(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2006-61156
(P2006-61156A)
(43)公開日　平成18年3月9日(2006.3.9)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	ZNAA	4B024
C12N 5/10	(2006.01)	C12N	5/00	B	4B064
C12N 1/21	(2006.01)	C12N	1/21		4B065
C12N 1/19	(2006.01)	C12N	1/19		4C084
C12P 21/02	(2006.01)	C12P	21/02	C	4H045

審査請求 未請求　請求項の数 23　ＯＬ　（全 155 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2005-238244 (P2005-238244)
(22)出願日　平成17年8月19日 (2005.8.19)
(62)分割の表示　特願2005-235120 (P2005-235120)の分割
原出願日　平成12年5月22日 (2000.5.22)
(31)優先権主張番号　60/139,695
(32)優先日　平成11年6月15日 (1999.6.15)
(33)優先権主張国　米国(US)
(31)優先権主張番号　60/145,070
(32)優先日　平成11年7月20日 (1999.7.20)
(33)優先権主張国　米国(US)
(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)

(71)出願人　596168317
ジェネンテック・インコーポレーテッド
ＧＥＮＥＮＴＥＣＨ，ＩＮＣ．
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・ディーエヌエー・ウェイ・１
(74)代理人　100109726
弁理士　園田　吉隆
(74)代理人　100101199
弁理士　小林　義教
(72)発明者　アシュケナジ，アヴィ，ジェー．
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

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】新規なポリペプチド及びそのポリペプチドをコードする核酸分子の提供。
【解決手段】新規なポリペプチド及びそのポリペプチドをコードする核酸分子。その核酸分子配列を含むベクター及び宿主細胞、異種性ポリペプチド配列に融合した該ポリペプチドを含むキメラポリペプチド分子、該ポリペプチドに結合する抗体及び該ポリペプチドを製造する方法。
【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：７３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、軟骨細胞の再分化を誘導するポリペプチド。
【請求項２】
以下の（ａ）又は（ｂ）の単離された核酸：
（ａ）配列番号：７２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、軟骨細胞の再分化を誘導するポリペプチドをコードする核酸。
【請求項３】
以下の（ａ）又は（ｂ）の単離された核酸：
（ａ）配列番号：７２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、軟骨細胞の再分化を誘導するポリペプチドをコードする核酸。
【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）ＡＴＣＣ寄託番号２０９６１８で寄託されたＤＮＡ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、軟骨細胞の再分化を誘導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。
【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ＣＨＯ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。
【請求項１１】
配列番号：７３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：７３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、軟骨細胞の再分化を誘導するポリペプチド。
【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２０９６１８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、軟骨細胞の再分化を誘導するポリペプチド。
【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。
【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。
【請求項１９】
以下の（ａ）又は（ｂ）の単離された核酸：
（ａ）配列番号：７３のアミノ酸位置１～２５に位置するシグナルポリペプチドを欠く、配列番号：７３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、軟骨細胞の再分化を誘導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：７３のアミノ酸位置１～２５に位置するシグナルポリペプチドを含む、該配列番号：７３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、軟骨細胞の再分化を誘導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。
【請求項２１】
以下の（ａ）又は（ｂ）の単離された核酸：
（ａ）配列番号：７３のアミノ酸位置１～２５に位置するシグナルポリペプチドを欠く、該配列番号：７３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、軟骨細胞の再分化を誘導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。
【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：７３のアミノ酸位置１～２５に位置するシグナルペプチドを含む、該配列番号：７３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、軟骨細胞の再分化を誘導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：
（ａ）配列番号：７３のアミノ酸位置１～２５に位置するシグナルペプチドを欠く、該配列番号：７３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、軟骨細胞の再分化を誘導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。
【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。
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術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]。
【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。
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。
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。ヒト白血病細胞(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WO 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WO 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、血管形成に活動的に含まれ、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WO 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λｇｔ１０と命名されたベクターはＡＴＣＣ登録番号７５９２８で寄託された。「ｈｔｉｅ-２ ２」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作用を反映して「アンギオポエチン-１(Angiopoietin-1)」と命名されたヒトリガンドは、WO 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。アンギオポエチン-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理的血管形成の間に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))、アンギオポエチン-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ＸｎＣＸ7ＣＸ4/5ＣＸ10ＣＸＣＸ5ＧＸ2ＣＸnを共有するＥＧＦレセプターと反応しうること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-α、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ィルス性コード化ペプチド(例えばワクシニアウィルス、Reisner, AH, Nature 313: 801-803 (1985), ショープ線維腫ウィルス、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)、及び粘液腫ウィルス、Upton C等, J. Virol. 61: 1271-1275 (1987)、Prigent SA及びLemoine, N.R., Prog. Growth Factor Res.. 4: 1-24 (1992)を含む。

ＥＧＦ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ＶＩ、ＩＸ、Ｘ、ＸＩＩ、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

ＤＬ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Ｃ１ｒ、ウロモジュリン)を含む。

更により興味深いことには、ＥＧＦ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ＥＧＦ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、ＥＧＦ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ＥＤＦ関連配列は膜の細胞外側に位置している。ＥＧＦ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、ＥＧＦ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、ＥＧＦ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)に関与していた。ＥＧＦ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、ＥＧＦ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-ｅｒｂ-２(またＨＥＲ-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)。

【０００９】

６．　ＰＲＯ２１５

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β-α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β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、及び腫瘍ストロー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、出血疾患ベルナール-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ＳＬＩＴタンパク質であり、エール大学のArtavanistsakonas,S.及びRothberg,J.M.のWO9210518-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WO9110727-A(トランスフォーミング成長因子βに結合しているデコリンがガンの治療、創傷治癒及び瘢痕化に関与)が含まれる。

【００１０】

７．　ＰＲＯ２４２、ＰＲＯ１３１８及びＰＲＯ１６００

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。

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。

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(ＭＩＰ-１アルファ及びベータ)、Ｉ-３０９、RANTES、及び単球化学走化性タンパク質(ＭＣＰ-１)が含まれる。

ＭＩＰ-１アルファ及びＭＩＰ-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。ＭＩＰ-１アルファ及びＭＩＰ-１ベータは６８－６９アミノ酸からなり、それらの成熟した分泌形態では約７０％の同一性を共有する。両方ともマイトジェン、抗-ＣＤ３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。ＭＩＰ-１アルファは、Ｔリンパ球及び好酸球のＣＤ-８サブセットの化学誘引物質として作用する一方、ＭＩＰ-１ベータはＴリンパ球のＣＤ-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(ＭＣＰ-１)は７６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、ＭＣＰ-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、ＭＣＰ-１はＭＣＰ-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ＭＣＰ-２とＭＣＰ-３は、それぞれＭＣＰ-１と６２％及び７３％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。

炎症を生じた又は羅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。

【００１１】

８．　ＰＲＯ２８８

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、及び疱疹ウイスル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ＤＮＡ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な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)］。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、及び腫瘍サプレッサー、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-α(「ＴＮＦ-α」)、腫瘍壊死因子-β(「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死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、NH_2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５

４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型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ＴＮＦ-Ｒ１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分解的に切断され；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、タンパク分解的に切断され、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)］。

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。

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／Ａｐｏｌ(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-κＢ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。

【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。言われるところによれば、ＣＤ９５はＦＡＤＤに直接結合する一方、ＴＮＦＲ１はＴＲＡＤＤを介して間接的にＦＡＤＤ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)］。ＦＡＤＤは、Ｃｅｄ-３-関連プロテアーゼ、ＭＡＣＨα／ＦＬＩＣＥ(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)］。ＭＡＣＨα／ＦＬＩＣＥ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-１β変換酵素(ＩＣＥ)及びＣＰＰ３２／Ｙａｍａ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］。

プログラム細胞死が、線虫の細胞死遺伝子、ｃｅｄ-３、及び哺乳動物のＩＬ-１-変換酵素、ＩＣＥ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。ＩＣＥ及びＣＰＰ３２／Ｙａｍａプロテアーゼの活性は、牛痘ウイルス遺伝子、ｃｒｍＡ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、ＣｒｍＡがＴＮＦＲ１-及びＣＤ９５-誘発細胞死を阻害しうることが示されている［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、ＴＮＦＲ１、ＴＮＦＲ２及びＣＤ４０は、転写因子、ＮＦ-κＢ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. Genet. Develop.，6：39-44(1996)］。ＮＦ-κＢは、そのサブユニットが保存Ｒｅｌ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、ＮＦ-κＢはＩκＢー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ＩκＢの不活性化の際に、放出されたＮＦ-κＢが、特異的ＤＮＡ配列と結合する核に転座して遺伝子転写を活性化する。

サイトカインのＴＮＦ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。

【００１７】

９．　ＰＲＯ３６５

ヒト２-１９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２-１９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。

【００１８】

１０．　ＰＲＯ１３６１

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ＰＲＯ１３６１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。

【００１９】

１１．　ＰＲＯ１３０８

フォリスタチンは、下垂体濾胞刺激ホルモン(ＦＳＨ)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ＦＳＨ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(ＴＧＦβ)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)と組み合わされて、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)：32

8-339；Pengら，Biol. Signals(1996)5(2)：81-89、及びHalvorsonら，Fertil Steril(1996)65(3)：459-469。

【００２０】

１２．　ＰＲＯ１１８３

プロトポ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ポルフィリン症になる。よって、プロトポ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)；Arnould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】

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】

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)。

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。

【００２４】

１６．　ＰＲＯ７１７０

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。

【００２５】
１７．　ＰＲＯ２４８
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与している。特に、トランスフォーミング成長因子β(ＴＧＦβ)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、ＴＧＦβ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。
ＴＧＦβファミリーには塩基性ミエリンタンパク質(ＢＭＰ-２、ＢＭＰ-４、ＢＭＰ-５、ＢＭＰ-６、ＢＭＰ-７)、アクチビンＡ及びＢ、デカペンタプレジック(decapentaplegic)(dpp)、６０Ａ、ＯＰ-２、ドルサリン(dorsalin)、成長分化因子(ＧＤＦｓ)１、３及び９、ノーダル(nodal)、ＭＩＳ、インヒビンα、トランスフォーミング成長因子ベータ(ＴＧＦ-β１、ＴＧＦ-β２、ＴＧＦ-β３、ＴＧＦ-β５)及び神経膠細胞誘導神経栄養因子(ＧＤＮＦ)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与しているためである。
よって、ＴＧＦβファミリーのメンバー、特に成長分化因子(ＧＤＦ)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、例えば機能の局部性などの、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。
【００２６】
１８．　ＰＲＯ３５３
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与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、炎症に関与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。
【００２７】
１９．　ＰＲＯ５３３
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(ＴＧＦ-β)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，(198

4), 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(chrondocytes)、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で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／又は化学療法の代わりに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-β)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)、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(chrondocytes)、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. Steroid Biochem. Mol. Biol. 57 (3-4): 173-78 (1996)。

ＦＧＦ-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ＦＧＦｓと共有し、これが、様々なＥＧＦｓが分化と胚形成において多重的でおそらくは協調的な役割を有するという理論を裏付けている。更に、ＦＧＦ-８はまた乳房腫瘍形成の過程においてＷｎｔ-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ＦＧＦｓとは対照的に、ＦＧＦ-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。ＦＧＦ-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、ＦＧＦ-８ｍＲＮＡ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、ＦＧＦ-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、ＦＧＦ-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、ＦＧＦ-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、ＦＧＦ-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ＰＲＯ１８７ポリペプチドと命名した。

【００３０】

２２．　ＰＲＯ３３７

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つくり出される一つの特定の手段は、細胞接着分子(ＣＡＭｓ)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。ニューロン的に発現されたＣＡＭｓ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ＣＡＭｓ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ＣＡＭｓ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(ＩｇＳＦ)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)。ＩｇＳＦ(又はＩｇ-ＣＡＭｓ)の細胞接着分子は特に、発達の間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); Bruemmendorf及びRathjen, J.Neurochem. 61:1207-1219 (1993)。しかし、哺乳動物Ｉｇ-ＣＡＭｓ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

キューの提供に関与している。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)。

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)。

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。

【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、ＩＩ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関与していることを示唆している。

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)]。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ＶＩ層からの求心性入力の

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的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)。

【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。

【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クグループ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。

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。

【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。

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β-α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β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Deis

enhofer, 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、及び腫瘍ストロー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、出血疾患ベルナール-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Artavanistsakonas,S.及びRothberg,J.M.のWO9210518-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WO9110727-A(トランスフォーミング成長因子β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Rouslahti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術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):531-542(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属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プ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。

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-１０ｃＤＮＡ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))。

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。

【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。

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。

他の実施態様では、本発明はＰＲＯ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ＰＲＯポリペプチドをコードするＤＮＡ分子

、又は(ｂ)(ａ)のＤＮＡ分子の補体に対して、少なくとも約８０％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８２％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８４％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８６％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８８％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９０％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９２％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９４％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９６％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９８％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するヌクレオチド配列を含む。

【００４１】

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ＰＲＯポリペプチドｃＤＮＡ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ＰＲＯポリペプチドｃＤＮＡ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ＰＲＯ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ＤＮＡ分子、又は(ｂ)(ａ)のＤＮＡ分子の補体に対して、少なくとも約８０％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８２％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８４％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８６％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８８％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９０％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９２％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９４％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９６％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９８％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するヌクレオチド配列を含む。

さらなる態様では、本発明は、(ａ)ここに開示されたＡＴＴＣに寄託されたヒトタンパク質ｃＤＮＡ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ＤＮＡ分子、又は(ｂ)(ａ)のＤＮＡ分子の補体に対して、少なくとも約８０％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８２％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８４％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８６％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８８％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９０％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９２％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９４％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９６％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９８％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するヌクレオチド配列を含む。

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ＰＲＯ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。

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。

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。

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。

【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。

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。

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。特定の実施態様では、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-末端境界は変化しうるが、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、幾つかの場合には、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Megalign(DNASTAR)ソフトウエ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。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配列比較コンピュータプログラムはジェネンテ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が用いれれる状況では、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://ww.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、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、ＰＲＯ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８０％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８２％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８４％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８６％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８８％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９０％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９２％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９４％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９６％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９８％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１８０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)ソフトウエ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が用いれれる状況では、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://ww.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
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、ここで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充分なほど、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い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、従来の手法に従って、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度、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を含む０．１ｘＳＳＣ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、５ｘＳＳＣ(１５０ｍＭのＮａＣｌ、１５ｍＭのクエン酸三ナトリウム)、５０ｍＭリン酸ナトリウム(ｐＨ７．６)、５ｘデンハート液、１０％デキストラン硫酸、及び２０ｍｇ／ｍＬ

の変性剪断サケ精子ＤＮＡを含む溶液中の３７℃での終夜インキュベーション、次いで１ｘＳＳＣ中３７－５０℃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充分に短い。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にかなり独特である。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みうる。

【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^{TM}、ポリエチレングリコール(ＰＥＧ)、及びPLURONICS^{TM}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, Rosenburg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。

「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充分なほど、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。

「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ー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。

「リポソーム」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。リポソームの成分は、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、Isacchiら, 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。

【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, _M, 0, 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, 0,_M,_M,_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, _M, 0, 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, _M, 0, 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();
```

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 an 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, 0xFFFFFFF, 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(0);     /* 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()                                                                    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_calloc("to get diags", len0+len1+1, sizeof(struct diag));

        ndely = (int *)g_calloc("to get ndely", len1+1, sizeof(int));
        dely = (int *)g_calloc("to get dely", len1+1, sizeof(int));
        col0 = (int *)g_calloc("to get col0", len1+1, sizeof(int));
        col1 = (int *)g_calloc("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 (col1[yy-1] - ins0 >= delx) {
                        delx = col1[yy-1] - (ins0+ins1);
                        ndelx = 1;
                } else {
                        delx -= ins1;
                        ndelx++;
                }
        } else {
                if (col1[yy-1] - (ins0+ins1) >= delx) {
                        delx = col1[yy-1] - (ins0+ins1);
                        ndelx = 1;
                } else
                        ndelx++;
        }

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

表1(続き)

...nw

```
                id = xx - yy + len1 - 1;
                if (mis >= delx && mis >= dely[yy])
                        col1[yy] = mis;
                else if (delx >= dely[yy]) {
                        col1[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) {
                                        writejmps(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 {
                        col1[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) {
                                        writejmps(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)
                                col1[yy] -= ins0+ins1*(len1-yy);
                        if (col1[yy] > smax) {
                                smax = col1[yy];
                                dmax = id;
                        }
                }
        }
        if (endgaps && xx < len0)
                col1[yy-1] -= ins0+ins1*(len0-xx);
        if (col1[yy-1] > smax) {
                smax = col1[yy-1];
                dmax = id;
        }
        tmp = col0; col0 = col1; col1 = tmp;
}
(void) free((char *)ndely);
(void) free((char *)dely);
(void) free((char *)col0);
(void) free((char *)col1);                      }
```

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();
}
```

表1(続き)

getmat

```
/*
 * trace back the best path, count matches
 */
static
getmat(lx, ly, firstgap, lastgap)
        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);
```

表1(続き)

...getmat

```
        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

```
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];                 }
```

表1(続き)

...pr_align

```
        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()
```

dumpblock

```
{
        register  i;

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

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

```
nums(ix)
        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; 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

```
putline(ix)
        int     ix;                     {
```

Table 1 (cont')

...putline

```
        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()                                                          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 (!dna && _day[*p0-'A'][*p1-'A'] > 0)
                                cx = '.';
                        else
                                cx = ' ';
                }
                else
                        cx = ' ';
                *px++ = cx;
        }
        *px++ = '\n';
        *px = '\0';
}
```

表1(続き)

stripname

```
/*
 * 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));

}
```

表1(続き)

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

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

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

/*
 * remove any tmp file if we blow
 */
cleanup(i)                                                          cleanup
        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)                                                   getseq
        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';
```

表1(続き)

...getseq

```
        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_calloc(msg, nx, sz)                                   g_calloc
        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_calloc() 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()                                              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--)
                                ;
```

表1(続き)

...readjmps

```
                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 jmps
 */
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;
}                       }
```

表1(続き)

```
/*
 * write a filled jmp struct offset of the prev one (if any): nw()
 */
writejmps(ix)                                                    writejmps
        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);
}
```

【００６３】

表2

PRO	XXXXXXXXXXXXXXX	(長さ = 15 アミノ酸)
比較タンパク質	XXXXXYYYYYYY	(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%

表3

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

表4

PRO-DNA	NNNNNNNNNNNNN	(長さ = 14 ヌクレオチド)
比較DNA	NNNNNNLLLLLLLLL	(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=

6 ÷ 14 = 42.9%

表5

PRO-DNA	NNNNNNNNNNN	(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=

4 ÷ 12 = 33.3%

【００６４】

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。

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。

【００６５】

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

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。

【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。

【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。

【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。

【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

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。

【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。

【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】

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。

【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

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。

【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。

【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β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。

【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信じられる。

【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

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いだした。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。

【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いだした。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。

【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。

【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ミンと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

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ィ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ポリペプチドが一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

然配列ＰＲＯ１００９６(図６４及び配列番号：１２６に示す)が、種々のインターロイキン-１０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ＰＲＯ１００９６ポリペプチドが新規に同定されたＩＬ-１０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。

【００９４】

３０．全長ＰＲＯ６００３ポリペプチド

ＤＮＡ８３５６８-２６９２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、ＤＮＡ８３５６８-２６９２ヌクレオチド配列はＰＲＯ６００３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。

【００９５】

Ｂ．ＰＲＯポリペプチド変異体

ここに記載した全長天然配列ＰＲＯポリペプチドに加えて、ＰＲＯ変異体も調製できると考えられる。ＰＲＯ変異体は、ＰＲＯ ＤＮＡ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ＰＲＯ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ＰＲＯ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ＰＲＯ又はここに記載したＰＲＯ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ＰＲＯと比較してＰＲＯのアミノ酸配列が変化することになるＰＲＯ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ＰＲＯ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、ＰＲＯ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。

【００９６】

ＰＲＯ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、ＰＲＯ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。

ＰＲＯ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ＤＮＡを消化して所望の断片を単離することによるＰＲＯ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(ＰＣＲ)により、所望のポリペプチド断片をコードするＤＮＡ断片を単離し増幅することを含む。ＤＮＡ断片の所望の末端を定めるオリゴヌクレオチドは、ＰＣＲの５’及び３’プライマーで用いられる。好ましくは、ＰＲＯポリペプチド断片は、ここに開示した天然ＰＲＯ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。

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

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
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
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)	tyr; phe	tyr
Tyr (Y)	trp; phe; thr; ser	phe
Val (V)	ile; leu; met; phe; ala; ノルロイシン	leu

【００９７】

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。

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

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 SerA, 317: 415 (1986)］又は他の周知の技術が、ＰＲＯ変異体ＤＮＡを製造するために、クローン化されたＤＮＡ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［Cuningham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．ＰＲＯの修飾

ＰＲＯ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、ＰＲＯポリペプチドの標的とするアミノ酸残基を、ＰＲＯ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ＰＲＯを水不溶性支持体マトリクスあるいは抗-ＰＲＯ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、グルタミニル及びアスパラギニル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α-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ＰＲＯ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ＰＲＯ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ＰＲＯ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。

ＰＲＯ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ＰＲＯ(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。ＰＲＯアミノ酸配列は、場合によっては、ＤＮＡレベルでの変化、特に、ＰＲＯポリペプチドをコードするＤＮＡ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】

ＰＲＯ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。

ＰＲＯ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。

ＰＲＯの共有結合的修飾の他の型は、ＰＲＯ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ＰＲＯは、他の異種ポリペプチド又はアミノ酸配列に融合したＰＲＯ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ＰＲＯとの融合を含む。エピトープタグは、一般的にはＰＲＯのアミノ又はカルボキシル末端に位置する。このようなＰＲＯ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ＰＲＯ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)］；ＫＴ３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ＰＲＯ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(「イムノアドヘシン」とも呼ばれる)については、そのような融合体はＩｇＧ分子のＦｃ領域であり得る。Ｉｇ融合体は、好ましくはＩｇ分子内の少なくとも一つの可変領域に換えてＰＲＯ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、ＩｇＧ１分子のヒンジ、ＣＨ２及びＣＨ３、又はヒンジ、ＣＨ１、ＣＨ２及びＣＨ３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．ＰＲＯの調製

以下の説明は、主として、ＰＲＯ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ＰＲＯ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ＰＲＯを調製することができると考えられる。例えば、ＰＲＯ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、ＰＲＯｍＲＮＡを保有してい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)により得ることもできる。

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)］。

【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、充分な長さで、疑陽性が最小化されるよう充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。

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。

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。

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WO 89/05859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。

【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、例えばバシリスブチリス(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ブ(Schizosaccharomyces prombe)(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(Kluveromyces 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; Louvencourt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・ウィケラミイ(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. drosophilarum)(ATCC 36,906; Van den Berg等, Bio/Technology, 8: 135 (1990))、ケー・テモトレランス(K. themotolerans)及びケー・マルキシアナス(K. marxianus)；ヤロウィア(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(reesia)(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(Tolypocladium)(1991年1月10日公開のWO 91/00357)；及びコウジ菌、例えば偽巣性コウジ菌(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及びスポドスペラ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／-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, ATTC 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はなく、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、酵母インベルターゼリーダー、α因子リーダー(酵母菌属(Saccharomyces)及びクルイベロマイシス(Kluyveromyces)α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)、又は酸ホスフォターゼリ

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WO 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、２μ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。

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)例えばバ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、ＤＨＦＲ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ＤＨＦＲ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ＤＨＦＲ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)］。

【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β-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。

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-ホスホグリセレートムターゼ、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。

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はEP 73,657に更に記載されている。

哺乳動物の宿主細胞におけるベクターからのＰＲＯ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ＰＲＯをコードするＤＮＡ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ＤＮＡのシス作動要素である。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ＳＶ４０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、ＰＲＯ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ｍＲＮＡ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ＤＮＡ又はｃＤＮＡ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、ＰＲＯをコードするｍＲＮＡ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ＰＲＯ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、従来よりのサザンブロット法、ｍＲＮＡの転写を定量化するノーザンブロット法［Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA,77:5201-5205 (1980)］、ドットブロット法(ＤＮＡ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、ＤＮＡ二本鎖、ＲＮＡ二本鎖及びＤＮＡ-ＲＮＡハイブリッド二本鎖又はＤＮＡ-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、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ＰＲＯポリペプチドに対して、又はここで提供されるＤＮＡ配列をベースとした合成ペプチドに対して、又はＰＲＯ ＤＮＡ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

ＰＲＯ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-Ｘ１００)又は酵素的切断を用いて膜から引き

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のエピトー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。

【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ろう。

全長天然配列ＰＲＯ遺伝子又はその一部は、全長ＰＲＯｃＤＮＡ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。

【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。

ＰＲＯ核酸の他の有用な断片は、標的ＰＲＯｍＲＮＡ(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(CancerRes. 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し、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

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

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。

【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、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。

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)を数キロベース含む［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、期間をおいて「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的状態及びその病理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。

【０１２０】
また、ＰＲＯ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ＤＮＡ又はｍＲＮＡ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ＲＮＡ及びＤＮＡ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。
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、ＤＥＡＥ-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。

【０１２１】
ここに記載したＰＲＯ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。
ここに記載したＰＲＯ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ＰＲＯ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ＰＲＯ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ＰＲＯ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。ＰＲＯ核酸分子は、ＰＣＲ、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。
ここに記載したＰＲＯポリペプチドは治療薬として用いてもよい。本発明のＰＲＯ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ＰＲＯ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ピエント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

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／又はTWEEN^{TM}、PLURONICS^{TM}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ＭＮｒｇｐ１２０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する、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

。

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［Fiels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-ｌａｃＺ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(MATCHMAKER^{TM})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、キーホー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、及びヒト由来の骨髄腫細胞である。通常、ラット又はマウスの骨髄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髄腫株であり、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髄腫及びマウス-ヒト異種骨髄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)によるスキャ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倍地が含まれる。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

ロブリンタンパク質を生成等しない骨髄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'、Ｆ(ａｂ')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.,

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、及び抗体レパー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。

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。

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WO93/08829、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。

【０１３５】

WO96/27011に記載された他の方法によれば、一対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「キャビティ」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。

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砒酸ナトリウムの存在

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Ｆａｂ'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。Ｆａｂ'-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Ｆａｂ'-チオールに再転換し、他のＦａｂ'-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Ｆａｂ'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(ａｂ')２分子の製造を記述している。各Ｆａｂ'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ＥｒｂＢ２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。

【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シ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)。Ｆｏｓ及びＪｕｎタンパク質からのロイシンジッパーペプチドを遺伝子融合により二つの異なった抗体のＦａｂ'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Ｆｖ(ｓＦｖ)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。

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ＰＲＯ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-ＰＲＯポリペプチドのアームは、特定のＰＲＯ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ＣＤ２、ＣＤ３、ＣＤ２８、又はＢ７)等の白血球上のトリガー分子、又はＦｃγＲＩ(ＣＤ６４)、ＦｃγＲＩＩ(ＣＤ３２)及びＦｃγＲＩＩＩ(ＣＤ１６)等のＩｇＧ(ＦｃγＲ)に対するＦｃ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ＰＲＯ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ＰＲＯ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ＥＯＴＵＢＥ、ＤＰＴＡ、ＤＯＴＡ、又はＴＥＴＡ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ＰＲＯポリペプチドに結合し、そしてさらに組織因子(ＴＦ)に結合する。

【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ＨＩＶ感染の治療のために［WO 91/00360; WO 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

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。

【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、アブリン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(Phytolaca 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(curcin)、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。

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

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(ドキソルビシン等)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】

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。

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、マイクロエマルション、ナノ粒子及びナノカプセル)中、又はマイクロエマルシ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。

【０１４２】

インビボ投与に使用される製剤は無菌でなけらばならない。これは、滅菌濾過膜を通し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。除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™ (乳酸-グリコール酸コポリマーと酢酸リュー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した分子間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。

【０１４３】
Ｇ．抗-ＰＲＯ抗体の用途
本発明の抗-ＰＲＯ抗体は様々な有用性を有している。例えば、抗-ＰＲＯ抗体は、ＰＲＯ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 Press, Inc. (1987) pp. 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抱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-ＰＲＯ抗体は組換え細胞培養又は天然供給源からのＰＲＯ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、ＰＲＯ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ＰＲＯを含む試料と接触させた後、固定化された抗体に結合したＰＲＯ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浄する。最後に、ＰＲＯを抗体から脱離させる他の適当な溶媒で支持体を洗浄する。
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。
【０１４４】
(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。ＡＴＣＣ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。
【０１４５】
実施例１：新規なポリペプチド及びそれをコードするｃＤＮＡ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(ＥＣＤ)配列(あれば、分泌シグナル配列を含む)を、ＥＳＴデータベースの検索に使用した。ＥＳＴ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™、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、ＥＣＤタンパク質配列のＥＳＴ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ＤＮＡ配列に構築した。
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ＥＳＴ配列に対してコンセンサスＤＮＡ配列を構築した。さらに、得られたコンセンサスＤＮＡ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ＥＳＴ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

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。

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へ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

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。

【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 Technoligies、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 Technplogies、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

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：ＭＡＴα、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２ｘ１０６細胞／ｍｌ(約ＯＤ６００＝０．１)に希釈し、１ｘ１０７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(100μｌ)を新鮮な変性一本鎖サケ精子ＤＮＡ(Lofstrand Labs, Gaitherburg, MD)及び形質転換ＤＮＡ(1μg vol.＜10μｌ)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(600μｌ, 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。この混合物を緩く撹拌し、３０分間撹拌しながら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、反応容器をミクロチューブ内で12,000rpmで5-10秒間遠心分離し、デカント及びＴＥ(500μｌ, 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(200μｌ)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ース寒天(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プ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、デンプンを赤色染料(反応性 Red-120, Sigma)に結合させた。結合したデンプンをＳ

ＣＤ-Ｕｒａ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ｐＨ７．０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ＳＣＤ-Ｕｒａ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．ＰＣＲ増幅によるＤＮＡ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(30μl)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(5μl)を、0.5μlのKlentaq(Clontech, Palo Alto, CA); 4.0μlの10mM dNTP(Perkin Elmer-Cetus); 2.5μlのKentaqバッファー(Clontech); 0.25μlの正方向オリゴ１；0.25μlの逆方向オリゴ２；12.5μlの蒸留水を含有する25μl容量におけるＰＣＲ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'- TGTAAAACGACGGCCAGTTAAATAGACCTGCAATTATTAATCT-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、ＰＣＲ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．２５サイクル：	変性	92℃、30秒間
	アニール	55℃、30秒間
	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ＡＤＨ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ｐＳＳＴ-ＡＭＹ．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ＰＣＲ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ｃＤＮＡは、かなり長いヌクレオチド配列をもたらした。

ＰＣＲに続いて、反応のアリコート(5μl)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ＰＣＲ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ＤＮＡ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ｃＤＮＡ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ＥＳＴｓ並びに集団化及び組み立てられたＥＳＴ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'-GCTGACGAACCAAGGCAACTACAAACTCCTGGT-3'(配列番号：５)；

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

(ｃ)5'-GGTGGTGAACTGCTTGCCGTTGTGCCATGTAAA-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、ブタペ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のパラグラフ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

