

(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2010-4889

(P2010-4889A)

(43) 公開日 平成22年1月14日(2010.1.14)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	2 G 0 4 5
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 B 0 2 4
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 B 0 6 3
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	4 B 0 6 4
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 A	4 B 0 6 5
審査請求 有 請求項の数 7 O L (全 41 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2009-188644 (P2009-188644)	(71) 出願人	592017633
(22) 出願日	平成21年8月17日 (2009. 8. 17)		ザ ジェネラル ホスピタル コーポレイ ション
(62) 分割の表示	特願2003-170024 (P2003-170024) の分割		アメリカ合衆国 マサチューセッツ O 2 1 1 4, ポストン, フルーツ ストリ ート 5 5
原出願日	平成4年4月6日 (1992. 4. 6)	(74) 代理人	100102978
(31) 優先権主張番号	681, 702		弁理士 清水 初志
(32) 優先日	平成3年4月5日 (1991. 4. 5)	(72) 発明者	セグレ ギノ ブイ
(33) 優先権主張国	米国 (US)		アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ウ エイランド セジメドウロード 5 8
(特許庁注：以下のものは登録商標)		(72) 発明者	クロネンベルグ ヘンリー エム
1. テフロン			アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ベ ルモント ヘイスティングスロード 4 8
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 副甲状腺ホルモンのレセプターとそれをコードしているDNA

(57) 【要約】

【課題】 副甲状腺ホルモンレセプターの提供と利用。

【解決手段】 副甲状腺ホルモンレセプターをコードしているDNA、組換え及び合成副甲状腺ホルモンレセプターポリペプチド及びその断片、副甲状腺ホルモンレセプター及びレセプター断片に対する抗体、候補化合物を副甲状腺ホルモンレセプターの作用に対するアンタゴニストあるいはアンタゴニスト効果についてスクリーニングする方法、及びこれらの化合物の利用による診断と治療法の提供。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

脊椎動物の細胞レセプターをコードしている DNA 配列からなる分離された DNA であって、前記レセプターが、図 3 に示されているアミノ酸配列に少なくとも 30% の同一性を持つアミノ酸配列を持つことを特徴とする方法。

【請求項 2】

請求項 1 に記載されている分離された DNA であって、前記 DNA 配列が図 1 に示されているアミノ酸配列 (SEQ ID NO. 1) の本質的にすべてをコードしていることを特徴とする方法。

【請求項 3】

請求項 1 に記載されている分離された DNA であって、前記 DNA の配列が図 3 に示されているアミノ酸配列 (SEQ ID NO. 3) の本質的にすべてをコードしていることを特徴とする方法。

【請求項 4】

請求項 1 に記載されている分離された DNA であって、前記分離された DNA が (8 A 6) であって、ATCC に寄託され、ATCC 寄託番号 68570 と呼ばれていることを特徴とする方法。

【請求項 5】

請求項 1 に記載されている分離された DNA であって、前記 DNA の配列が図 6 に示されているアミノ酸配列 (SEQ ID NO. 4) の本質的にすべてをコードしていることを特徴とする方法。

【請求項 6】

請求項 1 に記載されている分離された DNA であって、前記 DNA の配列が、図 1 に示されている DNA 配列 (SEQ ID NO. 1) とハイブリッドを形成することを特徴とする方法。

【請求項 7】

請求項 1 に記載されている分離された DNA であって、前記 DNA の配列が図 3 に示されている DNA 配列 (SEQ ID NO. 3) とハイブリッドを形成することを特徴とする方法。

【請求項 8】

請求項 1 に記載されている分離された DNA であって、前記 DNA の配列が図 6 に示されている DNA 配列 (SEQ ID NO. 4) とハイブリッドを形成することを特徴とする方法。

【請求項 9】

ベクターの精製標品であって、前記ベクターが副甲状腺ホルモンレセプターをコードしている DNA 配列からなることを特徴とする方法。

【請求項 10】

請求項 1 に記載されている分離されている DNA を含む細胞であることを特徴とする方法。

【請求項 11】

請求項 10 に記載されている細胞であって、前記細胞が前記の分離されている DNA から上記細胞レセプターを発現する能力のあることを特徴とする方法。

【請求項 12】

本質的に均質な細胞群であって、その各々が請求項 1 に記載されている分離された DNA を含むことを特徴とする方法。

【請求項 13】

分離された DNA が、副甲状腺ホルモンあるいは副甲状腺ホルモン関連蛋白質を結合することの出来るポリペプチドをコードしている DNA 配列からなることを特徴とする方法。

