列番号：16のコード配列から誘導されたアミノ酸配列(配列番号：17)を示す。

【図13】天然配列PRO217 cDNAのヌクレオチド配列(配列番号：21)を示し、配列番号：21は、ここで「DNA33094-1131」と命名されるクローンである。

【図14】図13に示した配列番号：21のコード配列から誘導されたアミノ酸配列(配列番号：22)を示す。

【図15】天然配列PRO242 cDNAのヌクレオチド配列(配列番号：23)を示し、配列番号：23は、ここで「DNA33785-1143」と命名されるクローンである。

【図16】図15に示した配列番号：23のコード配列から誘導されたアミノ酸配列(配列番号：24)を示す。

【図17】天然配列PRO288 cDNAのヌクレオチド配列(配列番号：28)を示し、配列番号：28は、ここで「DNA35663-1129」と命名されるクローンである。

【図18】図17に示した配列番号：28のコード配列から誘導されたアミノ酸配列(配列番号：29)を示す。

【図19】天然配列PRO365 cDNAのヌクレオチド配列(配列番号：31)を示し、配列番号：31は、ここで「DNA46777-1253」と命名されるクローンである。

【図20】図19に示した配列番号：31のコード配列から誘導されたアミノ酸配列(配列番号：32)を示す。

【図21】天然配列PRO1361 cDNAのヌクレオチド配列(配列番号：38)を示し、配列番号：38は、ここで「DNA60783-1611」と命名されるクローンである。

【図22】図21に示した配列番号：38のコード配列から誘導されたアミノ酸配列(配列番号：39)を示す。

【図23】天然配列PRO1308 cDNAのヌクレオチド配列(配列番号：40)を示し、配列番号：40は、ここで「DNA62306-1570」と命名されるクローンである。

【図24】図23に示した配列番号：40のコード配列から誘導されたアミノ酸配列(配列番号：41)を示す。

【図25】天然配列PRO1183 cDNAのヌクレオチド配列(配列番号：51)を示し、配列番号：51は、ここで「DNA62880-1513」と命名されるクローンである。

10

20

30

40

50

【図 2 6】図 2 5 に示した配列番号：5 1 のコード配列から誘導されたアミノ酸配列(配列番号：5 2)を示す。

【図 2 7】天然配列 PRO 1 2 7 2 c DNA のヌクレオチド配列(配列番号：5 3)を示し、配列番号：5 3 は、ここで「DNA 6 4 8 9 6 - 1 5 3 9」と命名されるクローンである。

【図 2 8】図 2 7 に示した配列番号：5 3 のコード配列から誘導されたアミノ酸配列(配列番号：5 4)を示す。

【図 2 9】天然配列 PRO 1 4 1 9 c DNA のヌクレオチド配列(配列番号：5 5)を示し、配列番号：5 5 は、ここで「DNA 7 1 2 9 0 - 1 6 3 0」と命名されるクローンである。

【図 3 0】図 2 9 に示した配列番号：5 5 のコード配列から誘導されたアミノ酸配列(配列番号：5 6)を示す。

【図 3 1】天然配列 PRO 4 9 9 9 c DNA のヌクレオチド配列(配列番号：5 7)を示し、配列番号：5 7 は、ここで「DNA 9 6 0 3 1 - 2 6 6 4」と命名されるクローンである。

【図 3 2】図 3 1 に示した配列番号：5 7 のコード配列から誘導されたアミノ酸配列(配列番号：5 8)を示す。

【図 3 3】天然配列 PRO 7 1 7 0 c DNA のヌクレオチド配列(配列番号：6 2)を示し、配列番号：6 2 は、ここで「DNA 1 0 8 7 2 2 - 2 7 4 3」と命名されるクローンである。

【図 3 4】図 3 3 に示した配列番号：6 2 のコード配列から誘導されたアミノ酸配列(配列番号：6 3)を示す。

【図 3 5】天然配列 PRO 2 4 8 c DNA のヌクレオチド配列(配列番号：6 4)を示し、配列番号：6 4 は、ここで「DNA 3 5 6 7 4 - 1 1 4 2」と命名されるクローンである。

【図 3 6】図 3 5 に示した配列番号：6 4 のコード配列から誘導されたアミノ酸配列(配列番号：6 5)を示す。

【図 3 7】天然配列 PRO 3 5 3 c DNA のヌクレオチド配列(配列番号：7 2)を示し、配列番号：7 2 は、ここで「DNA 4 1 2 3 4」と命名されるクローンである。

【図 3 8】図 3 7 に示した配列番号：7 2 のコード配列から誘導されたアミノ酸配列(配列番号：7 3)を示す。

【図 3 9】天然配列 PRO 1 3 1 8 c DNA のヌクレオチド配列(配列番号：7 7)を示し、配列番号：7 7 は、ここで「DNA 7 3 8 3 8 - 1 6 7 4」と命名されるクローンである。

【図 4 0】図 3 9 に示した配列番号：7 7 のコード配列から誘導されたアミノ酸配列(配列番号：7 8)を示す。

【図 4 1】天然配列 PRO 1 6 0 0 c DNA のヌクレオチド配列(配列番号：7 9)を示し、配列番号：7 9 は、ここで「DNA 7 7 5 0 3 - 1 6 8 6」と命名されるクローンである。

【図 4 2】図 4 1 に示した配列番号：7 9 のコード配列から誘導されたアミノ酸配列(配列番号：8 0)を示す。

【図 4 3】天然配列 PRO 9 9 4 0 c DNA のヌクレオチド配列(配列番号：8 3)を示し、配列番号：8 3 は、ここで「DNA 9 2 2 8 2」と命名されるクローンである。

【図 4 4】図 4 3 に示した配列番号：8 3 のコード配列から誘導されたアミノ酸配列(配列番号：8 4)を示す。

【図 4 5】天然配列 PRO 5 3 3 c DNA のヌクレオチド配列(配列番号：8 5)を示し、配列番号：8 5 は、ここで「DNA 4 9 4 3 5 - 1 2 1 9」と命名されるクローンである。

【図 4 6】図 4 5 に示した配列番号：8 5 のコード配列から誘導されたアミノ酸配列(配列番号：8 6)を示す。

10

20

30

40

50

【図47】天然配列PRO301cDNAのヌクレオチド配列(配列番号:90)を示し、配列番号:90は、ここで「DNA40628-1216」と命名されるクローンである。

【図48】図47に示した配列番号:90のコード配列から誘導されたアミノ酸配列(配列番号:91)を示す。

【図49】天然配列PRO187cDNAのヌクレオチド配列(配列番号:98)を示し、配列番号:98は、ここで「DNA27864-1155」と命名されるクローンである。

【図50】図49に示した配列番号:98のコード配列から誘導されたアミノ酸配列(配列番号:99)を示す。

【図51】天然配列PRO337cDNAのヌクレオチド配列(配列番号:103)を示し、配列番号:103は、ここで「DNA43316-1237」と命名されるクローンである。

【図52】図51に示した配列番号:103のコード配列から誘導されたアミノ酸配列(配列番号:104)を示す。

【図53】天然配列PRO1411cDNAのヌクレオチド配列(配列番号:105)を示し、配列番号:105は、ここで「DNA59212-1627」と命名されるクローンである。

【図54】図53に示した配列番号:105のコード配列から誘導されたアミノ酸配列(配列番号:106)を示す。

【図55】天然配列PRO4356cDNAのヌクレオチド配列(配列番号:107)を示し、配列番号:107は、ここで「DNA86576-2595」と命名されるクローンである。

【図56】図55に示した配列番号:107のコード配列から誘導されたアミノ酸配列(配列番号:108)を示す。

【図57】天然配列PRO246cDNAのヌクレオチド配列(配列番号:109)を示し、配列番号:109は、ここで「DNA35639-1172」と命名されるクローンである。

【図58】図57に示した配列番号:109のコード配列から誘導されたアミノ酸配列(配列番号:110)を示す。

【図59】天然配列PRO265cDNAのヌクレオチド配列(配列番号:114)を示し、配列番号:114は、ここで「DNA36350-1158」と命名されるクローンである。

【図60】図59に示した配列番号:114のコード配列から誘導されたアミノ酸配列(配列番号:115)を示す。

【図61】天然配列PRO941cDNAのヌクレオチド配列(配列番号:120)を示し、配列番号:120は、ここで「DNA53906-1368」と命名されるクローンである。

【図62】図61に示した配列番号:120のコード配列から誘導されたアミノ酸配列(配列番号:121)を示す。

【図63】天然配列PRO10096cDNAのヌクレオチド配列(配列番号:125)を示し、配列番号:125は、ここで「DNA125185-2806」と命名されるクローンである。

【図64】図63に示した配列番号:125のコード配列から誘導されたアミノ酸配列(配列番号:126)を示す。

【図65】天然配列PRO6003cDNAのヌクレオチド配列(配列番号:127)を示し、配列番号:127は、ここで「DNA83568-2692」と命名されるクローンである。

【図66】図65に示した配列番号:127のコード配列から誘導されたアミノ酸配列(配列番号:128)を示す。

10

20

30

40

50

【図67】天然配列PRO6004cDNAのヌクレオチド配列(配列番号:129)を示し、配列番号:129は、ここで「DNA92259」と命名されるクローンである。

【図68】図67A-Bに示した配列番号:129のコード配列から誘導されたアミノ酸配列(配列番号:130)を示す。

【図69】天然配列PRO350cDNAのヌクレオチド配列(配列番号:131)を示し、配列番号:131は、ここで「DNA44175-1314」と命名されるクローンである。

【図70】図69に示した配列番号:131のコード配列から誘導されたアミノ酸配列(配列番号:132)を示す。

【図71】天然配列PRO2630cDNAのヌクレオチド配列(配列番号:136)を示し、配列番号:136は、ここで「DNA83551」と命名されるクローンである。

【図72】図71に示した配列番号:136のコード配列から誘導されたアミノ酸配列(配列番号:137)を示す。

【図73】天然配列PRO6309cDNAのヌクレオチド配列(配列番号:138)を示し、配列番号:138は、ここで「DNA116510」と命名されるクローンである。

【図74】図73に示した配列番号:138のコード配列から誘導されたアミノ酸配列(配列番号:139)を示す。

【図1】

GGCTGAGGGGAGGCCCGGAGCCCTTCTGGGGCTGGGGGATCCTCTTGCATGGTGGTGGGA
GAGAAGCGCTGCAGCAACCAGGGTCAGGCTGTGCTCAGATTTCCTCTGGCGGCATGTAA
AGGCTCCACAAAGGAGITGGGAGTTCAAATGAGGCTGTGCGGACGGCCTGAGGATGGACCC
CAAGCCCTGGACCTGCCGAGCGTGGCACTGAGGACGGCTGACGCTACTGTAGGGGAAGA
AGGTTGTGAGCAGCCCGCAGGACCCCTGGCCAGCCCTGGCCCGCAGCCTCTGCCGGAGCCCT
CTGTGGAGGACAGCCAGTGGAGCCAGTGGGACAGGCTGCTTGGCAGCCACCGGCTGCA
ACTCAGGAACCCCTCCAGAGGCCATGGACAGGCTGCCCGCTGACGGCCAGGTTGAAGCATG
TGAGGAGCCGCCCCGAGCAAGCAGGAGGAGAGGCTTTCATAGATTCTATTCAAAAGA
ATAACCACCTTTTGCRAAGGACCAAGAGGCCACTGTGGCTGACATGCTGGTGGCTCGGACTG
CTGGCTGCCATGGGAGCTGTTCAGCCGAGGAGGACGGTTTGGAGGGCACTGAGGAGGGCTC
GCCAAGAGAGTTCATTTACTTAACAGGTACAGCCGGCCGGGAGTCCAGGACAGTGTGA
CTACACCTTCATTTGCCCCCAGCCGGCTCAGCGGCTCCCTCTGGCTCACTCCAGGAG
CTTGAAGTCTCTTGGAGACCGGCTGATAGCAGGAGCTGAGGCTGCTCAACATGAGCT
GCTCAGCAGAAAGCGGAGATCGACAGCCCTGCACAGCTGCTGGAGTGGACGGCGGCTTTG
TGAGCGAGGTGAGCTGCTGCCAAGGAGCCGCAACATGAACCTGCCGGTCCAGCAGCTC
TACATGCAGCTCCTGCACAGATCATCCGACAGCGGACCAACCGTTGGAGCTCTCCAGCT
GGAGAACAGATCCTGACACAGACAGCCGACATGCTGACGCTGGCCAGCAAGTCAAGGAGC
TGGAGCACAGATACAGCAGCTGGCCACACTGGCCACACCAATCAGAGATCATCGCGCAG
TTGAGGAGCAGTCCAGAGGTTGCCCTGGCCAGGCGCCCTCCCCAGCCACCCCGCTGC
CCCGCCCGGGTCTACCAACCCACCCACTACAGCCCATCATCAACAGATCTTACCAAGC
AGATCCAGAGTACCAAGACCTGAAGTGTGCCACCCCTCTGCCCACTATGCCCACTCTC
ACCAGCTCCATCTCCACCCGACAAGCCGCTGGGCCCATGGAGAGACTGCTGCAGGCCCT
GGAGGATGGCCACGACACAGCTCCATCTACCTGGTGAAGCCGGAGAACACCAACCCCTCA
TGCAGGTGTGGTGGACAGAGACAGCAGCCCGGGGGCTGGACCTCATCCAGAGCAGCTG
GATGGCTCTGTAACTTCTTCAGCAACTGGGAGACGTAACAGCAGGCTTGGCACTTGA
CGGAGATCTGCTGGCTGGGACCACTTACTTGGCTGACACAGCAAGGCAACTACAAAC
TCTGTGACATGAGGAGCTGCTGGCCGCTGCAAGCTCTTGCAGATACGCACTTCCGC
CTGCAACCTGAGAGCGATTTAATAGCTGGCTGGGGGCTACCATGGCAATCGCGGTGA
CTCTTTACATGGCACACGGCAAGCAGTTCACACCCCTGGACAGAGATCATGATGTCTACA
CAGGAACCTGTGCCACTACAGAGAGGGAGGCTGGTGGTATAAGCCTGTGCCCACTCAAC
CTCAACGGGCTGTGATCCGCGGGGCACTACCGGAGCTACCAGGACGGAGTCTACTG
GGCTGAGTCCGAGGAGGCTTACTCACTCAAGAAAGTGGTATGATGATCCGACCGAACCC
CCAACACCTTCCACTAGCCAGCTCCCCCTCTGACCTCTCGTGGCCATTGCCAGGAGCCCA
CCCTGTGTCAGCTGGCCACAGCAAAAGCAACTCTCACCAGTTCATCCTGAGGCTGGGA
GGAGCCGGATGCTGGATTCTGTTCAGGAGTCACTGCAAGCGGATGATGGAATGAACTGAT
ACGGTGTTCCTGCTCCCTACTTTCCTTCAACACAGACAGCCCTCATGCTCCAGGACA
GGACAGGACTACAGCAACTTCTTTTAAATAAATAAGTCTTACAATAAAAAA

【図2】

<</usr/seqdb2/sst/DNA/Dnaseqs.min/ss.DNA22779
>>subunit 1 of 1, 493 aa, 1 stop
<<MW: 57104, pI: 7.67, NX(S/T): 2
MRPLCVTCNWLGLLAAMGAVAGQEDGFEGTEEGSPREFIYLNRYKRAGESQDKCTYTFIVPQ
QRVTGALCVNSKPEVLENNRVHKQLELLNELLKQRQIETLQQLVEVDGGIVSEVKLLR
KESRNMNSRVTLYMQLLHEIIRKRDNALELSQLENRILNQADMLQLASKYKDLHKYQHL
ATLAHQSEIIAQLLEHCQRVPSARVPVQPPAAPPVRYQPPTYNRIINQISTNEIQSDQNL
KVLPPPLPTMPTLTLSPSTDKPSGWRDCLQALEDHDTSSIYLVKPNTRMLQVWCQR
HDPGGWTVIQRRLDGSVNFERNWETKQGFNGIDGEYWLGLENIYWLTNQGNKLVMTMEDW
SGRKVFAEYASFRLEPESEYKRLRLGRYHGNAGDSFTWHNGKQFTLLDRDHVYTGNCAYHQ
KGGWYNYACAHSNLNGVWYRGHYSRYQDGVYWAEFRGGYSYLRKVVMMIRPNPTFH

- タンパク質の重要な特徴
シグナルペプチド
アミノ酸 1-22
N-グリコシル化部位
アミノ酸 164-168, 192-196
cAMP-及びcGMP-依存性プロテインキナーゼリン酸化部位
アミノ酸 124-128
チロシンキナーゼリン酸化部位
アミノ酸 177-184, 385-393, 385-394, 461-468
N-ミristol化部位
アミノ酸 12-18, 18-24, 22-28, 29-35, 114-120, 341-347, 465-471, 473-479
アミド部位
アミノ酸 373-377
フィブリノーゲンベータ及びガンマ鎖C末端ドメインシグネチャー
アミノ酸 438-451
フィブリノーゲンベータ及びガンマ鎖C末端ドメインシグネチャータンパク質
アミノ酸 305-343, 365-402, 411-424, 428-458
トトララーゼタンパク質
アミノ酸 275-292

【 図 3 】

CCCACGGCTCCGGCCGCTGGCCCTCGCTCCATCTTTGCGCTCTCTCGGACCTGTCAAAA
GGAGTCGCGCCCGCCGCGCCCTCCCTCCGGTGGGCCCGGAGGTAGAGAAAGTCAGT
GCCACAGCCCGACCGCGCTCTCTAGCCCTGGGCACCGGAAACGGAGGGAGTCTGAGGGT
TGGGACGCTCTGTGAGGGAGGGGAAACAGCCGCTCGAGCCTGGGCGGGCCGACCGACTGGG
GCCGGGTAGGCTCTGAAAGGCGCCGGGAGAGGGTGGCGTTGGTCAGAACCTGAGAAACA
GCCGAGAGGTTTCCACCGAGGCCCGCCCTTGGAGGATCTGAAGAGGTTCCTAGAAGAGGGT
GTTCCCTCTTTCCGGGGTCTCACAGAAGAGTTCTTGGGGTCCCGCTTCTGAGGAGGCT
GCGGCTAACAGGGCCGAACTGCCATGGATGCCAGAATCCCTGTAGTTGATAAATGTTG
GGAATAAGCTCTGCAACTTTCTTTGGCATTCAGTTGTTAAAAACAATAGGATGCAAAATCC
TCACTCCAGGTTATGAARACAGACTCTGGAAAACAGAAACACCTAAATGATCGCTTTTG
GTTGGCCGCTGTTCTTAGCGAGCAGAAGCCTTGGCCAGGGTCTGTTGTTGACTCTCGAAGAG
CACATAGCCCACTTCTAGGACTGGAGGTGCCCTACTACCATGGTAATCTCTGTATCTG
CCGATGACAGTGGAACAGATGACAGTGTGACACCCACAGCAACAGCCGAGACAGTG
CAGTACCCACTGCTGACACAAGGACCAACCCAGGACCTGTCGGCCACCAAGGAGGGGG
CGAGGACCTCATGAGCCAAAGGAGAAACAAAATGTGATGGCTAGTGTGGACACACT
GGCAGTAAACGGACTCTTGTAGATAAGTAAAGTATCTGACTACCGTCCCTCCAGTGGAA
GAAAAGTGTCTGCCCCAGCACTGACTTTAGGACTCCTTCAGTTCTTTAGGACATACTCG
CCAAGCCTGTGCTCACAGGCAAAAGGAGAAATTTTAAATGCTCCGCTGATGGCAGAGTAAA
TGATAAGATTGATGTTTTGCTGCTCATCTACTTTGCTGGAAAATGCTAAATGTTTC
TGTAGCAGAAAACAGATAAAGCTATGATCTTTATTAGAG

【 図 4 】

</usr/seqdb2/sst/DNA/Dnaseqs.min/ss.DNA26846
<subunit 1 of 1, 117 aa, 1 stop
<MW: 12692, pI: 7.50, NX(S/T): 0
MIVFGWAVFLASRSLGQGLLLTLEEHIAHFLGTGGAATMGNSICRDDSSTDDSVDTQQQQ
AENSVAFTADTRSPRDPVPRPRRGRGPHPRRKKQNVGLVLDLAVIRTLVDK

重要な特徴
シグナルペプチド
アミノ酸 1-16
N-ミリスチル化部位
アミノ酸 18-24, 32-38, 34-40, 35-41, 51-57

【 図 6 】

></usr/seqdb2/sst/DNA/Dnaseqs.full/ss.DNA28498
><subunit 1 of 1, 245 aa, 1 stop
><MW: 27564, pI: 10.18, NX(S/T): 1
MAAAIASSLIRQKRQAREKEKSNACKCVSSPSKGGKTSCKKNLNVFSRVKLFSGSKRRRRR
EPQLKGIIVTKLYSRQYHLQLQADGTIDGTDKEDSTYTLFNLI PVGLRVVAIQGVQTKLYLA
MNSEGYLYTSELFPECKFKESVFENYVYYSMLYRQQSGRWYLGKNEKEIMKGNHVK
KNKPAAHFLPKLVAMVKEFSLHDLTEFSSRSGSTPTRKSRVSVGLNNGKSMHNEST