、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。DNA３２２７９-１１３１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。ＤＮＡ３２２７９-１１３１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。ＤＮＡ３３０９４-１１３１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ＤＮＡ２８７４８と命名した。ＤＮＡ２８７４８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ＤＮＡ２８７４８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へ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。
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ＤＮＡ３２２８８-１１３２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。
ＤＮＡ３２２８８-１１３２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ＤＮＡ３２２８８-１１３２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ＤＮＡ３２２８８-１１３２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(LIFESEQ^{TM}, 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ＤＮＡ２８７０９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。ＤＮＡ３３７８５-１１４３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ＤＮＡ３３７８５-１１４３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'-CATAAAAGTTCCTGCACCATGACCAGAGACACAGTGTGTCAGTGTAAAGA-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。

全長クローンを同定し(ＤＮＡ３５６６３-１１２９)、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１５７-１５９に見かけの翻訳開始部位を持ち、ヌクレオチド位置１３１５-１３１７に見出される停止コドンで終端する(図１７；配列番号：２８)。このクローンはｐＲＫ５-３５６６３と称され、ＡＴＣＣ番号２０９２０１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３８６アミノ酸長であり、約４１．８ｋＤａ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１-５５)、続いてＥＣＤ(アミノ酸５６-２１２)、膜貫通ドメイン(アミノ酸２１３-２３２)及び細胞内領域(アミノ酸２３３-３８６)が示された(図１８)。シグナルペプチド切断部位は、ＰＲＯ２８８ＥＣＤ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、ＰＲＯ２８８がＩ型の膜貫通タンパク質であることを示唆している。ＰＲＯ２８８は、アミノ酸位置１２７、１７１及び１８２に３つの潜在的Ｎ結合グリコシル化部位を含む(図１８)。

ＴＮＦ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４５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ＴＮＦ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。ＤＲ４、ＤＲ５及びＤｃＲ１と同様に、ＰＲＯ２８８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ＴＮＦＲ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１８(配列番号：２９)に示すＰＲＯ２８８配列のアライメント分析に基づくと、ＰＲＯ２８８は、他のアポトーシス関連レセプター、例えばＴＮＦＲ１、Ｆａｓ／Ａｐｏ-１又はＤＲ３よりも、ＤＲ４、ＤＲ５又はＤｃＲ１のＥＣＤに対して高い配列同一性を示した。予想されたＰＲＯ２８８の細胞内配列も、ＴＮＦＲ１、Ｆａｓ又はＤＲ３に比較して、ＤＲ４又はＤＲ５の対応する領域に対して高い相同性を示す。ＰＲＯ２８８の細胞内領域は、ＤＲ４又はＤＲ５について同定された細胞内領域より約５０残基短い。現在、ＰＲＯ２８８は、切断死亡ドメイン(アミノ酸３４０-３６４)を含み、それはＤＲ４又はＤＲ５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。ＴＮＦＲ１によるシグナル伝達に必要であり［Tartagliaら，上掲］、そしてＤＲ４及びＤＲ５に保持又は半保持されている６アミノ酸の中の５つが、ＰＲＯ２８８には存在していない。

【０１５９】

実施例１１：ヒトＰＲＯ３６５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ＤＮＡ３５６１３と命名する。ＤＮＡ３５６１３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)ＰＲＯ３６５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ＰＣＲプライマーを合成した：

正方向ＰＣＲプライマー　5'-GGCTGGCCTGCAGAGATC-3'(配列番号：３３)
正方向ＰＣＲプライマー　5'-AATGTGACCACTGGACTCCC-3'(配列番号：３４)
正方向ＰＣＲプライマー　5'-AGGCTTGGAACTCCCTTC-3'(配列番号：３５)
逆方向ＰＣＲプライマー　5'-AAGATTCTTGAGCGATTCCAGCTG-3'(配列番号：３６)

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ＤＮＡ３５６１３配列から作成した。

ハイブリッド形成プローブ

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 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-グルコシル化部位。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。

図２２(配列番号：３９)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、ＰＲＯ１３６１アミノ酸配列と以下のDayhoff配列：I50620、G64876、PMCMSG102B_2MSG104、HUMIGLVXY_1及びPH1370との間の有意な相同性が明らかになった。

【０１６１】

実施例１３：ヒトＰＲＯ１３０８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、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。伸長させたコンセンサス配列を、ここで「ＤＮＡ３５７２６」と命名する。ＤＮＡ３５７２６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)ＰＲＯ１３０８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'-TCCTGTGAGCACGTGGTGTG-3'(配列番号：４２)

5'-GGGTGGGATAGACCTGCG-3'(配列番号：４３)

5'-AAGGCCAAGAAGGCTGCC-3'(配列番号：４４)；及び

5'-CCAGGCCTGCAGACCCAG-3'(配列番号：４５)

逆方向ＰＣＲプライマー

5'-CTTCCTCAGTCCTTCCAGGATATC-3'(配列番号：４６)

5'-AAGCTGGATATCCTCCGTGTTGTC-3'(配列番号：４７)

5'-CCTGAAGAGGCATGACTGCTTTTCTCA-3'(配列番号：４８)；及び

5'-GGGGATAAACCTATTAATTATTGCTAC-3'(配列番号：４９)

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ＤＮＡ３５７２６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：５０)

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ＰＲＯ１３０８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ＳＫ-Ｌｕ-１腺癌細胞系から単離した。

上記のように単離したクローンのＤＮＡ配列決定により、ＰＲＯ１３０８の全長ＤＮＡ配列(ここではＤＮＡ６２３０６-１５７０と命名[図２３、配列番号：４０]及びＰＲＯ１３０８の誘導タンパク質配列が得られた。

ＰＲＯ１３０８の全コード配列を図２３(配列番号：４０)に示す。クローンＤＮＡ６２３０６-１５７０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１７-１９に見かけの翻訳開始部位、ヌクレオチド位置８０６-８０８に停止コドンを持つ。予測されるポリペプチド前駆体は２６３アミノ酸長である。図２４に示す全長ＰＲＯ１３０８タンパク質は、約２７,６６３の算定分子量、及び約６．７７のｐＩを有する。さらなる特徴は、約アミノ酸１-２０にシグナルペプチド、約アミノ酸７３-７６及び２１５-２１８に潜在的なＮ-グルコシル化部位、及び約アミノ酸９７-１２９及び１６９-２０１にオステオネクチンと相同性を有する領域を含む。

図２４(配列番号：４１)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、ＰＲＯ１３０８アミノ酸配列と以下のDayhoff配列Ｓ５５３６９との間の有意な相同性が明らかになった。また、ＰＲＯ１３０８アミノ酸配列と以下のDayhoff配列：FAS_HUMAN、P_R20063、CELT13C2_1、AGRI_RAT、p_W09406、G01639、SC1_RAT、S60062、S51362、及びIOV_CHICKとの間

の相同性も明らかになった。
クローンＤＮＡ６２３０６-１５７０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

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。

【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。

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。

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】

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

ブをＤＮＡ８６６３４配列から作成した。
ハイブリッド形成プローブ：
5'-CACTCTTGTCTGTGGGAACCACACATCTTGCCACAACTGTGGC-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、HWP1_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'-TCTCCAATTTCTGGGCTTAGATAAGGCGCCTTCACCCCAGAAGTTCC-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'-TACAGGCCCAGTCAGGACCAGGGG-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

ブをＤＮＡ３６３６３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'-CCCGGTGCTTGCGCTGCTGTGACCCCGGTACCTCCATGTACCCGG-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ＤＮＡ４１２３４-１２４２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。
ＤＮＡ４１２３４-１２４２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ＤＮＡ４１２３４-１２４２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ＤＮＡ４１２３４-１２４２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ＤＮＡ７３８３８-１６７４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ＤＮＡ７５５１６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。ＤＮＡ７５５１６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。
ＤＮＡ７５５１６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ＤＮＡ７７５０３-１６８６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。
ＤＮＡ７７５０３-１６８６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ＤＮＡ７７５０３-１６８６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４０８-４１０の停止コドンで終端する(図４１)。予測されるポリペプチド前駆体は１３４アミノ酸長である(図４２)。ＰＲＯ１６００によりコードされるアミノ酸配列の重要な領域を図４２に示す。クローンＤＮＡ７７５０３-１６８６はＡＴＣＣに寄託され、ＡＴＣＣ寄託番号２０３３６２が付与された。

【０１７１】

実施例２３：ヒトＰＲＯ５３３をコードするｃＤＮＡクローンの単離

ＥＳＴ配列寄託番号ＡＦ００７２６８であるマウス線維芽細胞成長因子(ＦＧＦ-１５)を様々な公的ＥＳＴ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、ＥＣＤタンパク質配列のＥＳＴ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GenBankＥＳＴ ＡＡ２２０９９４がヒットし、ストラタジーンＮＴ２ニューロン前駆体９３７２３０として同定された。

GenBankＥＳＴ ＡＡ２２０９９４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。正及び逆方向ＰＣＲプライマーは２０～３０のヌクレオチド(典型的には約２４)の範囲とでき、１００-１０００ｂｐの長さのＰＣＲ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４０-５５ｂｐ(典型的には約５０)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ＰＣＲプライマー対で、Ausubel等, Current Protocols in Molecular Biologyに従って、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ＰＲＯ５３３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ライブラリーの作成のためのＲＮＡはヒト胎児網膜から単離した。ｃＤＮＡクローンの単離に用いたｃＤＮＡライブラリーは、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。ｃＤＮＡは、ＮｏｔＩ部位を含むオリゴｄＴでプライムし、平滑末端でＳａｌＩへ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ｐＲＫＢ又はｐＲＫＤ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。

ｃＤＮＡクローンはその全体を配列決定した。ＰＲＯ５３３の全長ヌクレオチド列は図４５(配列番号：８５)に示す。クローンＤＮＡ４９４３５-１２１９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４５９-４６１に見かけの翻訳開始部位を持つ(図４５；配列番号：８５)。予測されるポリペプチド前駆体は２１６アミノ酸長である。クローンＤＮＡ４７４１２-１２１９はＡＴＣＣに寄託され、ＡＴＣＣ寄託番号２０９４８０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、ＰＲＯ５３３は線維芽細胞成長因子とアミノ酸配列同一性を示す(５３％)。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'-ATCCGCCCAGATGGCTACAATGTGTA-3'(配列番号：８７)；

FGF15.プローブ:5'-GCCTCCCGGTCTCCCTGAGCAGTGCCAAACAGCGGCAGTGTA-3'(配列番号：８８)：

FGF15.逆:5'-CCAGTCCGGTGACAAGCCCAAA-3'(配列番号：８９)。

【０１７２】
実施例２４：ヒトＰＲＯ３０１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、ここでＤＮＡ３５９３６と命名するコンセンサス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ＰＲＯ３０１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ライブラリーの作成のためのＲＮＡはヒト胎児腎臓から単離した。
ｃＤＮＡクローンはその全体を配列決定した。天然配列ＰＲＯ３０１の全長ヌクレオチド配列を図４７(配列番号：９０)に示す。クローンＤＮＡ４０６２８-１２１６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５２-５４に見かけの翻訳開始部位を持つ(図４７；配列番号：９０)。予測されるポリペプチド前駆体は２９９アミノ酸長で、３２,５８３ダルトンの予想分子量と８．２９のｐＩを持つ。クローンＤＮＡ４０６２８-１２１６はＡＴＣＣに寄託され、ＡＴＣＣ寄託番号２０９４３２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、ＰＲＯ３０１はＡ３３抗原前駆体(３０％)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(２９％)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：
OLI2162(35936.f1) 5'-TCGCGGAGCTGTGTTCTGTTTCCC-3'(配列番号：９２)
OLI2163(35936.p1)
5'-TGATCGCGATGGGGACAAAGGCGCAAGCTCGAGAGGAAACTGTTGTGCCT-3'(配列番号：９３)
OLI2164(35936.f2)
5'-ACACCTGGTTCAAAGATGGG-3'(配列番号：９４)
OLI2165(35936.r1)
5'-TAGGAAGAGTTGCTGAAGGCACGG-3'(配列番号：９５)
OLI2166(35936.f3)
5'-TTGCCTTACTCAGGTGCTAC-3'(配列番号：９６)
OLI2167(35936.r2)
5'-ACTCAGCAGTGGTAGGAAAG-3'(配列番号：９７)
【０１７３】
実施例２５：ヒトＰＲＯ１８７をコードするｃＤＮＡクローンの単離
企業の発現配列タグ(ＥＳＴ)ＤＮＡデータベース(LIFESEQ™、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(ＦＧＦ-８)と相同性を示したＥＳＴ(＃８４３１９３)を同定した。ｍＲＮＡ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)。ｃＤＮＡクローンを単離するために使用したｃＤＮＡ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。ｃＤＮＡは、ＮｏｔＩ部位を含むオリゴｄＴでプライムし、平滑末端でＳａｌＩへ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ｐＲＫ５Ｄに定まった方向でクローニングした。二本鎖ｃＤＮＡを１０００ｂｐより大きくなるようにサイズ調整し、ＳａｌＩ／ＮｏｔＩ結合ｃＤＮＡをＸｈｏＩ／ＮｏｔＩ切断ベクター中にクローニングした。ｐＲＫ５Ｄはｓｐ６転写開始部位に続いてＳｆｉＩ制限酵素部位と続いてＸｈｏＩ／ＮｏｔＩｃＤＮＡ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'-GCGGATCTGCCGCCTGCTCANCTGGTCGGTCATGGCGCCCT-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ミ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

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法を使用しての、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ＰＣＲプライマー　5'-ATTGTGGGCCTTGCAGACATAGAC-3'(配列番号：１１２)
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ＤＮＡ３０９５５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：１１３)
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及びＰＣＲプライマーの一方を用いてＰＲＯ２４６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ライブラリーの作成のためのＲＮＡ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ＤＮＡ配列決定により、ＰＲＯ２４６に対する全長ＤＮＡ配列［ここでＤＮＡ３５６３９-１１７２と命名］(配列番号：１０９)及びＰＲＯ２４６の誘導タンパク質配列が得られた。

ＤＮＡ３５６３９-１１７２の全ヌクレオチド配列を図５７(配列番号：１０９)に示す。クローンＤＮＡ３５６３９-１１７２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１２６-１２８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１２９６-１２９８の停止コドンで終端する(図５７)。予測されるポリペプチド前駆体は３９０アミノ酸長である(図５８)。クローンＤＮＡ３５６３９-１１７２はＡＴＣＣに寄託され、ＡＴＣＣ寄託番号２０９３９６が付与された。

全長ＰＲＯ２４６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ＨＣＡＲと有意な相同性を有しており、よってＰＲＯ２４６は新規な細胞表面ウィルスレセプターでありうることが示される。

【０１７８】

実施例３０：ヒトＰＲＯ２６５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ＤＮＡ３３６７９と命名する。ＤＮＡ３３６７９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)ＰＲＯ２６５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(２つの正方向及び一つの逆方向)を合成した：
正方向ＰＣＲプライマーＡ：5'-CGGTCTACCTGTATGGCAACC-3'(配列番号：１１６)
正方向ＰＣＲプライマーＢ：5'-GCAGGACAACCAGATAAACCAC-3'(配列番号：１１７)
逆方向ＰＣＲプライマー　5'-ACGCAGATTTGAGAAGGCTGTC-3'(配列番号：１１８)
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ＤＮＡ３３６７９配列から作成した。
ハイブリッド形成プローブ
5'-TTCACGGGCTGCTCTTGCCCAGCTCTTGAAGCTTGAAGAGCTGCAC-3'(配列番号：１１９)
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及びＰＣＲプライマーの一方を用いてＰＲＯ２６５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ライブラリーの作成のためのＲＮＡ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ＤＮＡ配列決定により、ＰＲＯ２６５に対する全長ＤＮＡ配列［ここでＤＮＡ３６３５０-１１５８と命名］(配列番号：１１４)及びＰＲＯ２６５の誘導タンパク質配列が得られた。

ＤＮＡ３６３５０-１１５８の全ヌクレオチド配列を図５９(配列番号：１１４)に示す。クローンＤＮＡ３６３５０-１１５８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３５２-３５４に見かけの翻訳開始部位を持ち、そして位置２３３２-

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'-AAGTGGTGGAAGCCTCCAGTGTGG-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'-CCACTACGGTATTAGAGCAAAAGTTAAAAACCATCATGGTTCCTGGAGCAGC-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ーチャー配列。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が示されている。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

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、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'-AGAAGTTCCAGTCAGCCCACAAGATGCCATTGTCCCCCGGCCTCC-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】

実施例３６：ハイブリッド形成プローブとしてのＰＲＯの使用
以下の方法は、ＰＲＯ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ＰＲＯのコード配列を含むＤＮＡは、ヒト組織ｃＤＮＡ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ＤＮＡ類(ＰＲＯ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ＤＮＡ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ＰＲＯ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、5xＳＳＣ、0.1%ＳＤＳ、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、0.1xＳＳＣ及び0.1%ＳＤＳの水溶液中、42℃で行った。
次いで、全長天然配列ＰＲＯをコードするＤＮＡと所望の配列同一性を有するＤＮＡ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。
【０１８５】
実施例３７：大腸菌におけるＰＲＯ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ＰＲＯの非グリコシル化形態の調製を例示する。
ＰＲＯをコードするＤＮＡ配列は、選択されたＰＣＲ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、ｐＢＲ３２２(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。ＰＣＲ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、ｔｒｐプロモーター、ｐｏｌｙｈｉｓリーダー(最初の６つのＳＴＩＩコドン、ｐｏｌｙｈｉｓ配列、及びエンテロキナーゼ切断部位を含む)、ＰＲＯコード化領域、ラムダ転写終結区、及びａｒｇＵ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ＬＢ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ＤＮＡが単離され、制限分析及びＤＮＡ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ＬＢ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ＰＲＯ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Ｈｉｓタグ形態でＰＲＯを発現させてもよい。ＰＲＯをコードするＤＮＡを選択したＰＣＲ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、及び効率的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ＰＣＲ増幅された、ポリ-Ｈｉｓタグ配列を発現ベクターに結合させ、それを株５２(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ＬＢ中、30℃で振盪しながら3-5のＯ．Ｄ．６００に達するまで成長させた。ついで培養をＣＲＡＰ培地(3.57gの(ＮＨ４)２ＳＯ４、0.71gのクエン酸ナトリウム・2H2O、1.07gのＫＣｌ、5.36gのDifco酵母抽出物、500mL水

中の5.36gのShefield hycase SF、並びに110mMのＭＰＯＳ、pH7.3、0.55%(w/v)のグルコース及び７ｍMのＭｇＳＯ４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ＳＤＳ-ＰＡＧＥ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ＮａＣｌ、2.5Mの尿素、5ｍMのシステイン、20mMのグリシン及び1mMのＥＤＴＡ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ＴＦＡ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%ＴＦＡ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をＳＤＳ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ＰＲＯ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Ｈｅｐｅｓ、pH6.8に処方した。

ここに開示した多くのＰＲＯ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ＰＲＯ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ＰＲＯの調製を例示する。

発現ベクターとしてベクターｐＲＫ５(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、ＰＲＯ ＤＮＡを選択した制限酵素を持つｐＲＫ５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ＰＲＯＤＮＡを挿入させることができる。得られたベクターは、ｐＲＫ５-ＰＲＯ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

添加したＤＭＥＭ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10μｇのｐＲＫ５-ＰＲＯ ＤＮＡを約1μｇのＶＡ ＲＮＡ遺伝子コード化ＤＮＡ［Thimmappaya等, Cell, 31:543 (1982))］と混合し、500μｌの1mMトリス-ＨＣｌ、0.1mMＥＤＴＡ、0.227MＣａＣｌ２に溶解させた。この混合物に、滴状の、500μｌの50mMＨＥＰＥＳ(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200μCi/ml３５Ｓ-システイン及び200μCi/ml３５Ｓ-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、Somparyac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、700μｇのｐＲＫ５-ＰＲＯＤＮＡ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、5μg/mlウシインシュリン及び0.1μg/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(イムノアドヘシン)、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

ＮＡの５’及び３’に適合する制限部位を有し、ｃＤＮＡ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ＣＨＯ細胞での発現を用い、関心あるｃＤＮＡ及びジヒドロフォレートレダクターゼ(ＤＨＦＲ)の発現の制御にＳＶ４０初期プロモーター／エンハンサーを用いる。ＤＨＦＲ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ＤＮＡ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), Dosper(登録商標)及びFugene(登録商標)(Boehringer Mannheim)を使用し約一千万のＣＨＯ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3x10－７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ＤＮＡ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(0.2μm濾過ＰＳ２０、5%の0.2μm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℃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3x10５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ＣＨＯ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1.2ｘ106細胞/mLで播種した。0日目に、細胞数とｐＨ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℃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ション、Dow Corning 365 Medical Grade Emulsion)の30mLとした。生産を通して、ｐＨ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0.22μmフィルターを通して濾過した。濾過物は、4℃で貯蔵するか、即座に精製用カラムに充填した。

【０１８９】

ポリ-Ｈｉｓ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ＮａＣｌ及び5mMイミダゾールを含む20mMのＨｅｐｅｓ, 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℃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Ｈｅｐｅｓ、0.14MのＮａＣｌ及び4%のマン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℃で貯蔵した。

イムノアドヘシン(Ｆｃ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275μl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-Ｈｉｓ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ＳＤＳ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。

【０１９０】

実施例３９：酵母菌でのＰＲＯの発現

以下の方法は、酵母菌中でのＰＲＯの組換え発現を記載する。

第１に、ＡＤＨ２／ＧＡＰＤＨプロモーターからのＰＲＯ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。ＰＲＯをコードするＤＮＡ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ＰＲＯの細胞内発現を指示する。分泌のた

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α因子又はインベ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'Reilley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

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、ＩｇＧタグ(又はＦｃタグ)ＰＲＯ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。
【０１９２】
実施例４１：ＰＲＯに結合する抗体の調製
この実施例は、ＰＲＯ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ＰＲＯ、ＰＲＯを含む融合タンパク質、細胞表面に組換えＰＲＯ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なすことができる。
Ｂａｌｂ／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ＰＲＯ免疫原で免疫化する。あるいは、免疫原をＭＰＬ-ＴＤＭアジュバント(Ribi Immunochemical Researh, 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-ＰＲＯ抗体の検出のためのＥＬＩＳＡ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、ＰＲＯ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)、ＡＣＴＴから番号ＣＲＬ１５９７で入手可能なＰ３Ｘ６３ＡｇＵ．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、ＨＡＴ(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、ＰＲＯに対する反応性についてのＥＬＩＳＡでスクリーニングされる。ＰＲＯ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Ｂａｌｂ／ｃマウスに腹腔内注入し、抗-ＰＲＯ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ＰＲＯポリペプチドの精製
天然又は組換えＰＲＯ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-ＰＲＯポリペプチド、成熟ポリペプチド、又はプレ-ＰＲＯポリペプチドは、関心あるＰＲＯ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-ＰＲＯ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、ＣｎＢｒ-活性化セファロース™(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ＰＲＯポリペプチドを含有する細胞から

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ープ)で溶離され、ＰＲＯポリペプチドが回収される。

【０１９４】

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、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／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。

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

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、例えばバーガー病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、一晩育成する。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 Aqueous１液試薬(Progema)２０μｌ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。

【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/180μｌ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)(20μｌ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。

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。

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ＤＭＥＭ、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／フンギゾンを含有する。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-ベータ；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。

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-ベータは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

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℃、5%ＣＯ２)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%ピルバート)に3X10６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-ＩｇＧを対照体として使用する。ついで、ウェルを３７℃、5%ＣＯ２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(1.0mC/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%ピルバート)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1X10７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

患の治療に有用である。

PDB12膵管細胞を、100μL/180μL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ーティングした。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100μLの成長培地をついで最終容積200μL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℃で4日間インキュベートした。ついで、20μLのアラマーブルー染料(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の対照は各９６ウェルプレートで２回なされる。

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ー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ー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。

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１００μｌ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。０．１μｇ／１００μｌ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。

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。

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℃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℃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

のためにＤＡＰＩで染色した。全細胞(蛍光)は、ＣＣＤカメラ及びMacIntosh用ＮＩＨ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ＰＲＯポリペプチドの効果は、培地中２－３日でのカルセインＡＭポジティブ細胞の合計数を、培地中２－３日のＤＡＰＩ標識細胞の合計数で除することにより計算した。３０％を越える生存をポジティブと考える。

以下のＰＲＯ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：ＰＲＯ３５０。

【０２０４】

実施例５４：ラット小嚢支持細胞の増殖(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ＵＥＣ－４小嚢上皮細胞が３３℃、２００μｌ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ＰＲＯ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(１μＣｉ/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ＰＲＯ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Ｃｐｍ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：ＰＲＯ３３７。

【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、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及び他の眼組織から切除し、ついで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℃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を添加した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℃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ＣＭＦＤＡ染色した。Rho 4D2(腹水又はＩｇＧ1:100)、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、ＣＣＤカメラ及びMacIntosh用ＮＩＨ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：ＰＲＯ３５０。

【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ＰＭＮ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(７５－８０mg/Kg)及び５mg/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１００μｌ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箇所の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１μｌ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。

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ウェルマイクロタータープレート(Amersham Life Science, cytostar-Tシン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100μｌでプレーティングした。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。細胞無しのウェルをブランクとして用い、細胞のみの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50μｌ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。

0.2mlのアネキシンＶ-ビオチンのストック溶液(100μg/ml)を、4.6mlの2ｘＣａ２＋結合バッファー及び2.5%BSA中に希釈した(1:25希釈)。50μｌの希釈アネキシンＶ-ビオチン液を、1.0μg/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2ｘＣａ２＋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量を表す。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。

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。

【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ーティングした。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

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β-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β-細胞前駆体から成熟した膵臓β-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β-細胞前駆体又は成熟したβ-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。
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、培体は取り除かれ、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β-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。
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)
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)
セレニウム、10－1Mの4μｌ(Aesar#12574)
グループＣ：(10mlの100%エタノール中)
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

、ＰＲＯ１６００及びＰＲＯ４３５６。
【０２１０】
実施例６０：周皮細胞ｃ-ｆｏｓの誘発(アッセイ９３)
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-ｆｏｓ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を示す。周皮細胞におけるｃ-ｆｏｓ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-ｆｏｓの発現を誘発可能なＰＲＯ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、５ml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９６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100μlのＰＲＯ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＝ＤＥＭ＋5%血清＋／－500ng/mlのＰＤＧＦ；ネガティブ対照体＝プロテイン３２)で処理した。複製を平均し、ＳＤ／ＣＶを決定した。化学ルミネセンス単位(ＲＬＵ)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３２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３２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。ＡＳＹマトリックス：成長培地＝低グルコースＤＭＥＭ＝20%ＦＢＳ＋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ＤＭＥＭ＋5%ＦＢＳ。
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：ＰＲＯ４４４及びＰＲＯ２１７。
【０２１１】
実施例６１：骨格筋におけるグルコース又は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１０６)
このアッセイは、ＰＲＯポリペプチドが骨格筋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たＰＲＯ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。
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分化骨格筋に添加し、終夜インキュベートした。次に、ＰＲＯ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ＦＦＡ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ＦＦＡの取込みを刺激し、ＰＲＯ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、ＰＲＯ１８３、ＰＲＯ１８５、ＰＲＯ２１５、ＰＲＯ２８８、ＰＲＯ１３６１、ＰＲＯ１６００、ＰＲＯ４９９９、ＰＲＯ７１７０、ＰＲＯ５３３及びＰＲＯ１８７。
【０２１２】
実施例６２：赤芽球細胞系における胎児ヘモグロビン誘発(アッセイ１０７)
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、ＰＲＯ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、９６ウ

ェルフォーマットに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)

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含有するヘムＦ-１２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。

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。

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含有するヘムＦ-１２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のアラマー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。

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

でポジティブであると検定されたＰＲＯ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Ｆ１２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、一晩育成する。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。ネガティブ対照体はＰＲＯ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 Aqueous１液試薬(Progema)２０μｌ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。

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：ＰＲＯ１３１８。

【０２１６】

実施例６６：膵臓β-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β-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β-細胞前駆体又は成熟したβ-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Ｐｄｘ１と呼ばれる転写因子である。

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％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で20μ/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１４Ｆ／１６４０である。２日目、培地が取り除かれ、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。未処理のコントロールに比べ、関連したβ-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。

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)
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)
セレニウム、10－1Mの4μｌ(Aesar#12574)

グループＣ：(10mlの100%エタノール中)

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においてポジティブであると検定された：ＰＲＯ１８３、ＰＲＯ１８５、ＰＲＯ２８８。
【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癌薬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; 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(100μL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℃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100μl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５log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℃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。
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
PRO301	黒色腫	UACC-62
PRO301	卵巣	IGROV1; OVCAR-4
PRO301	卵巣	OVCAR-5
PRO301	卵巣	OVCAR-8; SK0OV-3
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
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

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、及びこられあの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^{TM})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。

【０２１９】

TaqMan^{TM}の結果はデルタ(Δ)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

量化はプライマー及びＰＲＯポリペプチド-コード化遺伝子から誘導したTaqMan^{TM}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ＰＲＯ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。ＰＲＯ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：

ＰＲＯ５３３(ＤＮＡ４９４３５-１２１９)
正方向　　：5'-GGGACGTGCTTCTACAAGAACAG-3' (配列番号：１４０)
逆方向　　：5'-CAGGCTTACAATGTTATGATCAGACA-3' (配列番号：１４１)
プローブ　：5'-TATTCAGAGTTTTCCATTGGCAGTGCCAGTT-3' (配列番号：１４２)
ＰＲＯ１８７(ＤＮＡ２７８６４-１１５５)
正方向　　：5'-GGCCTTGCAGACAACCGT-3' (配列番号：１４３)
逆方向　　：5'-CAGACTGAGGGAGATCCGAGA-3' (配列番号：１４４)
プローブ　：5'-GCAGATTTTGAGGACAGCCACCTCCA-3' (配列番号：１４５)
正方向２　：5'-CATCAAGCGCCTCTACCA-3' (配列番号：１４６)
逆方向２　：5'-CACAAACTCGAACTGCTTCTG-3' (配列番号：１４７)
プローブ２：5'-CAGCTGCCCTTCCCCAACCA-3' (配列番号：１４８)
ＰＲＯ２４６(ＤＮＡ３５６３９-１１７２)
正方向　　：5'-GGCAGAGACTTCCAGTCACTGA-3' (配列番号：１４９)
逆方向　　：5'-GCCAAGGGTGGTGTTAGATAGG-3' (配列番号：１５０)
プローブ　：5'-CAGGCCCCCTTGATCTGTACCCCA-3' (配列番号：１５１)

【０２２０】

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リコンの生成に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 7700^{TM}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ＰＲＯ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]	1A			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

【０２２１】
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7.5x10８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、QuiagenＲＮＡｓｅＡストック(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

l)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(200μl、上記のように調製)を添加し、５０℃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℃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ｄｄＨ２Ｏ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℃で貯蔵した。ＤＮＡｓｅＡ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きなチップを用いて、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ｄｄＨ２Ｏで２ｘ３０秒間、次いでＧ２バッファー(50ml)でスピンさせる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℃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℃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ｄｄＨ２Ｏ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℃で貯蔵した。ＤＮＡｓｅＡを100mg/mlのストックから最終濃度200μg/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ｄｄＨ２Ｏ(ともに予め４℃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スイングバケットローターで、４℃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℃)及び6mlのｄｄＨ２Ｏ(４℃)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200μl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(200μl)し、５０℃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℃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℃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℃)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ロータで４℃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℃)を添加した。試料を、SS-34ロータで４℃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℃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℃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５ｘ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(5μｌＤＮＡ＋95μｌｄｄＨ２Ｏ)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。