【請求項 14】

ポリペプチドを生成する方法で、前記方法が以下のことからなることを特徴とする：

10

20

30

40

50

副甲状腺ホルモンレセプターあるいはその断片をコードしている分離されたDNAを含む細胞を提供する方法、及び

前記DNAからポリペプチドの発現を可能にする条件下に前記細胞を培養する方法。

【請求項15】

副甲状腺ホルモンレセプター遺伝子の1部からなる1本鎖DNAであって、前記部分が少なくとも18核酸の長さであることを特徴とする方法。

【請求項16】

請求項15に記載されている1本鎖DNAであって、前記部分が前記副甲状腺ホルモンレセプター遺伝子のすべてよりも短いことを特徴とする方法。

【請求項17】

請求項15に記載されている1本鎖DNAであって、上記DNAが標識されて検出可能であることを特徴とする方法。

【請求項18】

副甲状腺ホルモンレセプターcDNAの1部からなる1本鎖DNAであって、上記部分が少なくとも18ヌクレオチドの長さであることを特徴とする方法。

【請求項19】

請求項18に記載されている1本鎖DNAであって、前記DNAがアンチセンスであることを特徴とする方法。

【請求項20】

副甲状腺ホルモンレセプターをコードしている組換えDNA分子の発現によって生成される副甲状腺ホルモンレセプターを特徴とする方法。

【請求項21】

請求項20に記載されている副甲状腺ホルモンレセプターの本質的に精製された標品を特徴とする方法。

【請求項22】

請求項5に記載されているDNAの発現によって、生成される副甲状腺レセプターの本質的に精製された標品を特徴とする方法。

【請求項23】

少なくとも6個のアミノ酸、そして副甲状腺ホルモンレセプターの完全なアミノ酸配列よりは少ないアミノ酸からなるポリペプチドであって、上記ポリペプチドが副甲状腺ホルモンあるいは副甲状腺ホルモン関連蛋白質を結合出来ることを特徴とする方法。

【請求項24】

請求項23に記載されているポリペプチドであって、上記副甲状腺ホルモンレセプターがヒト副甲状腺レセプターであることを特徴とする方法。

【請求項25】

請求項23に記載されているポリペプチドであって、上記断片が以下のものからなることを特徴とする方法。

(a) TNETREREVFDR LGMIYTVG、

(b) YLYSGFTLDEAERL TEEEL、

(c) VTFFLYFLATNYYWILVEG、

(d) Y-RATLANTGCWDLSSGHKKWI IQVP、

(e) PYTEYSGTLWQIQMHYEM、

(f) DDVF TKEEQIFLLHRAQA、

(g) FFRLHCTRNY、

(h) EKKYLWGFTL、

(i) VLATKLRETNAGRCGTRQQYRKLLK、あるいは

(j) 副甲状腺ホルモンあるいは副甲状腺ホルモン関連蛋白質を結合出来る(a)から(i)の断片。

【請求項26】

製剤上許容される担体中に、(a) 副甲状腺ホルモンレセプターあるいは(b) 上記レセ

10

20

30

40

50

プターの断片からなるポリペプチドを含む治療混合物を特徴とする方法。

【請求項 27】

副甲状腺ホルモンレセプターと免疫複合体を形成することが出来る抗体を特徴とする方法。

【請求項 28】

請求項 27 に記載されている抗体と製剤上許容される担体からなる治療混合物を特徴とする方法。

【請求項 29】

動物の血中カルシウムレベルを低減する方法であって、請求項 26 に記載されている治療混合物を、上記動物に、副甲状腺ホルモンあるいは副甲状腺ホルモン関連蛋白質による、
上記動物の副甲状腺ホルモンレセプターの活性化の阻害に効果的な用量で投与することからなることを特徴とする方法。

【請求項 30】

動物の血中カルシウムレベルを低減する方法であって、請求項 28 に記載されている治療混合物を、上記動物に、副甲状腺ホルモンあるいは副甲状腺ホルモン関連蛋白質による、
上記動物の副甲状腺ホルモンレセプターの活性化の阻害に効果的な用量で投与することからなることを特徴とする方法。

【請求項 31】

副甲状腺ホルモンレセプターへの結合に対し、副甲状腺ホルモンと競合する能力のある化合物を確認する方法であって、該方法が以下の内容からなることを特徴とする：

(a) 請求項 23 に記載されているポリペプチドを副甲状腺ホルモンと、候補化合物の (i) 存在下あるいは (i i) 非存在下に接触させる、及び

(b) 上記候補化合物の存在下における上記ポリペプチドの副甲状腺ホルモンへの結合レベル (i) を、上記候補化合物の非存在下における上記ポリペプチドの副甲状腺ホルモンへの結合レベル (i i) と比較する；上記候補化合物の存在下における結合レベルが、その非存在下よりも低い場合は、上記候補化合物は上記レセプターへの結合に対し、
上記副甲状腺ホルモンと競合する能力のあることを示唆する。

【請求項 32】

副甲状腺ホルモンレセプターへの結合に対し、副甲状腺ホルモン関連蛋白質と競合する能力のある化合物を確認する方法であって、該方法が以下の内容からなることを特徴とする：

(a) 請求項 23 に記載されているポリペプチドを副甲状腺ホルモン関連蛋白質と、候補化合物の (i) 存在下あるいは (i i) 非存在下に接触させる、及び

(b) 上記候補化合物の存在下における上記ポリペプチドの副甲状腺ホルモン関連蛋白質への結合レベル (i) を、上記候補化合物の非存在下における上記ポリペプチドの副甲状腺ホルモン関連化合物への結合レベル (i i) と比較する；