N-グリコシル化部位
アミノ酸 242-246
グリコサミノグリカン付着部位
アミノ酸 165-169, 218-222
チロシンキナーゼリン酸化部位
アミノ酸 93-100
N-ミリスチル化部位
アミノ酸 87-93, 231-237
ATP/GTP- 結合部位モチーフA (P-ループ)
アミノ酸 231-239
HBGF/FGF ファミリータンパク質
アミノ酸 78-94, 102-153

【 図 5 】

CCCACGGCTCCGGCCGCTGGCCCTCGCTCCATCTTTGCGCTCTCTCGGACCTGTCAAAA
CCCGGGCTGTGGGCTCGACTCCGACCCAGGACAGCAGCCGCGGGAGCCGAGCCG
CGCCGGAGGAGCTGGGACGGCAITGCTGAGCCCTCTTTGCTGAAGCCGAGTGCAGGAA
GCCCGGGCAAACGAGGCTAAGGAGACCAAAGCGGCAAGTCCGAGACAGCCGACAAAGCAG
CGAGGAGAGAGGAGGAGGCGAACCCAGAGAGGGCGAGCAAAAGAGCGGTGGTGGTGG
CGTCTGGCCATGGCGGGCTATCGCCAGCTCGCTCATCCGTGAGAAGAGGCAAGCCCGG
AGCGCGAGAAATCCAACGCTGCAAGTGTGTGACGAGCCCAAGCAAGGCAAGACCGACTGC
GACAAAACAAGTAAATGCTTTTCCGGTCAAACCTCTTCGGCTCCAAGAAGAGGCGAG
AAGAACAGCAGCCCTCAGCTTAAAGGTATAGTTACCAAGCTATACAGCCGACAAAGCTACC
ACTTGGAGCTGCGAGCGGATGGAAACATTGATGGCACCAAGATGAGGACAGCACTTACACT
CTGTTAACCTCATCCCTGTTGGTCTGCGAGTGGTGCATCCAAGGAGTTCACCAAGCT
GTACTTGGCAATGAACAGTGAAGGATCTGTACACCTCGGAACTTTTACACCTGAGTGCA
AATTCAAAGAATCAGTGGTTGAAAATATTATGTGACATATTCATCAATGATATACCGTCA
CAGCAGTCAGCCGAGGGTGGTATCTGGCTGAAACAAAGAGAGATCATGAAAGGCAA
CCATGTAAAGAAAGAACAGCTGCAGCTCATTCTTCGCTAAACCACTGAAAGTGGCAGT
ACAAGGACCCACTCAGTCAGATCTCACGGAGTTCCTCCGATCTGGAAGCGGAGCCCAAC
AAGAGCAGAAAGTGTCTGCGCTGCTGACGGAGGCAAAATCCATGAGCCCAATGAATCAAC
GTAGCCAGTGAAGGCAAAAGAGGGCTCTGTGACAGAACCTTACCTCCAGGCTGTGTAAT
TCTTCTAGCAGTCTTACCCAAAAGTCAAATTTGTCAGTGACATTTACCAACAAACAGG
CAGAGTCACTACTATCTGCCATTAGACCTTCTTATCATCCATACTAAAGC

【 図 7 】

ATGCGCCGGCCATCGCTAGCGGCTTGTCCGCCAGAAGCGCGAGCGGGAGCAGCACTG
GGACCGCGCTCTGCCAGGAGGGCGAGCAGCCCAAGCAAGAACCGGGCTCTGCAACG
CCAACCTGTGGATATCTTCTCCAAAGTGGCCTCTTCGGCTCAAGAGCGCAGGTTCGGG
CGCCAAGATCCCAGCTCAAGGATAGTAGCAGGTTATATTCAGGCAAGGCTACTACTT
GCAATGCAACCCGATGGAGCTCTGATGGAAACCAAGGATGACAGCACTAATTTACTACTT
TCAACCTCATACCAGTGGGACTACGTGTTGTTGCCATCCAGGAGTGAACAGGTTGTAT
ATAGCCATGAATGGAGAAGGTACTCTACCCTACAGAACTTTTACCCCTGAATGCAAGTT
TAAAGAATCTGTTTTGAAAATTATTATGAACTACTACTCCATGTTGTACAGACAAAGG
AATCTGCTAGAGCCTGTTTTTGGGATTAATAAGGAAGGCAAGCTATGAAAGGAAACAGA
GTAAAGRAAACCAACAGCAGCTCATTCTACCCAAAGCCATTTGAAAGTGTCCATGTACCC
AGAACCATCTTTGATGATGTTGGGAAACGGTCCCGAACCTGGGGTGACGCCAAGTAAAA
GCACAAGTGCCTCTGCAATAATGAATGGAGCAACAGCTCAACAAGAGTAAAGCAACATAAG

【 図 8 】

></usr/seqdb2/sst/DNA/Dnaseqs.min/ss.DNA28503
><subunit 1 of 1, 247 aa, 1 stop
><MW: 27702, pI: 10.36, NX(S/T): 2
MAAAIASGLIRQKRQAREQHWRPSSARRSSPSKRNGLCNGNLVDIFSKVRI FGLKKRRLR
RQDPQLKGIIVTRLYCRQSYLQMHFDGALDGTKDDSTNLFNLI PVGLRVVAIQGVQTKLY
IAMNREGVLYPSELFPECKFKESVFENYVYYSMLYRQQSGRAWFLGKNEQGMKGNR
VKKTKPAAHFLPKLEVAMVREPSLHDVGTVPKPGVTPSKTSASAIMNGKPKVNSKTT

N-グリコシル化部位
アミノ酸 100-104, 242-246
eAMP- 及び eGMP- 依存性プロテインキナーゼリン酸化部位
アミノ酸 28-32, 29-33
チロシンキナーゼリン酸化部位
アミノ酸 199-207
N-ミリスチル化部位
アミノ酸 38-44, 89-95, 118-124, 122-128, 222-228
HBGF/FGF ファミリータンパク質
アミノ酸 104-155, 171-198

【 図 18 】

MGLWQGVPTASSARAGRYFGARTASGRPWLLDPKILKVVVIVAVLLPVRVDSATI PRQD
EVPQQTVAPOQRRSLKEBEECPAGSHRSEYTGACNPCTEGVDYTIASNNLPSCLLCTVCKSG
QTNKSSCTTTRDTVCQCEKGSFQDKNSPEMCRCTRTGCPRMVKNVSNCTPRSDIKCKNESAA
SSTGKTPAAEETVTLILGLASPHYHLIIIVLVVILVAVVVVGFSCRKFFISYLGKICSGGG
GGPERVHRVLFERRRSCPSRVPGAEDNARNETLSNRYLQPTQVSEQEIQQGELAEELTGVTVES
PEEPQRLLEQAEAEQCRRLRVFVNDADSDISTLLDASATLEEGBHAKETIQDQVLGSEKL
FYEEDEAGSATSCL

タンパク質の重要な特徴

膜貫通ドメイン

アミノ酸 35-52, 208-230

N-グリコシル化部位

アミノ酸 127-131, 182-186, 277-281

グリコサミノグリカン付着部位

アミノ酸 245-249

cAMP- 及び cGMP- 依存性プロテインキナーゼリン酸化部位

アミノ酸 260-264

N-ミリスチル化部位

アミノ酸 21-27, 86-92, 102-108, 161-167, 242-248, 270-276,
297-303, 380-386

ATP/GTP- 結合部位モチーフA (P-ループ)

アミノ酸 185-193

TNFR/NGFR システインリッチ領域

アミノ酸 99-139

【 図 21 】

CCGGGGAGGGGAGGCGCCGTCGCCGCCCTCCCGTCTCCCGCCCTCCCGTCCCTCCC
GCCGAAGCTCCGTCGCCGCCGCGGGCCGCTCCGCCCTCACCTCCCGCCGCGGCTGCCCTC
TGCCCGGGTTGTCCAAGATGGAGGGCGCTCCACCGGGGTCGCTCGCCCTCCGGCTCCTGCTG
TTCGTGGCGCTACCCGCTCCGGCTGGTGACGACGGCGCCCGCCGAGCCGCCCGCGCTGTC
CGGAGCCCCACAGGACGGCATCAGAATTAATGTAACACTGAAAGATGATGGGACATAT
CTAAACAGCAGGTTGTTCTTAACATAACCTATGAGAGTGGACAGGTGTATGTAATGACITTA
CCTGTPAATAGTGGTGAACCCGAATAAGCTGTCAGACTTTGATAGTGAAGAAATGAAAATCT
TGAAAATTTGGAGAAAAGAAATATTTGGAATTTGTCAGTGAAGATTTTAGTTCATGAGT
GGCCTATGACATCTGGTCCAGTTTGAACATAATGTCATTCAGAAGAGGTAGTAGAGATT
GATGGAAAACAAGTTACGAAAAGGATGTCAGTAAATGATATTTTAGTTAAGAACCAGGGG
AGTACTCAGACATTCNAACTATACCTCCCTTTGGAAGAAAGCATGCTCTACTCTATTCTC
GAGACAGTGACATTTTATCCCTTCTCAACCTCTCCAAAAGAAAGTGTAGTTCACAG
CAAAACACTAGCCAGTATCTTATCAGGAATGTGAAAACCACTGATAGTGAAGATGTTTACC
TGGCAAGTTACCTGAAACTCCTCTCAGAGCAGAGCCGCCATCTCATATAAGGTAATGTGTC
AGTGGATGGAAAAGTTTAGAAAAGATCTGTGTAGGTTCTGGAGCAACGTTTCCAGTATTC
TTTTCAGTTTTTGAACATCATGGTGGTGAATACAGGAGCAGCTGGTGAATAAACCATCTT
AAAGTGTTTTTCCAGTTTCTGAATACAAAGAAATTTCTCAGTTGGATAAAGTGGACGTC
TACCTGTGACAGCTATCAACTATATCCAGATGTCAGAGAAAAGAGCTGAAAACCTTGAA
GATAAACATGTATTTAAACGCCATCTCATATCATGACTCCGAAAGTAGCCTGTTGCCTCC
AAATTTGCCACTTGAATATAAATTTCTTTAAATCGTT

【 図 19 】

GCCGCACCTGGAAATGCGCCCATGGCTGGTGGCTGCTCAAGGTGGTGTTCGGTGTCTTC
GCCTCCTTGTGTGCCTGGTATTCGGGTACCTGCTCGCAGAGCTCATTCCAGATGCACCCCT
GTCCAGTGTGCTATAGCATCCGACGATCGGGAGAGGCGCTGTCTCAAAGCTCCAGCTCC
CCAAAAGGCAAAAATGTGACCACTGGACTCCCTGCCATCTGACACCTATGCCTACAGGTTA
CTCAGCGGAGGTGGCAGAAAGCAAGTACGCCAAAATCTGCTTTGAGGATAACCTACTTATGGG
AGAACAGCTGGGAAATGTGCCAGAGGAATAAACATTGCCATTCTCAACTATGTAACCTGGGA
ATGTGACAGCAACACGATGTTTGTATGATGATGAAGGCGATACTCTGGACCGATGACAAG
TTTTATTGAGAGTGTGCTCCAAAATCCCTGCTCTTCATGTTGACCTATGACGACGGAAGCAC
AAGACTGAATAACGATGCCAAGAAATGCCATAGAAGCACTTGAAGTAAAGAAATCAGGAACA
TGAATTCAGGCTAGCTGGTATTTATTGTCAGCAAAAAGCTTGAACCTCCCTCCGAAAT
CAGAGAGAAAAGATCAACCCTCTGATGCTAAGAACACAGATATCTGGCTGGCTGCAGA
GATCCAGATAGAAGGCTGCATACCCAAAAGAAAGCAAGCTGCACTGCAGGGTCTGATGTAAT
GTGTTCTGTATAAACAAATGACAGTGGAAATCGCTCAAGAAATCTTATTTTCTAAATCCAAACA
GCCCATATTTGATGAGTATTTGGGTTTGTGTAACCAATGAACATTGCTAGTGTGATCA
AATCTTGGTACGCAATTTTTATACCAATTTTTATGATGTAAGATGTCAAATAGCAGGA
AACTAAAATGAATGGAATCTTAAAAA

【 図 20 】

MRPLAGLLKVVVVFASLCAWYSGYLLAELIPDAPLSSAAYSIRSIGERFVLKAPVPKRQK
CDHWTPCPSDYAYRLLSGGGRKYAKICFEDNLLMGEQLGNVARGINIAIVNYVTGNVAT
RCFDMYEGDNGSPMTKFIQSAAPKSLLFMVYDDGSTRLNDAKNAIEALGSKEIRNMKFRS
SWVFIAAKGLELPESEIQREKINHSDAKNNRYSYGPAAEQIEGCIKPKERS

タンパク質の重要な特徴

シグナルペプチド

アミノ酸 1-20

N-グリコシル化部位

アミノ酸 120-124, 208-212

グリコサミノグリカン付着部位

アミノ酸 80-84

N-ミリスチル化部位

アミノ酸 81-87, 108-114, 119-125

【 図 22 】

></usr/seqdb2/sst/DNA/Dnaseqs.min/ss.DNA60783
><subunit 1 of 1, 330 aa, 1 stop
>MW: 36840, pI: 4.84, NX (S/T): 4
MEGAPPGSLALRLLFVALPASGWLTTGAPEPPPLSGAPDQIRINVTILKDDGDISKQVV
LNIITYESGVYVNDLPVNSGVTRISQTLIVKNENLENLEEKEYFGIVSVRILVHEWPMISG
SSLQLVIVIQEVEVEIDGKQVQKDVTEIDILVKNRGLRHSNYTLPLEESMLYSISRDSOIL
FTLPLNLSKESVSSLQTTSQLIRNVETVDEDVLPGLPETPLRAEPPSSYKVMQWMEKF
RKDLCRFWSNVFPVFFQFLNIMVVGITGAARVITILKVFVSEYKGIQLDKVDVIVPTAII
NLYPDGPEKRAENLEDKTCI

タンパク質の重要な特徴

シグナルペプチド

アミノ酸 1-23

膜貫通ドメイン

アミノ酸 266-284

ロイシンジッパーパターン

アミノ酸 155-176

N-グリコシル化部位

アミノ酸 46-49, 64-67, 166-169, 191-194

【 図 2 3 】

CGTCCTGCGGTTCGCCAAGCGTCCGGGGGCCAGGGGCCACTGGCCCTGCCCTGGGGG
CCCTGGCTTGGGCCGGGGCTTCGTGAGCTTCATGGCTCGGGGGAACCCCGCGCCCGTGGT
GTTTGGCTGGCTCCAGCAGGGGCCAGGAGCCACTGACAGCTGCTGGTCTCCAGACTGATGTAC
CGGGCCGAGTGTGCTGCTCCGGCAATTTACACCCCGCTGGTCCAACTCCACCCCGGG
GGAAACAAGATCAACCTCGCTGGCTTTCTGGGGCTTGCCACTGCTCCCTGCCAAGATTCG
TGCGAGCGCGTGGAGTGGGCCCGGGCAAGGGCTGCCGATGCTGGGGGCGGCGCCGGCTG
CGAGTGGCGGCCGCGACTGGCTGGGGCTCCCGCCGCGGCTSCAGGTCTGGGGCTCAGACGGG
CCACTTACCGCCAGCGTGGAGCTGCCCGCGCGGCTSCCGGGCCACCCCGSACTGAGC
GTCAATGACCGGGCCCGCTGCCAAGCTGTGAGCACGTGCTGCCGCGGCCACACTC
GTGGTGCTGGAGCCAGAGCCAGCCCACTGGCTGGTGTCTGCCGGCGGGCCCTGGCTG
TGCCCTCCAGCCCGGGCAGGAGCTTGGCGCAGCACACACTCACTTACACTTCTCGTGC
CACATGGCGCAGGCCACTGCCTTCTGGGCGCTCCATCGGCTGGCCAGCGGGGACGCTG
CGCAGGACCCCTGAGAGCGCCGCTGGTGGTGTGAGCTGCAGAGAGGAGAGAACTTCGTTG
GAGCCTGCAAGACAGCGCTGGCGTGGTGGCCGAGCCCCTATCATCCCTGTTATTTAT
GCCACAGCAGATTAATTTATATGCCACAGCACTCCTTAGAGCCGGATTGGGACACTT
GGGGATCCAGAACCTCCCTGACGATATCTGGAAGGACTGAGGAGGGAGGGCTGGGGCC
GGCTGGTGGTGGATAGCCTCGCTCCGGACACTGAGCGCTGATTAGGGCCCTCTCT
AGGATGCCCCAGCGCCCTAACCTAAGACTATTCGGGGGAGGATTCCACACTTCGCTCCTT
TGGGGATAAACCCTATTAAATTTGCTACTATCAAGAGGCTGGGCACTTCTGCTGTAAT
CCTGAAGAGGCATGACTGCTTTCTCAGCCCCAAGCCTTACTCTGGGIGTGTACGGAGGGT
TAGCCTGGGTGTGATCGGAGGGTCTAGCCTGGTGGTACGGAGGGCTAGCCCTGGTGG
TAGCGAGGGTCTAGCTGGTGGTACGGAGGGTCTAGCCTGGTGGTGTATGGAGGATCTAG
CCTGGTGGTATGGAGGGTCTAGCCTGGTGGTATGGAGGGTCTAGCCTGGTGGTGTATG
GAGGGTCTAGCTGGTGGTGGTATGGAGGGTCTAGCCTGGTGGTATGGAGGGTCTAGCCTG
GGTAGTATGGAGGGTCTAGCCTGGTGGTATGGAGGGTCTAGCCTGGTGGTATGGAGGGT
CCTCAGACCTCTGACTTTCAGCCGAGCGGGCTTAGCTGAGTGGTGGTGGGGA
CTCAGACCTCTGACTTTCAGCCGAGCGGGCTTAGCTGAGTGGTGGTGGGGA
CACTTCCCTGCGAGCCCAAGACTTCAGCTTCCCAGCTGCCTTCTGTGGCCCTTGGCT
CCTGTAAGGCCATGAGAAATGCCAGTGTGCCCTCGCGGGAAGGCCAGCCGTGTCTCC
TGACAGGGCTGTGCTTGCCACAGAACCCAGCGCTCTCCCTGCTGCTCCACTCAG
TTCATGAGCAACCTGCGCTGCTCAGAGCTGGAGCAGCCAGCCGACTCAGCAGAGGC
ACTGTGTCGGCCGAGCCAACTTCCTGTGGGGAGCTTGGCGGGACCCGCGCCACTGC
TCACCCTAGCGCCGAGGGGGTGTAGACGCAAGACTCACGATGTGACATCCGAGT
CCTGGAGCCGGGTGTCCAGTGGCACCAGTGGTGTGCTGCTGCCTCAGCAGTGGGTTACA
CCCGAGGGCTCTTGGTCCCGCACAACCTGGCCCGGGCAGGCTGACAGCCAGACTCCACG
AGACTGCTCAGCCCAATGACAGCGGGGGCTGGGACACCGCCAGGTCGCTGGTGGTGG
CCAGTTCTCCAGCAGCGCTCAGCCTCCCTCATCTGCTGTATGCTCAGAAATCGCTACC
TGCCCTGCGTGTAAACACAGCCTCAGACCCAGCTATGGGGAGGAGGCAACAGGGAGAT
CCAGCTTCCCGGCTCGGGGAGGAAATGGGGAGCTTGGGCATCTCCTCCAGCTCTC
CAGCCCCAGGCAAGTACCTGTGGTGGCCAGAAAGTGGCCCTAGGTGGTGGTGTCA
CAGGGCTCAGCCAGGCGCCACCCCTGGGGCCCTGGCTCCAGAGAAATAAAGA
CTCAAGCCATAAAAAAAAA

【 図 2 4 】

</usr/seqdb2/sst/DNA/Dnaseqs.min/ss.DNA62306
<subunit 1 of 1, 263 aa, 1 stop
<MW: 27663, pI: 6.77, NX(S/T): 2
MRPGAPGLWPLFWGLAWAVGFSVSSMGSPAPGGVCLWQQGQAEATCSLVLTQDVTAECC
ASGNIDTAWSNLRPHGNKINLLFLGLVHCLPKDKSDCGVECGPKACRMLGGRRPCECAPO
CSGLPARLVCGSDGATYRDECELRAARCRGHPDLSVMYRGRKRCSKEHVVCRRPQSCVVDQ
TGSAAHVVCRAAPCPVPSSPQELCGNANNVYISSCHMROAETFLGRSIVRHAGSCATPE
EPPGGESAEENEFV

重要な特徴
シグナルペプチド
アミノ酸 1-20
N-グリコシル化部位
アミノ酸 73-77, 215-219
ソステオネクンドメインタンパク質
アミノ酸 97-130, 169-202