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、Taqman^{TM}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。

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ΔＣｔ値を以下の表９に報告する。

【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ΔCt1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
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
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
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

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⊿Ct1値

原発性腫瘍又は細胞系列	PRO187	PRO533	PRO246
CT6	1.10		
CT7	1.40		
CT9	1.39		1.09
CT11	2.22		1.48
	2.26		1.12

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ーブ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-α、トロンボスポンジン、ＶＥＧＦ-β、アンギオポエイチン-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、1x106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ＩｇＧ処理対照と比較して、ＰＲＯ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：ＰＲＯ９９４０。
【０２２８】
実施例７１：周皮細胞を活性化させるＰＲＯポリペプチドの同定(アッセイ１２５)
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相関しており、よって、周皮細胞の増殖を誘発可能なＰＲＯ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、５ml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９６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100μlの特定のＰＲＯポリペプチド又は対照処理体(ポジティブ対照＝ＤＥＭ＋5%＋／－ＰＤＧＦ@500ng/ml；ネガティブ対照＝ＰＩＮ３２、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-ｆｏｓ及びＧＡＰＤＨ遺伝子発現レベルを測定し、複製を平均し、ＳＤを決定した。ｃ-ｆｏｓ値をＧＡＰＤＨに標準化し、結果をＰＩＮ２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。
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：ＰＲＯ２１７。
【０２２９】
実施例７２：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。
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ＰＲＯポリペプチドをヒトＩｇＧのＦｃ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ＰＲＯポリペプチドレセプターを発現する細胞(例えばＣｏｓ細胞)と相互作用させ、Ｆｃ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ＰＲＯポリペプチドをコードするｃＤＮＡ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ＰＲＯ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、ＰＲＯポリペプチドイムノアドヘシンのＦｃ部分に対する蛍光抱合抗体(例えば、ＦＩＴＣ抱合ヤギ抗ヒトＦｃ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

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と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と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

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

【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、どれが最初であろうとも、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。

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。

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。

【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。

【図５】天然配列ＰＲＯ１８３ｃＤＮＡ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ＰＲＯ１８５ｃＤＮＡ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ＰＲＯ２１０ｃＤＮＡ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ＰＲＯ２１５ｃＤＮＡ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ＰＲＯ２１７ｃＤＮＡ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ＰＲＯ２４２ｃＤＮＡ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ＰＲＯ２８８ｃＤＮＡ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ＰＲＯ３６５ｃＤＮＡ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ＰＲＯ１３６１ｃＤＮＡ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ＰＲＯ１３０８ｃＤＮＡ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ＰＲＯ１１８３ｃＤＮＡ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。

【図２６】図２５に示した配列番号：５１のコード配列から誘導されたアミノ酸配列(配列番号：５２)を示す。
【図２７】天然配列ＰＲＯ１２７２ｃＤＮＡのヌクレオチド配列(配列番号：５３)を示し、配列番号：５３は、ここで「ＤＮＡ６４８９６-１５３９」と命名されるクローンである。
【図２８】図２７に示した配列番号：５３のコード配列から誘導されたアミノ酸配列(配列番号：５４)を示す。
【図２９】天然配列ＰＲＯ１４１９ｃＤＮＡのヌクレオチド配列(配列番号：５５)を示し、配列番号：５５は、ここで「ＤＮＡ７１２９０-１６３０」と命名されるクローンである。
【図３０】図２９に示した配列番号：５５のコード配列から誘導されたアミノ酸配列(配列番号：５６)を示す。
【図３１】天然配列ＰＲＯ４９９９ｃＤＮＡのヌクレオチド配列(配列番号：５７)を示し、配列番号：５７は、ここで「ＤＮＡ９６０３１-２６６４」と命名されるクローンである。
【図３２】図３１に示した配列番号：５７のコード配列から誘導されたアミノ酸配列(配列番号：５８)を示す。
【図３３】天然配列ＰＲＯ７１７０ｃＤＮＡのヌクレオチド配列(配列番号：６２)を示し、配列番号：６２は、ここで「ＤＮＡ１０８７２２-２７４３」と命名されるクローンである。
【図３４】図３３に示した配列番号：６２のコード配列から誘導されたアミノ酸配列(配列番号：６３)を示す。
【図３５】天然配列ＰＲＯ２４８ｃＤＮＡのヌクレオチド配列(配列番号：６４)を示し、配列番号：６４は、ここで「ＤＮＡ３５６７４-１１４２」と命名されるクローンである。
【図３６】図３５に示した配列番号：６４のコード配列から誘導されたアミノ酸配列(配列番号：６５)を示す。
【図３７】天然配列ＰＲＯ３５３ｃＤＮＡのヌクレオチド配列(配列番号：７２)を示し、配列番号：７２は、ここで「ＤＮＡ４１２３４」と命名されるクローンである。
【図３８】図３７に示した配列番号：７２のコード配列から誘導されたアミノ酸配列(配列番号：７３)を示す。
【図３９】天然配列ＰＲＯ１３１８ｃＤＮＡのヌクレオチド配列(配列番号：７７)を示し、配列番号：７７は、ここで「ＤＮＡ７３８３８-１６７４」と命名されるクローンである。
【図４０】図３９に示した配列番号：７７のコード配列から誘導されたアミノ酸配列(配列番号：７８)を示す。
【図４１】天然配列ＰＲＯ１６００ｃＤＮＡのヌクレオチド配列(配列番号：７９)を示し、配列番号：７９は、ここで「ＤＮＡ７７５０３-１６８６」と命名されるクローンである。
【図４２】図４１に示した配列番号：７９のコード配列から誘導されたアミノ酸配列(配列番号：８０)を示す。
【図４３】天然配列ＰＲＯ９９４０ｃＤＮＡのヌクレオチド配列(配列番号：８３)を示し、配列番号：８３は、ここで「ＤＮＡ９２２８２」と命名されるクローンである。
【図４４】図４３に示した配列番号：８３のコード配列から誘導されたアミノ酸配列(配列番号：８４)を示す。
【図４５】天然配列ＰＲＯ５３３ｃＤＮＡのヌクレオチド配列(配列番号：８５)を示し、配列番号：８５は、ここで「ＤＮＡ４９４３５-１２１９」と命名されるクローンである。
【図４６】図４５に示した配列番号：８５のコード配列から誘導されたアミノ酸配列(配列番号：８６)を示す。

【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。

【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】

```
GGCTGAGGGGAGGCCCGGAGCCTTTCTGGGGCCTGGGGGATCCTCTTGCACTGGTGGGTGGA
GAGAAGCGCCTGCAGCCAACCAGGGTCAGGCTGTGCTCACAGTTTCCTCTGGCGGCATGTAA
AGGCTCCACAAAGGAGTTGGGAGTTCAAATGAGGCTGCTGCGGACGGCCTGAGGATGGACCC
CAAGCCCTGGACCTGCCGAGCGTGGCACTGAGGCAGCGGCTGACGCTACTGTGAGGGAAAGA
AGGTTGTGAGCAGCCCCGCAGGACCCCTGGCCAGCCCTGGCCCCAGCCTCTGCCGGAGCCCT
CTGTGGAGGCAGAGCCAGTGGAGCCCAGTGAGGCAGGGCTGCTTGGCAGCCACCGGCCTGCA
ACTCAGGAACCCCTCCAGAGGCCATGGACAGGCTGCCCCGCTGACGGCCAGGGTGAAGCATG
TGAGGAGCCGCCCCGGAGCCAAGCAGGAGGGAAGAGGCTTTCATAGATTCTATTCACAAAGA
ATAACCACCATTTTGCAAGGACCATGAGGCCACTGTGCGTGACATGCTGGTGGCTCGGACTG
CTGGCTGCCATGGGAGCTGTTGCAGGCCAGGAGGACGGTTTTGAGGGCACTGAGGAGGGCTC
GCCAAGAGAGTTCATTTACCTAAACAGGTACAAGCGGGCGGGCGAGTCCCAGGACAAGTGCA
CCTACACCTTCATTGTGCCCCAGCAGCGGGTCACGGGTGCCATCTGCGTCAACTCCAAGGAG
CCTGAGGTGCTTCTGGAGAACCGAGTGCATAAGCAGGAGCTAGAGCTGCTCAACAATGAGCT
GCTCAAGCAGAAGCGGCAGATCGAGACGCTGCAGCAGCTGGTGGAGGTGGACGGCGGCATTG
TGAGCGAGGTGAAGCTGCTGCGCAAGGAGAGCCGCAACATGAACTCGCGGGTCACGCAGCTC
TACATGCAGCTCCTGCACGAGATCATCCGCAAGCGGGACAACGCGTTGGAGCTCTCCCAGCT
GGAGAACAGGATCCTGAACCAGACAGCCGACATGCTGCAGCTGGCCAGCAAGTACAAGGACC
TGGAGCACAAGTACCAGCACCTGGCCACACTGGCCCACAACCAATCAGAGATCATCGCGCAG
CTTGAGGAGCACTGCCAGAGGGTGCCCTCGGCCAGGCCCGTCCCCCAGCCACCCCCGCTGC
CCCGCCCCGGGTCTACCAACCACCCACCTACAACCGCATCATCAACCAGATCTCTACCAACG
AGATCCAGAGTGACCAGAACCTGAAGGTGCTGCCACCCCCTCTGCCCACTATGCCCACTCTC
ACCAGCCTCCCATCTTCCACCGACAAGCCGTCGGGCCCATGGAGAGACTGCCTGCAGGCCCT
GGAGGATGGCCACGACACCAGCTCCATCTACCTGGTGAAGCCGGAGAACACCAACCGCCTCA
TGCAGGTGTGGTGCGACCAGAGACACGACCCCGGGGGCTGGACCGTCATCCAGAGACGCCTG
GATGGCTCTGTTAACTTCTTCAGGAACTGGGAGACGTACAAGCAAGGGTTTGGGAACATTGA
CGGCGAATACTGGCTGGGCCTGGAGAACATTTACTGGCTGACGAACCAAGGCAACTACAAAC
TCCTGGTGACCATGGAGGACTGGTCCGGCCGCAAAGTCTTTGCAGAATACGCCAGTTTCCGC
CTGGAACCTGAGAGCGAGTATTATAAGCTGCGGCTGGGGCGCTACCATGGCAATGCGGGTGA
CTCCTTTACATGGCACAACGGCAAGCAGTTCACCACCCTGGACAGAGATCATGATGTCTACA
CAGGAAACTGTGCCCACTACCAGAAGGGAGGCTGGTGGTATAACGCCTGTGCCCACTCCAAC
CTCAACGGGGTCTGGTACCGCGGGGGCCATTACCGGAGCCGCTACCAGGACGGAGTCTACTG
GGCTGAGTTCCGAGGAGGCTCTTACTCACTCAAGAAAGTGGTGATGATGATCCGACCGAACC
CCAACACCTTCCACTAAGCCAGCTCCCCCTCCTGACCTCTCGTGGCCATTGCCAGGAGCCCA
CCCTGGTCACGCTGGCCACAGCACAAAGAACAACTCCTCACCAGTTCATCCTGAGGCTGGGA
GGACCGGGATGCTGGATTCTGTTTCCGAAGTCACTGCAGCGGATGATGGAACTGAATCGAT
ACGGTGTTTCTGTCCCTCCTACTTTCCTTCACACCAGACAGCCCCTCATGTCTCCAGGACA
GGACAGGACTACAGACAACTCTTTCTTTAAATAAATTAAGTCTCTACAATAAAAAAAA
```

【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
MRPLCVTCWWLGLLAAMGAVAGQEDGFEGTEEGSPREFIYLNRYKRAGESQDKCTYTFIVPQ
QRVTGAICVNSKEPEVLLENRVHKQELELLNNELLKQKRQIETLQQLVEVDGGIVSEVKLLR
KESRNMNSRVTQLYMQLLHEIIRKRDNALELSQLENRILNQTADMLQLASKYKDLEHKYQHL
ATLAHNQSEIIAQLEEHCQRVPSARPVPQPPPAAPPRVYQPPTYNRIINQISTNEIQSDQNL
KVLPPPLPTMPTLTSLPSSTDKPSGPWRDCLQALEDGHDTSSIYLVKPENTNRLMQVWCDQR
HDPGGWTVIQRRLDGSVNFFRNWETYKQGFGNIDGEYWLGLENIYWLTNQGNYKLLVTMEDW
SGRKVFAEYASFRLEPESEYYKLRLGRYHGNAGDSFTWHNGKQFTTLDRDHDVYTGNCAHYQ
KGGWWYNACAHSNLNGVWYRGGHYRSRYQDGVYWAEFRGGSYSLKKVVMMIRPNPNTFH