上記候補化合物の存在下における結合レベルが、その非存在下よりも低い場合は、上記候補化合物が上記レセプターへの結合に対し、上記副甲状腺ホルモン関連蛋白質と競合する能力のあることを示唆する。

【請求項 33】

副甲状腺ホルモンレセプターへの結合に対し、副甲状腺ホルモンと競合する能力のある化合物を確認する方法であって、該方法が以下の内容からなることを特徴とする：

(a) 副甲状腺ホルモンを請求項 11 に記載されている細胞と、候補化合物の (i) 存在下あるいは (i i) 非存在下に組み合わせる、及び

(b) 上記候補化合物の存在下における上記副甲状腺ホルモンへの上記レセプターの結合レベル (i) を、上記候補化合物の非存在下における上記副甲状腺ホルモンへの上記レセプター結合レベル (i i) と比較する；上記候補化合物の存在下における結合レベルが、その非存在下よりも低い場合は、上記候補化合物は上記レセプターへの結合に対し上記副甲状腺ホルモンと競合する能力のあることを示唆する。

【請求項 34】

副甲状腺ホルモンあるいは副甲状腺ホルモン関連蛋白質の細胞表面上の副甲状腺レセプターへの結合を阻害する能力のある化合物を特徴とする方法。

【請求項 35】

請求項 34 に記載されている化合物と製剤上許容される担体からなる治療混合物を特徴とする方法。

【請求項 36】

副甲状腺ホルモンレセプターをコードしている DNA 配列に相同な DNA 配列を確認する方法であって、該方法が以下の内容からなることを特徴とする：

ゲノムあるいは cDNA ライブラリーを提供し；

上記ライブラリーを請求項 18 に記載されている 1 本鎖 DNA と、上記 1 本鎖 DNA 及び上記ライブラリー中の相同 DNA 配列間にハイブリッド形成が可能なような条件下に接触させ；及び

上記ライブラリーから、上記 1 本鎖 DNA とハイブリッドを形成しているクローンを割り出し確認する。そして、ハイブリッド形成は、上記クローンの中に、副甲状腺ホルモンレセプターをコードしている DNA 配列に相同な DNA 配列の存在することを示唆する。

【請求項 37】

副甲状腺ホルモンレセプターあるいはその断片をコードしている DNA 配列からなるトランス遺伝子を持つ形質転換されたヒト以外の脊椎動物を特徴とする方法。

【請求項 38】

以下の内容からなる診断法を特徴とする方法：

(a) 動物から 1 回目の血液試料取り；

(b) 請求項 35 に記載されている混合物を上記動物に投与し；

(c) 上記混合物の上記投与のあとに上記動物から 2 回目の血液試料を取り；

(d) 上記 1 回目の血液試料中のカルシウムレベルを上記 2 回目の血液試料中のものと比較し、上記 2 回目の血液試料中のカルシウムレベルが低い場合は、副甲状腺ホルモン関連の状態をの診断に役立つ。

【請求項 39】

請求項 1 に記載されている分離された DNA であって、上記 DNA の配列が副甲状腺ホルモンレセプターをコードしていることを特徴とする方法。

【請求項 40】

請求項 20 に記載されている副甲状腺ホルモンレセプターを治療及び診断に用いることを特徴とする方法。

【請求項 41】

請求項 23 に記載されているポリペプチドを治療及び診断に用いることを特徴とする方法。

【請求項 42】

請求項 27 に記載されている抗体を治療及び診断に用いることを特徴とする方法。

【請求項 43】

請求項 26 に記載されている治療混合物を、副甲状腺ホルモンあるいは副甲状腺関連蛋白質による動物の副甲状腺ホルモンレセプターの活性化を阻害するための、あるいは、動物の血中カルシウムレベルを低減するための治療に用いることを特徴とする方法。

【請求項 44】

請求項 28 に記載されている治療混合物を、副甲状腺ホルモンあるいは副甲状腺関連蛋白質による動物の副甲状腺ホルモンレセプターの活性化を阻害するための、あるいは、動物の血中カルシウムレベルを低減するための治療に用いることを特徴とする方法。

【請求項 45】

請求項 20 に記載されている副甲状腺ホルモンレセプターを、副甲状腺ホルモンあるいは副甲状腺ホルモン関連蛋白質による動物の副甲状腺ホルモンレセプターの活性化を阻害するための、あるいは、動物の血中カルシウムレベルを低減するための治療に用いる薬剤の製造に利用することを特徴とする方法。

10

20

30

40

50

【請求項 4 6】

請求項 2 3 に記載されているポリペプチドを、副甲状腺ホルモンあるいは副甲状腺ホルモン関連蛋白質による動物の副甲状腺ホルモンレセプターの活性化を阻害するための、あるいは、動物の血中カルシウムレベルを低減するための治療に用いる薬剤の製造に利用することを特徴とする方法。

【請求項 4 7】

請求項 2 7 に記載されている抗体を、副甲状腺ホルモンあるいは副甲状腺ホルモン関連蛋白質による動物の副甲状腺ホルモンレセプターの活性化を阻害するための、あるいは、動物の血中カルシウムレベルを低減するための治療に用いる薬剤の製造に利用することを特徴とする方法。