【 図 2 5 】

TGCAGAGCTTGGAGGCCAAGGGCGCTCCTGCGGAGCTCGTCTCGCTGCTGGGGT
TGTGGCTGTTGCTGTCGAGCTCGGATGCCCCGAGGGGCCGCGAGCTCGCTGCCCGAGAT
AAATCGCCGATTATTGAGCGCCGAAATGGTGGCACTTCAGCAGCTTATTACCTGGGCGAGAA
ATTTGGAAAGATGTAAGATGACCTGTTTGAAGAGAAAGAGGTGGGGGCCCGCCTGGTA
CCATGATGCTGACGGCCAGAAATCAGGAGAGAGGTTCGTCTCATCCATCCTTTAAATCTG
CAGATGAAACGTTTGTCAAAGACCTGGCTCTCTGCTGTTCAGGCCCTGCTGGCCCTACT
GGGGATATAATGGAGAGACTCTGGTATTTGAGGAGACCACTGGTTCATAATTAACCTGA
TTAAATAGTTTGGCGTATGGATTTCAACTCCCTCGGTATGCACATGTGGTAGAGGACCTG
TTAGACAAGTTTATGAGGACTCACCGCTACCAGTCTCATGACTATGCTCTCAGTAGTGTGCA
AAAATTACTTATGCTTAGGAGGAGACTTCCCTTGAATGCTTAATCGAACACTTCTTG
AAACCTTGCAAAGGCCGGGTTTTCTGAGAACTTCCTCAATGAAATGATGCTCCTGTTATG
AGGGTCAATTTAGCCCAAAGCAGGACATCAATGCTTGTGGGGCGGTGTCAGTCTGCTG
TCTGATTCTGGCCTTGGGCACTGAGAAGTGGCAATAAACTGTTTGGTACAGGGCTTCTG
AGGCATCCAAAGCAATCTTATATCTGGCTCAGTAATGTACATCGAGGAGAAACAAGACC
AAGTACACAGGAAATCCAAACAAGATGATGAAGTGGTCTACCAAAATGGAAGTGAAGCTG
TTGACACTTCTATGACATCGTCTGTTGGCCACTCCGTTGAATCGAAAATGTCGAAATTA
CTTTCTCAACTTTGACTCCCTCAATTTAGAAATGCAATCAATATATCAACATATAGTGACA
ACTTTAGTTAAGGGGAAATGAAATACATCTATCTTTAGCTTAGCCCATAGATAAAATTTGG
CCTTAATACAGTTTAAACCCTGATAATTGATGATTTGTCATTAACAGTATTGGGATTTGTC
CCTCTGAGAGGAAAAGAAATCCCTGAGCCATCACACAGATGGAACATATGTTTGAAGATC
TTTTCCCAAGAACTCCTTAATAAGCAGAAATTTAAAGCTCTTCTGTCTTATGATATGTC
GTGAAAGAGCCATGGCTGCAATATCCTCACTAAGCCCGGGAGAAATGCCCTCTATCA
TCTCCTATGATGACTTTATTAACCTCAATGGCAGTGGTGTGAGCAGTGGTGGAGATG
AGTGCCATTGCAAGCCCAACCGCTGGCTCTCTGGCTATCAACCGCTGGAAAGGGCACACAGA
CATGATGATCAGGTGGCTTATATGAGAACTTAAAATGAACATGAAATGAGTACACTCC
TTTTCCCTCTGATGTTCAATGACTATGATGAGCAAAAAAGCAAAAATCTGAGCAGAGA
TGAATTTGAAACAGATAATTTGGCAATTTGCACTGTTTAAATAAAAGTAATCCTGGTTCAT
AGGAAAAAAAAAAAAA

【 図 2 6 】

</usr/seqdb2/sst/DNA/Dnaseqs.min/ss.DNA62880
<subunit 1 of 1, 505 aa, 1 stop
<MW: 56640, pI: 6.10, NX(S/T): 4
MGRVVAELVSSLGLLNLLSCGCEGAELEPDKIAIIGAGIGTSAAYLYLRQKFKGDKVK
IDLFEVEVGRLATMMVQGEYEAGSVIHLPLNLMRREVKIDLGLSAVQASGGLLGIYNGE
TLVFEESNWFINVILKLVWRYGQSLRMMNVEDVLDFKMRIRYQSHDYAFSSVEKLLHAL
GGDDFLGMLNRTLLTQKAGFSEKFLNEMIAVMRVNYQSTQDINAIVGAVSLSCSDSGLW
AVEGKNLVCSSGLLQASKSNLISGSVMYLEEKTKTGTGNTKMYEVVYQIGTETRSDFDI
VLVATPLNRKMSNITFLNFDPPPTEEHHQYQHVITLVKGELENTSIFSSRPDKFLNTVLT
TDNSDLFINSIGIVPSVREKEDPEFSTDGT YVWVIFSQETLTKAQLKLESLYDVAVKRPLW
AYPHYKPEKCPKSIILHDLRYLYLNGIECAASMEMSAIAAHNAALLAYHRWNGHTDMIDQDG
LYEKIKTELE

重要な特徴
シグナルペプチド
アミノ酸 1-23
N-グリコシル化部位
アミノ酸 196-200, 323-327, 353-357
チロシネキナーゼリン酸化部位
アミノ酸 291-298
N-ミリスチル化部位
アミノ酸 23-29, 41-47, 43-49, 45-51, 46-52, 72-78, 115-121,
119-125, 260-266, 384-390, 459-465
原核生物膜リポタンパク質結合部位
アミノ酸 12-23, 232-243

【 3 3 】

```

GGAAAAGGTACCCGCGAGAGACAGCCAGCAGTCTCTGTGGAGCAGCGGTGGCCGGCTAGGATG
GGCTGTCTCTGGGGCTGGGCTCTGCCCTTTCTTCTCTGCTGGGAGGTGGGGTCTCTGG
GAGCTCTGAGGCCCCAGCAGCCGAGAGCAGACTGCGATGACAACGGACGACAGAGAAG
TGCCCGCTATGACTCTAGCACCGGGCCACCCGCTCTGGAACCTCAAACGCTGAGCGCTGAG
ACCTCTCTAGGGCTCAACCCGAGCGGCCCATTCAGAAAGCAGAGACAGGGGAGCCAA
GAGAATTTCCCTGCAAGAGAGACAGGAGTTTCAAAAAACATCTCCCAACTTCATGGTGC
TGATCGCCACCTCCGTGGAGACATCAGCCGCCAGTGGCAGCCCCGAGGGAGCTGGAATGAC
ACAGTTCAGACCATCACAGCGCTGATCCCGAGGAGGCCATCTTTGACACCCCTTGACCGGA
TGACAGCTCTGAAGAGGCAAGACACTCAATGACATATTGACATTTGGCTCACACCTCCA
CAGAAAGCTAAGGGCTCTCTCAGAGAGCAGTGCCTCTTCGACGGCCCCCATCCAGTCATC
ACCCGGTACCGGCCCTCAGAGAGCAGCGCTCTTCGACGGCCCCCATCCAGTCATCACCCC
GTACCGGGCTCAGAGAGCAGCGCTCTTCGACGGCCCCCATCCAGTCATCACCCCGTCTAT
GGTCCCGGGATCTGATGTCACCTCTCTCGCTGAGGCGCTGGTACTGTCACAAAACATCGAG
GTTATTAATTGACGATCAGAGAAATAGAAACAACAATTCCAGCATCCCTGGGGCTCAGA
CATAGATCTCATCCCGAGGAGGGTGAAGGCTCGTCCACCTCCGATCCACAGCTCTGC
CTGACTCCACTGAAGAAAACACACATCACTGAGGTCACAGCCCTTGCCGAGACCTCTGTC
ACAGCCGGCCACAGAGTCACTGACCTCATGCCAGGTGGGACCCCACTCCCACTAA
CAGCGCCACAGAAAGAGAGTGAACAGCCCGGGCCACAGCCCTCAGTGGAGCTTGGTCA
CAGTTAGCAGGAATCCCTGGAAGAAACCTCAGCCCTCTCTGTTGAGACCAAGTTACGTC
AAAGTCTCAGGAGCAGCTCCGCTCCATAGAGGCTGAGTCAAGTGGGCAAAAACAATTC
CTTTGCTGGAGCTCTGCTCTCTCAGCCCTCGGAGCCCGCTCAAGAACTTCACCC
CTTCAGAGACCCAGCAGTGAACATCGCAACCAAGGGGCTTCGCCACAGCAGGACCTC
CTCTCTCTGCTCCCTCCGACTACAAACAGCAGCGAGGGACGAACACCTTAGCCAA
GATCACAACCTCAGCAAGACCCAGTGAAGCCCAACAGCCAGCCACAGCTGCCCGGAC
GAGCCCGACCAAGAGCTGAGTGCAGGTGAATAAGGAGTTCCTCTCTGCGGCTGAGTG
TGGCTTCCCGGAAGCTCAGTACCCAGAGTGGCAGAAAGGCTGATGACGACCTCCAC
CGGAACTCACGCCACCGCCCTCACTCCAGGCTCTCTTACTCGCTGTCAGGAGAGGCTA
ACGGACATCAGCTGACCCAGCAGTCTCCCTATGCCAAAAGAGGCTGCTGCCCTAGCCGTG
GGCCCCCAGCAGACTGAGCTGCGTTACTGTGCTGAGAGGTACCCAGAAGGTTCCOATG
AAGGGCAGCATGTCCAAGCCCTAACCACAGATGGCAACAGGACCCCTCGCTCACATCCAC
CGGAGTATGATGATGGGAGGGCTTCACCTGTTCCAGAGGTCTCTGGACTCACCTTGG
CACATGTTCTGTGTTTCAGTAAAGAGAGACTGATCACCCATCTGTGCTTCCATCTGCA
TTAAAATTCACCTAGTGTGGCCAAAAA

```

【 3 5 】

```

GGCTCTGAATTGTTGGGAGCTGGCAGTGGAGCTCTCCCGGCTGACAGCCACTCCAGAG
GCCAGCTTCGTTTCTGGCAGATTGGCTTTCAGCTTCTGTTAATTCTGGCTTTGGGCCA
GGCAGTCCAATTTCAAGAAATATGCTTTCTCCAATTTCTGGGCTTAGATAGGGCCCTCAC
CCCAGAAGTCCAACCTGTCCTTATATCTTGAAGAAAATTTCCAGGATCGCGAGGACAGCA
GCGACCACTGGGGCTCTCCGAGACTTATGCTACGTAAGAGGAGCTGGGCGTCCGCGGGAATG
ACTTCGCTTCTCCGAGCAAGGTTCTTCTTTTCCCAAGAAAATTTCCCAAGCTTCTCT
CTGCTCGAGAAGCTCCTCTACTTTAACCCTGCTGCCAATCAAGAAAGGGAACAGTTGACA
TTGGCCAGCTGGGCTGGACTTGGGGCCAAATTTACTATAAACCCTGGGACAGAGCTGGA
ACTGGCTCTGTTCTGGTTCAGGAGCTCATGTGTGGGCCAGACCCCTAAGCAGGTA
AAATGTTGTTGCTGCGGTGAGTCCATGGCCACAAGGTGCTGTCTACTTCAACCTGCTGGAT
GTAGCTAAGGATGGAATGACAACCCCGAAAAATTTCCGGTATTCTCGGAGATCTGGT
CAAAGAAATAGAGACTCAGGGGTGAATTTCCAGCTGAAAGACACCTGTGCCAGACTAAGAT
GCTCCCTTCATGCTTCCCTGCTGGTGGTACTCTCAACCTGATCAGTGCACCCCTTCTCGG
AAAAGAGAGCAGCCACTCCCTGTCACCAAGCTTTCTTGAAGAACCCTTGCACCCGTCACCA
GCTATTCAATTAACCTCCGGGACTGGGTTGGCACAAGTGGATCATTGCCCCCAAGGGTTCA
TGGCAAAATTAAGTGCATGAGAGTGTCCCTTCTCACTGACCATCTCTCAACAGCTCCAA
TATGCTTTCATGCAAGCCCTGATGCATGCCCTGACCCAGAGATCCCCAGGCTGTGTGAT
CCCCACCAAGCTGCTCCCATTTCCATGCTCTACAGGACAAATATGACAATGTCAATCTAC
GACATTAAGAGACATGGTAGTCGATGAATGTGGGTGGGATGATGTCAGAAATGGGAAT
AGAAGGAGTGTCTTAGGGTAAATCTTTTAAATAAAACTACCTATCTGGTTTATGACCACTTA
GATCGAAATGTC

```

【 3 4 】

```

></usr/seqdb2/sst/DNA/Dnaseqs.min/ss.DNA10872
><subunit 1 of 1, 482 aa, 1 stop
><MW: 49060, pI: 4.74, NX(S/T): 4
MGCLWGLALPLFFPCWEVGVSGSAGPSTRADTAMTTDDTEVPAMTLAPGHALETQTLSEA
ETSRRASTFAGPIPEAETRGAKRISPAETRSFTKTSNFMVLIATSVETSASGSPGAGM
TTVQTITGSDPEEAIPTDLCDDSSSEAKLTMIDILTAHTSTEAAGLSSSSASDGPHPV
ITPSRAESSASDGPHPVITPSRAESSASDGPHPVITPSWSFGSDVTLLEALVTINI
EVINCSITEIETTSSIPGASDILIPTEGVKASSTSDPPALPDSTEAKPHITEVTASAE
LSTAGTTESAAPHATVGTPLPTNSATREVTAPGATTLGALVTVSRNPLEETSALSVETPSY
VKVSGAAPVSIIEAGSAVGKTTSFAGSSASSYSPSEALKNFTPSETPTMDIATKGPPTSRD
PLPSVPEPTTNSRGTNSTLAKITTSAKTMTKPKQPRRPLPGRGRPQT

```

タンパク質の重要な特徴
シグナルペプチド
アミノ酸 1-25

N-グリコシル化部位
アミノ酸 252-256, 445-449, 451-455

cAMP- 及び cGMP- 依存性プロテインキナーゼリン酸化部位
アミノ酸 84-88

N-ミristolil化部位
アミノ酸 2-8, 19-25, 117-123, 121-127, 232-238, 278-284, 314-320, 349-355, 386-392, 397-403, 449-455

ATP/GTP- 結合部位モチーフA (P-ループ)
アミノ酸 385-393

【 3 6 】

```

MLRFLDLAFLFLLILALGQAVQFQYVFLQLGLDKAPSPQKFPVPIYLKIKIQDREAAA
TTGVSRDLGYKELVGRGNVRLFPDQGFVLYPKKISQASSCLKLLYFNLSAIKEREQLTL
AQLGLDLGPNYSYNLGPELELALFLVQEPHVWQTTPKPKGMFVLRVWPQAVHFNLLDV
AKDWNDRNPRKNPGLFLEILVKEDRDSGVNFPEDTCARLRCSLHASLLVTLNPDQCHPSRK
RRAAIPVFKLCKNLCHRQLFINFRDLGWHKWIIAPKGFMANYPHCECFSLTISLNSNY
AFMQLMHAHVDEIPQAVCIPTKLSPIISMLYQDNNNDVILRHEDMVDVDECGCG

```

タンパク質の重要な特徴
シグナルペプチド
アミノ酸 1-21

N-グリコシル化部位
アミノ酸 112-116, 306-310

cAMP- 及び cGMP- 依存性プロテインキナーゼリン酸化部位
アミノ酸 96-100

N-ミristolil化部位
アミノ酸 77-83

TGF-ベータファミリータンパク質
アミノ酸 264-299, 327-341, 345-364

【 37】

CACCTTTCCTCCCTCTCTCCCTTTACTTTCGAGAAACCGCGCTTCGGCTTCGTGCGCAGAGAC
CTCGAGACCCGCCCGGGAGACGGAGTCTGCTGGTGGGGGGGACTGTGGCTGCTCTGTA
CGCCGCCCCCTCCCTCTTTCGCACCTCCGCTCTCCGAGAGACTTTCCCTGCTCTGTT
TCTTCACCGACTCTGTGCATCCCCGCGACTGTGGCCGAGAGAGGCTTGGCCGCGGGAGA
TGCCTTGGGGGCGCGGGAGSBCGCGCGGGACGAGGGCCCGGCAGGAAAGGGGGG
TCCCTTGGACAGGGCTTTCGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTTTCGCTGGCTGGT
CTGTAGTCTGCTGCCCATGCTCAAGGGGACGAGGGATGGGAGTGGAGTGTGAGAGTCT
CTGCCCTCCGGACCTGCCAGAGGCTGAGAACAACTGAARAATACAGGCCCACTCAG
GACCAGGGCTCCCTGTTCGGGTGCCTGGCTGTGTGAGCCCGGTACCTTCATGTACCC
GGGACCGCCGTGCCAGATCAACATCACTATCTTGAAGGGGAGAGGCTACCCGCGAG
ATCGAGGCTCCAAGGAATATGGCAAACAGGCTCAGCAGGGCCAGGGCCCACTGGA
CCCAAAGGGCAGAAGGCTCATATGGGGCCCTGGGGACGCTGCAAGAGCCACTACGCCG
CTTTTCGCTGGGCGGAGAGCCATGACACAGCAACTACTACAGACGGTGTATCTTCG
ACACGGAGTTCGTAACTCTACGACCACTTCAACATGTTACCGGCAAGTTCCTACTGTC
GTGCCGCCCTTACTTCTCAGCTCAAGTGCACACTGGAACAGAGAGGACACTACCT
GCACATCATGAAGACGAGGAGGAGTGTGATCTTGTTCGCCAGTGGGGACCCGACGA
TCATGCAAGCCAGCCTGTATGCTGGAGTGCAGAGGAGGAGGACTGGGTGCGGTACGCCT
TACAAGGGCGAACCTGAGAACGCCTTCCTCAGCGAGGACTGGACACTACATCACTTTCAG
TGGCTACTGTGCAGCAGCCAGCGGCCCTGGCGGGGCGCCCTCTTCTCTCTCGCC
ACCTTCACCGCTGGCTGGCTGAGCCCAACCGGCTCTTCCCGATCCCTGGACTCCGACTC
CTTGGCTTGGCATTAGTGGAGCCCTGCACACAGCAAGGCAAGCAGGATCGCTGCTCC
CAGATCCCGAGCTTGAGAGAGCTGAGGAGATGAATACCAAGGCGGGCACCCCGC
GAGAACCTCTGGGACTTTCGGCGGCTCTCTGCACATCTCAGTGAACCCGACGGC
GAGAGCGGGTGGGCGAGGCGTCCAGGAGTGGCGCACCGGCTCCAGCTCCTGGAATA
ATTAGCAAACTTCAAAGGCTCAAAGGAGCAAAGTCCAGGACAAAGAAAAGG
TTGTTATTGCTTTCCAGCCAGCTGCTGGCTCCCAAGAGAGGAGCCTTTCAGTTGAG
ACTCTGCTTAAGAGAAGTCCAAAGTTAAAGCTCTGGGTGAGGAGGGGCGGGGCGAG
AACTACTCTTGCTTAATTTCTTAAAGCACAGTAACTTCTTGAAGGATAGTGGAGC
CTGACATCCCTTGGCTTGGCCAGGCTCTGCTGCTTTCTGAGTACAGCTGCGAGGT
GATGGGGCTGGGCGGAGCGTCAAGCTCCAGAGGAGCAGCTGAGCCCTTGCCTGGC
TCCAGTGTGTAAGACGCGGAGAGGCTCTGAGACTGGCAGGACCCCTGGGTCCCCCA
GGCTGAGATGTTCTATGAGGGGCAAGGCTCTGATCATCCTGCTGGCTGCTCTCC
ACCTGTGCCACCCGAGCTCTGGGGGGTGTCTCCATGCCCTGCCCGCTGGCATCGGT
TCTGTGGCGCTCCACAGAAATCAGCCCAAGAGGCGGGGCTTGGTCTCTGTTTTT
TATAAAGCCTCAGGAGACTGCAGTCTCCATCTCTCTGCTGGGCTAAGCATCAGCGCTT
CCAGTGTGTGTTGGTGGAGCAGGCTGATCCAGCGCTTCTGCGCCTACTGCGCT
CATCCAGCTCTGAGCAGTCTGAGAGGCTTCTTAGCTGCTGAGAGGAGGAGGAGG
CTGAGGGGCTAGAAAGCTCCCGCTTCTCTTTCTCAGGCTCCTCTGAGCCTCAGTCTG
AGCCAGAGTCAAGAGAGTACAGCTCCAACTCCCGCTCAGGATTCAGCTCAGGAGC
TGGGTGCAGGAGGCAATAGCCCTTGGCAATTGAGAGGAGCTGAGCAGGTTGCG
GTGCTCAGCGTCTCTGCGCTGCGCATGCGCCAGCTGATCTCAGGAGCCCC
ATAGCCCTCTCCACCTTCCCCTATGTTGATGCCAGGCTACTTCTGCTACCGCTGGG
CCCAAGCCCTGCTCTCTTCTTCCCTCCCGCTACCCGCTGCTGTTGACTAATCCTGC
TTCCTCTGGGGCTGGCTGCCGGATCTGGGGTCCCTAAGTCCCTCTTTAAAGAACTT
CTCGGGTCAAGCTCTGAGCGAGTGTGTGGCGGCGCGGAGCAGAGCCGACACTC
GCTGTTAAGCTCCCCAGCTTTCAGAAACATAAACAAGCTCAGAATTGTGTTTCAA