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-ミリストイル化部位
アミノ酸　　12-18, 18-24, 22-28, 29-35, 114-120, 341-347, 465-471, 473-479
アミド化部位
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ーチャー
アミノ酸　　438-451
フィブリノーゲンベータ及びガンマン鎖C末端ドメインシグネーチャータンパク質
アミノ酸　　305-343, 365-402, 411-424, 428-458
トレハラーゼタンパク質
アミノ酸　　275-292
```

【図３】

CCCACGCGTCCGGCGCCGTGGCCTCGCGTCCATCTTTGCCGTTCTCTCGGACCTGTCACAAA
GGAGTCGCGCCGCCGCCGCCGCCCCCTCCCTCCGGTGGGCCCGGGAGGTAGAGAAAGTCAGT
GCCACAGCCCGACCGCGCTGCTCTGAGCCCTGGGCACGCGGAACGGGAGGGAGTCTGAGGGT
TGGGGACGTCTGTGAGGGAGGGGAACAGCCGCTCGAGCCTGGGGCGGGCGGACCGGACTGGG
GCCGGGGGTAGGCTCTGGAAAGGGCCCGGGAGAGAGGTGGCGTTGGTCAGAACCTGAGAAACA
GCCGAGAGGTTTTCCACCGAGGCCCGCGCTTGAGGGATCTGAAGAGGTTCCTAGAAGAGGGT
GTTCCCTCTTTCGGGGGTCCTCACCAGAAGAGGTTCTTGGGGGTCGCCCTTCTGAGGAGGCT
GCGGCTAACAGGGCCCAGAACTGCCATTGGATGTCCAGAATCCCCTGTAGTTGATAATGTTG
GGAATAAGCTCTGCAACTTTCTTTGGCATTCAGTTGTTAAAAACAAATAGGATGCAAATTCC
TCAACTCCAGGTTATGAAAACAGTACTTGGAAAACTGAAAACTACCTAAATGATCGTCTTTG
GTTGGGCCGTGTTCTTAGCGAGCAGAAGCCTTGGCCAGGGTCTGTTGTTGACTCTCGAAGAG
CACATAGCCCACTTCCTAGGGACTGGAGGTGCCGCTACTACCATGGGTAATTCCTGTATCTG
CCGAGATGACAGTGGAACAGATGACAGTGTTGACACCCAACAGCAACAGGCCGAGAACAGTG
CAGTACCCACTGCTGACACAAGGAGCCAACCACGGGACCCTGTTCGGCCACCAAGGAGGGGC
CGAGGACCTCATGAGCCAAGGAGAAAGAAACAAAATGTGGATGGGCTAGTGTTGGACACACT
GGCAGTAATACGGACTCTTGTAGATAAGTAAGTATCTGACTCACGGTCACCTCCAGTGGAAT
GAAAAGTGTTCTGCCCGGAACCATGACTTTAGGACTCCTTCAGTTCCTTTAGGACATACTCG
CCAAGCCTTGTGCTCACAGGGCAAAGGAGAATATTTTAATGCTCCGCTGATGGCAGAGTAAA
TGATAAGATTTGATGTTTTTGCTTGCTGTCATCTACTTTGTCTGGAAATGTCTAAATGTTTC
TGTAGCAGAAAACACGATAAAGCTATGATCTTTATTAGAG

【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
MIVFGWAVFLASRSLGQGLLLTLEEHIAHFLGTGGAATTMGNSCICRDDSGTDDSVDTQQQQ
AENSAVPTADTRSQPRDPVRPPRRGRGPHEPRRKKQNVDGLVLDTLAVIRTLVDK

重要な特徴
シグナルペプチド
アミノ酸　1-16

N-ミリストイル化部位
アミノ酸　18-24, 32-38, 34-40, 35-41, 51-57

【図５】

CCCACGCGTCCGCGCAGTCGCGCAGTTCTGCCTCCGCCTGCCAGTCTCGCCCGCGATCCCGG
CCCGGGGCTGTGGCGTCGACTCCGACCCAGGCAGCCAGCAGCCCCGCGCGGGAGCCCGGACCGC
CGCCGGAGGAGCTCGGACGGCATGCTGAGCCCCCTCCTTTGCTGAAGCCCGAGTGCGGAGAA
GCCCGGGCAAACGCAGGCTAAGGAGACCAAAGCGGCGAAGTCGCGAGACAGCGGACAAGCAG
CGGAGGAGAAGGAGGAGGAGGCGAACCCAGAGAGGGGCAGCAAAAGAAGCGGTGGTGGTGGG
CGTCGTGGCCATGGCGGCGGCTATCGCCAGCTCGCTCATCCGTCAGAAGAGGCAAGCCCGCG
AGCGCGAGAAATCCAACGCCTGCAAGTGTGTCAGCAGCCCCAGCAAAGGCAAGACCAGCTGC
GACAAAAACAAGTTAAATGTCTTTTCCCGGGTCAAACTCTTCGGCTCCAAGAAGAGGCGCAG
AAGAAGACCAGAGCCTCAGCTTAAGGGTATAGTTACCAAGCTATACAGCCGACAAGGCTACC
ACTTGCAGCTGCAGGCGGATGGAACCATTGATGGCACCAAAGATGAGGACAGCACTTACACT
CTGTTTAACCTCATCCCTGTGGGTCTGCGAGTGGTGGCTATCCAAGGAGTTCAAACCAAGCT
GTACTTGGCAATGAACAGTGAGGGATACTTGTACACCTCGGAACTTTTCACACCTGAGTGCA
AATTCAAAGAATCAGTGTTTGAAAATTATTATGTGACATATTCATCAATGATATACCGTCAG
CAGCAGTCAGGCCGAGGGTGGTATCTGGGTCTGAACAAAGAAGGAGAGATCATGAAAGGCAA
CCATGTGAAGAAGAACAAGCCTGCAGCTCATTTTCTGCCTAAACCACTGAAAGTGGCCATGT
ACAAGGAGCCATCACTGCACGATCTCACGGAGTTCTCCCGATCTGGAAGCGGGACCCCAACC
AAGAGCAGAAGTGTCTCTGGCGTGCTGAACGGAGGCAAATCCATGAGCCACAATGAATCAAC
GTAGCCAGTGAGGGCAAAAGAAGGGCTCTGTAACAGAACCTTACCTCCAGGTGCTGTTGAAT
TCTTCTAGCAGTCCTTCACCCAAAAGTTCAAATTTGTCAGTGACATTTACCAAACAAACAGG
CAGAGTTCACTATTCTATCTGCCATTAGACCTTCTTATCATCCATACTAAAGC

【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
MAAAIASSLIRQKRQARENEKSNACKCVSSPSKGKTSCDKNKLNVFSRVKLFGSKKRRRRRP
EPQLKGIVTKLYSRQGYHLQLQADGTIDGTKDEDSTYTLFNLIPVGLRVVAIQGVQTKLYLA
MNSEGYLYTSELFTPECKFKESVFENYYVTYSSMIYRQQQSGRGWYLGLNKEGEIMKGNHVK
KNKPAAHFLPKPLKVAMYKEPSLHDLTEFSRSGSGTPTKSRSVSGVLNGGKSMSHNEST

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-ミリストイル化部位
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７】

ATGGCCGCGGCCATCGCTAGCGGCTTGATCCGCCAGAAGCGGCAGGCGCGGGAGCAGCACTG
GGACCGGCCGTCTGCCAGCAGGAGGCGGAGCAGCCCCAGCAAGAACCGCGGGCTCTGCAACG
GCAACCTGGTGGATATCTTCTCCAAAGTGCGCATCTTCGGCCTCAAGAAGCGCAGGTTGCGG
CGCCAAGATCCCCAGCTCAAGGGTATAGTGACCAGGTTATATTGCAGGCAAGGCTACTACTT
GCAAATGCACCCCGATGGAGCTCTCGATGGAACCAAGGATGACAGCACTAATTCTACACTCT
TCAACCTCATACCAGTGGGACTACGTGTTGTTGCCATCCAGGGAGTGAAAACAGGGTTGTAT
ATAGCCATGAATGGAGAAGGTTACCTCTACCCATCAGAACTTTTTACCCCTGAATGCAAGTT
TAAAGAATCTGTTTTTGAAAATTATTATGTAATCTACTCATCCATGTTGTACAGACAACAGG
AATCTGGTAGAGCCTGGTTTTTGGGATTAAATAAGGAAGGGCAAGCTATGAAAGGGAACAGA
GTAAAGAAAACCAAACCAGCAGCTCATTTTCTACCCAAGCCATTGGAAGTTGCCATGTACCG
AGAACCATCTTTGCATGATGTTGGGGAAACGGTCCCGAAGCCTGGGGTGACGCCAAGTAAAA
GCACAAGTGCGTCTGCAATAATGAATGGAGGCAAACCAGTCAACAAGAGTAAGACAACATAG

【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
MAAAIASGLIRQKRQAREQHWDRPSASRRRSSPSKNRGLCNGNLVDIFSKVRIFGLKKRRLR
RQDPQLKGIVTRLYCRQGYYLQMHPDGALDGTKDDSTNSTLFNLIPVGLRVVAIQGVKTGLY
IAMNGEGYLYPSELFTPECKFKESVFENYYVIYSSMLYRQQESGRAWFLGLNKEGQAMKGNR
VKKTKPAAHFLPKPLEVAMYREPSLHDVGETVPKPGVTPSKSTSASAIMNGGKPVNKSKTT

N-グリコシル化部位
アミノ酸　100-104, 242-246

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　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-ミリストイル化部位
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９】

CTCGCAGCCGAGCGCGGCCGGGGAAGGGCTCTCCTTCCAGCGCCGAGCACTGGGCCCTGGCA
GACGCCCCAAGATTGTTGTGAGGAGTCTAGCCAGTTGGTGAGCGCTGTAATCTGAACCAGCT
GTGTCCAGACTGAGGCCCCATTTGCATTGTTTAACATACTTAGAAAATGAAGTGTTCATTTT
TAACATTCCTCCTCCAATTGGTTTAATGCTGAATTACTGAAGAGGGCTAAGCAAAACCAGGT
GCTTGCGCTGAGGGCTCTGCAGTGGCTGGGAGGACCCCGGCGCTCTCCCCGTGTCCTCTCCA
CGACTCGCTCGGCCCCTCTGGAATAAAACACCCGCGAGCCCCGAGGGCCCAGAGGAGGCCGA
CGTGCCCGAGCTCCTCCGGGGGTCCCGCCCGCGAGCTTTCTTCTCGCCTTCGCATCTCCTCC
TCGCGCGTCTTGGACATGCCAGGAATAAAAAGGATACTCACTGTTACCATTCTGGCTCTCTG
TCTTCCAAGCCCTGGGAATGCACAGGCACAGTGCACGAATGGCTTTGACCTGGATCGCCAGT
CAGGACAGTGTTTAGATATTGATGAATGCCGAACCATCCCCGAGGCCTGCCGAGGAGACATG
ATGTGTGTTAACCAAAATGGCGGGTATTTATGCATTCCCCGGACAAACCCTGTGTATCGAGG
GCCCTACTCGAACCCCTACTCGACCCCCTACTCAGGTCCGTACCCAGCAGCTGCCCCACCAC
TCTCAGCTCCAAACTATCCCACGATCTCCAGGCCTCTTATATGCCGCTTTGGATACCAGATG
GATGAAAGCAACCAATGTGTGGATGTGGACGAGTGTGCAACAGATTCCCACCAGTGCAACCC
CACCCAGATCTGCATCAATACTGAAGGCGGGTACACCTGCTCCTGCACCGACGGATATTGGC
TTCTGGAAGGCCAGTGCTTAGACATTGATGAATGTCGCTATGGTTACTGCCAGCAGCTCTGT
GCGAATGTTCCTGGATCCTATTCTTGTACATGCAACCCTGGTTTTACCCTCAATGAGGATGG
AAGGTCTTGCCAAGATGTGAACGAGTGTGCCACCGAGAACCCCTGCGTGCAAACCTGCGTCA
ACACCTACGGCTCTCTCATCTGCCGCTGTGACCCAGGATATGAACTTGAGGAAGATGGCGTT
CATTGCAGTGATATGGACGAGTGCAGCTTCTCTGAGTTCCTCTGCCAACATGAGTGTGTGAA
CCAGCCCGGCACATACTTCTGCTCCTGCCCTCCAGGCTACATCCTGCTGGATGACAACCGAA
GCTGCCAAGACATCAACGAATGTGAGCACAGGAACCACACGTGCAACCTGCAGCAGACGTGC
TACAATTTACAAGGGGGCTTCAAATGCATCGACCCCATCCGCTGTGAGGAGCCTTATCTGAG
GATCAGTGATAACCGCTGTATGTGTCCTGCTGAGAACCCTGGCTGCAGAGACCAGCCCTTTA
CCATCTTGTACCGGGACATGGACGTGGTGTCAGGACGCTCCGTTCCCGCTGACATCTTCCAA
ATGCAAGCCACGACCCGCTACCCTGGGGCCTATTACATTTTCCAGATCAAATCTGGGAATGA
GGGCAGAGAATTTTACATGCGGCAAACGGGCCCCATCAGTGCCACCCTGGTGATGACACGCC
CCATCAAAGGGCCCCGGGAAATCCAGCTGGACTTGGAAATGATCACTGTCAACACTGTCATC
AACTTCAGAGGCAGCTCCGTGATCCGACTGCGGATATATGTGTCGCAGTACCCATTCTGAGC
CTCGGGCTGGAGCCTCCGACGCTGCCTCTCATTGGCACCAAGGGACAGGAGAAGAGAGGAAA
TAACAGAGAGAATGAGAGCGACACAGACGTTAGGCATTTCCTGCTGAACGTTCCCCGAAGA
GTCAGCCCCGACTTCCTGACTCTCACCTGTACTATTGCAGACCTGTCACCCTGCAGGACTTG
CCACCCCCAGTTCCTATGACACAGTTATCAAAAAGTATTATCATTGCTCCCCTGATAGAAGA
TTGTTGGTGAATTTTCAAGGCCTTCAGTTTATTTCCACTATTTTCAAAGAAAATAGATTAGG
TTTGCGGGGGTCTGAGTCTATGTTCAAAGACTGTGAACAGCTTGCTGTCACTTCTTCACCTC
TTCCACTCCTTCTCTCACTGTGTTACTGCTTTGCAAAGACCCGGGAGCTGGCGGGGAACCCT
GGGAGTAGCTAGTTTGCTTTTGCGTACACAGAGAAGGCTATGTAAACAAACCACAGCAGGA
TCGAAGGGTTTTAGAGAATGTGTTTCAAAACCATGCCTGGTATTTTCAACCATAAAAGAAG
TTTCAGTTGTCCTTAAATTTGTATAACGGTTTAATTCTGTCTTGTTCATTTTGAGTATTTTT
AAAAAATATGTCGTAGAATTCCTTCGAAAGGCCTTCAGACACATGCTATGTTCTGTCTTCCC
AAACCCAGTCTCCTCTCCATTTAGCCCAGTGTTTTCTTTGAGGACCCCTTAATCTTGCTTT
CTTTAGAATTTTTACCCAATTGGATTGGAATGCAGAGGTCTCCAAACTGATTAAATATTTGA
AGAGA

【図１０】

MPGIKRILTVTILALCLPSPGNAQAQCTNGFDLDRQSGQCLDIDECRTIPEACRGDMMCVNQ
NGGYLCIPRTNPVYRGPYSNPYSTPYSGPYPAAAPPLSAPNYPTISRPLICRFGYQMDESNQ
CVDVDECATDSHQCNPTQICINTEGGYTCSCTDGYWLLEGQCLDIDECRYGYCQQLCANVPG
SYSCTCNPGFTLNEDGRSCQDVNECATENPCVQTCVNTYGSLICRCDPGYELEEDGVHCSDM
DECSFSEFLCQHECVNQPGTYFCSCPPGYILLDDNRSCQDINECEHRNHTCNLQQTCYNLQG
GFKCIDPIRCEEPYLRISDNRCMCPAENPGCRDQPFTILYRDMDVVSGRSVPADIFQMQATT
RYPGAYYIFQIKSGNEGREFYMRQTGPISATLVMTRFIKGPREIQLDLEMITVNTVINFRGS
SVIRLRIYVSQYPF

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　283-287, 296-300

N-ミリストイル化部位

アミノ酸　21-27, 64-70, 149-155, 186-192, 226-232, 242-248, 267-273, 310-316

アスパラギン酸及びアスパラギンヒドロキシル化部位

アミノ酸　144-156, 181-193, 262-274

細胞接着配列

アミノ酸　54-57

カルシウム結合EGF-様

アミノ酸　131-166, 172-205, 211-245, 251-286

【図１１】

CAGGTCCAACTGCACCTCGGTTCTATCGATTGAATTCCCCGGGGATCCTCTAGAGATCCCTC
GACCTCGACCCACGCGTCCGAACACAGGTCCTTGTTGCTGCAGAGAAGCAGTTGTTTTGCTG
GAAGGAGGGAGTGCGCGGGCTGCCCCGGGCTCCTCCCTGCCGCCTCCTCTCAGTGGATGGTT
CCAGGCACCCTGTCTGGGGCAGGGAGGGCACAGGCCTGCACATCGAAGGTGGGGTGGGACCA
GGCTGCCCCTCGCCCCAGCATCCAAGTCCTCCCTTGGGCGCCCGTGGCCCTGCAGACTCTCA
GGGCTAAGGTCCTCTGTTGCTTTTGGTTCCACCTTAGAAGAGGCTCCGCTTGACTAAGAGT
AGCTTGAAGGAGGCACCATGCAGGAGCTGCATCTGCTCTGGTGGGCGCTTCTCCTGGGCCTG
GCTCAGGCCTGCCCTGAGCCCTGCGACTGTGGGGAAAAGTATGGCTTCCAGATCGCCGACTG
TGCCTACCGCGACCTAGAATCCGTGCCGCCTGGCTTCCCGGCCAATGTGACTACACTGAGCC
TGTCAGCCAACCGGCTGCCAGGCTTGCCGGAGGGTGCCTTCAGGGAGGTGCCCCTGCTGCAG
TCGCTGTGGCTGGCACACAATGAGATCCGCACGGTGGCCGCCGGAGCCCTGGCCTCTCTGAG
CCATCTCAAGAGCCTGGACCTCAGCCACAATCTCATCTCTGACTTTGCCTGGAGCGACCTGC
ACAACCTCAGTGCCCTCCAATTGCTCAAGATGGACAGCAACGAGCTGACCTTCATCCCCCGC
GACGCCTTCCGCAGCCTCCGTGCTCTGCGCTCGCTGCAACTCAACCACAACCGCTTGCACAC
ATTGGCCGAGGGCACCTTCACCCCGCTCACCGCGCTGTCCCACCTGCAGATCAACGAGAACC
CCTTCGACTGCACCTGCGGCATCGTGTGGCTCAAGACATGGGCCCTGACCACGGCCGTGTCC
ATCCCGGAGCAGGACAACATCGCCTGCACCTCACCCCATGTGCTCAAGGGTACACCGCTGAG
CCGCCTGCCGCCACTGCCATGCTCGGCGCCCTCAGTGCAGCTCAGCTACCAACCCAGCCAGG
ATGGTGCCGAGCTGCGGCCTGGTTTTGTGCTGGCACTGCACTGTGATGTGGACGGGCAGCCG
GCCCCTCAGCTTCACTGGCACATCCAGATACCCAGTGGCATTGTGGAGATCACCAGCCCCAA
CGTGGGCACTGATGGGCGTGCCCTGCCTGGCACCCCTGTGGCCAGCTCCCAGCCGCGCTTCC
AGGCCTTTGCCAATGGCAGCCTGCTTATCCCCGACTTTGGCAAGCTGGAGGAAGGCACCTAC
AGCTGCCTGGCCACCAATGAGCTGGGCAGTGCTGAGAGCTCAGTGGACGTGGCACTGGCCAC
GCCCGGTGAGGGTGGTGAGGACACACTGGGGCGCAGGTTCCATGGCAAAGCGGTTGAGGGAA
AGGGCTGCTATACGGTTGACAACGAGGTGCAGCCATCAGGGCCGGAGGACAATGTGGTCATC
ATCTACCTCAGCCGTGCTGGGAACCCTGAGGCTGCAGTCGCAGAAGGGGTCCCTGGGCAGCT
GCCCCCAGGCCTGCTCCTGCTGGGCCAAAGCCTCCTCCTCTTCTTCCTCACCTCCTTCTAG
CCCCACCCAGGGCTTCCCTAACTCCTCCCCTTGCCCCTACCAATGCCCCTTTAAGTGCTG
CAGGGGTCTGGGGTTGGCAACTCCTGAGGCCTGCATGGGTGACTTCACATTTTCCTACCTCT
CCTTCTAATCTCTTCTAGAGCACCTGCTATCCCCAACTTCTAGACCTGCTCCAAACTAGTGA
CTAGGATAGAATTTGATCCCCTAACTCACTGTCTGCGGTGCTCATTGCTGCTAACAGCATTG
CCTGTGCTCTCCTCTCAGGGGCAGCATGCTAACGGGGCGACGTCCTAATCCAACTGGGAGAA
GCCTCAGTGGTGGAATTCCAGGCACTGTGACTGTCAAGCTGGCAAGGGCCAGGATTGGGGGA
ATGGAGCTGGGGCTTAGCTGGGAGGTGGTCTGAAGCAGACAGGGAATGGGAGAGGAGGATGG
GAAGTAGACAGTGGCTGGTATGGCTCTGAGGCTCCCTGGGGCCTGCTCAAGCTCCTCCTGCT
CCTTGCTGTTTTCTGATGATTTGGGGGCTTGGGAGTCCCTTTGTCCTCATCTGAGACTGAAA
TGTGGGGATCCAGGATGGCCTTCCTTCCTCTTACCCTTCCTCCCTCAGCCTGCAACCTCTAT
CCTGGAACCTGTCCTCCCTTTCTCCCCAACTATGCATCTGTTGTCTGCTCCTCTGCAAAGGC
CAGCCAGCTTGGGAGCAGCAGAGAAATAAACAGCATTTCTGATGCCAAAAAAAAAAAAAAAA
AAGGGCGGCCGCGACTCTAGAGTCGACCT

【図１２】

MQELHLLWWALLLGLAQACPEPCDCGEKYGFQIADCAYRDLESVPPGFPANVTTLSLSANRL
PGLPEGAFREVPLLQSLWLAHNEIRTVAAGALASLSHLKSLDLSHNLISDFAWSDLHNLSAL
QLLKMDSNELTFIPRDAFRSLRALRSLQLNHNRLHTLAEGTFTPLTALSHLQINENPFDCTC
GIVWLKTWALTTAVSIPEQDNIACTSPHVLKGTPLSRLPPLPCSAPSVQLSYQPSQDGAELR
PGFVLALHCDVDGQPAPQLHWHIQIPSGIVEITSPNVGTDGRALPGTPVASSQPRFQAFANG
SLLIPDFGKLEEGTYSCLATNELGSAESSVDVALATPGEGGEDTLGRRFHGKAVEGKGCYTV
DNEVQPSGPEDNVVIIYLSRAGNPEAAVAEGVPGQLPPGLLLLGQSLLLFFFLTSF

タンパク質の重要な特徴

シグナルペプチド

アミノ酸　1-18

膜貫通ドメイン

アミノ酸　403-418

N-グリコシル化部位

アミノ酸　51-55, 120-124, 309-313

チロシンキナーゼリン酸化部位

アミノ酸　319-326

N-ミリストイル化部位

アミノ酸　14-20, 64-70, 92-98, 218-224, 294-300, 323-329, 334-340, 350-356, 394-400

アミド化部位

アミノ酸　355-359

ロイシンリッチリピート

アミノ酸　51-74, 75-98, 99-122, 123-146, 147-170

ロイシンリッチリピートC末端ドメイン

アミノ酸　180-230

【図１３】

CCAGGCCGGGAGGCGACGCGCCCAGCCGTCTAAACGGGAACAGCCCTGGCTGAGGGAGCTGC
AGCGCAGCAGAGTATCTGACGGCGCCAGGTTGCGTAGGTGCGGCACGAGGAGTTTTCCCGGC
AGCGAGGAGGTCCTGAGCAGC**ATG**GCCCGGAGGAGCGCCTTCCCTGCCGCCGCGCTCTGGCT
CTGGAGCATCCTCCTGTGCCTGCTGGCACTGCGGGCGGAGGCCGGGCCGCCGCAGGAGGAGA
GCCTGTACCTATGGATCGATGCTCACCAGGCAAGAGTACTCATAGGATTTGAAGAAGATATC
CTGATTGTTTCAGAGGGAAAATGGCACCTTTTACACATGATTTCAGAAAAGCGCAACAGAG
AATGCCAGCTATTCCTGTCAATATCCATTCCATGAATTTTACCTGGCAAGCTGCAGGGCAGG
CAGAATACTTCTATGAATTCCTGTCCTTGCGCTCCCTGGATAAAGGCATCATGGCAGATCCA
ACCGTCAATGTCCCTCTGCTGGGAACAGTGCCTCACAAGGCATCAGTTGTTCAAGTTGGTTT
CCCATGTCTTGGAAAACAGGATGGGGTGGCAGCATTTGAAGTGGATGTGATTGTTATGAATT
CTGAAGGCAACACCATTCTCCAAACACCTCAAAATGCTATCTTCTTTAAAACATGTCAACAA
GCTGAGTGCCCAGGCGGGTGCCGAAATGGAGGCTTTTGTAATGAAAGACGCATCTGCGAGTG
TCCTGATGGGTTCCACGGACCTCACTGTGAGAAAGCCCTTTGTACCCCACGATGTATGAATG
GTGGACTTTGTGTGACTCCTGGTTTCTGCATCTGCCCACCTGGATTCTATGGAGTGAACTGT
GACAAAGCAAACTGCTCAACCACCTGCTTTAATGGAGGGACCTGTTTCTACCCTGGAAAATG
TATTTGCCCTCCAGGACTAGAGGGAGAGCAGTGTGAAATCAGCAAATGCCCACAACCCTGTC
GAAATGGAGGTAAATGCATTGGTAAAAGCAAATGTAAGTGTTCCAAAGGTTACCAGGGAGAC
CTCTGTTCAAAGCCTGTCTGCGAGCCTGGCTGTGGTGCACATGGAACCTGCCATGAACCCAA
CAAATGCCAATGTCAAGAAGGTTGGCATGGAAGACACTGCAATAAAAGGTACGAAGCCAGCC
TCATACATGCCCTGAGGCCAGCAGGCGCCCAGCTCAGGCAGCACACGCCTTCACTTAAAAAG
GCCGAGGAGCGGCGGGGATCCACCTGAATCCAATTACATCTGG**TGA**ACTCCGACATCTGAAAC
GTTTTAAGTTACACCAAGTTCATAGCCTTTGTTAACCTTTCATGTGTTGAATGTTCAAATAA
TGTTCATTACACTTAAGAATACTGGCCTGAATTTTATTAGCTTCATTATAAATCACTGAGCT
GATATTTACTCTTCCTTTTAAGTTTTCTAAGTACGTCTGTAGCATGATGGTATAGATTTTCT
TGTTTCAGTGCTTTGGGACAGATTTTATATTATGTCAATTGATCAGGTTAAAATTTTCAGTG
TGTAGTTGGCAGATATTTTCAAAATTACAATGCATTTATGGTGTCTGGGGGCAGGGGAACAT
CAGAAAGGTTAAATTGGGCAAAAATGCGTAAGTCACAAGAATTTGGATGGTGCAGTTAATGT
TGAAGTTACAGCATTTCAGATTTTATTGTCAGATATTTAGATGTTTGTTACATTTTTAAAAA
TTGCTCTTAATTTTTAAACTCTCAATACAATATATTTTGACCTTACCATTATTCCAGAGATT
CAGTATTAAAAAAAAAAAAATTACACTGTGGTAGTGGCATTTAAACAATATAATATATTCTA
AACACAATGAAATAGGGAATATAATGTATGAACTTTTTGCATTGGCTTGAAGCAATATAATA
TATTGTAAACAAAACACAGCTCTTACCTAATAAACATTTTATACTGTTTGTATGTATAAAAT
AAAGGTGCTGCTTTAGTTTTTTGGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

【図１４】

MARRSAFPAAALWLWSILLCLLALRAEAGPPQEESLYLWIDAHQARVLIGFEEDILIVSEGK
MAPFTHDFRKAQQRMPAIPVNIHSMNFTWQAACQAEYFYEFLSLRSLDKGIMADPTVNVPLL
GTVPHKASVVQVGFPCLGKQDGVAAFEVDVIVMNSEGNTILQTPQNAIFFKTCQQAECPGGC
RNGGFCNERRICECPDGFHGPHCEKALCTPRCMNGGLCVTPGFCICPPGFYGVNCDKANCST
TCFNGGTCFYPGKCICPPGLEGEQCEISKCPQPCRNGGKCIGKSKCKCSKGYQGDLCSKPVC
EPGCGAHGTCHEPNKCQCQEGWHGRHCNKRYEASLIHALRPAGAQLRQHTPSLKKAEERRDP
PESNYIW

シグナル配列

アミノ酸　1-28

N-グリコシル化部位

アミノ酸　88-92, 245-249

チロシンキナーゼリン酸化部位

アミノ酸　370-378

N-ミリストイル化部位

アミノ酸　184-190, 185-191, 189-195, 315-321

ATP/GTP- 結合部位モチーフA（P-ループ）

アミノ酸　285-293

EGF-様ドメインシステインパターンシグネーチャー

アミノ酸　198-210, 230-242, 262-274, 294-306, 326-338

【図１５】

AGAACCTCAGAAATGTGAGTTATTTGGGAATGGCTGTTTGTAAATGTCCTTACGTAAGCCAA
GAGGAGGTCTTGACTTGGGGTCCCAGGGGTACCGCAGATCCCAGGGACTGGAGCAGCACTAG
CAAGCTCTGGAGGATGAGCCAGGAGTCTGGAATTGAGGCTGAGCCAAAGACCCCAGGGCCGT
CTCAGTCTCATAAAAGGGGATCAGGCAGGAGGAGTTTGGGAGAAACCTGAGAAGGCCCTGAT
TTGCAGCATC**ATG**ATGGGCCTCTCCTTGGCCTCTGCTGTGCTCCTGGCCTCCCTCCTGAGTC
TCCACCTTGGAACTGCCACACGTGGGAGTGACATATCCAAGACCTGCTGCTTCCAATACAGC
CACAAGCCCCTTCCCTGGACCTGGGTGCGAAGCTATGAATTCACCAGTAACAGCTGCTCCCA
GCGGGCTGTGATATTCACTACCAAAAGAGGCAAGAAAGTCTGTACCCATCCAAGGAAAAAAT
GGGTGCAAAAATACATTTCTTTACTGAAAACTCCGAAACAATTG**TGA**CTCAGCTGAATTTTC
ATCCGAGGACGCTTGGACCCCGCTCTTGGCTCTGCAGCCCTCTGGGGAGCCTGCGGAATCTT
TTCTGAAGGCTACATGGACCCGCTGGGGAGGAGAGGGTGTTCCTCCCAGAGTTACTTTAAT
AAAGGTTGTTCATAGAGTTGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

【図１６】

MMGLSLASAVLLASLLSLHLGTATRGSDISKTCCFQYSHKPLPWTWVRSYEETSNSCSQRAV
IFTTKRGKKVCTHPRKKWVQKYISLLKTPKQL

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

N-ミリストイル化部位

アミノ酸　3-9, 26-32

アミド化部位

アミノ酸　68-72

小サイトカイン（インテクリン/ケモカイン）

アミノ酸　23-88

【図１７】

GCGAGAACCTTTGCACGCGCACAAACTACGGGGACGATTTCTGATTGATTTTTGGCGCTTTCGATCCACCCTCC
TCCCTTCT**CATG**GGACTTTGGGGACAAAGCGTCCCGACCGCCTCGAGCGCTCGAGCAGGGCGCTATCCAGGAGC
CAGGACAGCGTCGGGAACCAGACCATGGCTCCTGGACCCCAAGATCCTTAAGTTCGTCGTCTTCATCGTCGCGG
TTCTGCTGCCGGTCCGGGTTGACTCTGCCACCATCCCCGGCAGGACGAAGTTCCCCAGCAGACAGTGGCCCCA
CAGCAACAGAGCCGCAGCCTCAAGGAGGAGGAGTGTCCAGCAGGATCTCATAGATCAGAATATACTGGAGCCTG
TAACCCGTGCACAGAGGGTGTGGAFTACACCATTGCTTCCAACAATTTGCCTTCTTGCCTGCTATGTACAGTTT
GTAAATCAGGTCAAACAAATAAAAGTTCCTGTACCACGACCAGAGACACCGTGTGTCAGTGTGAAAAAGGAAGC
TTCCAGGATAAAAACTCCCCTGAGATGTGCCGGACGTGTAGAACAGGGTGTCCCAGAGGGATGGTCAAGGTCAG
TAATTGTACGCCCCGGAGTGACATCAAGTGCAAAAATGAATCAGCTGCCAGTTCCACTGGGAAAACCCCAGCAG
CGGAGGAGACAGTGACCACCATCCTGGGGATGCTTGCCTCTCCCTATCACTACCTTATCATCATAGTGGTTTTA
GTCATCATTTTAGCTGTGGTTGTGGTTGGCTTTTCATGTCGGAAGAAATTCATTTCTTACCTCAAAGGCATCTG
CTCAGGTGGTGGAGGAGGTCCCGAACGTGTGCACAGAGTCCTTTTCCGGGCGGCGTTCATGTCCTTCACGAGTTC
CTGGGGCGGAGGACAATGCCCGCAACGAGACCCTGAGTAACAGATACTTGCAGCCCACCCAGGTCTCTGAGCAG
GAAATCCAAGGTCAGGAGCTGGCAGAGCTAACAGGTGTGACTGTAGAGTCGCCAGAGGAGCCACAGCGTCTGCT
GGAACAGGCAGAAGCTGAAGGGTGTCAGAGGAGGAGGCTGCTGGTTCCAGTGAATGACGCTGACTCCGCTGACA
TCAGCACCTTGCTGGATGCCTCGGCAACACTGGAAGAAGGACATGCAAAGGAAACAATTCAGGACCAACTGGTG
GGCTCCGAAAAGCTCTTTATGAAGAAGATGAGGCAGGCTCTGCTACGTCCTGCCTG**TGA**AAGAATCTCTTCAG
GAAACCAGAGCTTCCCTCATTTACCTTTTCTCCTACAAAGGGAAGCAGCCTGGAAGAAACAGTCCAGTACTTGA
CCCATGCCCCAACAAACTCTACTATCCAATATGGGGCAGCTTACCAATGGTCCTAGAACTTTGTTAACGCACTT
GGAGTAATTTTTATGAAATACTGCGTGTGATAAGCAAACGGGAGAAATTTATATCAGATTCTTGGCTGCATAGT
TATACGATTGTGTATTAAGGGTCGTTTTAGGCCACATGCGGTGGCTCATGCCTGTAATCCCAGCACTTTGATAG
GCTGAGGCAGGTGGATTGCTTGAGCTCGGGAGTTTGAGACCAGCCTCATCAACACAGTGAAACTCCATCTCAAT
TTAAAAAGAAAAAAAGTGGTTTTAGGATGTCATTCTTTGCAGTTCTTCATCATGAGACAAGTCTTTTTTTCTGC
TTCTTATATTGCAAGCTCCATCTCTACTGGTGTGCATTTAATGACATCTAACTACAGATGCCGCACAGCCAC
AATGCTTTGCCTTATAGTTTTTTAACTTTAGAACGGGATTATCTTGTTATTACCTGTATTTTCAGTTTCGGATA
TTTTTGACTTAATGATGAGATTATCAAGACGTAGCCCTATGCTAAGTCATGAGCATATGGACTTACGAGGGTTC