10

【請求項 4 8】

患者における副甲状腺ホルモンあるいは副甲状腺ホルモン関連蛋白質によって仲介される高カルシウム血症状態を確認する方法であって、該方法が以下の内容からなることを特徴とする方法：

(a) 患者からの 1 回目の血液試料中のカルシウムレベルを測定し、

(b) 請求項 2 8 に記載されている治療混合物の投与後のある時期に患者から採取された 2 回目の血液試料中のカルシウムレベルを測定し、

(c) 2 つの血液試料のカルシウムレベルを比較して、2 回目の血液試料中のカルシウムレベルの方がより低い場合は、患者に副甲状腺ホルモンあるいは副甲状腺ホルモン関連蛋白質に関係のある状態であることを示唆する。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

ここに記載する研究の助成金は一部アメリカ合衆国政府によって提供されたものであり、同政府は本発明に対し一定の権利を保有する。

本発明は内分泌レセプターに関する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

ホルモン作用発現の重要な段階は、ホルモンと標的細胞の原形質膜表面上にあるレセプターとの相互作用である。ホルモナーレセプター複合体の形成によって、細胞外シグナルを細胞内に導入して種々の生物学的反応を顕現化することが可能となる。例えば、濾胞刺激ホルモン (F S H)、黄体形成ホルモン (L H)、甲状腺刺激ホルモン (T S H)、及び絨毛性性腺刺激ホルモン (C G) のようなホルモンの、その細胞表面レセプターへの結合はレセプターの高次構造の変化を誘発し、その結果、レセプターと導入分子、即ち、その一成分が (G_s) である刺激性グアニンヌクレオチド (G T P) 結合蛋白質との連携が起こる。この連携はアデニル酸シクラーゼを刺激し、次いで蛋白質のリン酸化、ステロイドの合成と分泌、及びイオンフラックスの調節のような他の細胞の過程を刺激する。アルギニンバソプレッシン (A V)、アンギオテンシン I I、及びノルエピネフリンを含む他のホルモンの、その細胞表面レセプターへの結合の結果、(G_p) のような別のタイプの G T P 結合蛋白質成分の活性化をもたらし、次いで酵素ホスホリパーゼ C の活性を刺激する。ホスホリパーゼ C による加水分解の生成物は、細胞内カルシウムの動員と蛋白質のリン酸化を含む細胞内現象の複雑なカスケードを引き起こす。

30

40

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0 0 0 3】

副甲状腺ホルモン (P T H) はカルシウムの恒常性の主要な調節物質であり、その重要な標的細胞は骨と腎臓に存在する。カルシウム濃度の調節は、胃腸、筋肉、神経、神経筋、及び心臓血管などの系の正常な機能のために必要である。P T H の合成と分泌は、主として血漿のカルシウムレベルによって制御される：低レベルでホルモンの合成と分泌の両方を刺激し、高レベルは抑制する。次いで P T H は、直接的または間接的に、3 つのカル

50

シウム交換部位、即ち、腸、骨、及び腎臓におけるカルシウムの血中への流入を促進することによって血漿カルシウムレベルを維持する。PTHは腎臓における活性型ビタミンDの生合成を助成することによってカルシウムの胃腸からの正味の吸収に寄与する。PTHは造骨細胞を阻害し、また、間接的に、骨吸収細胞である破骨細胞の分化を促進することによって骨からのカルシウム再吸収を促進する。このホルモンは、また、腎臓に対する少なくとも3つの効果：尿細管のカルシウム再吸収の刺激、リン酸クリアランスの向上、及び活性型ビタミンDの合成を完結する酵素量の増大促進を仲介する。PTHによるレセプター仲介のホスホリパーゼCの活性化も報告されているが(Hruska et al., J. Clin. Invest. 79:230, 1987)、PTHはこれらの効果を主としてレセプター仲介によるアデニル酸シクラーゼの活性化を通じて発揮する。

10

【0004】

カルシウム恒常性の崩壊は多くの臨床的障害（例えば、重症な骨の疾患、貧血、腎障害、潰瘍、筋障害、及び神経障害）を引き起こすことがあり、普通は、副甲状腺ホルモンのレベルの変化を起こすような状態に起因するものである。高カルシウム血症は血漿カルシウムレベルの上昇を特徴とする症状である。それは、しばしば、副甲状腺の病変（例えば、腺腫、増殖、または癌腫）の結果としてPTHの生産過剰が起こる一次性副甲状腺機能亢進症に関連している。もう一つのタイプの高カルシウム血症、悪性の体液性高カルシウム血症(HHM)はもっとも普通の腫瘍の症候群である。それは大抵の場合、腫瘍（鱗状、腎臓、卵巣または膀胱の癌種）によるPTHとアミノ酸相同性を共有する新しいクラスの蛋白質ホルモンの生成に起因するようである。これらのPTH関連蛋白質(PTHrP)は一見、PTHの腎臓と筋肉に対する作用のあるものを模倣し、これらの組織におけるPTHレセプターと相互作用すると信じられている。PTHrPは、通常、ケラチノサイト、脳、下垂体、副甲状腺、副腎皮質、髄質、胎児の肝臓、造骨細胞様細胞、及び授乳期の乳腺を含む多くの組織に少量見出だされる。多くのHHM悪性腫瘍において、PTHrPは循環系に高レベルで見出だされ、HHM関連の高カルシウムレベルを生じる。