【 39】

GAATTTCGGCAGAGGGGAGAAGGAAAGAAATCTCCGGGGCTGCTGGGAGCATATAAAGAA
GCCCTGTGGCCTTGGTGGTTTACCATCCAGACAGAGTCAAGCCAGACGGACATGGGCTG
CTCAAGGCTGTGCATCTGCTGCTGCTGCTTAACTAGGCATCTTGTCCCTCCCTGT
GACTCAAGAGCTACAGTGTCTGTATTCAGGAACACTGTAATTCACTCCTCAAACT
CATTAAAATATAATGGTATATTCAGGACCTTACTGCAACAGAAAGGAAGTATAGCAG
TCCCAAAAATGGAGTATGATTGTGTTGATCCTGATGCTCCATGGTGAAGGCTACTGTT
GGCCCAATTAACAAGTCTCACTGAGGACTCAAAACAAAGGAATTTCCACCGCAAT
GAAGCTTCGTATAGTGTGGAGCATGAAAGGCTCTATATCTTTCATTGGGAGACCTGAGA
ACAAGAGAATATTTCCCTTCAATTCGGAGACTCTAGACACTTTGTGATTAGTCTAC
AACAGTATAGGAATTTTCTAGCGGACTCCAGTGAAGTCAAGTTGACAGGCATGATGCCCT
AAAGGCACTCAGAGGCAAGGATTTCAAGGAGGCTCTCTCCTGGGTTTTGGCTTCTCA
TCTTATACTCTATTCCCGGCTTAGCTGCTGTATGATCTCCTATGAGCTCTCTTTAATATTT
TATTATAAATGTTTTTACTTAACCTTCTAGTGAATGTTTACAGGCTGACTTCCGCCAT
CCCCATTCTTATATACATATAATGGCATATATACCCCTTTATTGACTGACAAACTACT
CAGATGCTTAACTTTTGTCTTCAAAGCTTATCCCACTCCACTATGGGCTGTACAGAG
TGCATCTCGGTAGAGCAAGCTCTCTGCTTTCAGTGGCCGGGTAAGAAACTCTTTGGA
AAAATTTTCACTTCAAAAAATCTGAAATAAAATATGCTTAATTGAG

【 40】

></usr/seqdb2/sst/DNA/Dnaseqs.min/ss.DNA73838
><subunit 1 of 1, 167 aa, 1 stop
><MW: 19091, pI: 7.48, NX(S/T): 1
MAAQGWSMLLAVLNGLFVRRPCDTQLRLCIQEHSEFIPLKLIKINIMVIFETIYCNRKEV
IAVFKNGSMICLDPAWPKATVGPINRLEPELDKQKFPMPAMKLYLSEHEKPLYLSPGR
PENKRIFFPPIRETSRHFDLHNSDRNFLRSDSEVSLTGSDA

タンパク質の重要な特徴
シグナルペプチド
アミノ酸 1-25

N-グリコシル化部位
アミノ酸 68-72

N-ミリスチル化部位
アミノ酸 69-75

小サイトカイン(インターリン/ケモカイン)C-x-Cサブファミリーシグネチャー
アミノ酸 40-85

【 38】

></usr/seqdb2/sst/DNA/Dnaseqs.min/ss.DNA41234
><subunit 1 of 1, 281 aa, 1 stop
><MW: 31743, pI: 6.83, NX(S/T): 1
MGSRRGQLLALYCLLLAFASGLVLSRVPHVQGEQEQEWTEELPSPDHAERAEQHEKRYR
SQDGLPASRCLRCDDPGTSMYPATAVPIINITILKGERKDRDRLGQKYGKTSAGARGH
TGPKGKQSGMGAPEGRCKSHYAFVSVRKPMHSNHYQTVIDTFVNLVDHFMNMTGKVF
CYPVGLYFFSLNVHTWQKETYHLIMKNEEVILFAQVGDORSIMQSLSMLLELREQDQWLV
RLYKGERENAIHSELDYITFSGYLKHAETP

シグナル配列
アミノ酸 1-25

N-グリコシル化部位
アミノ酸 93-97

N-ミリスチル化部位
アミノ酸 7-13, 21-27, 67-73, 117-123, 129-135

アミド化部位
アミノ酸 150-154

細胞接着配列
アミノ酸 104-107

【 41】

CAGACATGGCTCAGTCACTGGCTCTGAGCCTCCITATCTGGTTCGGCTTGGCATCCC
AGGACCCAAAGGAGTGTGGAGGGGCTCAGGACTGTGCCCAAGTACAGCCAAAGGAAGAT
TCCCAGCAAAGTGTCCGAGCTACCGGAAGCAGGAAACAAGCTTAGGCTGCTCATCCAG
CTATCTGTCTTTCGGCCGAGGCGCTCTCAGGAGAGTATGTCAGACCCAAAGGAGGCTC
TGGGTGCAGCAGCTGATGCAGCATCTGGACAGACACCATCCCCACAGAAACGACCCAGG
CTCGAGGAAGACAGGGGGCTTCCAGACTGGCAAGAAAGGAGGCTCCAAAGGCTGCA
AGAGGACTGAGCGGTCACAGACCCCTAAGGGCCTATAGCCAGTGCAGGCTGGAGCCCTG
GAGACCCACCCAGCTCACACAGGCTTGAAGCCTGAAAGCTGAAAGATGCAAGAGGAGGCTG
CTCAGGGGCTGGAGCAGCCACCCATGCTGGCTTGGCCACACTTTTCTCCTGCTTAAAC
CACCCCATCTGATTCACAGCTACCTTGCATGGCTGAGCTGCCACAGCAGGCAAGTCC
AGAGAGACCCAGGAGGAGGCTCCTCCAGGAGCATGAGAGGGAGCAGGACTGTCCTC
TGAAGGAGATCATCAGGACCTTGGAGCTGATACGGCTCCCCAGTACACCCACCTTCTCT
TGTAATATGATTTATACCTAATCAATGAAATAAAAGCTGTTCTGCTTCCNCCCA

【 42】

><MW: 14646, pI: 10.45, NX(S/T): 0
MAQSLALSLILVLAFGIPRTQSGDGAQDCLKYSQKIKPVVRSYRQKPELSPGSIPIA
LELPKRKRSQAEIACDPKELMWQQLMHLDKTFSQKPAQGRKDRGASKTGKKGKSKGCKR
TERSQTPKGP

タンパク質の重要な特徴
シグナルペプチド
アミノ酸 1-17

cAMP-及びcGMP-依存性プロテインキナーゼリン酸化部位
アミノ酸 67-71

N-ミリスチル化部位
アミノ酸 17-23, 23-29, 27-33, 108-114, 118-124, 121-127

アミド化部位
アミノ酸 112-116

小サイトカイン
アミノ酸 51-91

【 図 4 3 】

AAGGAGCAGCCCGCAAGCAACAGTACAGAGGAGGAAAGTACAGTGTGGTTTCCGTTGGCTC
CTGGGTACAAACTGATATGTCCTCAGTAGCAACCCAGTCTCAGGAGATGTCGATTTCC
CACAGACATGCACCATATAGAAGAGAGTTTCAGAAATCAAAGAGCCATCCAAGTAAGG
ACACCTTCCAAATGTCACTATCCTGTCCACATTTGGAGACTCTGCAGATCAATTAAGCCCTTA
GATGTGTGCTGCGTAGCAAGAACCTCCTGGCTTCACGTGGACAGGGTGTCAAGGATCA
TCAGAGGCCAAACCCAAAATCTTGGAGAAAAATCAGCAGCAATGCGAACTCTTTCCCTCTACA
TCAGAAAAACTCTGGCGAATGTACGAGAACAGAGGCAGTCTCACTGCAGGCAGGAAGCCACC
AATGCCACACAGATCATCACTGACAACTATGATCAGCTGGAGGTCAGCGTGTGCCATTA
ATCCCTGGGAGAGCTCGACGTCTTTCTAGCCTGGATTAATAAAGAAATCATGAAGTAAATGTCT
CAGCTGGAGTACAAAGAACCTGTATAGTAGTCCAGGGATGAACACCCCTGTGCGGTTACT
GTGGAGACAGCCACCCTGAGGGGAAGGAGATGGGAAAGCCCTTGACAGTGAAAGTCC
CACTGGCTGGCCCTCAGGCTGTCTTATCCGCTTGAATAAGGCCAAAGAAGTCTACTGTGGTAT
TTGTAATAAAGCTCATCTGCTGAAAGGCCTCGAGGCCATCTGGGATGAAGGGCTGCCTT
CCCATCTAATTTATTTGTAAGTATATGTCATGTGTGTGTGAGCCAAAGTATATCCT
GTAGTACACATTTACTGTAGTGGTTTTTCTGAATAAATTCATATTTTACCTATGA

【 図 4 4 】

>/usr/seqdb2/sst/DNA/DnaSeqs.full/ss.DNA92282
>>subunit 1 of 1, 177 aa, 1 stop
><MW: 20452, pI: 8.00, NX(S/T): 2
MKLQCVSLWLGTLILLCVDNHLRRLRLLSTDMHHEESFQEKRAIQAKDTFPNVILST
LETLQIKPLDVCCVKNLAFYVDRVFKHDHQPKNPIKRLKISSIANFLYMQKTLRQCQEQ
RQCHCRQFATNATRVIHQNDYQLVHAAAIKSLGELDFLAWINKNHEVMFSA

シグナル配列
アミノ酸 1-18

N-グリコシル化部位
アミノ酸 56-60, 135-139

cAMP-及びcGMP-依存性プロテインキナーゼリン酸化部位
アミノ酸 102-106

N-ミristol化部位
アミノ酸 24-30

アクチニン型アクチン結合ドメインシグネチャー-1
アミノ酸 159-169

【 図 4 6 】

MRSQCVVVHVWILAGLWLVAVAGRELFASDAGEPHVHWGDFIRLHLYTSGPHLSSCFRLRI
RADGVVDCARGQSAHSLLEIKAVALRFVAIKGVHVRVRYLCMGADKMQGLLQYSEEDCAFE
EIRPDGYNVYRSEKHRLPVLSSAKRQLYKNRFLPSHLEPMLPMVPEEPEDLRGHLESD
MFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPEK
シグナルペプチド
アミノ酸 1-22
カゼインキナーゼ II リン酸化部位
アミノ酸 78-82, 116-120, 190-194, 204-208
N-ミristol化部位
アミノ酸 15-21, 54-60, 66-72, 201-207
原核生物膜リポタンパク質脂質結合部位
アミノ酸 48-59

【 図 4 5 】

GTCCTCCAGCCAGAACTCGGGGCGGTGCGGGTGGGAGGAGTCCCCGAAACCCGGCCG
CTAAGCGAGGCTCTCTCCGCGAGTCCGAAACGGCTGGCGGCGTCCCCGGCTTGGSA
CAGAAAGCCCGCTGCTGCCTGCCGCGGGCGGAGGGGCTGGCTGGCGCGGAGGCGG
GGTGTACTGGGTGTGCGGGGGCGGAGGCTGATGCAATCCGTAACAAATGCTCCGG
TGCTTGGSCACTACCGTGGGGCCCTAAGCGGCTACTATATAGGCTCGCGCCCGGAG
CCGCGCGCGCTCAGAGCAGGAGCGGCTGGCTCAGGATCPAGGCGCACGACCATCCAAC
GGACTCACAGCCCGGACGATCCGGTGGCGGCGGCGCGCTCCGCAACCCATCGCGCC
AGCTTGGCCGAGAGCCCGAGGAGGTGCGAAGGGAGCGGGTGTGGTGTCCAGTATGG
ATCTGGCCGGCTCTGCTGGCTGGCGGCGCGCGGCGCGCTCGCTCTCGGACGGCGGCG
CCAGTGCACTACGGCTGGGGGCGACCCATCGCGCTCGGGCACCTGTACACTCCGGCC
ACGGGCTCTCCAGCTGCTTCCTGGCATCGTGCGGAGCGCGCTGTGGACTCGCGCGGG
CAGAGCGCGCACAGTTTGGAGATCAAGGAGTGGCTCTCGGACCGTGGCCATCAAGGG
CGTGACAGCGCTGGCGTACTCTGCATGGGCGCGAGCCGCAAGATGCAGGGGCTGTCA
ACTGGAGGAAACTGTGCTTCGAGGAGGATCCGCGCAAGTGCTACAATGTTACCGA
TCGAGAGCACCGCTCCCGGTCTCCCTGAGCATGCGCAACAGCGGAGCTGTAGAAGAA
CAGAGGCTTCTTCCACTCTCTATTTCTGCCCATGGTCCAGAGGAGCGCTG
AGGACTCAGGGGCCACTTGAATCTGACATGTCTTCTGCCCCGGGAGCAGCAGGCTG
GACCATTTGGCTTTGTACCGGACTGGAGCGGTGAGGAGTCCAGCTTTGAGAAAT
GAGACATSCCGGGCTTTCACCTGCTCCAGGCGGCTGTGTACTTGCAGCTGGGAGAG
TGCTTCTACAAAGACTGCTGTGCTGACGCTTCTGTTAGCTTTAGGAAAGAACTGTAGA
GTTGTACATAFTCAGAGTTTTCATTTGGCAGTCCAGTTCTTACCAATAGACTTGTCTG
ATAAGATTTAAGCCTGTAGCTTCCCAGCTGCTGCTGGCCCCATTTCTGCTCCTCGA
GGTGTGTGACAAAGTGTCTGCACTGTCTCAGTCTGCTTGAATACCTCATCGATGGGA
TCCTTCTTTGAAAAATCTTATGTCAAGCTGAAATCTCTAATTTTTCTCATCACTTC
CCAGGAGCAGCAGAAAGCAGGCAGTAGTTTAAATTCAGAACAGGTGATCCACTCTGT
AAACAGCAGGTAATTTCACTCAACCCATGTGGAAATGATCTATATCTACTTCCAGGG
ACCATTTGCCCTTCCAAATCCCTCCAGGCCAGAACTGACTGGAGCAGCAGTGCACAG
GCTTCCAGAGTGGGAAAGCCTGGAGCCCACTCCAGCCTGGGCAACTTGAAATTTCCC
CTGAGGCCAGTTCTGTCATGGATGCTGTCTGAGAAACTGCTGTCCCGGTTGCACCTG
TTCATCTCCCAGCCACCGCCCTCTGCCACCTCAGTGCCTCCCAATGGTGGGCTC
CCAGGCCCCCCACCTTATGTCAACTGCACCTTCTTGTCAAAAACAGGAAAGAAAGAT
TTGAGACCCCAAGCTCTGTCAATACTGTCTGTGTGGAGCAGGGGGAGCAGCTAGA
CCTTCCAGCAGCACTGGTTTTCCCACTGATATTTATGAGTAATTTTGTATGTAGACA
TCCTTATTTTCTTACATATTTAAGCCCAAAATATATATATGATGTAGTGGGTTTTG
TTTTGTATATTAATGGAGTTGTTTGT

【 図 4 7 】

GTCCTGTCAGGAGTCTTCGGCGGCTGTGTGTGTCAGTGGCTGATCGCGAGGAGGACAA
GGCCGAGTGCAGAGGAAACTGTTGTCCTTTTCATATTTGGCGACTGTTGCTGCTCCCT
CATTTGGCAGTGTACAGTGCACCTTCTTGAACCTGAAGTCAGAAATCCTGAGAAATACT
GTGAAGTGTGCTGCTACTCGGGCTTTCTTCTCCCGGTGIGGAGTGAAGTTTGACCA
AGGAGACACCAAGACTCGTTGCTATAAACAAGATCACAGTCTCTATGAGGACCGGG
TGACCTTCTTGCCAACTGGTATCACTTCAGTCCGTGACAGCGGGAAGACACTGGGACAT
ACTTGTATGCTCTGAGGAAGCGGCAACAGCTATGGGAGGTCGAAGTCAAGCTCATCGT
GCTTGTGCTTCCATCAAGCTACAGTTAAACATCCCTCTCCTGCACCACTGGGAGCCGG
CAGTGTGACATGCTCAGAACAAAGTGGTCCCCACCTTCTGAATACCTGGTTCAAAGAT
GGGATGATGATGCTACGAATCCAAAGACCCCGTCCCTCAGCAACTCTTCTTATGCTCT
GATCCCAACAAGGAGGCTGGTCTTGTATCCCTGTCAGCCTCTGTATGATGGAAATACA
GCTGTGAGGCAAGGATGGGTATGGGACCCCCATGACTTCAAATGCTGTGCGCATGGAAGT
GTGGAGCGGAATGGGGGCTCATGCTGGCAGCCCTCTGTAAACCTGATCTCTCGGAA
CTTGGTTTTTGGCATCTGGTTGCCATAGCCGAGGCGCACTTGACAGAAACAAGAAAGGA
CTTCCAGTAAGAAGTGTATTTACAGCCAGCCTAGTGCCGGAAGTGAAGGAAATCAAAG
ACCTCGTATTCTGGTGTGGGCTGCGGCTACCCGCTACTCATCTGCATTTGCTTACT
CAGTGTACCGGACTTGGCCCTGTGATGCTGTAGTTTTACAGGATGCGCTTATTTGTCTT
TACACCCCAAGGCGGCTACTCTTCCGATGTGTAAAATAATGTCAAGTATGTGCCCC
ATCCTCCTTCAAGCCCTCCCTCCCTTCCCTACCACCTGCTGAGTGGCTGGAAGTTGTTAAA
GTGTTTATCCCATTTCTTTGAGGATCAGGAAGGAATCCTGGGTATGCCATTGACTTCC
TCTTAGTATGACAGCAAAAATGGCGGGGTGCGAGGAATCTGCACACTACGTCACCTGG
TGGCAGGATCTTTGAAATAGTATCTTGAGCTTGGTTCTGGCTCTTTCTTGTGACTGAC
GACAGGCGCAGTGTCTTAGAGCGGGAATTAGAGGCTAGAGCGGCTGAATGGTTGTGG
TGATGACACTGGGCTCTTCCATCTCTGGGCCACTCTCTTCTGCTTCCCAAGGGAAGTG
CCACTGGGATCCCTCTGGCCTGTCTCCTGAATAACAAGCTGACTGACATTGACTGTCTGT
GGAAAATGGGAGCTTGTGTGGAGAGCATAGTAAATTTCCAGAGACTTGAAGCCAAAAG
GATTTAAAACCGCTGTCTAAAAGAAAAGAAACTGGAGGCTGGGCGAGTGGCTCACGCC
TAATCCAGAGGCTGAGCGAGCGGATACCTGAGGTCGGAGTTGCGGATACGCTGACCA
ACATGGAGAACCTTACTGAAATACAAAGTTAGCAGGCTGTGGTGTGATGCTGTAGTC
CCAGCTGCTCAGGAGCTGGCAACAGAGCAAACTCCAGCTCAAAAAAAAAAAAAAAAAA

【 図 4 8 】

MGTKAQVERKLLCLFILAILLLCSLALGSVTVHSSEPEVRI PENNPVKLS CAYS GFSS PRVWE
KFDQGDTRRLVCYNNKITASYEDRVTFLEPTGITFKSVTRDTGTTCMVSEEGNSYGEVKV
KLIVLVPPSPKPTVNI PSSATIGNRAVLTCSEQDSSPPSEYTFWKDGI VMPTNPKSTRAFSNS
SYVLNPTTGLVFDPLSASDTGEYSCEARNYGT PMTSNAVRMEAVERNVGVIAAVLVTLI
LLGILVFGIWFAYS RGHFDRTRKKTSSKKVIYQSPARSSEGEFKQTS SFLV

シグナル配列
アミノ酸 1-27

膜貫通ドメイン
アミノ酸 238-255

N-グリコシル化部位
アミノ酸 185-189

cAMP- 及び eGMP- 依存性プロテインキナーゼリン酸化部位
アミノ酸 270-274

カゼインキナーゼ II リン酸化部位
アミノ酸 34-38, 82-86, 100-104, 118-122, 152-156, 154-158,
193-197, 203-207, 287-291

N-ミristolil化部位
アミノ酸 105-111, 116-122, 158-164, 219-225, 237-243, 256-262

【 図 4 9 】

CCCACGGTCCGAACCTCTCCAGCCATGGGAGCCGCGCGCTGTCGCCAACCTCACTCTGT
GCTTACAGCTGCTGATTCTCTGCTGCAAACTCAGTACGTFAGGGACCAGGGGCCATGACC
GACCAGCTGAGCAGCGCCAGATCCGCGAGTACCAACTCTACAGCAGGACCAAGTGGCAAGCA
CGTGCAGTCCACGGGCGTGCATCTCCGCCACCGCGAGGACGGCAACAGTTTGGCAAGC
TCATAGTGGAGACGGACCGTTTGGCAGCCGGTTCGCATCAAAAGGGGCTGAGATGAGAAG
TACATCTGTATGAACAAGGGGCAAGCTCATCGGAAGCCACGGGGAAGAGCAAAGACTG
CGTGTTCACGGAGATCGTCTGGAGAACAATAACGGCCTCCAGAACGCCCGCACGAGG
GCTGGTTCATGGCTTCCAGCGGCAGGGGCGGCCGCCAGGCTCCCGCAGCCGCCAGAAC
CAGCGCAGGCCACTTCAACAGCCCTTACCAAGGCCAGTGCCTTCCCAACCCACCGC
CGAGAAGCAGAAGCAGTTCGAGTTTGTGGCTCCGCCCCACCGCGGACCAAGCGCACAC
GGCGGCCCCAGCCCTCACCTAGTCTGGGAGGAGGGGGCAGCAGCCCTGGCGCCCTCCC
CACCCCTTCCCTTCTTAATCAAGGACTGGGCTGGGTGGGGAGGGAGGCCAGATCCCC
GAGGGAGGCCCTGAGGGCCCGAAGCATCCGAGCCCCAGCTGGGAAGGGGAGGCGCGGTG
CCCCAGGGCGCGTGGCACAGTCCCTTCCCGGACGGTGGCAGGCCCTGGAGAGGAACT
GAGTGTCACTGATCTCAGGCACAGCCTCTGCGGCCCTCCAGCGGGCTCCTGAAGCC
CGCTGAAAGGTGAGCAGTGAAGGCTTGCAGACAACCGTCTGGAGTGGCTGCTCAAAA
TCTGCTTCCGATCTCCCTCAGTCTGCCCCAGCCCAAACTCTCTGGTAGACTGTA
GGAGGGACTTTTGTGTTTGTGTTTTCAGAAAAAAGAAAGGAGAGAGAGAAAATAG
AGGGTTGCTCACTCTCACATTCACGACCCAGGCTGCACCCCAACCCCACTCCAGCC
CGGAATAAAACCATTTCTCTG