GACTTAGAGTTTTGAGCTTTAAGATAGGATTATTGGGGCTTACCCCCACCTTAATTAGAGAAACATTTATATTG
CTACTACTGTAGGCTGTACATCTCTTTTCCGATTTTTGTATAATGATGTAAACATGGAAAAACTTTAGGAAAT
GCACTTATTAGGCTGTTTACATGGGTTGCCTGGATACAAATCAGCAGTCAAAAATGACTAAAAATATAACTAGT
GACGGAGGGAGAAATCCTCCCTCTGTGGGAGGCACTTACTGCATTCCAGTTCTCCCTCCTGCGCCCTGAGACTG
GACGAGGGTTTGATGGCTGGCAGCTTCTCAAGGGGCAGCTTGTCTTACTTGTTAATTTAGAGGTATATAGCCA
TATTTATTTATAAACAAATATTTATTTATTTATTTATAAGTAGATGTTTACATATGCCCAGGATTTTGAAGAGC
CTGGTATCTTTGGGAAGCCATGTGTCTGGTTTGTCGTGCTGGGACAGTCATGGGACTGCATCTTCCGACTTGTC
CACAGCAGATGAGGACAGTGAGAATTAAGTTAGATCCGAGACTGCGAAGAGCTTCTCTTTCAAGCGCCATTACA
GTTGAACGTTAGTGAATCTTGAGCCTCATTTGGGCTCAGGGCAGAGCAGGTGTTTATCTGCCCCGGCATCTGCC
ATGGCATCAAGAGGGAAGAGTGGACGGTGCTTGGGAATGGTGTGAAATGGTTGCCGACTCAGGCATGGATGGGC
CCCTCTCGCTTCTGGTGGTCTGTGAACTGAGTCCCTGGGATGCCTTTTAGGGCAGAGATTCCTGAGCTGCGTTT
TAGGGTACAGATTCCCTGTTTGAGGAGCTTGGCCCCTCTGTAAGCATCTGACTCATCTCAGAGATATCAATTCT
TAAACACTGTGACAACGGGATCTAAAATGGCTGACACATTTGTCCTTGTGTCACGTTCCATTATTTTATTTAAA
AACCTCAGTAATCGTTTTAGCTTCTTTCCAGCAAACTCTTCTCCACAGATAGCCCAGTCGTGGTAGGATAAATTA
CGGATATAGTCATTCTAGGGGTTTCAGTCTTTCCATCTCAAGGCACTGTGTGTTTTGTTCCCGGGACTGGTTTG
GCTGGGACAAAGTTAGAACTGCCTGAAGTTCGCACATTCAGATTGTTGTCGTCCATCGAGTTTTAGGAGGGGATG
GCCTTTCCGGTCTTCGCACTTCCATCCTCTCCCACTTCCATCTGGCGTCCCACACCTTGTCCCCTGCACTTCTG
GATGACACAGGGTGCTGCTGCCTCCTAGTCTTTGCCTTTGCTGGGCCTTCTGTGCAGGAGACTTGGTCTCAAAG
CTCAGAGAGAGCCAGTCCGGTCCCAGCTCCTTTGTCCCTTCCTCAGAGGCCTTCCTTGAAGATGCATCTAGACT
ACCAGCCTTATCAGTGTTTAAGCTTATTCCTTAACATAAGCTTCCTGACAACATGAAATTGTTGGGGTTTTTT
GGCGTTGGTTGATTTGTTTAGGTTTTGCTTTATACCCGGGCCAAATAGCACATAACACCTGGTTATATATGAAA
TACTCATATGTTTATGACCAAAATAAATATGAAACCTCATRTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

【図１８】

MGLWGQSVPTASSARAGRYPGARTASGTRPWLLDPKILKFVVFIVAVLLPVRVDSATIPRQD
EVPQQTVAPQQQRRSLKEEECPAGSHRSEYTGACNPCTEGVDYTIASNNLPSCLLCTVCKSG
QTNKSSCTTTRDTVCQCEKGSFQDKNSPEMCRTCRTGCPRGMVKVSNCTPRSDIKCKNESAA
SSTGKTPAAEETVTTILGMLASPYHYLIIIVVLVIILAVVVVGFSCRKKFISYLKGICSGGG
GGPERVHRVLFRRRSCPSRVPGAEDNARNETLSNRYLQPTQVSEQEIQGQELAELTGVTVES
PEEPQRLLEQAEAEGCQRRRLLVPVNDADSADISTLLDASATLEEGHAKETIQDQLVGSEKL
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-ミリストイル化部位

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１９】

GCGGCACCTGGAAG**ATG**CGCCCATTGGCTGGTGGCCTGCTCAAGGTGGTGTTCGTGGTCTTC
GCCTCCTTGTGTGCCTGGTATTCGGGGTACCTGCTCGCAGAGCTCATTCCAGATGCACCCCT
GTCCAGTGCTGCCTATAGCATCCGCAGCATCGGGGAGAGGCCTGTCCTCAAAGCTCCAGTCC
CCAAAAGGCAAAAATGTGACCACTGGACTCCCTGCCCATCTGACACCTATGCCTACAGGTTA
CTCAGCGGAGGTGGCAGAAGCAAGTACGCCAAAATCTGCTTTGAGGATAACCTACTTATGGG
AGAACAGCTGGGAAATGTTGCCAGAGGAATAAACATTGCCATTGTCAACTATGTAACTGGGA
ATGTGACAGCAACACGATGTTTTGATATGTATGAAGGCGATAACTCTGGACCGATGACAAAG
TTTATTCAGAGTGCTGCTCCAAAATCCCTGCTCTTCATGGTGACCTATGACGACGGAAGCAC
AAGACTGAATAACGATGCCAAGAATGCCATAGAAGCACTTGGAAGTAAAGAAATCAGGAACA
TGAAATTCAGGTCTAGCTGGGTATTTATTGCAGCAAAAGGCTTGGAACTCCCTTCCGAAATT
CAGAGAGAAAAGATCAACCACTCTGATGCTAAGAACAACAGATATTCTGGCTGGCCTGCAGA
GATCCAGATAGAAGGCTGCATACCCAAAGAACGAAGC**TGA**CACTGCAGGGTCCTGAGTAAAT
GTGTTCTGTATAAACAAATGCAGCTGGAATCGCTCAAGAATCTTATTTTTCTAAATCCAACA
GCCCATATTTGATGAGTATTTTGGGTTTGTTGTAAACCAATGAACATTTGCTAGTTGTATCA
AATCTTGGTACGCAGTATTTTTATACCAGTATTTTATGTAGTGAAGATGTCAATTAGCAGGA
AACTAAAATGAATGGAAATTCTTAAAAAAAAAA

【図２０】

MRPLAGGLLKVVFVVFASLCAWYSGYLLAELIPDAPLSSAAYSIRSIGERPVLKAPVPKRQK
CDHWTPCPSDTYAYRLLSGGGRSKYAKICFEDNLLMGEQLGNVARGINIAIVNYVTGNVTAT
RCFDMYEGDNSGPMTKFIQSAAPKSLLFMVTYDDGSTRLNNDAKNAIEALGSKEIRNMKFRS
SWVFIAAKGLELPSEIQREKINHSDAKNNRYSGWPAEIQIEGCIPKERS

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-ミリストイル化部位

アミノ酸　81-87, 108-114, 119-125

【図２１】

CCGGGGAGGGGAGGGCCCGTCCCGCCCCTCCCCGTCTCTCCCCGCCCCTCCCCGTCCCTCCC
GCCGAAGCTCCGTCCCGCCCGCGGGCCGGCTCCGCCCTCACCTCCCGGCCGCGGCTGCCCTC
TGCCCGGGTTGTCCAAG**ATG**GAGGGCGCTCCACCGGGGTCGCTCGCCCTCCGGCTCCTGCTG
TTCGTGGCGCTACCCGCCTCCGGCTGGCTGACGACGGGCGCCCCCGAGCCGCCGCCGCTGTC
CGGAGCCCCACAGGACGGCATCAGAATTAATGTAACTACACTGAAAGATGATGGGGACATAT
CTAAACAGCAGGTTGTTCTTAACATAACCTATGAGAGTGGACAGGTGTATGTAAATGACTTA
CCTGTAAATAGTGGTGTAACCCGAATAAGCTGTCAGACTTTGATAGTGAAGAATGAAAATCT
TGAAAATTTGGAGGAAAAAGAATATTTTGGAATTGTCAGTGTAAGGATTTTAGTTCATGAGT
GGCCTATGACATCTGGTTCCAGTTTGCAACTAATTGTCATTCAAGAAGAGGTAGTAGAGATT
GATGGAAAACAAGTTCAGCAAAAGGATGTCACTGAAATTGATATTTTAGTTAAGAACCGGGG
AGTACTCAGACATTCAAACTATACCCTCCCTTTGGAAGAAAGCATGCTCTACTCTATTTCTC
GAGACAGTGACATTTTATTTACCCTTCCTAACCTCTCCAAAAAAGAAAGTGTTAGTTCACTG
CAAACCACTAGCCAGTATCTTATCAGGAATGTGGAAACCACTGTAGATGAAGATGTTTTACC
TGGCAAGTTACCTGAAACTCCTCTCAGAGCAGAGCCGCCATCTTCATATAAGGTAATGTGTC
AGTGGATGGAAAAGTTTAGAAAAGATCTGTGTAGGTTCTGGAGCAACGTTTTCCCAGTATTC
TTTCAGTTTTTGAACATCATGGTGGTTGGAATTACAGGAGCAGCTGTGGTAATAACCATCTT
AAAGGTGTTTTTCCCAGTTTCTGAATACAAAGGAATTCTTCAGTTGGATAAAGTGGACGTCA
TACCTGTGACAGCTATCAACTTATATCCAGATGGTCCAGAGAAAAGAGCTGAAAACCTTGAA
GATAAAACATGTATT**TAA**ACGCCATCTCATATCATGGACTCCGAAGTAGCCTGTTGCCTCC
AAATTTGCCACTTGAATATAATTTTCTTTAAATCGTT

【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
MEGAPPGSLALRLLLFVALPASGWLTTGAPEPPPLSGAPQDGIRINVTTLKDDGDISKQQVV
LNITYESGQVYVNDLPVNSGVTRISCQTLIVKNENLENLEEKEYFGIVSVRILVHEWPMTSG
SSLQLIVIQEEVVEIDGKQVQQKDVTEIDILVKNRGVLRHSNYTLPLEESMLYSISRDSDIL
FTLPNLSKKESVSSLQTTSQYLIRNVETTVDEDVLPGKLPETPLRAEPPSSYKVMCQWMEKF
RKDLCRFWSNVFPVFFQFLNIMVVGITGAAVVITILKVFFPVSEYKGILQLDKVDVIPVTAI
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２３】

CGTCTCTGCGTTCGCCATGCGTCCCGGGGCGCCAGGGCCACTCTGGCCTCTGCCCTGGGGGG
CCCTGGCTTGGGCCGTGGGCTTCGTGAGCTCCATGGGCTCGGGGAACCCCGCGCCCGGTGGT
GTTTGCTGGCTCCAGCAGGGCCAGGAGGCCACCTGCAGCCTGGTGCTCCAGACTGATGTCAC
CCGGGCCGAGTGCTGTGCCTCCGGCAACATTGACACCGCCTGGTCCAACCTCACCCACCCGG
GGAACAAGATCAACCTCCTCGGCTTCTTGGGCCTTGTCCACTGCCTTCCCTGCAAAGATTCG
TGCGACGGGGTGGAGTGCGGCCCGGGCAAGGCGTGCCGCATGCTGGGGGGCCGCCCGCGCTG
CGAGTGCGCGCCCGACTGCTCGGGGCTCCCGGCGCGGCTGCAGGTCTGCGGCTCAGACGGCG
CCACCTACCGCGACGAGTGCGAGCTGCGCGCCGCGCGCTGCCGCGGCCACCCGGACCTGAGC
GTCATGTACCGGGGCCGCTGCCGCAAGTCCTGTGAGCACGTGGTGTGCCCGCGGCCACAGTC
GTGCGTCGTGGACCAGACGGGCAGCGCCCACTGCGTGGTGTGTCGAGCGGCGCCCTGCCCTG
TGCCCTCCAGCCCCGGCCAGGAGCTTTGCGGCAACAACAACGTCACCTACATCTCCTCGTGC
CACATGCGCCAGGCCACCTGCTTCCTGGGCCGCTCCATCGGCGTGCGCCACGCGGGCAGCTG
CGCAGGCACCCCTGAGGAGCCGCCAGGTGGTGAGTCTGCAGAAGAGGAAGAGAACTTCGTGTGA
GAGCCTGCAGGACAGGCCTGGGCCTGGTGCCCGAGGCCCCCCATCATCCCCTGTTATTTATT
GCCACAGCAGAGTCTAATTTATATGCCACGGACACTCCTTAGAGCCCGGATTCGGACCACTT
GGGGATCCCAGAACCTCCCTGACGATATCCTGGAAGGACTGAGGAAGGGAGGCCTGGGGGCC
GGCTGGTGGGTGGGATAGACCTGCGTTCCGGACACTGAGCGCCTGATTTAGGGCCCTTCTCT
AGGATGCCCCAGCCCCTACCCTAAGACCTATTGCCGGGGAGGATTCCACACTTCCGCTCCTT
TGGGGATAAACCTATTAATTATTGCTACTATCAAGAGGGCTGGGCATTCTCTGCTGGTAATT
CCTGAAGAGGCATGACTGCTTTTCTCAGCCCCAAGCCTCTAGTCTGGGTGTGTACGGAGGGT
CTAGCCTGGGTGTGTACGGAGGGTCTAGCCTGGGTGAGTACGGAGGGTCTAGCCTGGGTGAG
TACGGAGGGTCTAGCCTGGGTGAGTACGGAGGGTCTAGCCTGGGTGTGTATGGAGGATCTAG
CCTGGGTGAGTATGGAGGGTCTAGCCTGGGTGAGTATGGAGGGTCTAGCCTGGGTGTGTATG
GAGGGTCTAGCCTGGGTGAGTATGGAGGGTCTAGCCTGGGTGTGTATGGAGGGTCTAGCCTG
GGTGAGTATGGAGGGTCTAGCCTGGGTGTGTACGGAGGGTCTAGTCTGAGTGCGTGTGGGGA
CCTCAGAACACTGTGACCTTAGCCCAGCAAGCCAGGCCCTTCATGAAGGCCAAGAAGGCTGC
CACCATTCCCTGCCAGCCCAAGAACTCCAGCTTCCCCACTGCCTCTGTGTGCCCCTTTGCGT
CCTGTGAAGGCCATTGAGAAATGCCCAGTGTGCCCCCTGGGAAAGGGCACGGCCTGTGCTCC
TGACACGGGCTGTGCTTGGCCACAGAACCACCCAGCGTCTCCCCTGCTGCTGTCCACGTCAG
TTCATGAGGCAACGTCGCGTGGTCTCAGACGTGGAGCAGCCAGCGGCAGCTCAGAGCAGGGC
ACTGTGTCCGGCGGAGCCAAGTCCACTCTGGGGGAGCTCTGGCGGGGACCACGGGCCACTGC
TCACCCACTGGCCCCGAGGGGGGTGTAGACGCCAAGACTCACGCATGTGTGACATCCGGAGT
CCTGGAGCCGGGTGTCCCAGTGGCACCACTAGGTGCCTGCTGCCTCCACAGTGGGGTTCACA
CCCAGGGCTCCTTGGTCCCCCACAACCTGCCCCGGCCAGGCCTGCAGACCCAGACTCCAGCC
AGACCTGCCTCACCCACCAATGCAGCCGGGGCTGGCGACACCAGCCAGGTGCTGGTCTTGGG
CCAGTTCTCCCACGACGGCTCACCCTCCCCTCCATCTGCGTTGATGCTCAGAATCGCCTACC
TGTGCCTGCGTGTAAACCACAGCCTCAGACCAGCTATGGGGAGAGGACAACACGGAGGATAT
CCAGCTTCCCCGGTCTGGGGTGAGGAATGTGGGGAGCTTGGGCATCCTCCTCCAGCCTCCTC
CAGCCCCCAGGCAGTGCCTTACCTGTGGTGCCCAGAAAAGTGCCCCTAGGTTGGTGGGTCTA
CAGGAGCCTCAGCCAGGCAGCCCACCCCACCCTGGGGCCCTGCCTCACCAAGGAAATAAAGA
CTCAAGCCATAAAAAAAA

【図２４】

</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
MRPGAPGPLWPLPWGALAWAVGFVSSMGSGNPAPGGVCWLQQGQEATCSLVLQTDVTRAECC
ASGNIDTAWSNLTHPGNKINLLGFLGLVHCLPCKDSCDGVECGPGKACRMLGGRPRCECAPD
CSGLPARLQVCGSDGATYRDECELRAARCRGHPDLSVMYRGRCRKSCEHVVCPRPQSCVVDQ
TGSAHCVVCRAAPCPVPSSPGQELCGNNNVTYISSCHMRQATCFLGRSIGVRHAGSCAGTPE
EPPGGESAEEEENFV

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

ソステオネクチンドメインタンパク質

アミノ酸　97-130, 169-202

【図２５】

TGCAGAGCTTGTGGAGGCCATGGGGCGCGTCGTCGCGGAGCTCGTCTCCTCGCTGCTGGGGT
TGTGGCTGTTGCTGTGCAGCTGCGGATGCCCCGAGGGCGCCGAGCTGCGTGCTCCGCCAGAT
AAAATCGCGATTATTGGAGCCGGAATTGGTGGCACTTCAGCAGCCTATTACCTGCGGCAGAA
ATTTGGGAAAGATGTGAAGATAGACCTGTTTGAAAGAGAAGAGGTCGGGGGCCGCCTGGCTA
CCATGATGGTGCAGGGGCAAGAATACGAGGCAGGAGGTTCTGTCATCCATCCTTTAAATCTG
CACATGAAACGTTTGTCAAAGACCTGGGTCTCTCTGCTGTTCAGGCCTCTGGTGGCCTACT
GGGGATATATAATGGAGAGACTCTGGTATTTGAGGAGAGCAACTGGTTCATAATTAACGTGA
TTAAATTAGTTTGGCGCTATGGATTTCAATCCCTCCGTATGCACATGTGGGTAGAGGACGTG
TTAGACAAGTTCATGAGGATCTACCGCTACCAGTCTCATGACTATGCCTTCAGTAGTGTCGA
AAAATTACTTCATGCTCTAGGAGGAGATGACTTCCTTGGAATGCTTAATCGAACACTTCTTG
AAACCTTGCAAAAGGCCGGCTTTTCTGAGAAGTTCCTCAATGAAATGATTGCTCCTGTTATG
AGGGTCAATTATGGCCAAAGCACGGACATCAATGCCTTTGTGGGGGCGGTGTCACTGTCCTG
TTCTGATTCTGGCCTTTGGGCAGTAGAAGGTGGCAATAAACTTGTTTGCTCAGGGCTTCTGC
AGGCATCCAAAAGCAATCTTATATCTGGCTCAGTAATGTACATCGAGGAGAAAACAAAGACC
AAGTACACAGGAAATCCAACAAAGATGTATGAAGTGGTCTACCAAATTGGAACTGAGACTCG
TTCAGACTTCTATGACATCGTCTTGGTGGCCACTCCGTTGAATCGAAAAATGTCGAATATTA
CTTTTCTCAACTTTGATCCTCCAATTGAGGAATTCCATCAATATTATCAACATATAGTGACA
ACTTTAGTTAAGGGGAATTGAATACATCTATCTTTAGCTCTAGACCCATAGATAAATTTGG
CCTTAATACAGTTTTAACCACTGATAATTCAGATTTGTTCATTAACAGTATTGGGATTGTGC
CCTCTGTGAGAGAAAAGGAAGATCCTGAGCCATCAACAGATGGAACATATGTTTGGAAGATC
TTTTCCCAAGAAACTCTTACTAAAGCACAAATTTTAAAGCTCTTTCTGTCCTATGATTATGC
TGTGAAGAAGCCATGGCTTGCATATCCTCACTATAAGCCCCCGGAGAAATGCCCCTCTATCA
TTCTCCATGATCGACTTTATTACCTCAATGGCATAGAGTGTGCAGCAAGTGCCATGGAGATG
AGTGCCATTGCAGCCCACAACGCTGCACTCCTTGCCTATCACCGCTGGAACGGGCACACAGA
CATGATTGATCAGGATGGCTTATATGAGAAACTTAAAACTGAACTATGAAGTGACACACTCC
TTTTTCCCCTCCTAGTTCCAAATGACTATCAGTGGCAAAAAAGAACAAAATCTGAGCAGAGA
TGATTTTGAACCAGATATTTTGCCATTATCATTGTTTAATAAAAGTAATCCCTGCTGGTCAT
AGGAAAAAAAAAAAAA

【図２６】

</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
MGRVVAELVSSLLGLWLLLCSCGCPEGAELRAPPDKIAIIGAGIGGTSAAYYLRQKFGKDVK
IDLFEREEVGGRLATMMVQGQEYEAGGSVIHPLNLHMKRFVKDLGLSAVQASGGLLGIYNGE
TLVFEESNWFIINVIKLVWRYGFQSLRMHMWVEDVLDKFMRIYRYQSHDYAFSSVEKLLHAL
GGDDFLGMLNRTLLETLQKAGFSEKFLNEMIAPVMRVNYGQSTDINAFVGAVSLSCSDSGLW
AVEGGNKLVCSGLLQASKSNLISGSVMYIEEKTKTKYTGNPTKMYEVVYQIGTETRSDFYDI
VLVATPLNRKMSNITFLNFDPPIEEFHQYYQHIVTTLVKGELNTSIFSSRPIDKFGLNTVLT
TDNSDLFINSIGIVPSVREKEDPEPSTDGTYVWKIFSQETLTKAQILKLFLSYDYAVKKPWL
AYPHYKPPEKCPSIILHDRLYYLNGIECAASAMEMSAIAAHNAALLAYHRWNGHTDMIDQDG
LYEKLKTEL

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

チロシンキナーゼリン酸化部位

アミノ酸　291-298

N-ミリストイル化部位

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脂質結合部位

アミノ酸　12-23, 232-243

【図２７】

CATTTCCAACAAGAGCACTGGCCAAGTCAGCTTCTTCTGAGAGAGTCTCTAGAAGACATGATGCTACACTCAGCTTTGGGTCTCTGCCTCTTACTCGTCACAGTTTCTTCCAACCTTGCCATTGCAATAAAAAAGGAAAAGAGGCCTCCTCAGACACTCTCAAGAGGATGGGGAGATGACATCACTTGGGTACAAACTTATGAAGAAGGTCTCTTTTATGCTCAAAAAAGTAAGAAGCCATTAATGGTTATTCATCACCTGGAGGATTGTCAATACTCTCAAGCACTAAAGAAAGTATTTGCCCAAAATGAAGAAATACAAGAAATGGCTCAGAATAAGTTCATCATGCTAAACCTTATGCATGAAACCACTGATAAGAATTTATCACCTGATGGGCAATATGTGCCTAGAATCATGTTTGTAGACCCTTCTTTAACAGTTAGAGCTGACATAGCTGGAAGATACTCTAACAGATTGTACACATATGAGCCTCGGGATTTACCCCTATTGATAGAAAACATGAAGAAAGCATTAAGACTTATTCAGTCAGAGCTATAAGAGATGATGGAAAAAAGCCTTCACTTCAAAGAAGTCAAATTTCATGAAGAAAACCTCTGGCACATTGACAAATACTAAATGTGCAAGTATATAGATTTTGTAATATTACTATTTAGTTTTTTAATGTGTTTGCAATAGTCTTATTAAAATAAATGTTTTTTAAATCTGA

【図２８】

</usr/seqdb2/sst/DNA/Dnaseqs.min/ss.DNA64896
<subunit 1 of 1, 166 aa, 1 stop
<MW: 19171, pI: 8.26, NX(S/T): 1
MMLHSALGLCLLLVTVSSNLAIAIKKEKRPPQTLSRGWGDDITWVQTYEEGLFYAQKSKKPLMVIHHLEDCQYSQALKKVFAQNEEIQEMAQNKFIMLNLMHETTDKNLSPDGQYVPRIMFVDPSLTVRADIAGRYSNRLYTYEPRDLPLLIENMKKALRLIQSEL

重要な特徴
シグナルペプチド
アミノ酸　1-23

N-ミリストイル化部位
アミノ酸　51-57

【図２９】

TAAAACAGCTACAATATTCCAGGGCCAGTCACTTGCCATTTCTCATAACAGCGTCAGAGAGAAAGAACTGACTGAAACGTTTGAGATGAAGAAAGTTCTCCTCCTGATCACAGCCATCTTGGCAGTGGCTGTTGGTTTCCCAGTCTCTCAAGACCAGGAACGAGAAAAAAGAAGTATCAGTGACAGCGATGAATTAGCTTCAGGGTTTTTTGTGTTCCCTTACCCATATCCATTTCGCCCACTTCCACCAATTCCATTTCCAAGATTTCCATGGTTTAGACGTAATTTTCCTATTCCAATACCTGAATCTGCCCCTACAACTCCCCTTCCTAGCGAAAAGTAAACAAGAAGGATAAGTCACGATAAACCTGGTCACCTGAAATTGAAATTGAGCCACTTCCTTGAAGAATCAAAATTCCTGTTAATAAAAGAAAAACAAATGTAATTGAAATAGCACACAGCATTCTCTAGTCAATATCTTTAGTGATCTTCTTTAATAAACATGAAAGCAAAGATTTTGGTTTCTTAATTTCCACA

【図３０】

></usr/seqdb2/sst/DNA/Dnaseqs.min/ss.DNA71290
><subunit 1 of 1, 85 aa, 1 stop
><MW: 9700, pI: 9.55, NX(S/T): 0
MKKVLLLITAILAVAVGFPVSQDQEREKRSISDSDELASGFFVFPYPYPFRPLPPIPFPRFPWFRRNFPIPIPESAPTTPLPSEK

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

B3-ホルディンに沿相同な領域
アミノ酸　47-85

【図３１】

CGGACGCGTGGGCGGGCGCGCCGGGAGGGACCGGCGGCGGCATGGGCCGGGGGCCCTGGGATGCGGGCCCGTCTCGCCGCCTGCTGCCGCTGTTGCTGCTGCTCGGCCTGGCCCGCGGCGCCGCGGGAGCGCCGGGCCCCGACGGTTTAGACGTCTGTGCCACTTGCCATGAACATGCCACATGCCAGCAAAGAGAAGGGAAGAAGATCTGTATTTGCAACTATGGATTTGTAGGGAACGGGAGGACTCAGTGTGTTGATAAAAATGAGTGCCAGTTTGGAGCCACTCTTGTCTGTGGGAACCACACATCTTGCCACAACACCCCCGGGGGCTTCTATTGCATTTGCCTGGAAGGATATCGAGCCACAAACAACAACAAGACATTCATTCCCAACGATGGCACCTTTTGTACAGACATAGATGAGTGTGAAGTTTCTGGCCTGTGCAGGCATGGAGGGCGATGCGTGAACACTCATGGGAGCTTTGAATGCTACTGTATGGATGGATACTTGCCAAGGAATGGACCTGAACCTTTCCACCCGACCACCGATGCCACATCATGCACAGAAATAGACTGTGGTACCCCTCCTGAGGTTCCAGATGGCTATATCATAGGAAATTATACGTCTAGTCTGGGCAGCCAGGTTCGTTATGCTTGCAGAGAAGGATTCTTCAGTGTTCCAGAAGATACAGTTTCAAGCTGCACAGGCCTGGGCACATGGGAGTCCCCAAAATTACATTGCCAAGAGATCAACTGTGGCAACCCTCCAGAAATGCGGCACGCCATCTTGGTAGGAAATCACAGCTCCAGGCTGGGCGGTGTGGCTCGCTATGTCTGTCAAGAGGGCTTTGAGAGCCCTGGAGGAAAGATCACTTCTGTTTGCACAGAGAAAGGCACCTGGAGAGAAAGTACTTTAACATGCACAGAAATTCTGACAAAGATTAATGATGTATCACTGTTTAATGATACCTGTGTGAGATGGCAAATAAACTCAAGAAGAATAAACCCCAAGATCTCATATGTGATATCCATAAAAGGACAACGGTTGGACCCTATGGAATCAGTTCGTGAGGAGACAGTCAACTTGACCACAGACAGCAGGACCCCAGAAGTGTGCCTAGCCCTGTACCCAGGCACCAACTACACCGTGAACATCTCCACAGCACCTCCCAGGCGCTCGATGCCAGCCGTCATCGGTTTCCAGACAGCTGAAGTTGATCTCTTAGAAGATGATGGAAGTTTCAATATTTCAATATTTAATGAAACTTGTTTGAAATTGAACAGGCGTTCTAGGAAAGTTGGATCAGAACACATGTACCAATTTACCGTTCTGGGTCAGAGGTGGTATCTGGCTAACTTTTCTCATGCAACATCGTTTAACTTCACAACGAGGGAACAAGTGCCTGTAGTGTGTTTGGATCTGTACCCTACGACTGATTATACGGTGAATGTGACCCTGCTGAGATCTCCTAAGCGGCACTCAGTGCAAATAACAATAGCAACTCCCCCAGCAGTAAAACAGACCATCAGTAACATTTCAGGATTTAATGAAACCTGCTTGAGATGGAGAAGCATCAAGACAGCTGATATGGAGGAGATGTATTTATTCCAACATTTGGGGCCAGAGATGGTATCAGAAGGAATTTGCCCAGGAAATGACCTTTAATATCAGTAGCAGCAGCCGAGATCCCGAGGTGTGCTTGGACCTACGTCCGGGTACCAACTACAATGTCAGTCTCCGGGCTCTGTCTTCGGAACTTCCTGTGGTCATCTCCCTGACAACCCAGATAACAGACCTCCCCTCCCGGAAGTAGAATTTTTTACGGTGCACAGAGGACCTCTACCACGCCTCAGACTGAGGAAAGCCAAGGAGAAAAATGGACCAATCAGTTCATATCAGGTGTTAGTGCTTCCCCTGGCCCTCCAAAGCACATTTTCTTGTGATTCTGAAGGCGCTTCCTCCTTCTTTAGCAACGCCTCTGATGCTGATGGATACGTGGCTGCAGAACTACTGGCCAAAGATGTTCCAGATGATGCCATGGAGATACCTATAGGAGACAGGCTGTACTATGGGGAATATTATAATGCACCCTTGAAAAGAGGGAGTGATTACTGCATTATATTACGAATCACAAGTGAATGGAATAAGGTGAGAAGACACTCCTGTGCAGTTTGGGCTCAGGTGAAAGATTCGTCACTCATGCTGCTGCAGATGGCGGGTGTTGGACTGGGTTCCCTGGCTGTTGTGATCATTCTCACATTCCTCTCCTTCTCAGCGGTGTGAATGGCAGATGGACACTGAGTGGGGAGGATGCACTGCTGCTGGGCAGGTGTTCTGGCAGCTTCTCAGGTGCCCGCACAGAGGCTCCGTGTGACTTCCGTCCAGGGAGCATGTGGGCCTGCAACTTTCTCCATTCCCAGCTGGGCCCCATTCCTGGATTTAAGATGGTGGCTATCCCTGAGGAGTCACCATAAGGAGAAAACTCAGGAATTCTGAGTCTTCCCTGCTACAGGACCAGTTCTGTGCAATGAACTTGAGACTCCTGATGTACACTGTGATATTGACCGAAGGCTACATACAGATCTGTGAATCTTGGCTGGGACTTCCTCTGAGTGATGCCTGAGGGTCAGCTCCTCTAGACATTGACTGCAAGAGAATCTCTGCAACCTCCTATATAAAAGCATTTCTGTTAATTCATTCAGAATCCATTCTTTACAATATGCAGTGAGATGGGCTTAAGTTTGGGCTAGAGTTTGACTTTATGAAGGAGGTCATTGAAAAAGAGAACAGTGACGTAGGCAAATGTTTCAAGCACTTTAGAAACAGTACTTTTCCTATAATTAGTTGATATACTAATGAGAAAATATACTAGCCTGGCCATGCCAATAAGTTTCCTGCTGTGTCTGTTAGGCAGCATTGCTTTGATGCAATTTCTATTGTCCTATATATTCAAAAGTAATGTCTACATTCCAGTAAAAATATCCCGTAATTAAAAA

【図３２】

></usr/seqdb2/sst/DNA/Dnaseqs.min/ss.DNA96031
><subunit 1 of 1, 747 aa, 1 stop
><MW: 82710, pI: 6.36, NX(S/T): 18
MGRGPWDAGPSRRLLPLLLLLGARGAAGAPGPDGLDVCATCHEHATCQQREGKKICICNYGFVGNGRTQCVDKNECQFGATLVCGNHTSCHNTPGGFYCICLEGYRATNNNKTFIPNDGTFCTDIDECEVSGLCRHGGRCVNTHGSFECYCMDGYLPRNGPEPFHPTTDATSCTEIDCGTPPEVPDGYIIGNYTSSLGSQVRYACREGFFSVPEDTVSSCTGLGTWESPKLHCQEINCGNPPEMRHAILVGNHSSRLGGVARYVCQEGFESPGGKITSVCTEKGTWRESTLTCTEILTKINDVSLFNDTCVRWQINSRRINPKISYVISIKGQRLDPMESVREETVNLTTDSRTPEVCLALYPGTNYTVNISTAPPRRSMPAVIGFQTAEVDLLEDDGSFNISIFNETCLKLNRRSRKVGSEHMYQFTVLGQRWYLANFSHATSFNFTTREQVPVVCLDLYPTTDYTVNVTLLRSPKRHSVQITIATPPAVKQTISNISGFNETCLRWRSIKTADMEEMYLFHIWGQRWYQKEFAQEMTFNISSSSRDPEVCLDLRPGTNYNVSLRALSSELPVVISLTTQITEPPLPEVEFFTVHRGPLPRLRLRKAKEKNGPISSYQVLVLPLALQSTFSCDSEGASSFFSNASDADGYVAAELLAKDVPDDAMEIPIGDRLYYGEYYNAPLKRGSDYCIILRITSEWNKVRRHSCAVWAQVKDSSLMLLQMAGVGLGSLAVVIILTFLSFSAV

タンパク質の重要な特徴
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　718-740
N-グリコシル化部位
アミノ酸　87-91, 112-116, 193-197, 253-257, 308-312, 348-352, 367-371, 371-375, 402-406, 407-411, 439-443, 447-451, 470-474, 498-502, 503-507, 542-546, 563-567, 645-649
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　478-482, 686-690, 705-709
チロシンキナーゼリン酸化部位
アミノ酸　419-427
N-ミリストイル化部位
アミノ酸　22-28, 35-41, 65-71, 86-92, 96-102, 120-126, 146-152, 192-198, 252-258, 274-280, 365-371, 559-565, 688-694, 727-733.
アミド化部位
アミノ酸　52-56
アスパラギン酸及びアスパラギンヒドロキシル化部位
アミノ酸　91-103, 141-153.
原核生物膜リポタンパク質脂質結合部位
アミノ酸　624-635
チトクロムC ファミリーヘム-結合部位シグネーチャー
アミノ酸　39-45
カルシウム結合EGF-様ドメインタンパク質パターンタンパク質
アミノ酸　85-106, 135-156
レセプターチロシンキナーゼクラスVタンパク質
アミノ酸　389-422

【図３３】

GGAAAAGGTACCCGCGAGAGACAGCCAGCAGTTCTGTGGAGCAGCGGTGGCCGGCTAGG**ATG**