20

【課題を解決するための手段】

【0005】

本発明は脊椎動物の細胞のレセプター、望むべくは、副甲状腺ホルモンレセプターをコードしているDNA配列からなる分離されたDNAを特徴とする。このレセプターは、図3に示されているアミノ酸配列（配列番号：3）に対し少なくとも30%（望ましいのは少なくとも50%、更に望ましいのは少なくとも60%、そして最も望ましいのは少なくとも75%）同一のアミノ酸配列を持つものである：即ち、2つのアミノ酸配列間で（標準の方法を用いて）最近似部位を求める場合、前者の配列のアミノ酸残基の少なくとも30%が後者の配列のアミノ酸残基と同一ということである。“分離された”とは、このDNAが、本発明のDNAが由来する（何であれ）生物に本来あるゲノム内で、本発明のDNAをコードしている遺伝子に直接隣接している遺伝子のコーディング配列を全く持たないということを意味する。分離されたDNAは一本鎖、または二本鎖でもよく、また、ゲノムDNA、cDNA、組換えハイブリッドDNA、あるいは合成DNAでもよい。それは自然に存在する細胞のレセプター（例えば、PTHレセプター）をコードしているDNA配列と同一かも知れず、あるいは、このような配列とは、1つあるいはそれ以上のヌクレオチドの欠落、付加、または、置換によって異なるかも知れない。本発明の一本鎖DNAは、一般に少なくとも8ヌクレオチドの長さを持ち（望ましいのは、少なくとも18ヌクレオチドの長さ、そして更に望ましいのは30ヌクレオチドの長さ）、遺伝子あるいはcDNAの全長に及ぶこともある。これらはハイブリッド形成プローブとして用いるため、検出され易いように標識されていることが望ましく、また、アンチセンスのこともあり得る。出来れば、この分離されたDNAは高度緊縮条件下に、図1（配列番号：1）、図2（配列番号：2）、図3（配列番号：3）、あるいは図6（配列番号：4）に示されているDNA配列の全体、あるいは一部とハイブリッドを形成することが望ましい。“高度緊縮”とは、例えばヒト腎臓のPTHレセプターcDNAの分離のための以下に記載されているような条件を意味する（Current Protocols in Mole

30

40

50

cular Biology, John Wiley & Sons, New York, 1989も参照のこと、ここには引用して組み込まれている)。最も望ましいのは動物が哺乳類（オポッサム、ラットあるいはヒト）であり、DNA配列が図1（配列番号：1）、図2（配列番号：2）、図3（配列番号：3）、あるいは図6（配列番号：4）に示されているアミノ酸配列を本質的にすべてコードしており、あるいはAmerican Type Culture Collection（ATCC）に寄託され、ATCC受託番号68570あるいは68571と名付けられているプラスミドの1つのコーディング配列によってコードされていることである。本発明のDNAは、この発明の細胞レセプター（例えば、副甲状腺ホルモンレセプター）、あるいはそのレセプターの断片をコードするDNA配列を含むあるベクター〔それは精製票品（例えば、ライブラリーを形成するベクターの混合物から分離されたあるベクター）として提供されるかも知れない〕に、及びそのベクター（あるいは上記の分離されたDNA）を含む細胞、または本質的に相同な細胞集団（例えば、原核細胞、あるいは哺乳動物細胞のような真核細胞）に組み込まれることもあり得る。“本質的に相同”とは、少なくとも99%の細胞が本発明のベクター（あるいは、場合によっては分離されたDNA）を含むことを意味する。望ましいのは、このベクター（例えば、R15B）が副甲状腺ホルモンレセプターの発現を（例えば、ベクターを移入され、あるいはベクターで形質転換された細胞に）指示する能力を持つことである。

【0006】

別の観点から見ると、本発明は、細胞レセプターをコードしている組換えDNA分子の発現によって生成される細胞レセプター、望むべくは副甲状腺ホルモンレセプター（あるいはその本質的に精製された標品）を特徴とする。“本質的に精製された標品”とは、それが自然状態下で結合している蛋白質や脂質を実質的には含まない標品のことである。

【0007】

関連した観点からは、本発明は、自然状態下に存在するこの発明の細胞レセプターの断片を含むポリペプチドを特徴とする。望ましいのは、このポリペプチドが、副甲状腺ホルモンあるいは副甲状腺ホルモン関連蛋白質と結合する能力を持つ自然状態下に存在する副甲状腺ホルモンレセプターの断片を含むことである。好適な実施態様では、この断片は少なくとも6つのアミノ酸の長さで、以下のグループから選ばれた配列を持つ：