【 図 5 0 】

MGAARLLPNLTLCLLILCCQTVYRDQAMTDQLSRRIQREYQLYSRTSGKHVQVIGRRI
SBAEDGNKFAKLIIVETDFTGSRVRIKGAESEKYICMNRKGLIGKPSGKSKDCVFTEIVLE
NNYTA PQNARHEGWFMFTRQGRPRQASRSRQREAHFIKRLYQGLPFPNHAEKQKQFEP
VGSAPTRTKRTRRPQPLT

シグナルペプチド
アミノ酸 1-22

N-グリコシル化部位
アミノ酸 9-13, 126-130

cAMP- 及び eGMP- 依存性プロテインキナーゼリン酸化部位
アミノ酸 60-64

カゼインキナーゼ II リン酸化部位
アミノ酸 65-69

チロシンキナーゼリン酸化部位
アミノ酸 39-48, 89-97

N-ミristolil化部位
アミノ酸 69-75, 188-194

アミド化部位
アミノ酸 58-62

HBGF/FGF ファミリーシグネチャー
アミノ酸 103-128

【 図 5 1 】

GTTGTGTCCTT CAGAAAAACAGTGGATTAAATCTCCTTGCAACAGCTTGAGAGCAACACA
TCTATCAGGAAAGAAAGAAAGAAAAACCGAACCTGCACAAAAAGAAAGAAAGAAAGAA
AAAAAATCATGAAACCATCAGCCAAAATGCACAATCTATCTCTTGGGCAATCTCAC
GGGGTGGTGTCTGTGCTCTTCCAAGGAGTCCCGTGGCAGCGGAGATGCCACTTCC
CAAAGCTATGGACAACGTGACGGTCCGGCAGGGGAGAGCCCAACCTCAGTGCATATT
GACAACCGGGTCAACCGGTGGCTAAACCGCAGCACCATCTCTATGCTGGGAATGA
CAATGGTGCCTGGATCCTCGCTGCTTCTGAGCAACCCAAACGAGTACAGCATCG
AGATCCAGAACGTGGATGTGTATGACGAGGGCCTTACACCTGCTCGGTGCAGACAGACAAC
CACCCAAAGACCTCTAGGGTCCACCTATTGTGCAAGTATCTCCAAAATIGTAGAGATTTC
TTCAGATATCTCCATTAATGAAGGAAACAATATAGCCTCACCTGCATAGCAACTGGTAGAC
CAGAGCCTACGGTACTTGGAGACACATCTTCCAAACCGGTGGCTTTGTGAGTGAAGAC
GAATACTTGGAAATCAGGGCATCACCCGGGAGCAGTCAAGGGACTACAGTGCAGTGCCTC
CAATGAGTGGCCGCCCGTGGTACGGAGTAAAGGTCACTGCAACTATCCACCATACA
TTTCAGAAGCCAAAGGTACAGGTGTCCTGGGACAAAAGGGGACACTGCAGTGTGAAGCC
TCAGCAGTCCCTCAGCAGAAATCCAGTGGTACAAGGATCACAAAGACTGATTGAAGGAAA
GAAAGGGTGAAGTGAAGAACAGACTTCTCTCAAATCTATCTTCAATGTCTCTG
AACTGACTATGGAACTACTTGGTGGCTCCAAACAGCTGGGCCACCAATGCCAGC
ATCATGCTATTGGTCCAGCGCCCTCAGCGAGGTGAGCAACGGCAGTCCAGGAGGGCAGG
CTGCTGCTGCTGCTCTTCTGCTTGCACCTGCTCTCAAATTTGGTGTGAGTGCC
ACTTCCCAACCGGAAAGGCTGCCGCCACCAACCAACCAACCAACAGCAATGGCAACAC
CGACAGCAACCAATCAGATATATACAAATGABATTAGAAGAARCAACAGCCCTCATGGGACAGA
AATTTGAGGGAGGGGAAACAAAGAACTTTGGGGGAAAGAGTTTAAAAAGAAATGAA
AATTTGCTTGCAGATATTAGGTACAATGGAGTTTCTTTTCCCAACGGGAAAGCAACAGC
ACACCCGCTTGGACCCACTGCAAGCTGCATCGTGAACCTCTTTGGTGCAGTGTGGGCAA
GGGCTCAGCCTCTCTGCCACAGAGTGCACCGTGAACACTTGGAGCTGGCCATCCCA
AATTCARTCAGTCCATAGAGACGAACAGAAAGAGCCTTCCGGCCAAAGCGTGGCCGCTGCGG
GCACCTTGGTAGACTGTGCCACCGCCTGTGTGTGAAACGTGAAATAAAAGAGCAAAA
AAAA

【 図 5 2 】

MKTIQPKMHNISWAI FTGLAALCLFQGVVPRSGDATFPKAMDVTVRQGESATLRCTIDNR
VTRVAVLNRSTILYAGNOKWCLDPRVLLSNTQTQYSIEIQNVQVYDEGPYTCVQDNDHPK
TSRVHLIVQSPKIVEISSDI SINEGNISLTCIATGRPEPTVWRHISPKAVGFVSEDEYL
EIQGITREQSGDYBESASNDVAAPVVRVVKVTVNYPYI SEAKGTGV PVQKGTIQCEASAV
PSAEFQWYKDDKRLIEGKKGKVENRPFSLKLI FFNVSEHDYGNVTCVASNLKHTNASIML
FPGAVSEVSNGTSSRAGCVWLLPLLVHLHLKLF

シグナルペプチド
アミノ酸 1-28

【 図 5 3 】

GTGACTCTGAGAAGCCAGGCAGTTGAGGACAGGAGAGAGAGGCTGCAGACCCAGAGGGA
GGGAGGACAGGGAGTCCGAAGGAGGAGGACAGAGAGGGCCACAGAGACCCAGAGCAAGGGCCG
CAAGGAGAGACCCCTGGTGGGAGGAGAACTCTGGGAGAGAGAGGGGGCTGGCCAGAGATG
AAGTTCCAGGGGCCCTGGCTCCCTGCTGGCCCTCTGCTGGGCGAGTGGGAGGCTGG
CCCCCTGCAGAGCGGAGAGGAAAGCACTGGGAACAATATTTGGGAGGCCCTTGACATYGGCC
TGGGAGACGCCCTGAGCGAAGGGTGGAAAGGCCATTTGGCAAGAGGCCGAGGGGCCAGCT
GGCTCTAAAGTCACTGAGGCCCTGGCCAGGGACAGAGAAGCAGTTGGCACTGGAGTCAG
GCAGGTTCCAGGCTTTGGCCAGCAGATGTTTGGGCCAAGGGTGGGGAAGCAGGCCATG
CTCTGGGAAACTGGCCAGCAGATTGGGACAGCGCAGAAATGTCACTGACACAGGAGCA
GATGCTGTCGGCGCTCCTGGCAGGGGTGCTGGCCAGCAGTGGTCTTGGGAACTTCTGG
AGGCCATGGCATCTTTGGCTCTCAAGGTGGCTTTGAGGCCAGGGCCAGGCCAATCCTGGAG
GTCTGGGGACTCCGTTGGTCCACGGATACCCGGAATACTGACAGCGAGCTTTGGAATGAAT
CCTCAGGGAGCTCCTGGGGTCAAGGAGGCAATGGAGGGCCCAAACTTTGGGACCAACAC
TCAGGGAGCTGTGGCCAGCCTGGCTATGTTTCACTGAGAGGCCAGCAACCAAGAAATGAAGGT
GCACGAATCCCCACCATTGTGCTCAGGTCAGGCTCGAACACTCTGGGGAGGCGAGCGGC
TCACAGTCCGGGACGAGTGGCAGTGGCAGCAATGGTGACAAACAATGGCAGCAGCAGTGG
TGGCAGCAGCAGTGGCAGCACTGGCAGCAGCAGTGGCGGACGAGTGGCGGACAGCAGTGG
GTGGCAGCAGTGGCAGCAGTGGCAGCAGTGGCAGCAGTGGCAGCAGTGGCAGCAGTGGGGA
TCCAGCACCGGCTCTCTCCCGCAACACGGTGGGAGCGGGGAGGAAATGGACATAAACC
CGGTTGTGAAAAGCCAGGAATGAAGCCCGGGAGCGGGGAATCTGGGATTCAGGGCTTCA
GAGGACAGGGAGTTCCAGCAACATGAGGAAATGACAAAGAGGGCAATCGCCCTCTTGGG
GCTCTGGAGACAAATTTAGGGGGCAGGGTCAAGCTGGGGCAGTGGGAGAGTGAAGCCTGT
TGTTGGAGTCAATCACTGCACTCTGAGACTCTGGAGCCTCTGAGGATGTTAACTTTGACACTTTCT
GGAAGATTTTAAATCCAAGTGGGTTTCACTCAACTGGGATGCCATAAACCAAGACCAGAGA
AGCTCTGCATCCCTGACTCCAGACAGGAGGCCAGATTTGATGGAGCGCCCAACTTA
CCCTCCTTAAACACCCCTCTCATCACTAATCTCAGCCTTGGCCTTGAATAAACTTAA
GCTGCCACAAAAAANAAAAAANAAAAAANAAAAAANAAAAAANAAAAAANAAAAAANAAAAA
AAAAAANAAAAAANAAAAAANAAAAAANAAAAAANAAAAAANAAAAAANAAAAA

【 図 5 4 】

></usr/seqdb2/sst/DNA/Dnaseqs.min/ss.DNA59212
><subunit 1 of 1, 440 aa, 1 stop
><MW: 42208, pI: 6.36, NX(S/T): 1
MKFGPLACLILLALCLGSGEAGFLQSGEESTGTINIGEALHGLHGDALSEGVKAIKEKAGGA
AGSKVSEALQGQREAVGTGVRQVPGFGAADLGNRVGEAAHALGNTGHEIGRQAEDEVIRHG
ADAVRGSWQGVVPHSGAWETSQGHGIQFSGQLGGQGGQNPGLGTPWVHGYRNSAGSFGM
NPQAPWQQGNGGPNFNTQAVQAPGVYVRASNQNEGCTNPPSPSGGGGSSNSGGGS
GSGSGSGSNGDNNNGSSSGSSSSGSSSSGSSSSGSSSSGSSSGSGSNGSNGSNGSNGSNGS
GSSSTGSSSNHCGSGGGNGHKGCEKPGNEARGSGESIQFRGGVSNMREISKEGNRLL
GSSGDNYRGGSSWGGGDAVGVVNTVNSPFGMNFDFWKNFKSKLGFINWDINKDQ
RSSRIIP
シグナルペプチド
アミノ酸 1-21
N-グリコシル化部位
アミノ酸 265-269
グリコサミノグリカン付着部位
アミノ酸 235-239, 237-241, 244-248, 255-259, 324-328, 388-392
カゼインキナーゼ IIリン酸化部位
アミノ酸 26-30, 109-113, 259-263, 300-304, 304-308
N-ミristolyl化部位
アミノ酸 17-23, 32-38, 42-48, 50-56, 60-66, 61-67, 64-70,
74-80, 90-96, 96-102, 130-136, 140-146, 149-155, 152-158,
155-161, 159-165, 163-169, 178-184, 190-196, 194-200, 199-205,
218-224, 236-242, 238-244, 239-245, 240-246, 245-251, 246-252,
249-252, 253-259, 256-262, 266-272, 270-276, 271-277, 275-281,
279-285, 283-289, 284-290, 287-293, 288-294, 291-297, 292-298,
295-301, 298-304, 305-311, 311-317, 315-321, 319-325, 322-328,
323-329, 325-331, 343-349, 354-360, 356-362, 374-380, 381-387,
383-389, 387-393, 389-395, 395-401
細胞接着配列
アミノ酸 301-304

【 図 5 5 】

AGCCAGGCAGCACATCACAGCGGGAGGAGTGTCCAGGTGGCCAGCTCAGCAATGGCAAT
GGGGTCCCCAGAGTCACTTGTCTTGGCCCTTTTGGGGTGGCCCTTGCTGACAGGGTCC
AAGCCTGCAGTGTACAGCTTTGAGCACACTACTTTGGCCCTTTGACTCAGGCGCATG
AAGTGTCCAGCATCTCTGCTCATAGTGTCTTGGAGGCTATCTGCTCTTGGACACCGG
GTATCGCGGGCGGGTACCTGTGGTGGAGGCTGTGTGACCGGGCCTCTGCGGGCCAGA
CGCAATCGAACCGGACCGGCTGCGCCGAGCTACTCGGTGGTGGCGGCTGCACAAGTGC
AAATGCAACGCCCACTCATTGACTGACGCTGTCGCCCTGCCCAACTGAGCCAAAGCACCAGCC
GCCAGCGCTCAGCGGGCCGAGTGTTCAGCCTGTATCGGGTCCACCAGGATGACTGGCCTA
TGGCAGGTCCCGACAGTCCAGTGTACCAGGACCAGCCGCTGCTCCAGGGCAGTGGC
AGAATGACAGTGGCAATTTCTCAGTCCCTGTGTACATCAGAACCTGCCACCAGCCCTCTCT
CACCACCGAGGCGCACCCAGCCCCIGGACGCCATCGACTCCAGGGCTCTCTGCTGTGAGG
GGTACTCTGCAACAGGAAATCCATGACCAGCCCCCTTCCACAGTCTTACCGCCACCCCT
CCCGAGCACTACAGGTCTGGCCCTGCTCCCTCCAGTCTCTCTGCTGGTGGGGTCTCAGC
ATAAGCCGCCCTCCAGGATGCTGGGGACAGGGCTCACACACCTATCTTCTGTGCTTCCAGC
CCATATCAGTGTGCTGAAAATGATGTTAAAGTAAGAAATGCAGAA

【 図 5 7 】

GGAGCGGCGCTGGGTGTCAAGCGGCTGGCTCCCGCCAGCTCCGGCCGTCGGCCAGCTCG
GCACCTGCAGGTCCGTCGCTCCCGGGCTGGCGCCCTGACTCCTCCCGCCAGGAGGGC
CAAGATTCCCTCCCGGGGCGCTGGTACCACACTGTCCGGCTTTTGTTCCTGGGGTCA
GTGCCCTCGCGGGCCCTCGGGGCGCCAGCTGCAACTGCATTTGCCCGCAACCGTTCGAG
CGGTGGAGGGAGGGAAAGTGTGCTTCCAGCGTGGTACACTTGACGGGAGGTTGTCTTC
ATCCAGCCATGGGAGGTGGCCCTTTGTGTGTTGTTCTTCAACACAGAAAGAAAGAGGATC
AGGTGTTGTCTCATCAATGGGGTCAACAAGCAAAACCTGGAGTATCCTTGGTCTACTTC
ATGCCCTCCCGGAACCTGTCCCTGGCGCTGGAGGTCTCCAGGAGAAAGACTTGGCCCCCTA
CAGTGTCTCCGTGAATGTGACAGACAAACAAGCAAAATCTAGGGCCACAGCATCAAAACT
TAGAATCAATGACTGTTCCTCCAGCTCCTCCATCCTGCCCTCCAGGGTGTGCCOCAT
GTGGGGCAAACGTGACCCGTGAGCTGCCAGTCTCCAAAGAGTAAGCCCGCTGTCCAATACCA
STGGGATCGGACGTTCCATCCTCTCAGACTTCTTTGCACAGCATAGATGTCTCCGGT
GGCTTTAAGCCTCACCAACTTTCGTTCCATGGCTGGAGTCTATGTCTGAAGGGCCAC
AATGAGGTGGGCACTCCCAATGTAATGTGACGCTGGAAGTGAAGCAGGGCCCTGGAGCTGC
AGTGGTTCGTGAGCTGTTGTGGGTACCTGGTGGACTGGGTTGCTGGCTGGGCTGGTCC
TCTGTGACCACCGGGGCAAGGCCCTGGAGAGCCAGCAATGATATCAGGAGGATGCC
ATTGCTCCCGGACCCTGCCCTGGCCAAAGACTCAGACACAACTCCAAGAAATGGGACCT
TTCCTGTGTCACCTCCGACAGGCCCTCCGCCCCACCCATGGCCCTCCAGGCCTGGTGCAT
TGACCCCCAGCGCCAGTCTCCAGCCAGGCCCTGCCCTCACCAAGACTGCCACGACAGAT
GGGGCCACCCCAACCAATATCCCCCATCCCTGGTGGGTTTCTTCTCCTGCTGGTTCGAGCGC
AGGGGCTGCTGCTGATGATGGTCCCTGCCAGAGTCAAGCTGGCTCTCTGTGATGATGAC
CCACCACTCATTTGGTAAAGGATTTGGGGTCTCTCTCTATAAGGGTCACTTACAGC
AGAGGGCTGAGTCTGGGAAGAGTCAACTCTGACCCCTTAGTACTCTGGCCCCCTCTCT
TTACTGTGGAAACCATCTCAGTAAGACTAAGTGTCCAGGAGACAGAAAGAAAGAGGA
AGTGGATCGAAATGGGAGGAGCTCCACCCACCCCTGACTCTCTCTATGAAAGCAGCTG
CCGAATGACTACTACCAAGAGTGGGGGCGAGAGCTTCCAGTCACTGAGTCTCCAGGCG
CCTTGATCTGTAGCCACCCACTATTAACACCACCCTTGGCTCCACCTCCAGCTCCCTGT
ATTGATATACTGTGAGGCTGGCTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGG
TATTAACCAACTAGCAATGATGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGG
TGTTGGTATAAAAA

【 図 5 6 】

></usr/seqdb2/sst/DNA/Dnaseqs.min/ss.DNA86576
><subunit 1 of 1, 251 aa, 1 stop
><MW: 26935, pI: 7.42, NX(S/T): 2
MAMGVPRVILLCLFGAALCLTGSQALQCSYFEHTYFGFFDLRAMKLPISICPHECFEAILSL
DTGYRAPVTLVRKGCWTGPPAGQTSNDLPPDYSVVRGCTTDCNAHLMHTDALPNLSQA
PDPPTLSGAECYACIGVHQDDCAIGRSRRVQCHQDQATACFQSGSRMTVGNFSVPHYRITCHR
PSCTTEGTTSPWTAIDLQSGCEGVLNCRKSMQPTFSASATTPPRALQVLLALLLVLLV
LSA
タンパク質の重要な特徴
シグナルペプチド
アミノ酸 1-19
膜貫通ドメイン
アミノ酸 233-251
N-グリコシル化部位
アミノ酸 120-124, 174-178
N-ミristolyl化部位
アミノ酸 15-21, 84-90

【 図 5 8 】

MISLPGPLVTLNLRFLFLGLSALAPPSRAQLQLHLPANRLQAVEGGEVLPWPAYTLHGEVSS
 SGPWEVPEFVMMFQKQEKEDQVLSYINGVTTSKPGVSLVYMPSPRNLSLRLEGLQEKDQSGY
 SCVNVQDRQKRSRHSIKTLELNLVLPFPSPSRLQVPHVGANVTLSCQSPRSKPAVQVQ
 WDRQLPSPQTFAPALDVIKRSLSLTLNLSMAGVYVCKAHNEVTAQCNVTLVSTGPGAA
 VVAGAVVGTLVGLGLLGLVLLYHRRKALEEPANDIKEDAIAPRTELPWPKSSDTISKNGTL
 SSVTSARALRPPHGPPRFPALTPPFLSSQALPSPRLPTTDGAPHQPISPDPGGVSSSLSR
 MGAVPVMVPAQSQASGLV

シグナルペプチド

アミノ酸 1-29

膜貫通ドメイン

アミノ酸 245-267

N-グリコシル化部位

アミノ酸 108-112, 169-173, 213-217, 236-240, 307-311

N-ミストイール化部位

アミノ酸 90-96, 167-173, 220-226, 231-237, 252-258, 256-262, 262-268, 308-314, 363-369, 364-370