GGCTGTCTCTGGGGTCTGGCTCTGCCCCTTTTCTTCTTCTGCTGGGAGGTTGGGGTCTCTGG
GAGCTCTGCAGGCCCCAGCACCCGCAGAGCAGACACTGCGATGACAACGGACGACACAGAAG
TGCCCGCTATGACTCTAGCACCGGGCCACGCCGCTCTGGAAACTCAAACGCTGAGCGCTGAG
ACCTCTTCTAGGGCCTCAACCCCAGCCGGCCCCATTCCAGAAGCAGAGACCAGGGGAGCCAA
GAGAATTTCCCCTGCAAGAGAGACCAGGAGTTTCACAAAAACATCTCCCAACTTCATGGTGC
TGATCGCCACCTCCGTGGAGACATCAGCCGCCAGTGGCAGCCCCGAGGGAGCTGGAATGACC
ACAGTTCAGACCATCACAGGCAGTGATCCCGAGGAAGCCATCTTTGACACCCTTTGCACCGA
TGACAGCTCTGAAGAGGCAAAGACACTCACAATGGACATATTGACATTGGCTCACACCTCCA
CAGAAGCTAAGGGCCTGTCCTCAGAGAGCAGTGCCTCTTCCGACGGCCCCCATCCAGTCATC
ACCCCGTCACGGGCCTCAGAGAGCAGCGCCTCTTCCGACGGCCCCCATCCAGTCATCACCCC
GTCACGGGCCTCAGAGAGCAGCGCCTCTTCCGACGGCCCCCATCCAGTCATCACCCCGTCAT
GGTCCCCGGGATCTGATGTCACTCTCCTCGCTGAAGCCCTGGTGACTGTCACAAACATCGAG
GTTATTAATTGCAGCATCACAGAAATAGAAACAACAACTTCCAGCATCCCTGGGGCCTCAGA
CATAGATCTCATCCCCACGGAAGGGGTGAAGGCCTCGTCCACCTCCGATCCACCAGCTCTGC
CTGACTCCACTGAAGCAAAACCACACATCACTGAGGTCACAGCCTCTGCCGAGACCCTGTCC
ACAGCCGGCACCACAGAGTCAGCTGCACCTCATGCCACGGTTGGGACCCCACTCCCCACTAA
CAGCGCCACAGAAAGAGAAGTGACAGCACCCGGGGCCACGACCCTCAGTGGAGCTCTGGTCA
CAGTTAGCAGGAATCCCCTGGAAGAAACCTCAGCCCTCTCTGTTGAGACACCAAGTTACGTC
AAAGTCTCAGGAGCAGCTCCGGTCTCCATAGAGGCTGGGTCAGCAGTGGGCAAAACAACTTC
CTTTGCTGGGAGCTCTGCTTCCTCCTACAGCCCCTCGGAAGCCGCCCTCAAGAACTTCACCC
CTTCAGAGACACCGACCATGGACATCGCAACCAAGGGGCCCTTCCCCACCAGCAGGGACCCT
CTTCCTTCTGTCCCTCCGACTACAACCAACAGCAGCCGAGGGACGAACAGCACCTTAGCCAA
GATCACAACCTCAGCGAAGACCACGATGAAGCCCCAACAGCCACGCCCACGACTGCCCGGAC
GAGGCCGACCACAGACG**TGA**GTGCAGGTGAAAATGGAGGTTCCTCCTCCTGCGGCTGAGTG
TGGCTTCCCCGGAAGACCTCACTGACCCCAGAGTGGCAGAAAGGCTGATGCAGCAGCTCCAC
CGGGAACTCCACGCCCACGCGCCTCACTTCCAGGTCTCCTTACTGCGTGTCAGGAGAGGCTA
ACGGACATCAGCTGCAGCCAGGCATGTCCCGTATGCCAAAAGAGGGTGCTGCCCCTAGCCTG
GGCCCCCACCGACAGACTGCAGCTGCGTTACTGTGCTGAGAGGTACCCAGAAGGTTCCCATG
AAGGGCAGCATGTCCAAGCCCCTAACCCCAGATGTGGCAACAGGACCCTCGCTCACATCCAC
CGGAGTGTATGTATGGGGAGGGGCTTCACCTGTTCCCAGAGGTGTCCTTGGACTCACCTTGG
CACATGTTCTGTGTTTCAGTAAAGAGAGACCTGATCACCCATCTGTGTGCTTCCATCCTGCA
TTAAAATTCACTCAGTGTGGCCCAAAAAAAA

【図３４】

></usr/seqdb2/sst/DNA/Dnaseqs.min/ss.DNA108722
><subunit 1 of 1, 482 aa, 1 stop
><MW: 49060, pI: 4.74, NX(S/T): 4
MGCLWGLALPLFFFCWEVGVSGSSAGPSTRRADTAMTTDDTEVPAMTLAPGHAALETQTLSA
ETSSRASTPAGPIPEAETRGAKRISPARETRSFTKTSPNFMVLIATSVETSAASGSPEGAGM
TTVQTITGSDPEEAIFDTLCTDDSSEEAKTLTMDILTLAHTSTEAKGLSSESSASSDGPHPV
ITPSRASESSASSDGPHPVITPSRASESSASSDGPHPVITPSWSPGSDVTLLAEALVTVTNI
EVINCSITEIETTTSSIPGASDIDLIPTEGVKASSTSDPPALPDSTEAKPHITEVTASAETL
STAGTTESAAPHATVGTPLPTNSATEREVTAPGATTLSGALVTVSRNPLEETSALSVETPSY
VKVSGAAPVSIEAGSAVGKTTSFAGSSASSYSPSEAALKNFTPSETPTMDIATKGPEPTSRD
PLPSVPPTTTNSSRGTNSTLAKITTSAKTTMKPQQPRPRLPGRGRPQT

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-ミリストイル化部位
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

【図３５】

GCCTCTGAATTGTTGGGCAGTCTGGCAGTGGAGCTCTCCCCGGTCTGACAGCCACTCCAGAG
GCC**ATG**CTTCGTTTCTTGCCAGATTTGGCTTTCAGCTTCCTGTTAATTCTGGCTTTGGGCCA
GGCAGTCCAATTTCAAGAATATGTCTTTCTCCAATTTCTGGGCTTAGATAAGGCGCCTTCAC
CCCAGAAGTTCCAACCTGTGCCTTATATCTTGAAGAAAATTTTCCAGGATCGCGAGGCAGCA
GCGACCACTGGGGTCTCCCGAGACTTATGCTACGTAAAGGAGCTGGGCGTCCGCGGGAATGT
ACTTCGCTTTCTCCCAGACCAAGGTTTCTTTCTTTACCCAAAGAAAATTTCCCAAGCTTCCT
CCTGCCTGCAGAAGCTCCTCTACTTTAACCTGTCTGCCATCAAAGAAAGGGAACAGTTGACA
TTGGCCCAGCTGGGCCTGGACTTGGGGCCCAATTCTTACTATAACCTGGGACCAGAGCTGGA
ACTGGCTCTGTTCCTGGTTCAGGAGCCTCATGTGTGGGGCCAGACCACCCCTAAGCCAGGTA
AAATGTTTGTGTTGCGGTCAGTCCCATGGCCACAAGGTGCTGTTCACTTCAACCTGCTGGAT
GTAGCTAAGGATTGGAATGACAACCCCCGGAAAAATTTCGGGTTATTCCTGGAGATACTGGT
CAAAGAAGATAGAGACTCAGGGGTGAATTTTCAGCCTGAAGACACCTGTGCCAGACTAAGAT
GCTCCCTTCATGCTTCCCTGCTGGTGGTGACTCTCAACCCTGATCAGTGCCACCCTTCTCGG
AAAAGGAGAGCAGCCATCCCTGTCCCCAAGCTTTCTTGTAAGAACCTCTGCCACCGTCACCA
GCTATTCATTAACTTCCGGGACCTGGGTTGGCACAAGTGGATCATTGCCCCCAAGGGGTTCA
TGGCAAATTACTGCCATGGAGAGTGTCCCTTCTCACTGACCATCTCTCTCAACAGCTCCAAT
TATGCTTTCATGCAAGCCCTGATGCATGCCGTTGACCCAGAGATCCCCCAGGCTGTGTGTAT
CCCCACCAAGCTGTCTCCCATTTCCATGCTCTACCAGGACAATAATGACAATGTCATTCTAC
GACATTATGAAGACATGGTAGTCGATGAATGTGGGTGTGGG**TAG**GATGTCAGAAATGGGAAT
AGAAGGAGTGTTCTTAGGGTAAATCTTTTAATAAAACTACCTATCTGGTTTATGACCACTTA
GATCGAAATGTC

【図３６】

MLRFLPDLAFSFLLILALGQAVQFQEYVFLQFLGLDKAPSPQKFQPVPYILKKIFQDREAAA
TTGVSRDLCYVKELGVRGNVLRFLPDQGFFLYPKKISQASSCLQKLLYFNLSAIKEREQLTL
AQLGLDLGPNSYYNLGPELELALFLVQEPHVWGQTTPKPGKMFVLRSVPWPQGAVHFNLLDV
AKDWNDNPRKNFGLFLEILVKEDRDSGVNFQPEDTCARLRCSLHASLLVVTLNPDQCHPSRK
RRAAIPVPKLSCKNLCHRHQLFINFRDLGWHKWIIAPKGFMANYCHGECPFSLTISLNSSNY
AFMQALMHAVDPEIPQAVCIPTKLSPISMLYQDNNDNVILRHYEDMVVDECGCG

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

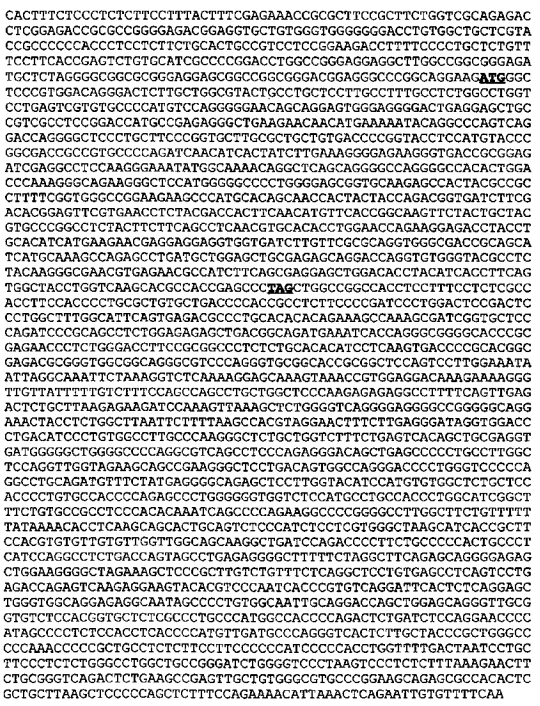
N-グリコシル化部位
アミノ酸　112-116, 306-310

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-ミリストイル化部位
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

【図３７】



【図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
MGSRGQGLLLAYCLLLAFASGLVLSRVPHVQGEQQEWEGTEELPSPPDHAERAEEQHEKYRP
SQDQGLPASRCLRCCDPGTSMYPATAVPQINITILKGEKGDRGDRGLQGKYGKTGSAGARGH
TGPKGQKGSMGAPGERCKSHYAAFSVGRKKPMHSNHYYQTVIFDTEFVNLYDHFNMFTGKFY
CYVPGLYFFSLNVHTWNQKETYLHIMKNEEEVVILFAQVGDRSIMQSQSLMLELREQDQVWV
RLYKGERENAIFSEELDTYITFSGYLVKHATEP

シグナル配列
アミノ酸　1-25

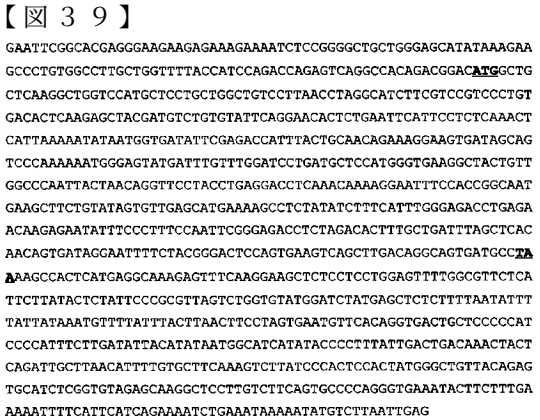
N-グリコシル化部位
アミノ酸　93-97

N-ミリストイル化部位
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

【図３９】



【図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
MAAQGWSMLLLAVLNLGIFVRPCDTQELRCLCIQEHSEFIPLKLIKNIMVIFETIYCNRKEV
IAVPKNGSMICLDPDAPWVKATVGPITNRFLPEDLKQKEFPPAMKLLYSVEHEKPLYLSFGR
PENKRIFPFPIRETSRHFADLAHNSDRNFLRDSSEVSLTGSDA

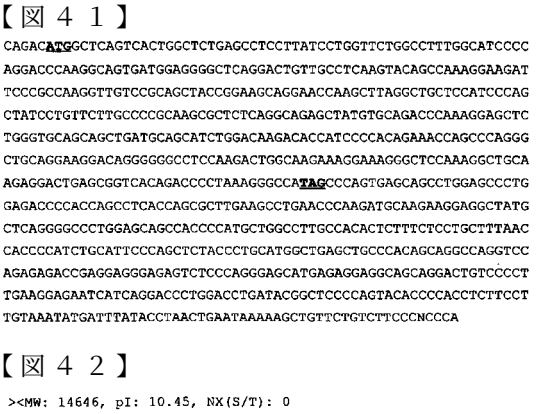
タンパク質の重要な特徴
シグナルペプチド
アミノ酸　1-25

N-グリコシル化部位
アミノ酸　68-72

N-ミリストイル化部位
アミノ酸　69-75

小サイトカイン(インテルクリン/ケモカイン)C-x-Cサブファミリーシグネーチャー
アミノ酸　40-85

【図４１】



【図４２】

><MW: 14646, pI: 10.45, NX(S/T): 0
MAQSLALSLLILVLAFGIPRTQGSDGGAQDCCLKYSQRKIPAKVVRSYRKQEPSLGCSIPAI
LFLPRKRSQAELCADPKELWVQQLMQHLDKTPSPQKPAQGCRKDRGASKTGKKGKGSKGCKR
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-ミリストイル化部位
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４３】

AAGGAGCAGCCCGCAAGCACCAAGTGAGAGGC**ATG**AAGTTACAGTGTGTTTCCCTTTGGCTC
CTGGGTACAATACTGATATTGTGCTCAGTAGACAACCACGGTCTCAGGAGATGTCTGATTTC
CACAGACATGCACCATATAGAAGAGAGTTTCCAAGAAATCAAAAGAGCCATCCAAGCTAAGG
ACACCTTCCCAAATGTCACTATCCTGTCCACATTGGAGACTCTGCAGATCATTAAGCCCTTA
GATGTGTGCTGCGTGACCAAGAACCTCCTGGCGTTCTACGTGGACAGGGTGTTCAAGGATCA
TCAGGAGCCAAACCCCAAAATCTTGAGAAAAATCAGCAGCATTGCCAACTCTTTCCTCTACA
TGCAGAAAACTCTGCGGCAATGTCAGGAACAGAGGCAGTGTCACTGCAGGCAGGAAGCCACC
AATGCCACCAGAGTCATCCATGACAACTATGATCAGCTGGAGGTCCACGCTGCTGCCATTAA
ATCCCTGGGAGAGCTCGACGTCTTTCTAGCCTGGATTAATAAGAATCATGAAGTAATGTTCT
CAGCT**TGA**TGACAAGGAACCTGTATAGTGATCCAGGGATGAACACCCCCTGTGCGGTTTACT
GTGGGAGACAGCCCACCTTGAAGGGGAAGGAGATGGGGAAGGCCCCTTGCAGCTGAAAGTCC
CACTGGCTGGCCTCAGGCTGTCTTATTCCGCTTGAAAATAGGCAAAAAGTCTACTGTGGTAT
TTGTAATAAACTCTATCTGCTGAAAGGGCCTGCAGGCCATCCTGGGAGTAAAGGGCTGCCTT
CCCATCTAATTTATTGTAAAGTCATATAGTCCATGTCTGTGATGTGAGCCAAGTGATATCCT
GTAGTACACATTGTACTGAGTGGTTTTTCTGAATAAATTCCATATTTTACCTATGA

【図４４】

><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
MKLQCVSLWLLGTILILCSVDNHGLRRCLISTDMHHIEESFQEIKRAIQAKDTFPNVTILST
LETLQIIKPLDVCCVTKNLLAFYVDRVFKDHQEPNPKILRKISSIANSFLYMQKTLRQCQEQ
RQCHCRQEATNATRVIHDNYDQLEVHAAAIKSLGELDVFLAWINKNHEVMFSA

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-ミリストイル化部位
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ーチャー1
アミノ酸　159-169

【図４５】

GCTCCCAGCCAAGAACCTCGGGGCCGCTGCGCGGTGGGGAGGAGTTCCCCGAAACCCGGCCG
CTAAGCGAGGCCTCCTCCTCCCGCAGATCCGAACGGCCTGGGCGGGGTCACCCCGGCTGGGA
CAAGAAGCCGCCGCCTGCCTGCCCGGGCCCGGGGAGGGGGCTGGGGCTGGGGCCGGAGGCGG
GGTGTGAGTGGGTGTGTGCGGGGGGCGGAGGCTTGATGCAATCCCGATAAGAAATGCTCGGG
TGTCTTGGGCACCTACCCGTGGGGCCCGTAAGGCGCTACTATATAAGGCTGCCGGCCCCGGAG
CCGCCGCCGCCGTCAGAGCAGGAGCGCTGCGTCCAGGATCTAGGGCCACGACCATCCCAACCC
GGC**ACT**CACAGCCCCGCAGCGCATCCCGGTCGCCGCCCAGCCTCCCGCACCCCATCGCCGG
AGCTGCGCCGAGAGCCCCAGGGAGGTGCC**ATG**CGGAGCGGGTGTGTGGTGGTCCACGTATGG
ATCCTGGCCGGCCTCTGGCTGGCCGTGGCCGGGCGCCCCCTCGCCTTCTCGGACGCGGGGCC
CCACGTGCACTACGGCTGGGGCGACCCCATCCGCCTGCGGCACCTGTACACCTCCGGCCCCC
ACGGGCTCTCCAGCTGCTTCCTGCGCATCCGTGCCGACGGCGTCGTGGACTGCGCGCGGGGC
CAGAGCGCGCACAGTTTGCTGGAGATCAAGGCAGTCGCTCTGCGGACCGTGGCCATCAAGGG
CGTGCACAGCGTGCGGTACCTCTGCATGGGCGCCGACGGCAAGATGCAGGGGCTGCTTCAGT
ACTCGGAGGAAGACTGTGCTTTCGAGGAGGAGATCCGCCCAGATGGCTACAATGTGTACCGA
TCCGAGAAGCACCGCCTCCCGGTCTCCCTGAGCAGTGCCAAACAGCGGCAGCTGTACAAGAA
CAGAGGCTTTCTTCCACTCTCTCATTTCCTGCCCATGCTGCCCATGGTCCCAGAGGAGCCTG
AGGACCTCAGGGGCCACTTGGAATCTGACATGTTCTCTTCGCCCCTGGAGACCGACAGCATG
GACCCATTTGGGCTTGTCACCGGA**CT**GGAGGCCGT**GAGGAG**TCCC**AGCTTTGAGAAG**T**AA**CT
GAGACCATGCCCGGGCCTCTTCACTGCTGCCAGGGGCTGTGGTACCTGCAGCGTGGGGGACG
TGCTTCTACAAGAACAGTCCTGAGTCCACGTTCTGTTTAGCTTAGGAAGAAACATCTAGAA
GTTGTACATATTCAGAGTTTTCCATTGGCAGTGCCAGTTTCTAGCCAATAGACTTGTCTGAT
CATAACATTGTAAGCCTGTAGCTTGCCCAGCTGCTGCCTGGGCCCCCATTCTGCTCCCTCGA
GGTTGCTGGACAAGCTGCTGCACTGTCTCAGTTCTGCTTGAATACCTCCATCGATGGGGAAC
TCACTTCCTTTGGAAAAATTCTTATGTCAAGCTGAAATTCTCTAATTTTTTCTCATCACTTC
CCCAGGAGCAGCCAGAAGACAGGCAGTAGTTTTAATTTCAGGAACAGGTGATCCACTCTGTA
AAACAGCAGGTAAATTTCACTCAACCCCATGTGGGAATTGATCTATATCTCTACTTCCAGGG
ACCATTTGCCCTTCCCAAATCCCTCCAGGCCAGAACTGACTGGAGCAGGCATGGCCCACCAG
GCTTCAGGAGTAGGGGAAGCCTGGAGCCCCACTCCAGCCCTGGGACAACTTGAGAATTCCCC
CTGAGGCCAGTTCTGTCATGGATGCTGTCCTGAGAATAACTTGCTGTCCCGGTGTCACCTGC
TTCCATCTCCCAGCCCACCAGCCCTCTGCCCACCTCACATGCCTCCCCATGGATTGGGGCCT
CCCAGGCCCCCCACCTTATGTCAACCTGCACTTCTTGTTCAAAAATCAGGAAAAGAAAAGAT
TTGAAGACCCCAAGTCTTGTCAATAACTTGCTGTGTGGAAGCAGCGGGGGAAGACCTAGAAC
CCTTTCCCCAGCACTTGGTTTTCCAACATGATATTTATGAGTAATTTATTTTGATATGTACA
TCTCTTATTTTCTTACATTATTTATGCCCCCAAATTATATTTATGTATGTAAGTGAGGTTTG
TTTTGTATATTAAAATGGAGTTTGTTTGT

【図４６】

MRSGCVVVHVWILAGLWLAVAGRPLAFSDAGPHVHYGWGDPIRLRHLYTSGPHGLSSCFLRI
RADGVVDCARGQSAHSLLEIKAVALRTVAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEE
EIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESD
MFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSFEK

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-ミリストイル化部位
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４７】

GTCTGTTCCCAGGAGTCCTTCGGCGGCTGTTGTGTCAGTGGCCTGATCGCG**ATG**GGGACAAA
GGCGCAAGTCGAGAGGAAACTGTTGTGCCTCTTCATATTGGCGATCCTGTTGTGCTCCCTGG
CATTGGGCAGTGTTACAGTGCACTCTTCTGAACCTGAAGTCAGAATTCCTGAGAATAATCCT
GTGAAGTTGTCCTGTGCCTACTCGGGCTTTTCTTCTCCCCGTGTGGAGTGGAAGTTTGACCA
AGGAGACACCACCAGACTCGTTTGCTATAATAACAAGATCACAGCTTCCTATGAGGACCGGG
TGACCTTCTTGCCAACTGGTATCACCTTCAAGTCCGTGACACGGGAAGACACTGGGACATAC
ACTTGTATGGTCTCTGAGGAAGGCGGCAACAGCTATGGGGAGGTCAAGGTCAAGCTCATCGT
GCTTGTGCCTCCATCCAAGCCTACAGTTAACATCCCCTCCTCTGCCACCATTGGGAACCGGG
CAGTGCTGACATGCTCAGAACAAGATGGTTCCCCACCTTCTGAATACACCTGGTTCAAAGAT
GGGATAGTGATGCCTACGAATCCCAAAAGCACCCGTGCCTTCAGCAACTCTTCCTATGTCCT
GAATCCCACAACAGGAGAGCTGGTCTTTGATCCCCTGTCAGCCTCTGATACTGGAGAATACA
GCTGTGAGGCACGGAATGGGTATGGGACACCCATGACTTCAAATGCTGTGCGCATGGAAGCT
GTGGAGCGGAATGTGGGGGTCATCGTGGCAGCCGTCCTTGTAACCCTGATTCTCCTGGGAAT
CTTGGTTTTTGGCATCTGGTTTGCCTATAGCCGAGGCCACTTTGACAGAACAAAGAAAGGGA
CTTCGAGTAAGAAGGTGATTTACAGCCAGCCTAGTGCCCGAAGTGAAGGAGAATTCAAACAG
ACCTCGTCATTCCTGGTG**TGA**GCCTGGTCGGCTCACCGCCTATCATCTGCATTTGCCTTACT
CAGGTGCTACCGGACTCTGGCCCCTGATGTCTGTAGTTTCACAGGATGCCTTATTTGTCTTC
TACACCCCACAGGGCCCCCTACTTCTTCGGATGTGTTTTTAATAATGTCAGCTATGTGCCCC
ATCCTCCTTCATGCCCTCCCTCCCTTTCCTACCACTGCTGAGTGGCCTGGAACTTGTTTAAA
GTGTTTATTCCCCATTTCTTTGAGGGATCAGGAAGGAATCCTGGGTATGCCATTGACTTCCC
TTCTAAGTAGACAGCAAAAATGGCGGGGGTCGCAGGAATCTGCACTCAACTGCCCACCTGGC
TGGCAGGGATCTTTGAATAGGTATCTTGAGCTTGGTTCTGGGCTCTTTCCTTGTGTACTGAC
GACCAGGGCCAGCTGTTCTAGAGCGGGAATTAGAGGCTAGAGCGGCTGAAATGGTTGTTTGG
TGATGACACTGGGGTCCTTCCATCTCTGGGGCCCACTCTCTTCTGTCTTCCCATGGGAAGTG
CCACTGGGATCCCTCTGCCCTGTCCTCCTGAATACAAGCTGACTGACATTGACTGTGTCTGT
GGAAAATGGGAGCTCTTGTTGTGGAGAGCATAGTAAATTTTCAGAGAACTTGAAGCCAAAAG
GATTTAAAACCGCTGCTCTAAAGAAAAGAAAACTGGAGGCTGGGCGCAGTGGCTCACGCCTG
TAATCCCAGAGGCTGAGGCAGGCGGATCACCTGAGGTCGGGAGTTCGGGATCAGCCTGACCA
ACATGGAGAAACCCTACTGGAAATACAAAGTTAGCCAGGCATGGTGGTGCATGCCTGTAGTC
CCAGCTGCTCAGGAGCCTGGCAACAAGAGCAAAACTCCAGCTCAAAAAAAAAAAAAAAA

【図４８】

MGTKAQVERKLLCLFILAILLCSLALGSVTVHSSEPEVRIPENNPVKLSCAYSGFSSPRVEW
KFDQGDTTRLVCYNNKITASYEDRVTFLPTGITFKSVTREDTGTYTCMVSEEGGNSYGEVKV
KLIVLVPPSKPTVNIPSSATIGNRAVLTCSEQDGSPPSEYTWFKDGIVMPTNPKSTRAFSNS
SYVLNPTTGELVFDPLSASDTGEYSCEARNGYGTPMTSNAVRMEAVERNVGVIVAAVLVTLI
LLGILVFGIWFAYSRGHFDRTKKGTSSKKVIYSQPSARSEGEFKQTSSFLV

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 cGMP-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-ミリストイル化部位
アミノ酸　105-111, 116-122, 158-164, 219-225, 237-243, 256-262

【図４９】

CCCACGCGTCCGAACCTCTCCAGCG**ATG**GGAGCCGCCCGCCTGCTGCCCAACCTCACTCTGT
GCTTACAGCTGCTGATTCTCTGCTGTCAAACTCAGTACGTGAGGGACCAGGGCGCCATGACC
GACCAGCTGAGCAGGCGGCAGATCCGCGAGTACCAACTCTACAGCAGGACCAGTGGCAAGCA
CGTGCAGGTCACCGGGCGTCGCATCTCCGCCACCGCCGAGGACGGCAACAAGTTTGCCAAGC
TCATAGTGGAGACGGACACGTTTGGCAGCCGGGTTCGCATCAAAGGGGCTGAGAGTGAGAAG
TACATCTGTATGAACAAGAGGGGCAAGCTCATCGGGAAGCCCAGCGGGAAGAGCAAAGACTG
CGTGTTCACGGAGATCGTGCTGGAGAACAACTATACGGCCTTCCAGAACGCCCGGCACGAGG
GCTGGTTCATGGCCTTCACGCGGCAGGGGCGGCCCCGCCAGGCTTCCCGCAGCCGCCAGAAC
CAGCGCGAGGCCCACTTCATCAAGCGCCTCTACCAAGGCCAGCTGCCCTTCCCCAACCACGC
CGAGAAGCAGAAGCAGTTCGAGTTTGTGGGCTCCGCCCCCACCCGCCGGACCAAGCGCACAC
GGCGGCCCCAGCCCCTCACG**TAG**TCTGGGAGGCAGGGGGCAGCAGCCCCTGGGCCGCCTCCC
CACCCCTTTCCCTTCTTAATCCAAGGACTGGGCTGGGGTGGCGGGAGGGGAGCCAGATCCCC
GAGGGAGGACCCTGAGGGCCGCGAAGCATCCGAGCCCCCAGCTGGGAAGGGGCAGGCCGGTG
CCCCAGGGGCGGCTGGCACAGTGCCCCCTTCCCGGACGGGTGGCAGGCCCTGGAGAGGAACT
GAGTGTCACCCTGATCTCAGGCCACCAGCCTCTGCCGGCCTCCCAGCCGGGCTCCTGAAGCC
CGCTGAAAGGTCAGCGACTGAAGGCCTTGCAGACAACCGTCTGGAGGTGGCTGTCCTCAAAA
TCTGCTTCTCGGATCTCCCTCAGTCTGCCCCCAGCCCCCAAACTCCTCCTGGCTAGACTGTA
GGAAGGGACTTTTGTTTGTTTGTTTCAGGAAAAAAGAAAGGGAGAGAGAGGAAAATAG
AGGGTTGTCCACTCCTCACATTCCACGACCCAGGCCTGCACCCCACCCCCAACTCCCAGCCC
CGGAATAAAACCATTTTCCTGC

【図５０】

MGAARLLPNLTLCLQLLILCCQTQYVRDQGAMTDQLSRRQIREYQLYSRTSGKHVQVTGRRI
SATAEDGNKFAKLIVETDTFGSRVRIKGAESEKYICMNKRGKLIGKPSGKSKDCVFTEIVLE
NNYTAFQNARHEGWFMAFTRQGRPRQASRSRQNQREAHFIKRLYQGQLPFPNHAEKQKQFEF
VGSAPTRRTKRTRRPQPLT

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 cGMP-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-ミリストイル化部位
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５１】

GTTGTGTCCTTCAGCAAAACAGTGGATTTAAATCTCCTTGCACAAGCTTGAGAGCAACACAA
TCTATCAGGAAAGAAAGAAAGAAAAAAACCGAACCTGACAAAAAAGAAGAAAAAGAAGAAGA
AAAAAAATC**ATG**AAAACCATCCAGCCAAAAATGCACAATTCTATCTCTTGGGCAATCTTCAC
GGGGCTGGCTGCTCTGTGTCTCTTCCAAGGAGTGCCCGTGCGCAGCGGAGATGCCACCTTCC
CCAAAGCTATGGACAACGTGACGGTCCGGCAGGGGGAGAGCGCCACCCTCAGGTGCACTATT
GACAACCGGGTCACCCGGGTGGCCTGGCTAAACCGCAGCACCATCCTCTATGCTGGGAATGA
CAAGTGGTGCCTGGATCCTCGCGTGGTCCTTCTGAGCAACACCCAAACGCAGTACAGCATCG
AGATCCAGAACGTGGATGTGTATGACGAGGGCCCTTACACCTGCTCGGTGCAGACAGACAAC
CACCCAAAGACCTCTAGGGTCCACCTCATTGTGCAAGTATCTCCCAAAATTGTAGAGATTTC
TTCAGATATCTCCATTAATGAAGGGAACAATATTAGCCTCACCTGCATAGCAACTGGTAGAC
CAGAGCCTACGGTTACTTGGAGACACATCTCTCCCAAAGCGGTTGGCTTTGTGAGTGAAGAC
GAATACTTGGAAATTCAGGGCATCACCCGGGAGCAGTCAGGGGACTACGAGTGCAGTGCCTC
CAATGACGTGGCCGCGCCCGTGGTACGGAGAGTAAAGGTCACCGTGAACTATCCACCATACA
TTTCAGAAGCCAAGGGTACAGGTGTCCCCGTGGGACAAAAGGGGACACTGCAGTGTGAAGCC
TCAGCAGTCCCCTCAGCAGAATTCCAGTGGTACAAGGATGACAAAAGACTGATTGAAGGAAA
GAAAGGGGTGAAAGTGGAAAACAGACCTTTCCTCTCAAAACTCATCTTCTTCAATGTCTCTG
AACATGACTATGGGAACTACACTTGCGTGGCCTCCAACAAGCTGGGCCACACCAATGCCAGC
ATCATGCTATTTGGTCCAGGCGCCGTCAGCGAGGTGAGCAACGGCACGTCGAGGAGGGCAGG
CTGCGTCTGGCTGCTGCCTCTTCTGGTCTTGCACCTGCTTCTCAAATTT**TGA**TGTGAGTGCC
ACTTCCCCACCCGGGAAAGGCTGCCGCCACCACCACCACCAACACAACAGCAATGGCAACAC
CGACAGCAACCAATCAGATATATACAAATGAAATTAGAAGAAACACAGCCTCATGGGACAGA
AATTTGAGGGAGGGGAACAAAGAATACTTTGGGGGGAAAAGAGTTTTAAAAAAGAAATTGAA
AATTGCCTTGCAGATATTTAGGTACAATGGAGTTTTCTTTTCCCAAACGGGAAGAACACAGC
ACACCCGGCTTGGACCCACTGCAAGCTGCATCGTGCAACCTCTTTGGTGCCAGTGTGGGCAA
GGGCTCAGCCTCTCTGCCCACAGAGTGCCCCCACGTGGAACATTCTGGAGCTGGCCATCCCA
AATTCAATCAGTCCATAGAGACGAACAGAATGAGACCTTCCGGCCCAAGCGTGGCGCTGCGG
GCACTTTGGTAGACTGTGCCACCACGGCGTGTGTTGTGAAACGTGAAATAAAAAGAGCAAAA
AAAAA

【図５２】

MKTIQPKMHNSISWAIFTGLAALCLFQGVPVRSGDATFPKAMDNVTVRQGESATLRCTIDNR
VTRVAWLNRSTILYAGNDKWCLDPRVVLLSNTQTQYSIEIQNVDVYDEGPYTCSVQTDNHPK
TSRVHLIVQVSPKIVEISSDISINEGNNISLTCIATGRPEPTVTWRHISPKAVGFVSEDEYL
EIQGITREQSGDYECSASNDVAAPVVRRVKVTVNYPPYISEAKGTGVPVGQKGTLQCEASAV
PSAEFQWYKDDKRLIEGKKGVKVENRPFLSKLIFFNVSEHDYGNYTCVASNKLGHTNASIML
FGPGAVSEVSNGTSRRAGCVWLLPLLVLHLLLKF

シグナルペプチド
アミノ酸　1-28

【図５３】

GTGGACTCTGAGAAGCCCAGGCAGTTGAGGACAGGAGAGAGAAGGCTGCAGACCCAGAGGGA
GGGAGGACAGGGAGTCGGAAGGAGGAGGACAGAGGAGGGCACAGAGACGCAGAGCAAGGCG
GCAAGGAGGAGACCCTGGTGGGAGGAAGACACTCTGGAGAGAGAGGGGGCTGGCCAGAGATG
AAGTTCCAGGGGCCCCTGGCCTGCCTCCTGCTGGCCCTCTGCCTGGGCAGTGGGGAGGCTGG
CCCCCTGCAGAGCGGAGAGGAAAGCACTGGGACAAATATTGGGGAGGCCCTTGGACATGGCC
TGGGAGACGCCCTGAGCGAAGGGGTGGGAAAGGCCATTGGCAAAGAGGCCGGAGGGGCAGCT
GGCTCTAAAGTCAGTGAGGCCCTTGGCCAAGGGACCAGAGAAGCAGTTGGCACTGGAGTCAG
GCAGGTTCCAGGCTTTGGCGCAGCAGATGCTTTGGGCAACAGGGTCGGGGAAGCAGCCCATG
CTCTGGGAAACACTGGGCACGAGATTGGCAGACAGGCAGAAGATGTCATTCGACACGGAGCA
GATGCTGTCCGCGGCTCCTGGCAGGGGGTGCCTGGCCACAGTGGTGCTTGGGAAACTTCTGG
AGGCCATGGCATCTTTGGCTCTCAAGGTGGCCTTGGAGGCCAGGGCCAGGGCAATCCTGGAG
GTCTGGGGACTCCGTGGGTCCACGGATACCCCGGAAACTCAGCAGGCAGCTTTGGAATGAAT
CCTCAGGGAGCTCCCTGGGGTCAAGGAGGCAATGGAGGGCCACCAAACTTTGGGACCAACAC
TCAGGGAGCTGTGGCCCAGCCTGGCTATGGTTCAGTGAGAGCCAGCAACCAGAATGAAGGGT
GCACGAATCCCCCACCATCTGGCTCAGGTGGAGGCTCCAGCAACTCTGGGGGAGGCAGCGGC
TCACAGTCGGGCAGCAGTGGCAGTGGCAGCAATGGTGACAACAACAATGGCAGCAGCAGTGG
TGGCAGCAGCAGTGGCAGCAGCAGTGGCAGCAGCAGTGGCGGCAGCAGTGGCGGCAGCAGTG
GTGGCAGCAGTGGCAACAGTGGTGGCAGCAGAGGTGACAGCGGCAGTGAGTCCTCCTGGGGA
TCCAGCACCGGCTCCTCCTCCGGCAACCACGGTGGGAGCGGCGGAGGAAATGGACATAAACC
CGGGTGTGAAAAGCCAGGGAATGAAGCCCGCGGGAGCGGGGAATCTGGGATTCAGGGCTTCA
GAGGACAGGGAGTTTCCAGCAACATGAGGGAAATAAGCAAAGAGGGCAATCGCCTCCTTGGA