- (a) TNETREREREVFDRLGMIYTVG；（配列番号：5）
- (b) YLYSGFTLDEAERLTEEEL；（配列番号：6）
- (c) VTFFLYFLATNYWILVEG；（配列番号：7）
- (d) Y-RATLANTGCWDLSSGHKKWI IQVP；（配列番号：8）
- (e) PYTEYSGTLWQIQMHYEM；（配列番号：9）
- (f) DDVFTKEEQIFLLHRAQA；（配列番号：10）
- (g) FFRLHCTRNY；（配列番号：11）
- (h) EKKYLWGFTL；（配列番号：12）
- (i) VLATKLR ETNAGRC DTRQQYRKLLK；（配列番号：13）

あるいは

(j) 断片（即ち、少なくとも6残基の長さを持つが、全体よりは短い部分）あるいは(a)－(i)の類似体（アナログ）で、副甲状腺ホルモン、あるいは副甲状腺ホルモン関連蛋白質〔ここで“類似体（アナログ；analog）”とは、それが類似体であるペプチドと少なくとも50%（そして望ましいのは少なくとも70%）同等の配列を持つペプチドを指す〕を結合する能力を持つもの。出来れば、本発明のポリペプチドは組換えDNA分子の発現によって生成されるか、または合成品（即ち、生物学的よりも化学的な手段によって組み立てられた）であることが望ましい。本発明はこのようなポリペプチドを生成する方法を提供し、この方法には、本発明の細胞レセプター、あるいはレセプターの断片をコードしている分離されたDNAを含む細胞を提供すること、及びこの細胞を、分離されたDNAからポリペプチドの発現を可能にするような条件下で培養することが含まれる。

【0008】

10

20

30

40

50

本発明は、また、この発明の細胞レセプター（出来ればヒトのPTHレセプターのような副甲状腺ホルモンレセプター）と免疫複合体を形成する能力のある抗体（単クローン性または多クローン性）及び抗体の精製標品を特徴とする。このような抗体は、抗原として（１）本発明の細胞レセプターの断片を含むポリペプチド、あるいは（２）細胞表面上に存在する本発明の細胞レセプターを用いることによって生成される。この抗体は、出来れば、本発明の細胞レセプターの活性（即ち、レセプターにそのリガンドが結合する時、レセプターによって本来引き起こされるカスケード反応の一部を構成するもの）を中和（即ち、部分的に、または完全に阻害する）する能力を持つことが望ましい。好適な実施態様において、本発明の抗体は副甲状腺ホルモンレセプターと免疫複合体を形成する能力を持ち、PTHレセプターの生物学的活性（即ち、アデニル酸シクラーゼの活性化、あるいはホスホリパーゼCの刺激）を中和することが出来る。

10

【0009】

また本発明には、製剤上許容出来る担体中に、（a）本発明の細胞レセプター、（b）本発明の細胞レセプターの断片を持つポリペプチド、あるいは（c）本発明の細胞レセプターに対する抗体を含む治療混合物が包含される。これらの治療混合物は、本発明の細胞レセプターのリガンドによる過剰刺激を特徴とする種々の疾病を処置する手段を提供する。好適な実施態様において、本発明のポリペプチドにはPTHレセプター、PTHレセプターの断片、及びPTHレセプターと免疫複合体を形成する抗体が含まれる。これらのポリペプチド及び抗体は、PTHあるいはPTHrPに関連する高カルシウム血症の症例を、これとは関連のないものと識別するための診断用薬として有用である。

20

【0010】

本発明の核酸プローブは、遺伝子工学の一般研究者が、細胞レセプター同族体、あるいは本発明の細胞レセプターに関連した、いかなる動物由来にせよ、その細胞レセプターを同定し、クローン化することを可能にし、本発明の配列の有用性を拡大する。