原核生膜リポタンパク質脂質結合部位

アミノ酸 164-175

【 図 5 9 】

ACTTGGCATCACGTTGCGAGTGGGAAAAATTCGCCGTGTAATTTTTTGCACATGGAG
 GNACAGCGRARAGGCGACACCGCTGATAGACCCAGGACGACGGAGGATATTATTAC
 CATACGCCCTCAGGACCTTCCTACGAGTCTGGAATTCACAGAAACCCATCCAGT
 CATTTTGATTTGCTGTATATTTTTCCTTTTCTGTTGTTGCTCCACACTGTGATTTT
 TTCCCTACTTCAGAAATGGGGCTACAGACCACAACTGGCCAGGACGAGGGCTGTATTT
 GAAGTCTGGCTTTATCATTCCTCCGGGCTCTACTCACAGGTTCCAAACTCTGGGCTGC
 CTAGTGTGGCGTGCACAGGAACTTTGCTACTGTAAATGAGGCGAGCTTGACCCTAGT
 CCTTCTGGGATCCCGAGGGGGCTAACCGTACTTCTACTCCCAACACCAAAATAATATG
 TGGATTTCTCGAGAATGCACAATGTACAGTCTGGTGCACAGGTCTACTTGTGGAAC
 AACTTGACAGATTCCCAGTCACTTCCAGAAATGTCCAGAGTCTCCATTTGCAGGAAC
 ANATTTGACACCTTTACCGGCTGCTTGTCCAGCTCTTGAGGTTTGGAAGCTGACACCT
 GGATGACAACTCCATATCCAGTGGGGCTGAAAGACGGGGCTCCGGGAGGCTATTAGC
 TCAAATTTGTTGTTTGTCTAGAAATCACCTGAGCAGTGTGCCTGTTGGGCTTCCTGTGGAG
 TTGCAAGAGCTGAGAGTGGATGAAAAATCGAATTTGCTGTGCATATCCGACATGGCCTCCAGAA
 TCTCAGAGCTGGAGGCTCTTATTGTGGACGGGAACTCTGACCAACAGGATATCCGCG
 AGGCACTTCAGCCATCTACCAAGCTCAAGAAATTTCAATTTGATGTAATTCGCTGTCC
 CGCCCTCCCGGATCCAGGATACGCTCTGATCAGGCTTATTTGACGAAACACGAT
 NAACCAATTTCTTTGACAGCTTTCAAATGTTGGTAAAGCTTGAAGCTTGAAGAGCTGACCT
 ACAAACCACTGCGGATGCTGACTCAAGGGGTTTTGATAATCTCTCAACTGAAGCCTC
 ACTGCTGGAATTAACCTTGGTFTTGACTGCAGTATTAATGGGTCACAGATGCTTCAA
 ATATATCCCTTATCTCCTACAGCTGCGGGTTTCTATGGCAAGGCTTGAACAGTCCGG
 GGTGGCCCTCAGGAAATTAATATGAACTTTTTCCTCTCCACCAACAGCCCGGGCTG
 CCTTCTTACCCAGCCCAAGTACAGCTTCTCGACCACTCAGGCTCCACCTCTCTAT
 TCCAAACCTTACAGAGCTACAGCCTCCAACTCCTACCACTGGAACCTCCACGATTT
 CTGACTGGGATGGCAGAGAAGAGTACCCCACTATTCTGAACGATCCAGCTTCTATC
 CATTGTGTAATGATCTTCAATCAAGTCAAGTGGCTCTCTCTTCCAGCTGATGGATG
 CAACTCACATGGGTGAAAATGGGCCACAGTTTGTAGGGGAGCTTTCAGGAGGCAATG
 TACGCGGTGAGAACCAACCTGAGGCTTGTACTTAGAGCCCATGACCCTATCGGATTT
 TGTTTAGTSCCATGAGGATGTTTAACTACCGGGCGTGAAGAGCAGCATTTGTTCAGAGG
 CACCACCAATGCTTCTGACAGCCTTCTCAAATGTTGGTAAAGCTTGAAGCTGACAGACCA
 GCTCCACAGATGGCTCCCGCTTCTGCTGGCGGCTGATCGGGCGGCGGATATT
 GGCTGGTGTCTTGCCTGAGCTCTTTGCTGGCAGATATGCAAAAAGGGGCGCTACCCCT
 CCAGAGTTGAAATACACCCGGGGCGGGGAAAGATGATTATGGGAGGCGCCACCAAG
 AGGACAACCTCCATCCTGGAGATGACGAAAACAGTTTCAGATGCTCTCTAAATAGCAT
 CAACCTCTTAAGGAGATTTGACGACTGAGCCATTTACACCCCAATGGGGCATTAAATTA
 CACAGACTGCCATATCCCAACAACATGGGATACTGCAACAGAGCTGCCAGACTGGAGC
 ACTGCCATACCTACGCGCCAGGGCCAGGCTTATCAAGCGGCAATTAGACTCTTGAGAA
 CACACTGCTGTGACATTAAGACACGAGATTAATTTGATAAATGTACACAGATGCT
 TTGTGCAATTTGAATCTCTGTAATTTATACGGGTACTATAATGGGATTTAAAAAAGTG
 CTATTTTCTTATTTCAAGTAAATTAACAACAGTTTGAACCTTTGCTTTTAAATCTT

【 図 6 0 】

MGLQTTKWPESHGAFLLKSWLIISLGLYSQVSKLLACPSVRCDRNFVYCNERSLTVSPGLIP
 EGVTVLYLHNQINNAGFPAELHNQVSHVTVLYLGNQDEFFMNLKPNVRLHLQENNIQTI
 SRAALAQLKLEELHLDDNISTYVGEDGAFREAIKLLFLSKNHLSSVPVGLPVDLQELR
 VDENRIVISDMAFQNLTSI.ERLIVDGNLLTNKGIAEGTFSHLTKLKFSFVIRNLSHPPD
 LPGTHLRILYLDQNIHILPATAFSNLRKLERLIDISNNQLRMLTQGVFNLSNKLQIARNN
 PWFCDCKIKWTEWLYKIPSSLNVRFMPCQPEQVRGMAVRELNMNLSCPTTTPGLPLFT
 APSTASPTTQPPFLSIPNPSRSTPPTTPTTKLPTIPDWDGERVTPPISERIQLSIHFVND
 TSIOVWMLSLFTVMAYKLTWVKMGHSLVGGVQERIVSGEKOHLSLVNLEPRSTYRIGVPL
 DAENVRAVEDTICSEATTHASYLNNGSNTASSHGETTSHSMGSPFLLAGLIGCAVIFVLVL
 LSVFCWHMHRKGRYSQKWKYNRRKKDDYCEAGTKKDNLSILEMETSFOYVLSNLDQLKG
 DFRLQPIYTPNGGINYTDCHIENNMRYCNSSVPDLHECHT

シグナルペプチド

アミノ酸 1-42

膜貫通ドメイン

アミノ酸 542-561

N-グリコシル化部位

アミノ酸 202-206, 298-302, 433-437, 521-525, 635-639, 649-653

カゼインキナーゼBリン酸化部位

アミノ酸 204-208, 407-411, 527-531, 593-597, 598-602, 651-655

チロシンキナーゼリン酸化部位

アミノ酸 319-328

N-ミストイール化部位

アミノ酸 2-8, 60-66, 149-155, 213-219, 220-226, 294-300, 522-528, 545-551, 633-639

アミド化部位

アミノ酸 581-585

ロイシンジッパーモチーフ

アミノ酸 164-186

ホスホリパーゼA2アスパラギン酸活性化部位

アミノ酸 39-50

【 図 6 1 】

TGAAGAGTAATAGTTGGAATCAAAGAGTCAACGCAATGCACTGTTATTACTGCTGGCTTT
 TATGTTGGAAATTCCTCCTTAGGCTTGTCTTGGAGCAACAGAAACTCTCAAACAAAGA
 AAGTCAAGCAGCCAGCTGCATCTATTGAGAGTGAAGCGTGGCTGGGTGGTGGACAAATTT
 TTTGACACAGGAAATGAAATACAGCTAGTCAATCACATCGGCCAGCTAAGATCTGATTA
 CAATGGAAACAATTCTTCCAGTCAAGCTTTGGGAGCTGGAGCTGGAGTACTTTTATCA
 TGTAGTAAAGAACAGGTTGACATATATGCCATACAGAGCTTATAGAGAGGAGGCTGCCCT
 TACATCTTAGAGCCAGGATAAGACATCCTACTTGGAGGCTTGGAGTAACTGACTGATG
 GTTGTGATCAAAGTTTGGGATTCATGACATGAAACAAATTCCTAGATGAACCTTATG
 AGGCAATGTACAGAGATGTTCCGAGAGGAGTAACTTACTGGTGGAGTCAAGCAAGTGTAT
 SCTGAGCCTCCTCAAGTGTAAATAGTCTGCTCCTCTCAGCTTACTTCAAGCCAGCCAG
 ATTTTTCCTGTTGAACCAACACAGGAGTCAAGAAATATCTTCAAATGGATAGAGAAAT
 TGCAGACTGAGTATTTGTTAAACTTCCAGGCAAGCTGTTGCGGTGAAATGGAGGGAT
 TCGGACCAACAATGATTAATTAATTAATTCAGGCAAGCTGTTGTTGAGCCAGGAGGTTG
 AGAAGTTTATACCGCTGACTGCTCTGAATCTGCACCCACTGGGACTCTATAGGAAACA
 TCATGGCATATGATAATGACATAGGAGCAATCCAGAAATGGTTTACAGCTTGAAGAGGAT
 GATTGCAAAATTTGACATFATTAATAATCATGAACTCAAGAGCAATAGTTATTTTAA
 AAGAAAGTGGATTTGAGCAGGAGCAGCACTGAGGATAGAGCAAAATTTAAAAACCAT
 ATGTTCCCTGAGCAGCTCATGAAGTACCACACTGAGGCTTCCACCACTTAAATAGATCCAG
 GTGGAGATGTGATGAGCTCCTCTTTCCTCCTCCATATGATTTTGAAGTTTTTGA
 GAAACCCCAAGGATCATTGTAGGCTGTTGTCTGCGCAGACAGCAATAGGAAAT
 CTCTATCAGGATTCATTACTAGGAGCAAATGTTCAATATCAATGATATGATGACAAAT
 ACTACAAGTAACTCACTGGATCGTGAATCAGTCTTGGTACAACTAAGTATTACAGCCAC
 AGAAAAATGCAATATAGAACAGATCTCTGATCCCACTGATGTCGAAGTCTTAACATCA
 ATGATCAIGCTCCTGAGTCTCTCAATACTATGAGACTTATGTTGTGAAAATGAGGGCTCT
 GTCAGTAAATTCAGACTATCAGTGCAGTGGATAGAGATGAATCCATAGAAAGAGCAGCATTT
 TFACTTAACTTACTTTCAGCAGTCAACAAATCAGTTTATCAATAGGAAAGCCTGCTTCC
 ATACACACAGCTGCTCAATTTGACTATAGAACTGGTTTAACTCTCAAAGAAAGCCTTAC
 TACACTCCTATTTAATTTGCCAGCAATGGAATCCCTGCTTACAGTACACACCTTAC
 CACTCATGCTGTGACTGTGGTGCAGTGGAGCACACAGCACTGCCAGTACAGGAGCTG
 TGCCTTCCATGGGATTCAGAGCAGAATTTATCTGTCTTCTTCAATTTGATATGATATTA
 TTTGGTTTATTTTTGACTTTGGGTTTAAACACAGGAGAAACAGATTTCTATTTCCGTGA
 GAAAAGTGAAGATTCAGAGAGAATATTTCCAAATATGATGATGAAAGGGGTGAGAGAGG
 ATACAGAGCCCTTTGATATAGCAGGCTGAGGAGTAGTACCATAAATGGGGAGCCAGAAC
 CGGAAACCCACACGCTGAGATCAGGAGCTTACAGGCACTTTCAGGTTGGCCCCGAG
 GATGCCCATATTCAGGAAATCATTCGGAAAAGCTCGAAGAACTTAACTGATCCGTGTG
 CCCCCTTGTGATTTCCCTCCAGACCTACGCTTTGAGGGAACAGGCTCATAGCTGGATCC
 CTGAGCTCCTTAGAAACAGCAGCTCTGATCAGGATGAAAGCTATGATCACTTAAATGAGT
 GSGAGCTCCTTTAAAGATTAGCATGATCTTTGTTCTGCACTCAGTCAAAATATAGG
 GCTTTTTACCACAAAAATTTTAAAGTCTAATGTGTATTCGAAACCCCAATGGTACTTAA
 AGAGTTLTGTCCTGGCTGATGGCGGGAAAGCCTTAGTCTATGAGGATTTTCTGATTTCC
 CTGAGCAATACTCAAGTGTATTTAAAGTCCACTACATGCTGTGATTGAACAGAGGTGG
 GGGAAAAATGAAACATTCAGCTCAGGAGCTCAATCAACACAGATTTGAAGTAAATTAATG
 TAGCAAGATTTAAAGATGATGAGGAGCAGCAAGATGTAGTGGTCTGATGGCATATGCA
 CATTTACTTAGGAAGAGTAAATTTACAACAGGAAAAATTTAGAGGCAAAATTTGCAATGAA
 CAAGTCAAAATGAAATGTAACAAATGAGATTAATTTCACTTCAATATGCAATGAAAT
 ATTGAAAATGATATAGTCAGAGAAATTTCAATGAAATTTCCACTGAGTATTGTTCCTTTAT
 TTAAT

【 図 6 2 】

></usr/seqdb2/sst/DNA/Dnaseqs.min/ss.DNA53906
><subunit 1 of 1, 772 aa, 1 stop
><MW: 87002, pI: 4.64, NX(S/T): 8
MNCYLLRFLGLIPLLWPCLGATENSQTKKVKQPVRSHLRVVKRQVWVNNQFVPEEMNTTSHH
IGQLRSDLQNGNNSFYKLGAGAGSTFIIDERTGDIYAIQKLDREERSLYILRAQVIDIAT
GRAVEPESEFVIKVDINDNEPKFLDEPEYIAIVPEMSPGLVQVTSADDDPSSGNARL
LVSLLQGGQPYESVEPTTGIVIRISSKMDRELQDEYVWIIQAKDMIQPGALSGTTSVLIKLSD
VNDNKPFIKESLYRLTVSEAPTGSTIGTIMAYDNDIGENAEMDYSIEEDSQTFDIITNHE
TQEGIVILKKKVDFEHQHYGIRAKVKNHVPQLMKYHT EASTTFIKIQVEDVDEPPFLFL
PYVFEVEFEETPQGSFVGVVVSATDPDNKRKSPYRISYITRISKVFNINDNGTITTSNSLREISA
WYNLSITATEKYNIEQISSIPLYVQLVINDHAPEFSQYETVVCENAGSGQVIQIISAVDR
DESEIEHHFYNLSVEDTNNSSFTIIDNQNTAVILNTRTGNLQEPVFIYISILIDAGNIP
SLTSTNTLTHVDCDGSSTGTQCYQLVLSMGFRKEVIILALICIMIIFGFIFLTGLQK
RRKQILFPEKSEDFRENIQYDDEGGGEEDTEAFDIAELRSSTIMRERKRRTTSAEIRSLY
RQSLQVGDPSAIFRFILEKLEEAANTDPCAPPFDSLQTYAFEGTGLAGSLSSLESVSDQD
ESYDYLNELGPERFKLACMFSAVQNSN

重要な特徴

シグナルペプチド

アミノ酸 1-21

膜貫通ドメイン

597-617

N-グリコシ化部位

アミノ酸 57-60, 74-77, 419-423, 437-440, 508-511, 515-518, 516-519 及び 534-537

カドヘリン細胞外反復ドメインシグネチャー

アミノ酸 136-146 及び 244-254

【 図 6 3 】

CTTCAGAACAGGTTCTCTTCCCCAGTCACCAGTGTGCGAGTTAGAAATGTCTGCAATGKGC
CGCCCTCGCAAAATCTGTGAGCTCTTTCCTTATGGGGACCCITGGCCACAGCTCCTCCTTC
TCTTGGCCCTCTTGGTACAGGAGGAGGAGCTGCGCCATCAGTCCCCACTGCGAGCTTAG
AAGTCCAACCTCCAGCAGCCCTATATCACCACCAGCTTCAATGGTGGCTAAGGAGGCTAG
CTTGGCTGATAACAACACAGACGTTGCTCTCATTGGGGAGAACTGTTCCACGGAGTCAGTA
TGAGTGAGCGCTGCTATCTGATGAAGCAGGTGCTGAACTTACCCTTGAAGAAGTGTGCTTC
CCTCAATCTGATAGTTCAGCTTATATGACAGGAGTGGTGCCTCTCCTGGCCAGGCTCAG
CAGCAGGCTAAGCACATGTCATATTGAAGGTGATGACCTGCATATCCAGAGGAATGTGCAAA
AGCTGAAGGACACAGTGAAGAAGCTTGGAGAGAGTGAGAGATCAAAGCAATGGGAAGCTG
GATTTGCTGTTTATGICTGTGAGAAATGCGCTGATTTCGACAGAGCAAGCTGAATAATGAA
TAACATAACCCCTTCCCTGTAGAAATAACAATAGATGCCCAAGCGGATTTTTTTTAAAC
CAAAGGAAGATGGGAAGCCAACTCCATCATGATGGGTGATTCCAAATGAACCTCGCT
TAGTTACAAAGGAACCAACTGCACTTTTGTTTTAAGCCAGAGGTTAGACTTCTAAGCA
TAGATATTTATTGATAACATTTTACTGTACTGTTGCTTATACACAGAAAACAATTTATT
TTAATAATTTGCTTTTTCCATAAAAAAGATTACTTCCATTCCTTAGGGGAAAAAACCT
CCAAATAGCTTCACTGTTCCATAATCAGTACTTTATATTTATAAATGATATTTATTTATTA
TAAGACTGCATTTTATTTATCATTTTTATTAATATGATTTTATTATAGAAACATTCATCG
ATATTGCTACTTGAGTGAAGGTAATATTGATATTTAGACAAATATATAGAGCTATAAC
ATGTTTTATTGACCTCAATAACACTTGGATATCCC

【 図 6 4 】

></usr/seqdb2/sst/DNA/Dnaseqs.min/ss.DNA125185
><subunit 1 of 1, 179 aa, 1 stop
><MW: 20011, pI: 8.10, NX(S/T): 3
MARLQKVSVSLMGTLATSCLLALLVQGGAAAFISSHRLDKNSFQQPYITNRTFMIAKE
ASLADNNTDVRLEGEKLFHGVMSERCYIMKQVNLNFLEEVLFPQSDRFQPYMQEVPVFLAR
LSNRLSTCHI EGDDLHIQRNVKIKDTVKKLGESGEIKAI GELDLLFMSLRNACI

タンパク質の重要な特徴

シグナルペプチド

アミノ酸 1-33

N-グリコシ化部位

アミノ酸 54-58, 68-72, 97-101

N-ミリスチル化部位

アミノ酸 14-20, 82-88

原核生物膜リポタンパク質結合部位

アミノ酸

【 図 6 5 】

GCCCTAACCTTCCCAGGGCTCAGCTCTTTGGAGTGCCCATCTCCGGCTGCGAGAAAGCA
CGCCGCCCTTGGCTCGGGCGAAGAAAGAACAAACTTTGGAGGAGGTTTCTGCTATCARC
CTCCTTCCCGCAAACCTAAACCTTCTGCGGGGCCATCCCTAGCAGAGGAAAGTTTCTTGCA
GAGGCGACGAGCCCTAGTGGATCTGGGCGAGCAGCGCGCTGGCTGTGAAATAGATCTGT
TTTGAACCCAGTGAGGCGCATCGTGGGCCCGGAAGTCACCTCCGCGGGCACCGGTTGG
CGCTGCCGAGTGGAAACCGACAGTTTGGCAGCTCGGCTCCAAATGGCTCTCCTCCCGGG
GTTTCTTCTCAGTCTCGGGTGAAGGTGGAGGTGGAGGTGGAGGTTGCAAAAGAGAGCCCTCAGAGG
TCGAAAGACGCTGCCCTCCTACTCGGTTGGCTTCTCTCTCTCGTTCCCTACTGTGA
AATCGACGCGACATTACAAAGGCTCCCGGCTCTACCAGACCGATCCGACGCTTTGGCC
CGGCTGTGCTTATGCAATCGGAGCCCGGAGCACCGCGGAATGCGAGGTTCCCGAAGCC
CGACTGGCCGCTGAGGAGTTATGTTACTTTGCCACTTCTCCAGGACAGTTTCAGTTCC
CGATGGGAAACCGGAGACCAAATCCTTGATTTGGCAGTATGGAGTTACTCAGGCTTCCCT
CACACAGAGGAGGAGTTGGAAGTTGATTCACACCGCTACAGCCACAGGTGGAAAGAAACTT
CAGCAGAGGAGGAGTTGGAAGTTGATTCACACCGCTACAGCCAGCCTCGGCCAAGACTCTCTGAGCCCA
GGCTTCTCAGGCGGTGAGACCAGCAGCAGCAGCAGCCTCGGCCAAGACTCTGAGTCGAGGAGAT
AGAGACCACAAATRACTATATCTCGAATATATGTTCCATCTGATTTCTCCCGCGGATTT
ATGGGTGAACATAGACCAAATGAAAGAAATGAAAGTAGAATCTGTGAAATTTGCCAATTA
CTCATCGCAAGTCGCAAGAGTGAATCTGTCTTCGATTTCCATTTTATGGCCACTTCCCTA
CGTAATCACACTGTTGGAAACCGGGGGTTTATATACACTCGGAGAGTCTGATCATCGAATGCT
AACAGCCACACAGTACATAGCACCCTTAATGGCAATTTGATCCAGTGTATCCAGAAATTA
CACTGTCAGATATTTGATAATGGACAGCACTTGTGGTCCAGTGGGACCATGTAGATCTC
CAGGATAATATAACCTGGGAAGTTCACATTCAGGCAACCTGCTCATGGATGGACGAAT
CATCTTGGATAACAAGAAATTCCTGCTTGGTCCACAGATAGTTCAACCAATCATCCAG
TGAAGTCGGACTGTCCGATGCATTTGCTGTTCACAGGATCCAAACAAATTCCAAATGTT
CGAAGAGAAACAATTTATGAATACCACCGAGTAGAGCTACAAATGTCAAAAATTTACACAT
TTCCGCTGTTGGAGATGACCCCATTTCCACATGCCTCCAGTTTAAACAGATGTGCGCCCTGTG
TATCTCTCAGATTTGGCTTCACTCGGTTGGTAGTAACTTCAAAGATGTCCAGTGGGA
TTTGTCTCTATCGGCGAGCTGGCTGGCAGTGGTGCCTGAGACTCAAAAGGAGAGAT
GTTGAGAATACAGAACCACTGTGAAACTCTTTTCGAACCCACCAACCTGAGGAGGACATA
CCACCAGTTCCAGGTCTTAACTACCAACGAGAGCAGTACTTCTCACTTTCCACACCG
CTCCTAGAGAAAGATGATACCAAGATAGCACTACATCTAAAGAAATATGAGGCTTCTACAGA
TGACGTGACAGTGAAGAAAGGGGGACCCTCCACGCTGGCTCATCATTTGAAATCTCTA
CCTGCTCTCATTTAGTACCACAGCCATTTGTGACAGTCTATATGATACACCAACCCAA
TCAGCAGCCAGCATCTTCTTATGAGAGAGCCCAAGCAGATGGCTCGCATGAAGTTAG
AAGGCTCTGGACATCCTGCTTATGCTGAAGTTGAACAGTGGAGAGAAGAAGGCTTTA
TTGATCAGAGCAGTCTAAATTTTAGGACAGAAACAACAAGTACTGGTTTACAGGTGT
TAGACTAAAATTTTGCCTATACCTTTAAGACAAAACAACAACAACAACAACAACAAGCTC
TAAGCTGTGTAGCTGAGAGAAAGCAGATTTCTGGCAAAGCTCAGCCGAAAACAAGGG
TAACAAAAAACTAAAACTTATAAAGATACCATTTACACTGAACATAGAATTCCTTACTGG
AATGTATCTATATGCTACTCGGAACATCTCCCTGGACTTATCTGAAGTATGACAAAGATTA
TATGCTTTGGCTTAGGTCAGGCTTGAAGGGATGCAAAAGGATCAGAAAAAATAAATAAAGG
TTTAGTTCATGAGG