GGCTCTGGAGACAATTATCGGGGGCAAGGGTCGAGCTGGGGCAGTGGAGGAGGTGACGCTGT
TGGTGGAGTCAATACTGTGAACTCTGAGACGTCTCCTGGGATGTTTAACTTTGACACTTTCT
GGAAGAATTTTAAATCCAAGCTGGGTTTCATCAACTGGGATGCCATAAACAAGGACCAGAGA
AGCTCTCGCATCCCGTGACCTCCAGACAAGGAGCCACCAGATTGGATGGGAGCCCCCACACT
CCCTCCTTAAAACACCACCCTCTCATCACTAATCTCAGCCCTTGCCCTTGAAATAAACCTTA
GCTGCCCCACAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

【図５４】

></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

MKFQGPLACLLLALCLGSGEAGPLQSGEESTGTNIGEALGHGLGDALSEGVGKAIGKEAGGA
AGSKVSEALGQGTREAVGTGVRQVPGFGAADALGNRVGEAAHALGNTGHEIGRQAEDVIRHG
ADAVRGSWQGVPGHSGAWETSGGHGIFGSQGGLGGQGQGNPGGLGTPWVHGYPGNSAGSFGM
NPQGAPWGQGGNGGPPNFGTNTQGAVAQPGYGSVRASNQNEGCTNPPPSGSGGGSSNSGGGS
GSQSGSSGSGSNGDNNNGSSSGGSSSSGSSSGSSSGGSSGGSSGSNSGGSRGDSGSESSW
GSSTGSSSGNHGGSGGGNGHKPGCEKPGNEARGSGESGIQGFRGQGVSSNMREISKEGNRLL
GGSGDNYRGQGSSWGSGGGDAVGGVNTVNSETSPGMFNFDTFWKNFKSKLGFINWDAINKDQ
RSSRIP

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-ミリストイル化部位

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５５】

AGCCAGGCAGCACATCACAGCGGGAGGAGCTGTCCCAGGTGGCCCAGCTCAGCAATGGCAAT
GGGGGTCCCCAGAGTCATTCTGCTCTGCCTCTTTGGGGCTGCGCTCTGCCTGACAGGGTCCC
AAGCCCTGCAGTGCTACAGCTTTGAGCACACCTACTTTGGCCCCTTTGACCTCAGGGCCATG
AAGCTGCCCAGCATCTCCTGTCCTCATGAGTGCTTTGAGGCTATCCTGTCTCTGGACACCGG
GTATCGCGCGCCGGTGACCCTGGTGCGGAAGGGCTGCTGGACCGGGCCTCCTGCGGGCCAGA
CGCAATCGAACCCGGACGCGCTGCCGCCAGACTACTCGGTGGTGCGCGGCTGCACAACTGAC
AAATGCAACGCCCACCTCATGACTCATGACGCCCTCCCCAACCTGAGCCAAGCACCCGACCC
GCCGACGCTCAGCGGCGCCGAGTGCTACGCCTGTATCGGGGTCCACCAGGATGACTGCGCTA
TCGGCAGGTCCCGACGAGTCCAGTGTCACCAGGACCAGACCGCCTGCTTCCAGGGCAGTGGC
AGAATGACAGTTGGCAATTTCTCAGTCCCTGTGTACATCAGAACCTGCCACCGGCCCTCCTG
CACCACCGAGGGCACCACCAGCCCCTGGACAGCCATCGACCTCCAGGGCTCCTGCTGTGAGG
GGTACCTCTGCAACAGGAAATCCATGACCCAGCCCTTCACCAGTGCTTCAGCCACCACCCCT
CCCCGAGCACTACAGGTCCTGGCCCTGCTCCTCCCAGTCCTCCTGCTGGTGGGGCTCTCAGC
ATAGACCGCCCCTCCAGGATGCTGGGGACAGGGCTCACACACCTCATTCTTGCTGCTTCAGC
CCCTATCACATAGCTCACTGGAAAATGATGTTAAAGTAAGAATTGCAAAA

【図５６】

></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

MAMGVPRVILLCLFGAALCLTGSQALQCYSFEHTYFGPFDLRAMKLPSISCPHECFEAILSL
DTGYRAPVTLVRKGCWTGPPAGQTQSNPDALPPDYSVVRGCTTDKCNAHLMTHDALPNLSQA
PDPPTLSGAECYACIGVHQDDCAIGRSRRVQCHQDQTACFQGSGRMTVGNFSVPVYIRTCHR
PSCTTEGTTSPWTAIDLQGSCCEGYLCNRKSMTQPFTSASATTPPRALQVLALLLPVLLLVG
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-ミリストイル化部位

アミノ酸　15-21, 84-90

【図５７】

GGAGCCGCCCTGGGTGTCAGCGGCTCGGCTCCCGCGCACGCTCCGGCCGTCGCGCAGCCTCG
GCACCTGCAGGTCCGTGCGTCCCGCGGCTGGCGCCCCTGACTCCGTCCCGGCCAGGGAGGGC
CATGATTTCCCTCCCGGGGCCCCTGGTGACCAACTTGCTGCCGGTTTTGTTCCTGGGGCTGA
GTGCCCTCGCGCCCCCCTCGCGGGCCCAGCTGCAACTGCACTTGCCCGCCAACCGGTTGCAG
GCGGTGGAGGGAGGGGAAGTGGTGCTTCCAGCGTGGTACACCTTGCACGGGGAGGTGTCTTC
ATCCCAGCCATGGGAGGTGCCCTTTGTGATGTGGTTCTTCAAACAGAAAGAAAAGGAGGATC
AGGTGTTGTCCTACATCAATGGGGTCACAACAAGCAAACCTGGAGTATCCTTGGTCTACTCC
ATGCCCTCCCGGAACCTGTCCCTGCGGCTGGAGGGTCTCCAGGAGAAAGACTCTGGCCCCTA
CAGCTGCTCCGTGAATGTGCAAGACAAACAAGGCAAATCTAGGGGCCACAGCATCAAAACCT
TAGAACTCAATGTACTGGTTCCTCCAGCTCCTCCATCCTGCCGTCTCCAGGGTGTGCCCCAT
GTGGGGGCAAACGTGACCCTGAGCTGCCAGTCTCCAAGGAGTAAGCCCGCTGTCCAATACCA
GTGGGATCGGCAGCTTCCATCCTTCCAGACTTTCTTTGCACCAGCATTAGATGTCATCCGTG
GGTCTTTAAGCCTCACCAACCTTTCGTCTTCCATGGCTGGAGTCTATGTCTGCAAGGCCCAC
AATGAGGTGGGCACTGCCCAATGTAATGTGACGCTGGAAGTGAGCACAGGGCCTGGAGCTGC
AGTGGTTGCTGGAGCTGTTGTGGGTACCCTGGTTGGACTGGGGTTGCTGGCTGGGCTGGTCC
TCTTGTACCACCGCCGGGGCAAGGCCCTGGAGGAGCCAGCCAATGATATCAAGGAGGATGCC
ATTGCTCCCCGGACCCTGCCCTGGCCCAAGAGCTCAGACACAATCTCCAAGAATGGGACCCT
TTCCTCTGTCACCTCCGCACGAGCCCTCCGGCCACCCCATGGCCCTCCCAGGCCTGGTGCAT
TGACCCCCACGCCCAGTCTCTCCAGCCAGGCCCTGCCCTCACCAAGACTGCCCACGACAGAT
GGGGCCCACCCTCAACCAATATCCCCCATCCCTGGTGGGGTTTCTTCCTCTGGCTTGAGCCG
CATGGGTGCTGTGCCTGTGATGGTGCCTGCCCAGAGTCAAGCTGGCTCTCTGGTATGACTGAC
CCCACCACTCATTGGCTAAAGGATTTGGGGTCTCTCCTTCCTATAAGGGTCACCTCTAGCAC
AGAGGCCTGAGTCATGGGAAAGAGTCACACTCCTGACCCTTAGTACTCTGCCCCCACCTCTC
TTTACTGTGGGAAAACCATCTCAGTAAGACCTAAGTGTCCAGGAGACAGAAGGAGAAGAGGA
AGTGGATCTGGAATTGGGAGGAGCCTCCACCCACCCCTGACTCCTCCTTATGAAGCCAGCTG
CTGAAATTAGCTACTCACCAAGAGTGAGGGGCAGAGACTTCCAGTCACTGAGTCTCCCAGGC
CCCCTTGATCTGTACCCCACCCCTATCTAACACCACCCTTGGCTCCCACTCCAGCTCCCTGT
ATTGATATAACCTGTCAGGCTGGCTTGGTTAGGTTTTACTGGGGCAGAGGATAGGGAATCTC
TTATTAAAACTAACATGAAATATGTGTTGTTTTCATTTGCAAATTTAAATAAAGATACATAA
TGTTTGTATGAAAAA

【図５８】

MISLPGPLVTNLLRFLFLGLSALAPPSRAQLQLHLPANRLQAVEGGEVVLPAWYTLHGEVSS
SQPWEVPFVMWFFKQKEKEDQVLSYINGVTTSKPGVSLVYSMPSRNLSLRLEGLQEKDSGPY
SCSVNVQDKQGKSRGHSIKTLELNVLVPPAPPSCRLQGVPHVGANVTLSCQSPRSKPAVQYQ
WDRQLPSFQTFFAPALDVIRGSLSLTNLSSSMAGVYVCKAHNEVGTAQCNVTLEVSTGPGAA
VVAGAVVGTLVGLGLLAGLVLLYHRRGKALEEPANDIKEDAIAPRTLPWPKSSDTISKNGTL
SSVTSARALRPPHGPPRPGALTPTPSLSSQALPSPRLPTTDGAHPQPISPIPGGVSSSGLSR
MGAVPVMVPAQSQAGSLV

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-ミリストイル化部位

アミノ酸　90-96, 167-173, 220-226, 231-237, 252-258, 256-262, 262-268, 308-314, 363-369, 364-370

原核生物膜リポタンパク質脂質結合部位

アミノ酸　164-175

【図５９】

ACTTGCCATCACCTGTTGCCAGTGTGGAAAAATTCTCCCTGTTGAATTTTTTGCACATGGAG
GACAGCAGCAAAGAGGGCAACACAGGCTGATAAGACCAGAGACAGCAGGGAGATTATTTTAC
CATACGCCCTCAGGACGTTCCCTCTAGCTGGAGTTCTGGACTTCAACAGAACCCCATCCAGT
CATTTTGATTTTGCTGTTTATTTTTTTTTCTTTTTCTTTTCCCACCACATTGTATTTTAT
TTCCGTACTTCAGAA**ATG**GGCCTACAGACCACAAAGTGGCCCAGCCATGGGGCTTTTTTCCT
GAAGTCTTGGCTTATCATTTCCCTGGGGCTCTACTCACAGGTGTCCAAACTCCTGGCCTGCC
CTAGTGTGTGCCGCTGCGACAGGAACTTTGTCTACTGTAATGAGCGAAGCTTGACCTCAGTG
CCTCTTGGGATCCCGGAGGGCGTAACCGTACTCTACCTCCACAACAACCAAATTAATAATGC
TGGATTTCCTGCAGAACTGCACAATGTACAGTCGGTGCACACGGTCTACCTGTATGGCAACC
AACTGGACGAATTCCCCATGAACCTTCCCAAGAATGTCAGAGTTCTCCATTTGCAGGAAAAC
AATATTCAGACCATTTCACGGGCTGCTCTTGCCCAGCTCTTGAAGCTTGAAGAGGCTGCACCT
GGATGACAACTCCATATCCACAGTGGGGGTGGAAGACGGGGCCTTCCGGGAGGCTATTAGCC
TCAAATTGTTGTTTTTGTCTAAGAATCACCTGAGCAGTGTGCCTCTTGGGCTTCCTGTGGAC
TTGCAAGAGCTGAGAGTGGATGAAAATCGAATTGCTGTCATATCCGACATGGCCTTCCAGAA
TCTCACGAGCTTGGAGCGTCTTATTGTGGACGGGAACCTCCTGACCAACAAGGGTATCGCCG
AGGGCACCTTCAGCCATCTCACCAAGCTCAAGGAATTTTCAATTGTACGTAATTCGCTGTCC
CACCCTCCTCCCGATCTCCCAGGTACGCATCTGATCAGGCTCTATTTGCAGGACAACCAGAT
AAACCACATTCCTTTGACAGCCTTCTCAAATCTGCGTAAGCTGGAACGGCTGGATATATCCA
ACAACCAACTGCGGATGCTGACTCAAGGGGTTTTTGATAATCTCTCCAACCTGAAGCAGCTC
ACTGCTCGGAATAACCCTTGGTTTTGTGACTGCAGTATTAAATGGGTCACAGAATGGCTCAA
ATATATCCCTTCATCTCTCAACGTGCGGGGTTTCATGTGCCAAGGTCCTGAACAAGTCCGGG
GGATGGCCGTCAGGGAATTAAATATGAATCTTTTGTCCTGTCCCACCACGACCCCCGGCCTG
CCTCTCTTCACCCCAGCCCCAAGTACAGCTTCTCCGACCACTCAGCCTCCCACCCTCTCTAT
TCCAAACCCTAGCAGAAGCTACACGCCTCCAACTCCTACCACATCGAAACTTCCCACGATTC
CTGACTGGGATGGCAGAGAAAGAGTGACCCCACCTATTTCTGAACGGATCCAGCTCTCTATC
CATTTTGTGAATGATACTTCCATTCAAGTCAGCTGGCTCTCTCTCTTCACCGTGATGGCATA
CAAACTCACATGGGTGAAAATGGGCCACAGTTTAGTAGGGGGCATCGTTCAGGAGCGCATAG
TCAGCGGTGAGAAGCAACACCTGAGCCTGGTTAACTTAGAGCCCCGATCCACCTATCGGATT
TGTTTAGTGCCACTGGATGCTTTTAACTACCGCGCGGTAGAAGACACCATTTGTTCAGAGGC
CACCACCCATGCCTCCTATCTGAACAACGGCAGCAACACAGCGTCCAGCCATGAGCAGACGA
CGTCCCACAGCATGGGCTCCCCCTTTCTGCTGGCGGGCTTGATCGGGGGCGGGTGATATTT
GTGCTGGTGGTCTTGCTCAGCGTCTTTTGCTGGCATATGCACAAAAAGGGGCGCTACACCTC
CCAGAAGTGGAAATACAACCGGGGCCGGCGGAAAGATGATTATTGCGAGGCAGGCACCAAGA
AGGACAACTCCATCCTGGAGATGACAGAAACCAGTTTCAGATCGTCTCCTTAAATAACGAT
CAACTCCTTAAAGGAGATTTCAGACTGCAGCCCATTTACACCCCAAATGGGGGCATTAATTA
CACAGACTGCCATATCCCCAACAACATGCGATACTGCAACAGCAGCGTGCCAGACCTGGAGC
ACTGCCATACG**TGA**CAGCCAGAGGCCCAGCGTTATCAAGGCGGACAATTAGACTCTTGAGAA
CACACTCGTGTGTGCACATAAAGACACGCAGATTACATTTGATAAATGTTACACAGATGCAT
TTGTGCATTTGAATACTCTGTAATTTATACGGTGTACTATATAATGGGATTTAAAAAAAGTG
CTATCTTTTCTATTTCAAGTTAATTACAAACAGTTTTGTAACTCTTTGCTTTTTAAATCTT

【図６０】

MGLQTTKWPSHGAFFLKSWLIISLGLYSQVSKLLACPSVCRCDRNFVYCNERSLTSVPLGIP
EGVTVLYLHNNQINNAGFPAELHNVQSVHTVYLYGNQLDEFPMNLPKNVRVLHLQENNIQTI
SRAALAQLLKLEELHLDDNSISTVGVEDGAFREAISLKLLFLSKNHLSSVPVGLPVDLQELR
VDENRIAVISDMAFQNLTSLERLIVDGNLLTNKGIAEGTFSHLTKLKEFSIVRNSLSHPPPD
LPGTHLIRLYLQDNQINHIPLTAFSNLRKLERLDISNNQLRMLTQGVFDNLSNLKQLTARNN
PWFCDCSIKWVTEWLKYIPSSLNVRGFMCQGPEQVRGMAVRELNMNLLSCPTTTPGLPLFTP
APSTASPTTQPPTLSIPNPSRSYTPPTPTTSKLPTIPDWDGRERVTPPISERIQLSIHFVND
TSIQVSWLSLFTVMAYKLTWVKMGHSLVGGIVQERIVSGEKQHLSLVNLEPRSTYRICLVPL
DAFNYRAVEDTICSEATTHASYLNNGSNTASSHEQTTSHSMGSPFLLAGLIGGAVIFVLVVL
LSVFCWHMHKKGRYTSQKWKYNRGRRKDDYCEAGTKKDNSILEMTETSFQIVSLNNDQLLKG
DFRLQPIYTPNGGINYTDCHIPNNMRYCNSSVPDLEHCHT

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 II 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-ミリストイル化部位

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

ロイシンジッパーパターン

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６１】

TGAAGAGTAATAGTTGGAATCAAAAGAGTCAACGCA**ATG**AACTGTTATTTACTGCTGCGTTT
TATGTTGGGAATTCCTCTCCTATGGCCTTGTCTTGGAGCAACAGAAAACTCTCAAACAAAGA
AAGTCAAGCAGCCAGTGCGATCTCATTTGAGAGTGAAGCGTGGCTGGGTGTGGAACCAATTT
TTTGTACCAGAGGAAATGAATACGACTAGTCATCACATCGGCCAGCTAAGATCTGATTTAGA
CAATGGAAACAATTCTTTCCAGTACAAGCTTTTGGGAGCTGGAGCTGGAAGTACTTTTATCA
TTGATGAAAGAACAGGTGACATATATGCCATACAGAAGCTTGATAGAGAGGAGCGATCCCTC
TACATCTTAAGAGCCCAGGTAATAGACATCGCTACTGGAAGGGCTGTGGAACCTGAGTCTGA
GTTTGTCATCAAAGTTTCGGATATCAATGACAATGAACCAAAATTCCTAGATGAACCTTATG
AGGCCATTGTACCAGAGATGTCTCCAGAAGGAACATTAGTTATCCAGGTGACAGCAAGTGAT
GCTGACGATCCCTCAAGTGGTAATAATGCTCGTCTCCTCTACAGCTTACTTCAAGGCCAGCC
ATATTTTTCTGTTGAACCAACAACAGGAGTCATAAGAATATCTTCTAAAATGGATAGAGAAC
TGCAAGATGAGTATTGGGTAATCATTCAAGCCAAGGACATGATTGGTCAGCCAGGAGCGTTG
TCTGGAACAACAAGTGTATTAATTAAACTTTCAGATGTTAATGACAATAAGCCTATATTTAA
AGAAAGTTTATACCGCTTGACTGTCTCTGAATCTGCACCCACTGGGACTTCTATAGGAACAA
TCATGGCATATGATAATGACATAGGAGAGAATGCAGAAATGGATTACAGCATTGAAGAGGAT
GATTCGCAAACATTTGACATTATTACTAATCATGAAACTCAAGAAGGAATAGTTATATTAAA
AAAGAAAGTGGATTTTGAGCACCAGAACCACTACGGTATTAGAGCAAAAGTTAAAAACCATC
ATGTTCCTGAGCAGCTCATGAAGTACCACACTGAGGCTTCCACCACTTTCATTAAGATCCAG
GTGGAAGATGTTGATGAGCCTCCTCTTTTCCTCCTTCCATATTATGTATTTGAAGTTTTTGA
AGAAACCCCACAGGGATCATTTGTAGGCGTGGTGTCTGCCACAGACCCAGACAATAGGAAAT
CTCCTATCAGGTATTCTATTACTAGGAGCAAAGTCTTCAATATCAATGATAATGGTACAATC
ACTACAAGTAACTCACTGGATCGTGAAATCAGTGCTTGGTACAACCTAAGTATTACAGCCAC
AGAAAAATACAATATAGAACAGATCTCTTCGATCCCACTGTATGTGCAAGTTCTTAACATCA
ATGATCATGCTCCTGAGTTCTCTCAATACTATGAGACTTATGTTTGTGAAAATGCAGGCTCT
GGTCAGGTAATTCAGACTATCAGTGCAGTGGATAGAGATGAATCCATAGAAGAGCACCATTT
TTACTTTAATCTATCTGTAGAAGACACTAACAATTCAAGTTTTACAATCATAGATAATCAAG
ATAACACAGCTGTCATTTTGACTAATAGAACTGGTTTTAACCTTCAAGAAGAACCTGTCTTC
TACATCTCCATCTTAATTGCCGACAATGGAATCCCGTCACTTACAAGTACAAACACCCTTAC
CATCCATGTCTGTGACTGTGGTGACAGTGGGAGCACACAGACCTGCCAGTACCAGGAGCTTG
TGCTTTCCATGGGATTCAAGACAGAAGTTATCATTGCTATTCTCATTTGCATTATGATCATA
TTTGGGTTTATTTTTTTGACTTTGGGTTTAAAACAACGGAGAAAACAGATTCTATTTCCTGA
GAAAAGTGAAGATTTCAGAGAGAATATATTCCAATATGATGATGAAGGGGGTGGAGAAGAAG
ATACAGAGGCCTTTGATATAGCAGAGCTGAGGAGTAGTACCATAATGCGGGAACGCAAGACT
CGGAAAACCACAAGCGCTGAGATCAGGAGCCTATACAGGCAGTCTTTGCAAGTTGGCCCCGA
CAGTGCCATATTCAGGAAATTCATTCTGGAAAAGCTCGAAGAAGCTAATACTGATCCGTGTG
CCCCTCCTTTTGATTCCCTCCAGACCTACGCTTTTGAGGGAACAGGGTCATTAGCTGGATCC
CTGAGCTCCTTAGAATCAGCAGTCTCTGATCAGGATGAAAGCTATGATTACCTTAATGAGTT
GGGACCTCGCTTTAAAAGATTAGCATGCATGTTTGGTTCTGCAGTGCAGTCAAATAAT**TAG**G
GCTTTTTACCATCAAAATTTTTAAAAGTGCTAATGTGTATTCGAACCCAATGGTAGTCTTAA
AGAGTTTTGTGCCCTGGCTCTATGGCGGGGAAAGCCCTAGTCTATGGAGTTTCTGATTTCC
CTGGAGTAAATACTCCATGGTTATTTTAAGCTACCTACATGCTGTCATTGAACAGAGATGTG
GGGAGAAATGTAAACAATCAGCTCACAGGCATCAATACAACCAGATTTGAAGTAAAATAATG
TAGGAAGATATTAAAAGTAGATGAGAGGACACAAGATGTAGTCGATCCTTATGCGATTATAT
CATTATTTACTTAGGAAAGAGTAAAAATACCAAACGAGAAAATTTAAAGGAGCAAAAATTTG
CAAGTCAAATAGAAATGTACAAATCGAGATAACATTTACATTTCTATCATATTGACATGAAA
ATTGAAAATGTATAGTCAGAGAAATTTTCATGAATTATTCCATGAAGTATTGTTTCCTTTAT
TTTAAA

【図６２】

></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
MNCYLLLRFMLGIPLLWPCLGATENSQTKKVKQPVRSHLRVKRGWVWNQFFVPEEMNTTSHH
IGQLRSDLDNGNNSFQYKLLGAGAGSTFIIDERTGDIYAIQKLDREERSLYILRAQVIDIAT
GRAVEPESEFVIKVSDINDNEPKFLDEPYEAIVPEMSPEGTLVIQVTASDADDPSSGNNARL
LYSLLQGQPYFSVEPTTGVIRISSKMDRELQDEYWVIIQAKDMIGQPGALSGTTSVLIKLSD
VNDNKPIFKESLYRLTVSESAPTGTSIGTIMAYDNDIGENAEMDYSIEEDDSQTFDIITNHE
TQEGIVILKKKVDFEHQNHYGIRAKVKNHHVPEQLMKYHTEASTTFIKIQVEDVDEPPLFLL
PYYVFEVFEETPQGSFVGVVSATDPDNRKSPIRYSITRSKVFNINDNGTITTSNSLDREISA
WYNLSITATEKYNIEQISSIPLYVQVLNINDHAPEFSQYYETYVCENAGSGQVIQTISAVDR
DESIEEHHFYFNLSVEDTNNSSFTIIDNQDNTAVILTNRTGFNLQEEPVFYISILIADNGIP
SLTSTNTLTIHVCDCGDSGSTQTCQYQELVLSMGFKTEVIIAILICIMIIFGFIFLTLGLKQ
RRKQILFPEKSEDFRENIFQYDDEGGGEEDTEAFDIAELRSSTIMRERKTRKTTSAEIRSLY
RQSLQVGPDSAIFRKFILEKLEEANTDPCAPPFDSLQTYAFEGTGSLAGSLSSLESAVSDQD
ESYDYLNELGPRFKRLACMFGSAVQSNN

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-グリコシル化部位

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ーチャー

アミノ酸　136-146 及び 244-254

【図６３】

CTTCAGAACAGGTTCTCCTTCCCCAGTCACCAGTTGCTCGAGTTAGAATTGTCTGCA**ATG**GC
CGCCCTGCAGAAATCTGTGAGCTCTTTCCTTATGGGGACCCTGGCCACCAGCTGCCTCCTTC
TCTTGGCCCTCTTGGTACAGGGAGGAGCAGCTGCGCCCATCAGCTCCCACTGCAGGCTTGAC
AAGTCCAACTTCCAGCAGCCCTATATCACCAACCGCACCTTCATGCTGGCTAAGGAGGCTAG
CTTGGCTGATAACAACACAGACGTTCGTCTCATTGGGGAGAAACTGTTCCACGGAGTCAGTA
TGAGTGAGCGCTGCTATCTGATGAAGCAGGTGCTGAACTTCACCCTTGAAGAAGTGCTGTTC
CCTCAATCTGATAGGTTCCAGCCTTATATGCAGGAGGTGGTGCCCTTCCTGGCCAGGCTCAG
CAACAGGCTAAGCACATGTCATATTGAAGGTGATGACCTGCATATCCAGAGGAATGTGCAAA
AGCTGAAGGACACAGTGAAAAAGCTTGGAGAGAGTGGAGAGATCAAAGCAATTGGAGAACTG
GATTTGCTGTTTATGTCTCTGAGAAATGCCTGCATT**TGA**CCAGAGCAAAGCTGAAAAATGAA
TAACTAACCCCCTTTCCCTGCTAGAAATAACAATTAGATGCCCCAAAGCGATTTTTTTTAAC
CAAAAGGAAGATGGGAAGCCAAACTCCATCATGATGGGTGGATTCCAAATGAACCCCTGCGT
TAGTTACAAAGGAAACCAATGCCACTTTTGTTTATAAGACCAGAAGGTAGACTTTCTAAGCA
TAGATATTTATTGATAACATTTCATTGTAACTGGTGTTCTATACACAGAAAACAATTTATTT
TTTAAATAATTGTCTTTTTCCATAAAAAAAGATTACTTTCCATTCCTTTAGGGGAAAAAACCC
CTAAATAGCTTCATGTTTCCATAATCAGTACTTTATATTTATAAATGTATTTATTATTATTA
TAAGACTGCATTTTATTTATATCATTTTATTAATATGGATTTATTTATAGAAACATCATTCG
ATATTGCTACTTGAGTGTAAGGCTAATATTGATATTTATGACAATAATTATAGAGCTATAAC
ATGTTTATTTGACCTCAATAAACACTTGGATATCCC

【図６４】

></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
MAALQKSVSSFLMGTLATSCLLLLALLVQGGAAAPISSHCRLDKSNFQQPYIITNRTFMLAKE
ASLADNNTDVRLIGEKLFHGVSMSERCYLMKQVLNFTLEEVLFPQSDRFQPYMQEVVPFLAR
LSNRLSTCHIEGDDLHIQRNVQKLKDTVKKLGESGEIKAIGELDLLFMSLRNACI

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-グリコシル化部位

アミノ酸　54-58, 68-72, 97-101

N-ミリストイル化部位

アミノ酸　14-20, 82-88

原核生物膜リポタンパク質脂質結合部位

アミノ酸

【図６５】

GCCCTAACCTTCCCAGGGCTCAGCTCTTTGGAGCTGCCCATTCCTCCGGCTGCGAGAAAGGA
CGCGCGCCCTGCGTCGGGCGAAGAAAAGAAGCAAAACTTGTCGGGAGGGTTTCGTCATCAAC
CTCCTTCCCGCAAACCTAAACCTCCTGCCGGGGCCATCCCTAGACAGAGGAAAGTTCCTGCA
GAGCCGACCAGCCCTAGTGGATCTGGGGCAGGCAGCGGCGCTGGCTGTGGAATTAGATCTGT
TTTGAACCCAGTGGAGCGCATCGCCTGGGGCTCGGAAGTCACCGTCCGCGGGCACCGGGTTGG
CGCTGCCCGAGTGGAACCGACAGTTTGCGAGCCTCGGCTGCAAGTGGCCTCTCCTCCCCGCG
GTTGTTGTTCAGTGTCGGGTGAGGGCTGCGAGTGTGGCAAGTTGCAAAGAGAGCCTCAGAGG
TCCGAAGAGCGCTGCGCTCCTACTCGCGTTCGCTTCTTCCTCTTCTCGGTTCCCTACTGTGA
AATCGCAGCGACATTTACAAAGGCCTCCGGGTCCTACCGAGACCGATCCGCAGCGTTTGGCC
CGGTCGTGCCTATTGCATCGGGAGCCCCCGAGCACCGGCGAA**ATG**GCGAGGTTCCCGAAGGC
CGACCTGGCCGCTGCAGGAGTTATGTTACTTTGCCACTTCTTCACGGACCAGTTTCAGTTCG
CCGATGGGAAACCCGGAGACCAAATCCTTGATTGGCAGTATGGAGTTACTCAGGCCTTCCCT
CACACAGAGGAGGAGGTGGAAGTTGATTCACACGCGTACAGCCACAGGTGGAAAAGAAACTT
GGACTTTCTCAAGGCGGTAGACACGAACCGAGCAAGCGTCGGCCAAGACTCTCCTGAGCCCA
GAAGCTTCACAGACCTGCTGCTGGATGATGGGCAGGACAATAACACTCAGATCGAGGAGGAT
ACAGACCACAATTACTATATATCTCGAATATATGGTCCATCTGATTCTGCCAGCCGGGATTT
ATGGGTGAACATAGACCAAATGGAAAAAGATAAAGTGAAGATTCATGGAATATTGTCCAATA
CTCATCGGCAAGCTGCAAGAGTGAATCTGTCCTTCGATTTTCCATTTTATGGCCACTTCCTA
CGTGAAATCACTGTGGCAACCGGGGGTTTCATATACACTGGAGAAGTCGTACATCGAATGCT
AACAGCCACACAGTACATAGCACCTTTAATGGCAAATTTCGATCCCAGTGTATCCAGAAATT
CAACTGTCAGATATTTTGATAATGGCACAGCACTTGTGGTCCAGTGGGACCATGTACATCTC
CAGGATAATTATAACCTGGGAAGCTTCACATTCCAGGCAACCCTGCTCATGGATGGACGAAT
CATCTTTGGATACAAAGAAATTCCTGTCTTGGTCACACAGATAAGTTCAACCAATCATCCAG
TGAAAGTCGGACTGTCCGATGCATTTGTCGTTGTCCACAGGATCCAACAAATTCCCAATGTT
CGAAGAAGAACAATTTATGAATACCACCGAGTAGAGCTACAAATGTCAAAAATTACCAACAT
TTCGGCTGTGGAGATGACCCCATTACCCACATGCCTCCAGTTTAACAGATGTGGCCCCTGTG
TATCTTCTCAGATTGGCTTCAACTGCAGTTGGTGTAGTAAACTTCAAAGATGTTCCAGTGGA
TTTGATCGTCATCGGCAGGACTGGGTGGACAGTGGATGCCCTGAAGAGTCAAAAGAGAAGAT
GTGTGAGAATACAGAACCAGTGGAAACTTCTTCTCGAACCACCACAACCGTAGGAGCGACAA
CCACCCAGTTCAGGGTCCTAACTACCACCAGAAGAGCAGTGACTTCTCAGTTTCCCACCAGC
CTCCCTACAGAAGATGATACCAAGATAGCACTACATCTAAAAGATAATGGAGCTTCTACAGA
TGACAGTGCAGCTGAGAAGAAAGGGGGAACCCTCCACGCTGGCCTCATCATTGGAATCCTCA
TCCTGGTCCTCATTGTAGCCACAGCCATTCTTGTGACAGTCTATATGTATCACCACCCAACA
TCAGCAGCCAGCATCTTCTTTATTGAGAGACGCCCAAGCAGATGGCCTGCGATGAAGTTTAG
AAGAGGCTCTGGACATCCTGCCTATGCTGAAGTTGAACCAGTTGGAGAGAAAGAAGGCTTTA
TTGTATCAGAGCAGTGC**TAA**AATTTCTAGGACAGAACAACACCAGTACTGGTTTACAGGTGT
TAAGACTAAAATTTTGCCTATACCTTTAAGACAAACAAACAAACACACACACAAACAAGCTC
TAAGCTGCTGTAGCCTGAAGAAGACAAGATTTCTGGACAAGCTCAGCCCAGGAAACAAAGGG
TAAACAAAAAACTAAAACTTATACAAGATACCATTTACACTGAACATAGAATTCCCTAGTGG
AATGTCATCTATAGTTCACTCGGAACATCTCCCGTGGACTTATCTGAAGTATGACAAGATTA
TAATGCTTTTGGCTTAGGTGCAGGGTTGCAAAGGGATCAGAAAAAAAAAATCATAATAAAGC
TTTAGTTCATGAGGG

【図６６】

MARFPKADLAAAGVMLLCHFFTDQFQFADGKPGDQILDWQYGVTQAFPHTEEEVEVDSHAYS
HRWKRNLDFLKAVDTNRASVGQDSPEPRSFTDLLLDDGQDNNTQIEEDTDHNYYISRIYGPS
DSASRDLWVNIDQMEKDKVKIHGILSNTHRQAARVNLSFDFPFYGHFLREITVATGGFIYTG
EVVHRMLTATQYIAPLMANFDPSVSRNSTVRYFDNGTALVVQWDHVHLQDNYNLGSFTFQAT
LLMDGRIIFGYKEIPVLVTQISSTNHPVKVGLSDAFVVVHRIQQIPNVRRRTIYEYHRVELQ
MSKITNISAVEMTPLPTCLQFNRCGPCVSSQIGFNCSWCSKLQRCSSGFDRHRQDWVDSGCP
EESKEKMCENTEPVETSSRTTTTVGATTTQFRVLTTTRRAVTSQFPTSLPTEDDTKIALHLK
DNGASTDDSAAEKKGGTLHAGLIIIGILILVLIVATAILVTVYMYHHPTSAASIFFIERRPSR
WPAMKFRRGSGHPAYAEVEPVGEKEGFIVSEQC

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-ミリストイル化部位

アミノ酸　42-48, 100-106, 147-153, 279-285, 397-403, 450-456, 455-461

【図６７】

GCAGCCCTAGCAGGGATGGACATGATGCTGTTGGTGCAGGGTGCTTGTTGCTCGAACCAGTG
GCTGGCGGCGGTGCTCCTCAGCCTGTGCTGCCTGCTACCCTCCTGCCTCCCGGCTGGACAGA