【図面の簡単な説明】

【0011】

【図1A】図1はオポッサムの腎臓のPTH／PTHrプレセプタークローン、OK-Hをコードしている核酸とアミノ酸の配列の表示である（配列番号：1）。

【図1B】図1はオポッサムの腎臓のPTH／PTHrプレセプタークローン、OK-Hをコードしている核酸とアミノ酸の配列の表示である（配列番号：1）。

30

【図1C】図1はオポッサムの腎臓のPTH／PTHrプレセプタークローン、OK-Hをコードしている核酸とアミノ酸の配列の表示である（配列番号：1）。

【図2A】図2はオポッサムの腎臓のPTH／PTHrプレセプタークローン、OK-Oをコードしている核酸とアミノ酸の配列の表示である（配列番号：2）。

【図2B】図2はオポッサムの腎臓のPTH／PTHrプレセプタークローン、OK-Oをコードしている核酸とアミノ酸の配列の表示である（配列番号：2）。

【図2C】図2はオポッサムの腎臓のPTH／PTHrプレセプタークローン、OK-Oをコードしている核酸とアミノ酸の配列の表示である（配列番号：2）。

【図3A】図3はラットの骨のPTH／PTHrプレセプターのクローン、R15Bをコードしている核酸とアミノ酸の配列の表示である（配列番号：3）。

40

【図3B】図3はラットの骨のPTH／PTHrプレセプターのクローン、R15Bをコードしている核酸とアミノ酸の配列の表示である（配列番号：3）。

【図3C】図3はラットの骨のPTH／PTHrプレセプターのクローン、R15Bをコードしている核酸とアミノ酸の配列の表示である（配列番号：3）。

【図4】図4はクローンOK-O及びR15BからのcDNAにコードされている推定アミノ酸配列の比較である。

【図5】図5はOK-O、OK-HとR15Bの推定アミノ酸配列を配列相同性に従って並べて比較したものである。

【図6A】図6はヒトのPTH／PTHrプレセプターをコードしている核酸とアミノ酸配列の表示である（配列番号：4）。

50

【図 6 B】図 6 はヒトの PTH/PTHrP レセプターをコードしている核酸とアミノ酸配列の表示である（配列番号：4）。

【図 6 C】図 6 はヒトの PTH/PTHrP レセプターをコードしている核酸とアミノ酸配列の表示である（配列番号：4）。

【図 6 D】図 6 はヒトの PTH/PTHrP レセプターをコードしている核酸とアミノ酸配列の表示である（配列番号：4）。

【図 7】図 7 はラットの骨の PTH/PTHrP レセプターの cDNA、ヒトのゲノム DNA クローン及びヒトの PTH/PTHrP レセプターをコードしている 2 つの cDNA クローンの略図である。

【図 8】図 8 はヒトの腎臓の PTH/PTHrP レセプターの推定アミノ酸配列の疎水性プロットである。予測される貫膜ドメイン I～VII が示されている；A、B、C は追加の疎水性部位を示す。

【図 9】図 9 は OK-H を移入した COS 細胞への PTHrP の結合を示すグラフである。

【図 10】図 10 は OK-H を移入した COS 細胞における NlePTH による細胞内遊離カルシウムの刺激を示すグラフである。

【図 11】図 11 は OK-O を移入した COS 細胞への PTHrP の結合を示すグラフである。

【図 12】図 12 は OK-O を移入した COS 細胞における NlePTH による細胞内遊離カルシウムの刺激を示すグラフである。

【図 13】図 13 は R15B を移入した COS 細胞への PTHrP の結合を示すグラフである。

【図 14】図 14 は R15B を移入した COS 細胞における NlePTH による細胞内遊離カルシウムの刺激を示すグラフである。

【図 15】図 15 は OK-H、OK-O、あるいは R15B を移入した COS 細胞における NlePTH によるイノシトールリン酸代謝の刺激を示すグラフである。

【図 16】図 16 は CDM-8、OK-H、R15B を移入した COS 細胞における NlePTH によるサイクリック AMP 刺激を示すグラフである。

【図 17】図 17 はヒトの腎臓（A と C）及びラットの骨（B と D）の PTH/PTHrP レセプターを一過性に発現している COS 細胞への ^{125}I -標識 PTH（1-34）（A と B）及び ^{125}I -標識 PTHrP（1-36）（C と D）の結合を示すグラフである。競合するリガンドには、PTH（1-34）（□）、PTHrP（1-36）（*）、PTH（3-34）（■）、PTH（7-34）（+）が含まれる。データは特異的結合のパーセントとして示され、少なくとも 3 つの独立した実験の平均値 ± 標準偏差を表すものである。

【図 18】図 18 はヒトの腎臓のレセプターを一過性に発現している COS 細胞における細胞内 cAMP の蓄積刺激を示すグラフである。データは平均値 ± 標準偏差を示し、少なくとも 3 つの独立した実験を表すものである。

【図 19】図 19 はヒトの腎臓（A）と SaOS-2 細胞（B）から作られた総 RNA（～10 µg/レーン）のノーザンブロット分析の表示である。プロットはヒト腎臓の PTH/PTHrP レセプターをコードしている完全長の cDNA とハイブリッドを形成した。28S と 18S のリボソーム RNA バンドの位置が示されている。

【図 20】図 20 はヒトのゲノム DNA を Sst I、Hind III 及び Xho I（～10 µg/レーン）で消化したもののサザンブロット分析を示す。プロットはヒトの腎臓の PTH/PTHrP レセプターをコードしている完全長の cDNA とハイブリッドを形成した。

【図 21】図 21 は R15B によってコードされているラットの骨の PTH/PTHrP レセプターの細胞膜における配置提案の略図である。

【発明を実施するための形態】

【0012】

10

20

30

40

50

本発明の他の特徴と利点は、以下の好適な実施態様の説明と請求の範囲から明らかになるであろう。

【0013】

材料と方法

一般：[Nle^{8, 18}, Tyr³⁴] bPTH(1-34)アミド(PTH(1-34))、[Nle^{8, 18}, Tyr³⁴] bPTH(3-34)アミド(PTH(3-34))及び[Nle^{8, 18}, Tyr³⁴] bPTH(7-34)アミド(PTH(7-34))はBachem Fine Chemicals, Torrance, CAから購入した；[Tyr³⁶] PTHrP(1-36)アミド(PTHrP(1-36))は記載(Keutman et al., Endocrinology 117:1230, 1985)されているように、Applied Biosystems Synthesizer 420Aを用いて合成した。ダルベッコ変法イーグル培地(DMEM)、EDTA／トリプシン及びゲンタマイシンはGIBCO(Grand Island, NY)から；牛胎児血清(FBS)はHyclone Laboratory, Logan, UTから入手した。ヒト腎臓の総RNAはスエーデン、ウプサラ、大学病院のPer Hellmann氏によって提供された。オリゴヌクレオチドプライマーはApplied Biosystems 380B DNA Synthesizerを用いて合成した。制限酵素類、クレノウ酵素、T4ポリヌクレオチドキナーゼとT4DNAリガーゼは、New England Biolabs, Beverly, MAから購入した。子牛アルカリホスファターゼは、Boehringer Mannheim, 20
ドイツから購入した。すべての他の試薬は入手可能な最高純度のものであった。