【 図 6 6 】

```
MARFKADLAAGVMLLCHFFTDQFOFADKPGDQILDWQYVQAFPHTEEEVEVDSHAYS
HRWKRLNDFLKAVDNTRASVGQDSPEPRSDTDLDDGQDNTQIEEDDHNYISRIYGPS
DSASRDLVVNIHQMEKDKVKGILNTHRQARVNLSPDFPFYGHLEIREITVAGGFIYGG
EVVHRMLTATQYIAPLMANFDPVSRNSTVRYFDNGTLVLVQWHDVHLQDNYNLGSFTQT
LLMDGRIIPGYKEIPVLVTQISSTNHVVKVGLSDAFVVVRIQQPNVRRRTIYEHVREIQ
MSKITNISAVENTFELTCLQFNRCGPCYSSQGFENCWSKLRQCSSGFDHRHQDWVDSSGPC
EESKEKMCENTEPVETSSRRTITVGGATTQFRVLTTRRAVTSQFPPTSILPTEDDKIAHLK
DNGASTDSSAEEKKGGTILHAGLIIGILLVLIVATAILVTVYMHHPHTSAASIFFIERRPSR
WPAMKFRRSGHPAYAEVFPVGEKGFIVSEQC
```

タンパク質の重要な特徴
膜貫通ドメイン
アミノ酸 454-478

N-グリコシル化部位
アミノ酸 103-107, 160-164, 213-217, 221-225, 316-320, 345-349

cAMP- 及び cGMP- 依存性プロテインキナーゼリン酸化部位
アミノ酸 297-301, 492-496, 503-507

N-ミristolイ化部位
アミノ酸 42-48, 100-106, 147-153, 279-285, 397-403, 450-456,
455-461

【 図 6 8 】

```
></usr/seqdb2/sst/DNA/Dnaseqs.full/ss.DNA92259
><subunit 1 of 1, 354 aa, 1 stop
><MW: 38719, pI: 6.12, NX(S/T): 6
MDMMLLVQAGCCSNQWLAAVLLSLCLLPSCLPAGQSVDFPAAVDNMMVVRKGVAVLRCYL
EDGASGAWLNRSSIIFAGDQKWSVDPVRSISTLNKRDYSLQIQNVDTDDGPTCSVQTH
TPRTMVHLTQVVPKIIYDISNMDTVNEGTNVVLECLATGKPEPSISWRHISPSAKPENEQ
YLDYIGITRDQAGEYCSAENDVFPDRKVKVNVVNFAPTIQEKISGVTPEPRGLIRCEGA
GVPEPFAFEWYRGEKFLNQGGIIIIQFNSTRSLIVTNVTQEHFGNYTCAANKLGTTNASL
FLNPPSTAQYIGTGSADVLFSCWYLVLTLSSTSIYFLKNAILQ
```

タンパク質の重要な特徴
シグナルペプチド
アミノ酸 1-33

膜貫通ドメイン
アミノ酸 322-343

N-グリコシル化部位
アミノ酸 73-77, 155-159, 275-279, 286-290, 294-298, 307-311

チロシンキナーゼリン酸化部位
アミノ酸 180-188

N-ミristolイ化部位
アミノ酸 9-15, 65-71, 69-75, 153-159, 241-247, 293-299,
304-310, 321-327

ミエリン PO タンパク質
アミノ酸 94-123

【 図 6 7 】

```
GCNCCCTCAGCAGGGAAGGACATGAGTGTGTCAGGATGCTTTGTCGGAACAGTGA
GCTGGGGGGGGTCTCCTCAGCCGCTGCTGCTGCTGCTACCCCTTCCGCCGGGACAGCA
GTTGGGACCTCCCCTGGCGCCGCTGGACAGCATGATGGTCAAGAAAGGCGACGCGGCTG
CTTAGGTGTTATTTGGAAGTGGGGCTTCGAAGGGCTGGCTGACGGGGCTGAGTATATF
TTTTGGCGAGCTGGATGAGGGGCTGAGGATCTCCGGTTCATTTCAACATGGATATAA
GGGACTACAGCCCTCAGATACAGAAATGAGATGTGACAGATGATGGCCATACACGGTCT
GTTCAAGACTACACATACCACAAACATCGAGGTGATCTACGCTGGCAGGTTCTCTTCA
GRIIFATGACITGGTCATGAGAGACACAGCTGGTCTTAGTGTGT
TGGCCACTGGGAAGCCAGGCTTCCATTTCTGGCGACACATCCCTCATCAGCAAAACCA
TTGAAATGGACAATATTTGGACATTATGGAATTACAGGACAGCCAGCTGGGATATGA
ATGCGTGGCAAAATGATGTTGCTATCCAGATCGAGAAAGTAAAGSTGTGTGACTAG
TGTCTCTTCTAGTGGGAATTAATTCGGACCTGACCTGCCCGCAAGTGGGCA
AGATGTGAGGTGCAAGGTGGCCGGCTTCTGAGTGGTCAAGGACAGAGAGAAGACT
CTTCAATGGCCACAGGAAITATTTCAAAATTTTAGCACAGTCCTCTCTCATCTGTA
CCACGCTCCAGCAGGAGCTCCGCAATTATCTGTGTGGCTCCCAACAGTGGGCA
ACCAATGGCAGGCTCCTTTTCACCTCCAGTACAGCCAGCTAGTGGAAATACCGGAGCGC
TGATGCTTCTTCCCTGGTACCTTTGTGTGACACTGCTCTTTCACGACATATCT
ACCTGAGAAATGGCTTCTCAAAATTCAGAGACCTAAABGGCTTTTAGGATCTCT
GAAATGCTGATGGCTGTGATCCTTCCAGACTTTGTAAAGCGGCTGGAGATAC
AGCAGCTGCTACATGGGGATATCCCTCTGTAGAATTTGCCATATGTAATACTTTAAT
TCTACTCTTTTGTATGACTACTTACCTTTGGAAGCAGTACATTTGCTTTTTTAG
AGCTGAAGCTCTGAATTTACTTTTAGAGGATTAATTTGCTAGTTCCATGTTGATCTC
AGTTTTCAAGAGCATCGTCTGCTTCTGGTGTGCTTCAGTATACAAAGCAAT
TATTGCGTGAATATGCTTCTTTAGGCTGCAATACAAGATTCAGTTCCTTTCCAT
AGAGTCAATCCAGATTTACAGAGTGCATTTTCTTCTTTGATAAAAAGCAATATATA
TGCTTCTCAGATTGATGATCAAAATGGCTTCTAGGACTGAGCTAGTAAACCA
TCAGTTTCCAGAAATGAGGCTTGAATATAACCTGCTGTCAGCTCTGCTTCTTCTGT
AAGTCCAGCATGGTGGCTTCTACAAATATATTTTCTCTTTGCTCCAGCATAATATA
NATGTTTTCGAATCTTCAAAATTCAGAAITAGAAAGAAATAAAGCAGAGTGAAGCA
CTGACCTCTTCTGATGAGGACTTGGGCTTGGAGCTTGAAGATCTTCTCTGCACTGACAA
TGGGCTTTGAGAAATTTGGCCACACTACTCGTCTTGTGATGAGGAAATTTAATTAAC
AGATAGAAATPACCAATAGTATTGTTTGTGTTAGTAAATTTGATGACTACGCGGGGA
ATCCTCCTCTTCTGATGAGACTGAGGCTTCAAGAGTGGCTGCTGAGTGAAGTAAACCA
TTTCTTCTACTCTCCAGCCAAATAATTTAGATGATTTCTGAGAAAGCCACAACTCC
TATCAGTAAATACAGAAATGGAAGTCAAGCTCATCTTAATTTATTTGTGGAGTCAA
GTTAGATGAGCAGGAGTGGCTGGAGAGAGGACTTTTGATATTTTCATCTGCAATGAA
CAGGACTCTGTGATGGTGGAGACACTTATTTTAAATTTCCAAAATATATATA
TACAAACACTTATTCGCTATGAGCAGCACTCTTAAAATAGCTAAITCTTCAATA
AACTTCTATATAGCCATTGAGTGGACAGATTAATTAACAAAGACACTCTTTATTT
TCTCTACAGATATGATGAGATGAGTCAATCAATGAGCAGCAAGTGAAGTGGAT
CTTAANLNAATGATGAGAAATATTTGAAATGTTAAATTTCTTACTATAGAAGCAAA
AACTACTTTTTGAAGAAATGCTTACTTCAATTAATTTACAGAAATGATTTGATGG
TTTCACTTTCTANAAAAGGCGCATCCTGGAGGCATTTCAGGTGTTGATCAAGTT
ACCATTTCAGTCAAGTAAATTTGCTGAGTCTTTTAAAGAGTGGATGAGAAAT
ACCCTTAAATAAATTAGATAGAAGAAATTTGCAAGTGTATACATTTTGGATATCTAG
TATGTTGGCTAGCAGGAGTGGCTTAAAAGTGTGATTTTTCTCAAGTAAACTTGT
GCCAAAGTACATTAATCAATTTAATTAGAAAAATGATTTAAATGGGGGCAGCATAA
TATCTTTCCAAAGTGAATGATGAGAAATGAGGACTCCTCAATTAATTTAGGACTAGA
AATGCTACAGCATTATTTGGATGATACATAAAGAGATTTTGAAGAATAATGGCAT
TACTTATATTTTACTTCTTAAAGAAATTTCTTCTGGATTTGATTAACATATA
AATATATTTCTANAAGTCCACTTTGGAGCTGCTTTGTTGGCCTATTTTTTAAAG
AGCGGAGAGCAAGTAAATAGTAAATGAGCTGGGCTGGGAGGAAAGAGCAATC
AAGAGGCAATATTTAGTGGTCTTCTGAGGTAAAATACCTTCTTGTGAGGTT
TGAAGTAAATGGGATATAACTATGATGAGCAGCAAAATTAATAGTCAAAGTGTGATG
ATCCTAATTTGGGGATCTGCTTTTACATAGATTTGAGCAGAGTACACTGATGATG
CAGTGTCTTTAGGAGACTTTTCTAGAGCTTTTCTGAGCAGCTTTTAAAGTAAAT
GAGGAGGTACTACTATGTTTTCTGTATCAGCAGCAGTCTCTAGTCTTGGCCCTGGGA
CAGAGTAAATCATGATATTATGATGTCATATGTCATTAAGGCTACAGATTTGCTTT
TTTTGAGGATGATGATGATGATTAAGTCAAGTGAATATTTACTATTAGGACATATA
ANSTGTATTTGCCCATTTTCTGATGCTTGTGCTGAGCAGGATTTAGCAGTGAAG
AGTTTTAAATGATTTACTTTTAACTATAACAAATTTGCTTAGCTGCTCTTCAAGG
ANGATATTTCTANAAGTCCACTTTGGAGCTGCTTTGTTGGCCTATTTTTTAAAG
AAGCGGAGAGCAAGTAAATAGTAAATGAGCTGGGCTGGGAGGAAAGAGCAATC
AAAGCAGGCACTAAAGAGGAAAGAAAGGAGGAGTGAAGGAAATGAAGGAGGAGGG
AGGAGGGGAGAGGAGGAGGAAAGAAAGGAGTGAAGGAGGAGGAAATCAGAGATTAGG
GTACTTACTTCAACTTTGCATCTTAGTTTACTGCAAGTGGGTAAGTATGTTTCAA
AGTGGCTTTGATAGTCTGCTTATTAGCATTAGTCTTATTAGGAGCAATTAAT
AATAAAAGACTCCTGCCCAGATTATAGTAAATGGGGTGTTTGAGACATAAAGATTTAG
AGGAGAAATTCAACTTAAAGCCACTTTGGGGGTTTAACTTACTGAGAAATTAATG
CTTCACTAATACACTTAAAGCTATTGAGAACTGACTGGGAGTGAAGAAATACCGAG
CTAATTCGGCAAAAAGAAATATATATAATAAATACCCTTCACTTGAAGTCAAGAA
ACTCTGAAAACCTGAATATAAAGTCAATCATCTATAATGATCAATTTACTGAACATG
TTAATTTACCCTTTGGCTTAGCTTTGTGACAGCAGCCAAAGTTACTATTTAATTTTCA
ATVAATTTGTTTTGATGATGATTTAABAGGAGTCAAGTCTTACTATTA
TTGAAGTATGATGATGACTTTCAATGATATAATGATTAAGGATGATGCTTAA
GATCTTTGAATGATGATTTACTTTAAAGACTGGAAAAGCTCTCTGCTTTTAGTAAA
CTTCAATTTCTANACTGAGTAAATATCTGACTGTTCCAAATAGTGAATTAAC
CTGCTTTACTAATTAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAG
```

【 図 6 9 】

```
ATAGTAGAAGATGCTCTGAAATCTAGTGAAGTTTCTAGCTACTTTTCACTGGGACAA
ATTTCACTCAAGCTCTTATCTAGGCTAATTTTATATTAGTAAATCACTGTGTTTTG
TCTCAGCGGCTTCTGCTGCTATAGGCAATATACAGAGGAAAGCAGAACTTCCAGAGCA
AGCGCACATCGTTCCAAAATTAAGACAAATTCGCTTAAACACAGGAAAGACTGAACT
TAAATTAAGGGTTTACATCAACCAGAGCGGCTTTTGGGCGACTGCTGCTCCAGCTTCT
CGCTCACTGGCGAGGGAAGGGAAGAGGATCCAGCGGTTAGCAGTATATAGCACAAAA
CAGCTGGAGATTTGGGCTTAAATACCCCAAGTCCCAAGAGAGAGCCCCAAGTCCCCAA
CAITTTTCTAGGCTGCCAGGAGGAAGGAGCAGCAGCGGCTGGGAGAGAACTCAGTCA
GCCCAAGATGCCATTGCTCCCGGCTTCTGCTGCTGCTCTCCGGGCCACGGCCAC
CGCTGCCCTGCCCTGAGGGTGGCCCCACGGCCAGACAGCAGGACATAATGAGGACGG
CAGAAATAAGGAAAGAGAGCTCTGACTTCTCTGCTTTGGTGTGATGGACCTCCGAG
GCCAGTGCCGGGCCCCATAGGAGAGGAAAGCTCGGAGGAGTGGCAGGCGGAGAGGCC
ACCCGCCAGCAATCCGGCGCGGCGGACAGAAATGCCCTGCGAGAACTTCTTGGAAAGCT
TCTCTCTCTGCAAAATAG
```

【 図 7 0 】

```
></usr/seqdb2/sst/DNA/Dnaseqs.full/ss.DNA41175
><subunit 1 of 1, 155 aa, 1 stop
><MW: 17194, pI: 10.44, NX(S/T): 0
MYRHKNSWRLLGLKYPPSSKETQVPKTLISGLPGRKSSSRVGEKIQSAHKMPLSPLLLLLL
SGATATAALPLEGGPTGRDSEHMQEAGIRKSLTLPLAWFEWTSQASAGPLIGEEAREVA
RRQEGAPPQASARRDRMPCRNFFWKTFSSCK
```

タンパク質の重要な特徴
膜貫通ドメイン
アミノ酸 51-69

cAMP- 及び cGMP- 依存性プロテインキナーゼリン酸化部位
アミノ酸 35-39, 92-96

N-ミristolイ化部位
アミノ酸 64-70, 75-81, 90-96

アミド化部位
アミノ酸 33-37

【 7 1 】

```

GTCTGTGTCTGGAGGAAACCGCGGAAACCCGCGGTCGGTCAAGCGGTGGAGCCTGGGA
GCTGCTGGGTGGCTGCCTGCTGTGTGCAGCATTTGGGAATGGTACCACCTCCCGAAATGTC
AGAAATGAATCTGTTAATTTCAGAAGCAATTACAGTGGGAGTCACTGCTTTGGCAAAGG
GAACCTGACTTTCACAGCTCAGTACCTAAGTTATAGGAATTTCCAAGATAAATGCATGAATA
CTACCTTGACGGAATGATTCTCAAGTCTTCTCAAGATGTTGGACCAACACTTGAGATGC
AGGGCTGAATTTGCAGATGAGCATTGACACTGGGTAACATCACTTCTGCTGCTGGATGA
CACCATTAATGGACCCCCTGGAATGCAAGTAGAAGTACTTGTGATCTTACATATGCGFT
TCTTAGCCCCAAAATTGAGAATGAAACGAAACTTGGACTATGAAGAATGTTATAAATCA
TGGACTTATAATGTCATATGGAAGAACGCTGATGATGAAAGTTTCAAAATTACTCCCA
GTATGACTTTGAGGTCTCAGAATCTGGGCCATGGACAACCTTATGTTTCAAGTTTCGAG
GGTTTCTTCTGATCGGAACAAGCTGGGGAATGGATGAGCCTGCTGAGCAAAACACC
CATGACGAAGCGTCCCTCCTGGATGTGGCCCTCATCTGATGCCCTCGTCTTCATGGT
CTGCCTGGCACTCCTCGGTGCTTCTCCTTGTGTGTGGTTTACAAGAACAAAGTACG
CCTTCTCCCTTAGGAATTTCTTCCACAGCACTGAAAGAGTTTGGGCCATCTCATCAT
AACACACTTCTGTTTCTTCTTCCATTGTCGGATGAGGAATGATGTTTTGCAAGCTAAG
TGTCTTTCAGGAAGCTCAGAGCGGCAAGCAATCCTGGTGACAGTGCACGCTCGGGA
CCCCGCTGGCAGGGGCCAAAGCTAGGCTCTGAGAAGGAACACACTCGGCTGGGCA
GTGACGCTACCTCATCTACATCTGCTCAGTGGAGGATCAGGCCAGCAAACAGGGCCAA
CAATCTGAGCCAGCCACATCTAGAACTCCAGACTGAGCTAGCCACAGAGACTACAT
TTTAAAGGCTGTCTGGCAAATTAACCTTATTTGGAACTCACTGCTTATAAAGGCTTTCA
TGATGTTTTAGAAAGTTGGCCACTGAGAGGTAAATTTAGCCTTTTATATCAATAAA
GATCATTTTTAATGTGAGAAAACAGGGCCGAGCAGACTGGCTCAGCCGCTAAATACAGCA
CCTTAGAGGTGGGCGAGGCGGATCACTTGAAGTCAAGAGTCAAGACAGCCTGGCCAA
TGGTAAAACCGACTCTTCTACTAAAATAACAAAATTAGCTAGGCAATGATGGCGCATG
AATCCAGCTACTGAGTGTCTGAGGCGAGGAAATGCAAGCAAGGGAGGAGGAGGAA
GGTTGACGTGAGCCAGATAGCCGCACTGCACTCCAGCCCTGGTGACAAAAGTGAGCTCA
CTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAATGAGAAACAGAAATCACTAAATGAGGAAATAAGAAATG
AGATGTTACATCTGAGTATGAACATCTACCAGATTTGAGTGGACTGATCTGAAATCG
ACCTCAACTCAAGGGTGTGCTCAATGTACACAGAGCAGCGACTTTGGATTTCTTGCA
GTACTTTGAATTTATTTTCTACTATATATGTTTTATATGCTGCTGCTGCTCCATTAAGT
TTTACTCTGTGTGTC