GTGTGGACTTCCCCTGGGCGGCCGTGGACAACATGATGGTCAGAAAAGGGGACACGGCGGTG
CTTAGGTGTTATTTGGAAGATGGAGCTTCAAAGGGTGCCTGGCTGAACCGGTCAAGTATTAT
TTTTGCGGGAGGTGATAAGTGGTCAGTGGATCCTCGAGTTTCAATTTCAACATTGAATAAAA
GGGACTACAGCCTCCAGATACAGAATGTAGATTGTGACAGATGATGGCCATACACGTGTTCT
GTTCAGACTCAACATACACCCAGAACAATGCAGGTGCATCTAACTGTGCAAGTTCCTCCTAA
GATATATGACATCTCAAATGATATGACCGTCAATGAAGGAACCAACGTCACTCTTACTTGTT
TGGCCACTGGGAAACCAGAGCCTTCCATTTCTTGGCGACACATCTCCCCATCAGCAAAACCA
TTTGAAAATGGACAATATTTGGACATTTATGGAATTACAAGGGACCAGGCTGGGGAATATGA
ATGCAGTGCGGAAAATGATGTGTCATTCCCAGATGTGAGGAAAGTAAAAGTTGTTGTCAACT
TTGCTCCTACTATTCAGGAAATTAATCTGGCAGCGTGACCCCCGGACGCAGTGGCCTGATA
AGATGTGAAGCTGCAGGTGTGCCGCCTCCAGCCTTTGAATGGTACAAAGGAGAGAAGAAGCT
CTTCAATGGCCAACAAGGAATTATTATTCAAAATTTTAGCACAAGATCCATTCTCACTGTTA
CCAACGTGACACAGGAGCACTTCGGCAATTATACTTGTGGCTGCCAACAAGCTAGGCACA
ACCAATGCGAGCCTGCCTCTTAACCCTCCAAGTACAGCCCAGTATGGAATTACCGGGAGCGC
TGATGTTCTTTTCTCCTGCTGGTACCTTGTGTTGACACTGTCCICTTTCACCAGCATATTCT
ACCTGAAGAATGCCATTCTACAATAAATTCAAAGACCCATAAAGGCTTTAAGGATTCTCT
GAAAGTGCTGATGGCTGGATCCAATCTGGTACAGTTTGTTAAAAGCAGCGTGGGATATAATC
AGCAGTGCTTACATGGGGATGATCGCCTTCTGTAGAATTGCTCATTATGTAAATACTTTAAT
TCTACTCTTTTTTGATTAGCTACATTACCTTGTGAAGCAGTACACATTGTCCTTTTTTTAAG
ACGTGAAAGCTCTGAAATTACTTTTAGAGGATATTAATTGTGATTTCATGTTTGTAATCTAC
AACTTTTCAAAAGCATTCAGTCATGGTCTGCTAGGTTGCAGCTCTATGTTACAAAACGAA
TATTGCAGTGATATGTGATTTTAAGCTGCAATACAAGCATTCAGTTCCCTGTTTCAAT
AAGAGTCAATCCACATTTACAAAGATGCATTTTTTCTTTTTTGATAAAAAAGCAAATAATA
TTGCCTTCAGATTATTCTTCAAAATATAACACATATCTAGATTTTTCTGCTCGCATGATAT
TCAGGTTTCAGGAATGAGCCTTGTAATATAACTGGCTGTGCAGCTCTGCTTCTCTTTCCTGT
AAGTTCAGCATGGGTGTGCCTTCATACAATAATATTTTTCTCTTTGTCTCCACTAATATAA
AATGTTTGCTAAATCTTACAATTTCAAAGTAAAATAAACCAGAGTCATCAGTTAACCA
TACACTATCTCTAAGTAACGAAGGAGCTATTGGACTGTAAAAATCTCTTCCTGCACTGACAA
TGGGGTTTGAGAATTTTGCCCCACACTAACTCAGTTCTTGTGATGAGAGACAATTTAATAAC
AGTATAGTAAATATACCATATGATTTCTTTAGTTGTAGCTAAATGTTAGATCCACCGTGGGA
AATCATTCCCTTTAAAATGACAGCACAGTCCACTCAAAGGATTGCCTAGCAATACAGCATCT
TTTCCTTTCACTAGTCCAAGCCAAAAATTTAAGATGATTTGTCAGAAAGGGCACAAGTCC
TATCACCPAATATTCAAGTTGGTAAGCGCTCATCATTAATTTTATTTGTGGCAGCTAA
GTTAGTATGACAGAGGCAGTGCTCCTGTGGACAGGAGCATTTTGCATATTTTCCATCTGAAA
GTATCACTCAGTTGATAGTCTGGAATGCATGTTATATATTTAAAACTTCCAAAATATATTA
TAACAAACATTCTATATCGGTATGTAGCAGACCAATCTCTAAAATAGCTAATTCTTCAATAA
AATCTTTCTATATAGCCATTTCAGTGCAAACAAGTAAAATCAAAAAAGACCATCCTTTATTT
TTCCTTACATGATATATGTAAGATGCGATCAAATAAAGACAAAACACGCAGTGATGAGAATAT
CTTAAGATAGTAAGTAATTCAAATTATTGTGAATGTTAATTATTCTACTATAAAGAAGCAA
AACTACATTTTGAAGGAAAATGCTGTTACTCTAACATTAATTTACAGGAATAGTTTGATGG
TTTCACTCTTTACTAAAGAAAGGCCATCACCTTGAAAGCCATTTTACAGGTTTGATGAAGTT
ACCAATTTCAGTACACCTAAATTTCTACAAATAGTCCCCTTTTACAAGTTGTAACAACAAAG
ACCCTATAATAAAATTAGATACAAGAAATTTTGCAGTGGTTATACATATTTGAGATATCTAG
TATGTTGCCCTAGCAGGGATGGCTTAAAAACTGTGATTTTTTTCTTCAAGTAAAACTTAGT
CCCAAAGTACATCATAAATCAATTTTAATTAGAAAATGAATCTTAAATGAGGGACATAAG
TATACTCTTTCTCACAAATGGCAATAATAAGGCATAAAGCTAGTAAATCTACTAACTGTAAT
AAATGCATGACATTATTTGATTGATACATTAAAAAGAGTTTTAGAACAAATATGGCATT
TAACTTTATTATTTATTTGCTTTAAGAAATATTCTTTGTGGAATTGTTGAATAAACTATAA
AATATTATTTTGTATTGCAGCTTTAAAGTGGCACACTCCATAATAATCTACTTACTAGAAAT
AGTGGTGCTACCACAAAAAATGTTAACCATCAGTACCATTGTTTGGGAGAAAGAAACAGATC
AAGAATGCATATTATTCAGTGACCGCTTTCCTAGAGTTAAAATACCTCCTCTTTGTAAGGTT
TGTAGGTAAATTGAGGTATAAACTATGGATGAACCAAATAATTAGTTCAAAGTGTTGTCATG
ATTCCAAATTTGTGGAGTCTGGTGTTTTTACCATAGAATGTGACAGAAGTACACATCATAGCT
CAGTAGCTATATGTATTTGCCTTTATGTTAGAAGAGACTTTCTTGAGTGACATTTTTAAATA
GAGGAGGTATTCACTATGTTTTTCTGTATCACAGCAGCATTCCTAGTCCTTAGGCCCTCGGA
CAGAGTGAAATCATGAGTATTTATGAGTTCAATATTGTCAAATAAGGCTACAGTATTTGCTT
TTTTGTGTGAATGTATTGCATATAATGTTCAAGTAGATGATTTTACATTTATGGACATATAA
AATGTCTGATTACCCCATTTTATCAGTCCTGACTGTACAAGATTGTTGCAATTTCAGAATAG
CAGTTTTATAAAATTGATTTATCTTTTAATCTATAACAATTTGTGTTAGCTGTTCATTTCAGG
ANTATATTTTCTACAAGTTCCACTTGTGGGACTCCTTTTGTTGCCCCTATTTTTTTTTAAAG
AAGGAAGAAAGAAAAATAAGTAGCAGTTTAAAAATGAGAATGGAGAGAAAAGAAAAAGAATG
AAAAGCAAAGGCAGTAAAGAGGGAAAAAAAAGGAAGGATGGAAGGAATGAAGGAAGGAAGGG
AGGAAGGGGAGAAGGTAGGAAGAAAGAAAGGATGAGAGGGAAGGAAGAATCAGAGTATTAGG
GTAGTTAACTTACACATTGCATTCTTAGTTTAACTGCAAGTGGTGTAACTATGTTTTCAA
TGATGCATTTGAAACATAAGTCCTATTATACCATTAAGTTCCTATTATGCAGCAATTATAT
AATAAAAAGTACTGCCCAAGTTATAGTAATGTGGGTGTTTTGAGACACTAAAAGATTTGAG
AGGGAGAATTTCAAACTTAAAGCCACTTTTGGGGGGTTTATAACTTAACTGAAAAATTAATG
CTTCATCATAACATTTAAGCTATATCTAGAAACTAGACTGGAGAACTGAGAAAATTACCCAG
GTAATTCAGGCAAAAAAAAAAATATATATATATAAATACCCCTACATTTGAAGTCAGAAA
ACTCTGAAAAACTGATATACAAGTCAATCATCTATAATGATCAAATTACTGAACAATTG
TTAATTTATCCATTGTGCTTAGCTTTGTGACACAGCCAAAAGTTACCTATTTAATCTTTTCA
ATAAAAATTGTTTTTTGAAATCCAGAAATGATTTAAAAAGAGGTCAGGTTTTTAACTATTTA
TTGAAGTATGTGGATGTACAGTATTTCAATAGATATGAATATGAATAAATGGTATGCCTTAA
GATTCTTTGAATATGTATTTACTTTAAAGACTGGAAAAAGCTCTTCCTGTCTTTTAGTAAAA
CATCCATATTTCATAACCTGATGTAAAATATGTTGTACTGTTTCCAATAGGTGAATATAAAC
TCAGTTTATCAATTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

【図６８】

></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
MDMMLLVQGACCSNQWLAAVLLSLCCLLPSCLPAGQSVDFPWAAVDNMMVRKGDTAVLRCYL
EDGASKGAWLNRSSIIFAGGDKWSVDPRVSISTLNKRDYSLQIQNVDVTDDGPYTCSVQTQH
TPRTMQVHLTVQVPPKIYDISNDMTVNEGTNVTLTCLATGKPEPSISWRHISPSAKPFENGQ
YLDIYGITRDQAGEYECSAENDVSFPDVRKVKVVVNFAPTIQEIKSGTVTPGRSGLIRCEGA
GVPPPAFEWYKGEKKLFNGQQGIIIQNFSTRSILTVTNVTQEHFGNYTCVAANKLGTTNASL
PLNPPSTAQYGITGSADVLFSCWYLVLTLSSFTSIFYLKNAILQ

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-ミリストイル化部位

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６９】

ATAGTAGAAGAATGTCTCTGAAATTACTGGATGAGTTTCAGTCATACTTTCACATGGGCACA
ATTTCACATTCAAGCTCCTTATCCTAGGCTAATTTTATATTATGTTAAATCACTTGTTTTTG
TTCTCACGGCTTCCTGCCTGCTATAGGCATAATTACGAGGAAGCAGAACTTCTCCAGAAGCA
AGCGCACATGCGTTCCAAAATAAGAGCAAATTCGCTCTAAACACAGGAAAAGACCTGAAGCT
TTAATTAAGGGGTTACATCCAACCCCAGAGCGCTTTTGTGGGCACTGATTGCTCCAGCTTCT
GCGTCACTGCGCGAGGGAAGAGGGAAGAGGATCCAGGCGTTAGACATGTATAGACACAAAAA
CAGCTGGAGATTGGGCTTAAAATACCCACCAAGCTCCAAAGAAGAGACCCAAGTCCCCAAAA
CATTGATTTCAGGGCTGCCAGGAAGGAAGAGCAGCAGCAGGGTGGGAGAGAAGCTCCAGTCA
GCCCACAAGATGCCATTGTCCCCCGGCCTCCTGCTGCTGCTGCTCTCCGGGGCCACGGCCAC
CGCTGCCCTGCCCCTGGAGGGTGGCCCCACCGGCCGAGACAGCGAGCATATGCAGGAAGCGG
CAGGAATAAGGAAAAGCAGCCTCCTGACTTTCCTCGCTTGGTGGTTTGAGTGGACCTCCCAG
GCCAGTGCCGGGCCCCTCATAGGAGAGGAAGCTCGGGAGGTGGCCAGGCGGCAGGAAGGCGC
ACCCCCCCAGCAATCCGCGCGCCGGGACAGAATGCCCTGCAGGAACTTCTTCTGGAAGACCT
TCTCCTCCTGCAAATAG

【図７０】

></usr/seqdb2/sst/DNA/Dnaseqs.full/ss.DNA44175
><subunit 1 of 1, 155 aa, 1 stop
><MW: 17194, pI: 10.44, NX(S/T): 0
MYRHKNSWRLGLKYPPSSKEETQVPKTLISGLPGRKSSSRVGEKLQSAHKMPLSPGLLLLLL
SGATATAALPLEGGPTGRDSEHMQEAAGIRKSSLLTFLAWWFEWTSQASAGPLIGEEAREVA
RRQEGAPPQQSARRDRMPCRNFFWKTFSSCK

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-ミリストイル化部位

アミノ酸　64-70, 75-81, 90-96

アミド化部位

アミノ酸　33-37

【図７１】

GTCGTGTGCTTGGAGGAAGCCGCGGAACCCCCAGCGTCCGTCCATGGCGTGGAGCCTTGGGA
GCTGGCTGGGTGGCTGCCTGCTGGTGTCAGCATTGGGAATGGTACCACCTCCCGAAAATGTC
AGAATGAATTCTGTTAATTTCAAGAACATTCTACAGTGGGAGTCACCTGCTTTTGCCAAAGG
GAACCTGACTTTCACAGCTCAGTACCTAAGTTATAGGATATTCCAAGATAAATGCATGAATA
CTACCTTGACGGAATGTGATTTCTCAAGTCTTTCCAAGTATGGTGACCACACCTTGAGAGTC
AGGGCTGAATTTGCAGATGAGCATTCAGACTGGGTAAACATCACCTTCTGTCCTGTGGATGA
CACCATTATTGGACCCCCTGGAATGCAAGTAGAAGTACTTGCTGATTCTTTACATATGCGTT
TCTTAGCCCCTAAAATTGAGAATGAATACGAAACTTGGACTATGAAGAATGTGTATAACTCA
TGGACTTATAATGTGCAATACTGGAAAAACGGTACTGATGAAAAGTTTCAAATTACTCCCCA
GTATGACTTTGAGGTCCTCAGAAACCTGGAGCCATGGACAACTTATTGTGTTCAAGTTCGAG
GGTTTCTTCCTGATCGGAACAAAGCTGGGGAATGGAGTGAGCCTGTCTGTGAGCAAACAACC
CATGACGAAACGGTCCCCTCCTGGATGGTGGCCGTCATCCTCATGGCCTCGGTCTTCATGGT
CTGCCTGGCACTCCTCGGCTGCTTCTCCTTGCTGTGGTGCGTTTACAAGAAGACAAAGTACG
CCTTCTCCCCTAGGAATTCTCTTCCACAGCACCTGAAAGAGTTTTTGGGCCATCCTCATCAT
AACACACTTCTGTTTTTCTCCTTTCCATTGTCGGATGAGAATGATGTTTTTGACAAGCTAAG
TGTCATTGCAGAAGACTCTGAGAGCGGCAAGCAGAATCCTGGTGACAGCTGCAGCCTCGGGA
CCCCGCCTGGGCAGGGCCCCAAAGCTAGGCTCTGAGAAGGAAACACACTCGGCTGGGCACA
GTGACGTACTCCATCTCACATCTGCCTCAGTGAGGGATCAGGGCAGCAAACAAGGGCCAAGA
CCATCTGAGCCAGCCCCACATCTAGAACTCCAGACCTGGACTTAGCCACCAGAGAGCTACAT
TTTAAAGGCTGTCTTGGCAAAAATACTCCATTTGGGAACTCACTGCCTTATAAAGGCTTTCA
TGATGTTTTCAGAAGTTGGCCACTGAGAGTGTAATTTTCAGCCTTTTATATCACTAAAATAA
GATCATGTTTTAATTGTGAGAAACAGGGCCGAGCACAGTGGCTCACGCCTGTAATACCAGCA
CCTTAGAGGTCGAGGCAGGCGGATCACTTGAGGTCAGGAGTTCAAGACCAGCCTGGCCAATA
TGGTGAAACCCAGTCTCTACTAAAAATACAAAAATTAGCTAGGCATGATGGCGCATGCCTAT
AATCCCAGCTACTCGAGTGCCTGAGGCAGGAGAATTGCATGAACCCGGGAGGAGGAGGAGGA
GGTTGCAGTGAGCCGAGATAGCGGCACTGCACTCCAGCCTGGGTGACAAAGTGAGACTCCAT
CTCAAAAAAAAAAAAAAAAAATTGTGAGAAACAGAAATACTTAAAATGAGGAATAAGAATGG
AGATGTTACATCTGGTAGATGTAACATTCTACCAGATTATGGATGGACTGATCTGAAAATCG
ACCTCAACTCAAGGGTGGTCAGCTCAATGCTACACAGAGCACGGACTTTTGGATTCTTTGCA
GTACTTTGAATTTATTTTTCTACCTATATATGTTTTATATGCTGCTGGTGCTCCATTAAAGT
TTTACTCTGTGTTGC

【図７２】

></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
MAWSLGSWLGGCLLVSALGMVPPPENVRMNSVNFKNILQWESPAFAKGNLTFTAQYLSYRIF
QDKCMNTTLTECDFSSLSKYGDHTLRVRAEFADEHSDWVNITFCPVDDTIIGPPGMQVEVLA
DSLHMRFLAPKIENEYETWTMKNVYNSWTYNVQYWKNGTDEKFQITPQYDFEVLRNLEPWTT
YCVQVRGFLPDRNKAGEWSEPVCEQTTHDETVPSWMVAVILMASVFMVCLALLGCFSLLWCV
YKKTKYAFSPRNSLPQHLKEFLGHPHHNTLLFFSFPLSDENDVFDKLSVIAEDSESGKQNPG
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-ミリストイル化部位
アミノ酸　6-12, 316-322

【図７３】

CGAGCGCCAACCCGCTAGCGCCTGAATCCGGCGTGCTGCCCGCTCGCCGCCCGCCATGGCCC
GCGCAGCCCCGCTGCTCGCCGCGTTGACCGCGCTCCTCGCCGCCGCCGCTGCTGGCGGAGAT
GCCCCGCCGGGCAAAATCGCGGTGGTTGGGGCTGGGATTGGGGGCTCTGCTGTGGCCCATTT
TCTCCAGCAGCACTTTGGACCTCGGGTGCAGATCGACGTGTACGAGAAGGGAACCGTGGGTG
GCCGCTTGGCCACCATCTCAGTCAACAAGCAGCACTATGAGAGCGGGGCTGCCTCCTTCCAC
TCCCTGAGCCTGCACATGCAGGACTTCGTCAAGCTGCTGGGGCTGAGGCACCGGCGCGAGGT
GGTGGGCAGGAGCGCCATCTTCGGCGGGGAGCACTTCATGCTGGAGGAGACTGACTGGTACC
TGCTGAACCTCTTCCGCCTCTGGTGGCACTATGGCATCAGCTTCCTGAGGCTGCAGATGTGG
GTGGAGGAGGTCATGGAGAAGTTCATGAGGATCTATAAGTACCAGGCCCACGGCTATGCCTT
CTCGGGTGTGGAGGAGCTGCTCTACTCACTGGGGGAGTCCACCTTTGTTAACATGACCCAGC
ACTCTGTGGCTGAGTCCCTGCTGCAGGTGGGCGTCACGCAGCGCTTTATTGATGATGTCGTT
TCTGCTGTCCTGCGGGCCAGCTATGGCCAGTCAGCAGCGATGCCCGCCTTTGCAGGAGCCAT
GTCACTAGCCGGGGCCCAAGGCAGCCTGTGGTCTGTGGAAGGAGGCAATAAGCTGGTTTGTT
CCGGTTTGCTGAAGCTCACCAAGGCCAATGTGATCCATGCCACAGTGACCTCTGTGACCCTG
CACAGCACAGAGGGGAAAGCCCTGTACCAGGTGGCGTATGAGAATGAGGTAGGCAACAGCTC
TGACTTCTATGACATCGTGGTCATCGCCACCCCCCTGCACCTGGACAACAGCAGCAGCAACT
TAACCTTTGCAGGCTTCCACCCGCCCATTGATGACGTGCAGGGCTCTTTCCAGCCCACCGTC
GTCTCCTTGGTCCACGGCTACCTCAACTCGTCCTACTTCGGTTTCCCAGACCCTAAGCTTTT
CCCCTTTGCCAACATCCTTACCACAGATTTCCCCAGCTTCTTCTGCACTCTGGACAACATCT
GCCCTGTCAACATCTCTGCCAGCTTCCGGCGAAAGCAGCCCCAGGAGGCAGCTGTTTGGCGA
GTCCAGTCCCCCAAGCCCCTCTTTCGGACCCAGCTAAAGACCCTGTTCCGTTCCTATTACTC
AGTGCAGACAGCTGAGTGGCAGGCCCATCCCCTCTATGGCTCCCGCCCCACGCTCCCGAGGT
TTGCACTCCATGACCAGCTCTTCTACCTCAATGCCCTGGAGTGGGCGGCCAGCTCCGTGGAG
GTGATGGCCGTGGCTGCCAAGAATGTGGCCTTGCTGGCTTACAACCGCTGGTACCAGGACCT
AGACAAGATTGATCAAAAAGATTTGATGCACAAGGTCAAGACTGAACTGTGAGGGCTCTAGG
GAGAGCCTGGGAACTTTCATCCCCCACTGAAGATGGATCATCCCACAGCAGCCCAGGACTGA
ATAAGCCATGCTCGCCCACCAGGCTTCTTTCTGACCCCTCATGTATCAAGCATCTCCAGGTG
ACCTACTGTCTGCCTATATTAAGGGTCCACACGCCGGCTGCTGCTTTTTTTTAAGGGGGAAA
GTAAGAAAAGAGAAGGAAATCCAAGCCAGTATATTTGTTTTATTTATTTTTTTTAAGAAGAA
AAAAGTTCATCTTCACAAGGTGCTTCAGACTTGGTTTCTTAGCTAGAAACCAGAAGACTACG
GGAGGGAATATAAGGCAGAGAACTATGAGTCTTATTTTATTACTGTTTTCACTACCTACTC
CCACAATGGACAATCAATTGAGGCAACCTACAAGAAAACATTTACAACCAGATGGTTACAAA
TAAAGTAGAAGGGAAGATCAGAAAACCTAAGAAATGATCATAGCTCCTGGTTACTGTGGACT
TGATGGATTTGAAGTACCTAGTTCAGAACTCCCTAGTCACCATCTCCAAGCCTGTCAACATC
ACTGCATATTGGAGGAGATGACTGTGGTAGGACCCAAGGAAGAGATGTGTGCCTGAATAGTC
GTCACCATATCTCCAAGCTTCCTGGCAACCAGTGGGAAAAGAAACATGCGAGGCTGTAGGAA
GAGGGAAGCTCTTCCTTGGCACCTAGAGGAATTAGCCATTCTCTTCCTTATGCAAAGATTGA
GGAATGCAACAATATAAAGAAGAGAAGTCCCCAGATGGTAGAGAGCAGTCATATCTTACCCC
TAGATGTTCATCCCAGCAGAAGAAAGAAGAAGGTGTTGGGGTAGGATTCTTCAGAGGTTAGC
CTGGTACTTTCTCATCAGACACTAGCTTGAAGTAAGAGGAGAATTATGCTTTTCTTTGCTTT
TTCTACAAACCCTTAAAAATCACTTGTTTTAAAAAGAAAGTAAAAGCCCTTTTCATTCAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

【図７４】

></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
MARAAPLLAALTALLAAAAAGGDAPPGKIAVVGAGIGGSAVAHFLQQHFGPRVQIDVYEKGT
VGGRLATISVNKQHYESGAASFHSLSLHMQDFVKLLGLRHRREVVGRSAIFGGEHFMLEETD
WYLLNLFRLWWHYGISFLRLQMWVEEVMEKFMRIYKYQAHGYAFSGVEELLYSLGESTFVNM
TQHSVAESLLQVGVTQRFIDDVVSAVLRASYGQSAAMPAFAGAMSLAGAQGSLWSVEGGNKL
VCSGLLKLTKANVIHATVTSVTLHSTEGKALYQVAYENEVGNSSDFYDIVVIATPLHLDNSS
SNLTFAGFHPPIDDVQGSFQPTVVSLVHGYLNSSYFGFPDPKLFPFANILTTDFPSFFCTLD
NICPVNISASFRRKQPQEAAVWRVQSPKPLFRTQLKTLFRSYYSVQTAEWQAHPLYGSRPTL
PRFALHDQLFYLNALEWAASSVEVMAVAAKNVALLAYNRWYQDLDKIDQKDLMHKVKTEL

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-ミリストイル化部位
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】
2006061156000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		FI		テーマコード（参考）
C07K 14/47	***(2006.01)***	C07K	14/47	
C07K 19/00	***(2006.01)***	C07K	19/00	
C07K 16/00	***(2006.01)***	C07K	16/00	
C07K 16/18	***(2006.01)***	C07K	16/18	
A61P 13/12	***(2006.01)***	A61P	13/12	
A61P 3/04	***(2006.01)***	A61P	3/04	
A61P 3/10	***(2006.01)***	A61P	3/10	
A61P 9/00	***(2006.01)***	A61P	9/00	
A61P 35/00	***(2006.01)***	A61P	35/00	
A61P 37/04	***(2006.01)***	A61P	37/04	
A61P 27/02	***(2006.01)***	A61P	27/02	
A61P 7/00	***(2006.01)***	A61P	7/00	
A61P 19/02	***(2006.01)***	A61P	19/02	
A61P 17/02	***(2006.01)***	A61P	17/02	
C12P 21/08	*(2006.01)*	C12P	21/08	
A61K 38/00	*(2006.01)*	A61K	37/02	

(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．ＵＮＩＸ
２．Ｍａｃｉｎｔｏｓｈ

(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 １４００６
(72)発明者 ボッツタイン，デーヴィッド
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 ６４１

(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 １１２１ 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 ９４４０２，サンマテオ，パロット ドライブ ５４１
(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 ９４１３１，サンフランシスコ，コンゴ ストリート １１０
(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 ９４０１０，バーリンゲーム，イーストン ドライブ ２６２７
(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 ９４００２，ベルモント、デビー レーン １
(72)発明者 クルジャビン，イバール，ジェー.
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９４０４４，パシフィカ，デル ロード ８１１
(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 ９４０３０，ミルブレー，ラ プレンダ ドライブ ２６９
(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 ９４０１０，ヒルズバラ，ヘイン ロード １０１５
(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 ９４００２，ベルモント，コロネット ブールバード ２７０５
(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 ９４００２，ベルモント，テラス ドライブ １７５６
(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 ９４１２３，サンフランシスコ，ウェブスター ストリート ２９６０ 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 ９４１１４，サンフランシスコ，ダグラス ストリート ４６５
(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 ９４５６３，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 ９４５５６，モラガ，コーリス ドライブ １２８
(72)発明者 ウィリアムズ，ピー. ，ミッキー
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９４０１９，ハーフ ムーン ベイ，アルト アヴェニュー ５０９
(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 ９４０１０，ヒルズバラ，サウスダウン コート ３５
(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 ９４４０４，フォスター シティ，トーラス ドライブ ８７６

Ｆターム(参考) 4B024 AA01 BA21 BA44 BA63 BA80 CA04 DA02 DA06 DA12 EA04
GA11 HA01 HA03
4B064 AG01 AG02 AG13 AG20 AG27 AG31 CA02 CA06 CA10 CA19
CC24 CE03 CE10 DA01
4B065 AA26X AA72X AA91X AA93Y AB01 AC14 BA02 CA24 CA25 CA44
4C084 AA02 AA07 BA01 BA02 BA22 BA23 CA53 NA14 ZA332 ZA342
ZA362 ZA512 ZA702 ZA812 ZA892 ZA962 ZB022 ZB092 ZB262 ZC352
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA40 DA01 DA50 DA76
DA86 EA28 FA74 GA15 GA26

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	JP2006061156A	公开(公告)日	2006-03-09
申请号	JP2005238244	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 ネピアマリーエー 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 スチュアートティモシーエー 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		
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,エー. 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,ティモシー,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分类号	C12N15/09 C12N5/10 C12N1/21 C12N1/19 C12P21/02 C07K14/47 C07K19/00 C07K16/00 C07K16/18 A61P13/12 A61P3/04 A61P3/10 A61P9/00 A61P35/00 A61P37/04 A61P27/02 A61P7/00 A61P19/02 A61P17/02 C12P21/08 A61K38/00 G01N33/53 A61K31/7088 A61K39/395 A61K45/00 A61K48/00 A61P37/02 A61P43/00 C07K14/00 C07K14/705 C07K16/28 C12N1/15 C12N15/12 C12N15/62 G01N33/566 G01N33/577 G01N33/58
CPC分类号	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分类号	C12N15/00.ZNA.A C12N5/00.B C12N1/21 C12N1/19 C12P21/02.C C07K14/47 C07K19/00 C07K16/00 C07K16/18 A61P13/12 A61P3/04 A61P3/10 A61P9/00 A61P35/00 A61P37/04 A61P27/02 A61P7/00 A61P19/02 A61P17/02 C12P21/08 A61K37/02 A61K38/00 A61K38/02 A61K38/16 C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A C12N5/00.102 C12N5/10
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/BA21 4B024/BA44 4B024/BA63 4B024/BA80 4B024/CA04 4B024/DA02 4B024/DA06 4B024/DA12 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA01 4B024/HA03 4B064/AG01 4B064/AG02 4B064/AG13 4B064/AG20 4B064/AG27 4B064/AG31 4B064/CA02 4B064/CA06 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/CE03 4B064/CE10 4B064/DA01 4B065/AA26X 4B065/AA72X 4B065/AA91X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA44 4C084/AA02 4C084/AA07 4C084/BA01 4C084/BA02 4C084/BA22 4C084/BA23 4C084/CA53 4C084/NA14 4C084/ZA332 4C084/ZA342 4C084/ZA362 4C084/ZA512 4C084/ZA702 4C084/ZA812 4C084/ZA892 4C084/ZA962 4C084/ZB022 4C084/ZB092 4C084/ZB262 4C084/ZC352 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA01 4H045/DA50 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA28 4H045/FA74 4H045/GA15 4H045/GA26
优先权	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
外部链接	Espacenet

摘要(译)

解决的问题：提供一种新颖的多肽和编码该多肽的核酸分子。 新型多肽和编码该多肽的核酸分子。 包含核酸分子序列的载体和宿主细胞，包含与异源多肽序列融合的多肽的嵌合多肽分子，与该多肽结合的抗体和该多肽的制备方法。 [选择图]无