```

【 7 3 】

```

CAGCGCCAACCCGCTAGCGCTGAATCCGGGTGTGCCCGCTGCGCCGCGCATGCGCC
GGCACGCCGCTGCTCGCCGCTGACCGGCTCTGCGCCGCGGCTGCTGGCGGAGAT
GCCCCGCCGGGCAAAATCGCGTGGTTGGGCTGGGATTGGGGCTTCTGCTGGCCATTT
TCTCCAGCAGCACTTTGGACCTGGGTGCAGATGCAGCTGTACGAGAAGGAAAGCGTGGG
GGCGTTTGGCCACCATCTCAGTCAACAAAGCAGCACTATGAGAGCGGGGCTGCTCCTC
TCCCTGAGCCTGCACATGACGAGCTTCGTCAAGCTGCTGGGCTGAGGCCAGCGCGGAGG
GTGGGAGGAGCCATCTCGGCGGGAGCACTTCATGCTGGAGGAGACTGACTGGTACC
TGCTGAACTCTTCGGCTCTGGTGGCACTATGCAATCAGCTTCTGAGGCTGAGATGGT
GTGGAGGCTCATGAGAAATTCATGAGACTTATGATACCGGCCAAGCGCTATGCTT
CTCCGCTCTGGAGGAGTCTCCTACTACTGGGGGAGTCCACCTTTCTAATGAGCCAGC
ACTCTGGGCTAGTCCTGTGCAGCTGGGCTCACCAGCCTTTATGATGATGGCTT
TCTGCTGTCTGGGGCCAGCTATGGCCAGTCAAGCAGGATGCCCGCTTTCAGGAGCCAT
GTCACTAGCCGGGCCCAGGCAAGCAGCTGGTGTGTGAGAGGAGCAATGAGCTGGTGT
CCGGTTTCTGAAGCTCAGCAAGCCAAATGTATGATCCAGCACTGACTGCTGAGCCCTG
CACAGCAGAGGGGAAAGCCCTGTAAGCAGTTGGCTATGAGAAAGGATGAGGAGCAAGCTC
TGACTTCTATGACATCTGTTGCTATGCCACCCCGCTGCACTGGACCAAGCAGCAGCACT
TAACCTTTGACAGCTTCCACCAGCAATGATGACCTGCAAGGCTTCCAGCCACCGCT
GTCTCCTTGGTCCAGCGCTACTCAACTGCTGCTACTTCCGGTTTCCAGACCCCTAAGCT
CCCTTTGCCAAGCTACTTACCAAGATTTCCCCAGCTTCTTCTGCACTGGACAACATCT
GCCCTGCAAGCTTCTGGCAGTTCGCGCAAGCAGCCAGCAGGAGGCGACTGTTTGGCGA
GTCCAGTCCGCCAGCCCTTCTTGGCAGCAGTAAAGACCCCTTCCGCTTATTAATCTC
ACTCGAGCAGCTGAGTGGAGGCCATCCCTCTATAGCTTCCCGCCCAAGCTCCGAGGT
TTGACTCTCAGTACCAGCTTCTACTCACTGAGCCTGAGCTGGGCGGCGACTGGGAGG
GGATGGCCGTGGTCCAGAAATGTGGCTTCTGCTTACAAAGCCTGCTGACAGGACCT
AGACAAGATGATCAAAAGATTGATGACAAAGTCAAGACTGAACTGTGAGGCTCTAG
GAGAGCCTGGGAACTTTCACTCCCACTGAAAGATGATCATCCACAGCAGCCAGGACTGA
ATAAGCCTGCTGCGCCACAGGCTTCTTCTGACCCCTCATGTATCAAGCATCTCCAGGT
ACCTACTGCTGCTATATAAGGTTCCACAGCGGCTGCTGCTTTTTTAAAGGGGAAA
GTAAGAAAGAGAGAAATCCAGCAGCTATATTTGTTTTATTTATTTTAAAGAAAGA
AAAAGTTCATCTCAGAGGTTCTCAGACTTGGTTCTTACTAGTAAAGCAGAAAGTCAAG
GGAGGAAATAAGGCCAGAGACTATGAGTCTTATTTTATTAAGCTTTTTCACTACTC
CCACAAATGACAATCAATTGAGGAACTACAAAGAAACATTTACCAAGCAGAGGTTACAAA
TAAAGTAAAGGGAAGATCAGAAAACCTAAGAAATGATCATAGCTTCCCTGTTACTGGA
TGTGATTTGAGTACCTAGTTCAGACTCCCTAGTCAACTCTCCAGGCTGTAACATC
ACTGCATTTGGAGGAGTGTGTGAGGACCAAGGAGATGCTGCTGAAATGATGCT
CTACCATATCTCAAGCTTCTTGGCAACCTGGGAAAGAAATCGGAGGCTTAGGAA
GAGGAGGCTTCTTGGCACTAGAGAAATGACCATCTCTTCTTATGCAAGATGAA
GGATGCACAATATAAAGGAGAGTCCCAGATGATGAGGAGCAGTCAATCTTACCCC
TAGATGTTCACTCCAGGAGAAAGAAAGGTTGGGGTAGGATCTTCAGAGGTAGC
CTGACTCTTCTCAGACACTAGCTTGAAGTAAAGGAGAAATGCTTTTCTTGTCTT
TCTCAAAACCTTAAAATCACTGTTTTAAAAGAAAGTAAAGCCCTTTCATTCAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

【 7 2 】

```

></usr/seqdb2/sst/DNA/Dnaseqs.min/ss.DNA83551
><subunit 1 of 1, 325 aa, 1 stop
><MW: 37011, pI: 5.09, NX(S/T): 4
MAWSLGSWLGCLLVSALGMVPPPENVRNMFVNFKNLQWESPAFAGKLNLTFAQYLSYRIF
QDKCMNTLLTECDFSSLKVDHTLVRVEFADEHSWVNFVDFVDDTIIIPPQMVEVLA
DSLHMRFLAPKIENEYETWMKNVNSWTYNVQYKNGTDEKFQITPQYDFEVLNLEPWT
YCVQVRGFLPDRNKAGEWSEPVCEQTTTHDETPSPMVAVILMASVFMVCLALLGCFSLMCV
YKTKYAFSPRNLPLQLKEFLGHPHNTLLFFSFLSDENDVFDKLSVIAEDSESGKNQP
DSCSLGTPPGQGPQS

タンパク質の重要な特徴
シグナルペプチド
アミノ酸 1-19

膜貫通ドメイン
アミノ酸 222-245

N-グリコシル化部位
アミノ酸 49-53, 68-72, 102-106, 161-165

N-ミristolil化部位
アミノ酸 6-12, 316-322

```

【 7 4 】

```

></usr/seqdb2/sst/DNA/Dnaseqs.full/ss.DNA116510
><subunit 1 of 1, 494 aa, 1 stop
><MW: 54646, pI: 7.27, NX(S/T): 6
HARRAFLAALTAALAAAAGGDAAPGKIIVVGGAGIGGSAVAHFQQHFGPRVQIDVYEGKT
VGGRLATISVNRQHYESGAAFSHLSLHMQDFVLLGLRHRREVVGRSAIFGGHFMLEETD
WYLLNLFRLMWHYGISFLRLQMWVEEVEKEMRIYKYQAHYAFSGVEELLYSLGESTFVNM
TQHSVABSLQVWGTQRFDVAVILRASVYQSAAMPFAFAGMSLAGAAGSLWSVEGGNK
VCSGLLKLTKANVHATVTSVILHSTEGKALYQVAYEVEVNGSSDFYDIVVIATPLHLDNSS
SNLTFAFHPPIDVVQGSFPQIVVSLVHGLNSSFYGFPPDKLFPFANILITDFFSFFCTLD
NICPVNISASFRRKQPEAAVVRVQSPKLFRTQKTLFRSYYSVQTAEWQAHPLYGSRPTL
PRFALHDQLFYLNALEWAAASVEVMAAKNVALLAYNRWYQDLDKIQKDLHVKVTEL

タンパク質の重要な特徴
シグナルペプチド
アミノ酸 1-19

N-グリコシル化部位
アミノ酸 185-189, 290-294, 308-312, 312-316, 342-346, 378-382

N-ミristolil化部位
アミノ酸 33-39, 35-41, 38-44, 61-67, 64-70, 218-224, 234-240,
237-243, 429-435

```

【配列表】

2006051032000001.app

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
<i>C 0 7 K 14/52 (2006.01)</i>	C 0 7 K 14/52	4 C 0 8 6
<i>C 0 7 K 19/00 (2006.01)</i>	C 0 7 K 19/00	4 H 0 4 5
<i>C 0 7 K 16/24 (2006.01)</i>	C 0 7 K 16/24	
<i>A 6 1 K 38/00 (2006.01)</i>	A 6 1 K 37/02	
<i>A 6 1 K 39/395 (2006.01)</i>	A 6 1 K 39/395	D
<i>A 6 1 K 45/00 (2006.01)</i>	A 6 1 K 39/395	N
<i>A 6 1 K 48/00 (2006.01)</i>	A 6 1 K 45/00	
<i>A 6 1 K 31/7088 (2006.01)</i>	A 6 1 K 48/00	
<i>A 6 1 P 29/00 (2006.01)</i>	A 6 1 K 31/7088	
<i>A 6 1 P 37/02 (2006.01)</i>	A 6 1 P 29/00	
<i>A 6 1 P 43/00 (2006.01)</i>	A 6 1 P 37/02	
<i>C 1 2 P 21/08 (2006.01)</i>	A 6 1 P 43/00	1 0 5
	C 1 2 P 21/08	

- (31)優先権主張番号 60/149,396
(32)優先日 平成11年8月17日(1999.8.17)
(33)優先権主張国 米国(US)
- (31)優先権主張番号 PCT/US99/20111
(32)優先日 平成11年9月1日(1999.9.1)
(33)優先権主張国 米国(US)
- (31)優先権主張番号 PCT/US99/20594
(32)優先日 平成11年9月8日(1999.9.8)
(33)優先権主張国 米国(US)
- (31)優先権主張番号 PCT/US99/21090
(32)優先日 平成11年9月15日(1999.9.15)
(33)優先権主張国 米国(US)
- (31)優先権主張番号 PCT/US99/21547
(32)優先日 平成11年9月15日(1999.9.15)
(33)優先権主張国 米国(US)
- (31)優先権主張番号 PCT/US99/28313
(32)優先日 平成11年11月30日(1999.11.30)
(33)優先権主張国 米国(US)
- (31)優先権主張番号 PCT/US99/28301
(32)優先日 平成11年12月1日(1999.12.1)
(33)優先権主張国 米国(US)
- (31)優先権主張番号 PCT/US99/28565
(32)優先日 平成11年12月2日(1999.12.2)
(33)優先権主張国 米国(US)
- (31)優先権主張番号 60/169,495
(32)優先日 平成11年12月7日(1999.12.7)
(33)優先権主張国 米国(US)
- (31)優先権主張番号 PCT/US00/00219
(32)優先日 平成12年1月5日(2000.1.5)
(33)優先権主張国 米国(US)
- (31)優先権主張番号 PCT/US00/04341
(32)優先日 平成12年2月18日(2000.2.18)
(33)優先権主張国 米国(US)

- (31)優先権主張番号 PCT/US00/04342
 (32)優先日 平成12年2月18日(2000.2.18)
 (33)優先権主張国 米国(US)
- (31)優先権主張番号 PCT/US00/04414
 (32)優先日 平成12年2月22日(2000.2.22)
 (33)優先権主張国 米国(US)
- (31)優先権主張番号 PCT/US00/05601
 (32)優先日 平成12年3月1日(2000.3.1)
 (33)優先権主張国 米国(US)
- (31)優先権主張番号 PCT/US00/05841
 (32)優先日 平成12年3月2日(2000.3.2)
 (33)優先権主張国 米国(US)
- (31)優先権主張番号 PCT/US00/07377
 (32)優先日 平成12年3月20日(2000.3.20)
 (33)優先権主張国 米国(US)
- (31)優先権主張番号 PCT/US00/08439
 (32)優先日 平成12年3月30日(2000.3.30)
 (33)優先権主張国 米国(US)
- (31)優先権主張番号 PCT/US00/13358
 (32)優先日 平成12年5月15日(2000.5.15)
 (33)優先権主張国 米国(US)
- (31)優先権主張番号 PCT/US00/13705
 (32)優先日 平成12年5月17日(2000.5.17)
 (33)優先権主張国 米国(US)

(特許庁注：以下のものは登録商標)

- 1 . U N I X
- 2 . M a c i n t o s h

- (72)発明者 ベーカー，ケビン，ピー．
 アメリカ合衆国 メリーランド 20878，ダーンズタウン，インディアン ドライブ 140
 06
- (72)発明者 ボッツタイン，デ - ヴィッド
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 94002，ベルモント，サマセット ドライブ 2539
- (72)発明者 デスノイヤーズ，ルーク
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 94133，サンフランシスコ，ストックトン ストリート
 2050
- (72)発明者 イートン，ダン，エル．
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 94901，サンラファエル，ナイト ドライブ 75
- (72)発明者 フェララ，ナポレオン
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 94109，サンフランシスコ，パシフィック アヴェニュー
 2090 704号
- (72)発明者 フォン，シャーマン
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 94502，アラメダ，ベイシンサイド ウェイ 19
- (72)発明者 ガオ，ウェイ - キャン
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 94404，フォスター シティ，ピルグリム ドライブ 6
 41
- (72)発明者 ガーバー，ハンスピーター
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 94107，サンフランシスコ，テネシー ストリート 11
 21 5号

- (72)発明者 ゲリッツェン, マリー, イー.
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 4 0 2, サンマテオ, パロット ドライブ 5 4 1
- (72)発明者 ゴダード, オードリー
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 1 3 1, サンフランシスコ, コンゴ ストリート 1 1 0
- (72)発明者 ゴドウスキー, ポール, ジェー.
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 1 0, バーリングゲーム, イーストン ドライブ 2 6 2
7
- (72)発明者 ガーニー, オースティン, エル.
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 0 2, ベルモント, デビー レーン 1
- (72)発明者 クルジャビン, イバー, ジェー.
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 4 4, パシフィカ, デル ロード 8 1 1
- (72)発明者 マザー, ジェニー, ピー.
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 3 0, ミルブレー, ラ プレンダ ドライブ 2 6 9
- (72)発明者 ネピア, マリー, エー.
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 1 0, ヒルズバラ, ヘイン ロード 1 0 1 5
- (72)発明者 パン, ジェームス
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 0 2, ベルモント, コロネット ブールバード 2 7 0
5
- (72)発明者 パオニ, ニコラス, エフ.
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 0 2, ベルモント, テラス ドライブ 1 7 5 6
- (72)発明者 ロイ, マーガレット, アン
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 1 2 3, サンフランシスコ, ウェブスター ストリート
2 9 6 0 4号
- (72)発明者 スチュアート, ティモシー, エー.
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 1 1 4, サンフランシスコ, ダグラス ストリート 4 6
5
- (72)発明者 タマス, ダニエル
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 5 6 3, オリンダ, ラエ アヴェニュー 3
- (72)発明者 ワタナベ, コリン, ケー.
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 5 5 6, モラガ, コーリス ドライブ 1 2 8
- (72)発明者 ウィリアムズ, ビー., ミッキー
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 1 9, ハーフ ムーン ベイ, アルト アヴェニュー
5 0 9
- (72)発明者 ウッド, ウィリアム, アイ.
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 1 0, ヒルズバラ, サウスダウン コート 3 5
- (72)発明者 ツァン, ツェミン
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 4 0 4, フォスター シティ, トーラス ドライブ 8 7
6

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA21 BA56 CA02 DA02 DA06 DA12 EA04 GA11 HA11
HA17
4B064 AG01 AG02 AG13 AG27 CA02 CA06 CA10 CA19 CA20 CC24
DA01
4B065 AA26X AA72X AA90X AA93Y AB01 AB04 AC14 BA02 CA24 CA25
CA44 CA46
4C084 AA02 AA06 AA07 AA13 AA17 BA01 BA08 BA22 BA23 CA17
MA01 NA14 ZB022 ZB072 ZB112 ZB212
4C085 AA13 AA14 BB11 CC02 CC32 DD88 EE01 GG01
4C086 AA01 AA02 AA03 AA04 EA16 MA01 MA04 NA14 ZB02 ZB07
ZB11 ZB21
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA41 CA40 DA01 DA20 DA76 EA20

EA50 FA72 FA74

专利名称(译)	分泌的和跨膜的多肽和编码它们的核酸		
公开(公告)号	JP2006051032A	公开(公告)日	2006-02-23
申请号	JP2005238274	申请日	2005-08-19
[标]申请(专利权)人(译)	健泰科生物技术公司		
申请(专利权)人(译)	Genentech公司		
[标]发明人	アシュケナジアヴィジェー ベーカーケビンピー ボッツタインデヴィッド デスノイヤーズルーク イートンダンエル フェララナポレオン フォンシャーマン ガオウェイキャン ガーバーハンスピーター ゲリッツェンマリーイー ゴダードオードリー ゴドウスキーポールジェー ガーニーオースティンエル クルジャビンイバールジェー マザージェニーピー ネピアマリーイー パンジェームス パオニコラスエフ ロイマーガレットアン スチュアートティモシーイー タマスダニエル ワタナベコリンケー ウィリアムズピーミッキー ウッドウィリアムアイ ツァンツェミン		
发明人	アシュケナジ,アヴィ,ジェー. ベーカー,ケビン,ピー. ボッツタイン,デ-ヴィッド デスノイヤーズ,ルーク イートン,ダン,エル. フェララ,ナポレオン フォン,シャーマン ガオ,ウェイ-キャン ガーバー,ハンスピーター ゲリッツェン,マリー,イー. ゴダード,オードリー ゴドウスキー,ポール,ジェー. ガーニー,オースティン,エル. クルジャビン,イバール,ジェー. マザー,ジェニー,ピー. ネピア,マリー,イー. パン,ジェームス パオニ,ニコラス,エフ. ロイ,マーガレット,アン		

スチュアート, テイモシー, エー.
タマス, ダニエル
ワタナベ, コリン, ケー.
ウィリアムズ, ピー., ミッキー
ウッド, ウィリアム, アイ.
ツァン, ツェミン

IPC分類号	C12N15/09 C12N5/10 C12N1/21 C12N1/19 C12P21/02 C07K14/52 C07K19/00 C07K16/24 A61K38/00 A61K39/395 A61K45/00 A61K48/00 A61K31/7088 A61P29/00 A61P37/02 A61P43/00 C12P21/08 G01N33/53 A61P35/00 C07K14/00 C07K14/47 C07K14/705 C07K16/18 C07K16/28 C12N1/15 C12N15/12 C12N15/62 G01N33/566 G01N33/577 G01N33/58
CPC分類号	A61P3/04 A61P3/10 A61P7/00 A61P9/00 A61P9/04 A61P13/12 A61P17/02 A61P19/00 A61P19/02 A61P25/00 A61P27/02 A61P27/16 A61P29/00 A61P35/00 A61P37/02 A61P37/04 A61P43/00 C07K14/47 C07K14/495
FI分類号	C12N15/00.ZNA.A C12N5/00.B C12N1/21 C12N1/19 C12P21/02.C C07K14/52 C07K19/00 C07K16/24 A61K37/02 A61K39/395.D A61K39/395.N A61K45/00 A61K48/00 A61K31/7088 A61P29/00 A61P37/02 A61P43/00.105 C12P21/08 A61K38/00 A61K38/16 C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A C12N5/00.102 C12N5/16
F-TERM分類号	4B024/AA01 4B024/BA21 4B024/BA56 4B024/CA02 4B024/DA02 4B024/DA06 4B024/DA12 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA11 4B024/HA17 4B064/AG01 4B064/AG02 4B064/AG13 4B064/AG27 4B064/CA02 4B064/CA06 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA01 4B065/AA26X 4B065/AA72X 4B065/AA90X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AB04 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA06 4C084/AA07 4C084/AA13 4C084/AA17 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA22 4C084/BA23 4C084/CA17 4C084/MA01 4C084/NA14 4C084/ZB022 4C084/ZB072 4C084/ZB112 4C084/ZB212 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BB11 4C085/CC02 4C085/CC32 4C085/DD88 4C085/EE01 4C085/GG01 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/AA03 4C086/AA04 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/ZB02 4C086/ZB07 4C086/ZB11 4C086/ZB21 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA01 4H045/DA20 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/FA74
優先権	60/139695 1999-06-15 US 60/145070 1999-07-20 US 60/145698 1999-07-26 US 60/149396 1999-08-17 US PCT/US1999/020111 1999-09-01 WO PCT/US1999/020594 1999-09-08 WO PCT/US1999/021090 1999-09-15 WO PCT/US1999/021547 1999-09-15 WO PCT/US1999/028313 1999-11-30 WO PCT/US1999/028301 1999-12-01 WO PCT/US1999/028565 1999-12-02 WO 60/169495 1999-12-07 US PCT/US2000/000219 2000-01-05 WO PCT/US2000/004341 2000-02-18 WO PCT/US2000/004342 2000-02-18 WO PCT/US2000/004414 2000-02-22 WO PCT/US2000/005601 2000-03-01 WO PCT/US2000/005841 2000-03-02 WO PCT/US2000/007377 2000-03-20 WO PCT/US2000/008439 2000-03-30 WO PCT/US2000/013358 2000-05-15 WO PCT/US2000/013705 2000-05-17 WO

外部リンク Espacenet

摘要(译)

要解决的问题：为了阐明新型分泌/跨膜多肽的结构以及编码它们的核酸分子（氨基酸序列和碱基序列，包括信号序列和胞外域，它们的分子间同源性等），提供有关药物和诊断方法开发的基本信息。载体和宿主细胞，其包含编码许多多肽的核酸的核苷酸序列，包括趋化因子，EGF家族的新肽，融合至异源肽的嵌合分子，结合抗体及其生产方法。赠送。

[选择图]无