【0014】

細胞

使用された細胞には、COS細胞、OK細胞、SaOS-2細胞、CHO細胞、AtT20細胞、LLC-PK1細胞及びUMR-106細胞が含まれ、Americann Type Culture Collection(Rockland, Maryland)、受託番号、夫々、CRL1650、CRL6551、HTB85、CCL61、CCL89、CL101及びCRL1161を含む種々の供給源から入手した。ROS17/2及びROS 17/2.8はGideon Rodan博士(Merck Laboratories, West Point, PA)を含むいくつかの供給源から入手した。MC-3T3細胞はマウスの骨細胞から誘導されるが、滋野長平博士(医化学、医学部、京都大学、京都、日本)を含む種々の供給源からも入手出来る。 30

【0015】

すべての細胞は湿度95%の空気、CO₂ 5%を含む気相で培養され、牛胎児血清(M. A. Bioproducts, Walkerville, MD)を5%、あるいは、10%添加したハムF-12培地、あるいはDMEM培地(Grand Island Biological Co.)で単層培養として維持された。培地は3乃至4日ごとに交換され、細胞は2乃至3週ごとに標準の方法を用い、トリプシン処理によって継代培養された。

【0016】

クローニング

ラット及びオポッサムのPTH／PTHrPレセプターをコードしているcDNAクローンの分離：

総RNAは、最初にラットの骨肉腫(ROS)細胞(ROS 17/2.8)とオポッサムの腎臓(OK)細胞から、グアニジンイソチオシアネートを用いる標準法(Ullrich et al., Science 196: 1313, 1977; Chirgwin et al., Biochemistry 24: 5294, 1979)と塩化セシウム密度勾配遠心法(Gilsen et al., Biochemistry 13: 2633, 1974)によって分離された。次いでポリA+RNAs(mRNAs)は、AvivとLeder(Proc. Natl. Acad. Sci. U 50

SA 69:14087, 1972)の方法により、総RNAsをオリゴdTカラム (Pharmacia, Piscataway, NJ)を通した後回収された。ROS 17/2.8 mRNAからのcDNAライブラリーは、ポリA+RNAからGublerとHoffman (Gene (Amst.) 25: 263, 1983)の方法を用いて作られた。オリゴdTをプライマーとする、及びランダムプライマーをプライマーとするcDNAは、夫々、ポリA+ROS 17/2.8及びOK細胞のmRNAから合成された (AvivとLeder, 前記)。cDNAはBstX1リンカー (Invitrogen, San Diego, CA)に連結され、5-20%の酢酸カリウム密度勾配遠心 (3時間、55,000xg)によってサイズ選別が行われた。サイズ選別されたcDNAは、次いで、非自己アニーリングBstX1制限部位を用いてプラスミドベクター、pcDNA1 (Invitrogen)に挿入された。その結果得られたプラスミドライブラリーは、次に、より大きなヘルパープラスミド、p3を持つE. coli (MC1061/P3, Invitrogen)を形質転換するのに用いられた。p3プラスミドは、2つの遺伝子にアンバー変異を持ち、アンピシリン及びテトラサイクリン耐性をコードしている。アンピシリン及びテトラサイクリンを用いると、p3とpcDNA 1内に含まれているtRNAサプレッサー遺伝子の両方を持つ細胞のみが成長することが出来た。変異した細菌は、次いで集密状態まで培養され、プラスミドcDNAは標準技法 (例えば、Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley Sons, New York, 1989を参照のこと)により分離された。これらDNAは、次いでDEAE-デキストラン溶液に取り込まれ、予め“サイドフラスコ” (Nunc, デンマーク)中で75%の集密度にまで培養されたアフリカミドリザルの腎臓 (COS)細胞に移入するのに用いられた。

【0017】

ROSあるいはOK細胞の機能的に完全な副甲状腺ホルモン/副甲状腺ホルモン関連蛋白質 (PTH/PTHrP)のレセプターを発現する能力のあるプラスミドを含むCOS細胞のスクリーニングは、Gearringらの方法 (EMBO J. 8: 3676, 1989)に従い、これにサイドフラスコ中でのDEAE-デキストラン移入を含むいくらかの変法を加えて行った。移入して48時間後、細胞は既述の方法 (Yamamoto et al., Endocrinology 122: 1028, 1988)を用い、ただし例外として、インキュベーションの時間と温度は、夫々、2時間と室温に変更して、¹²⁵I-標識 [Tyr³⁶] PTHrP (1-36)アミドとの結合能を検査された。洗浄後、細胞は1.25%のグルタルアルデヒドで固定され、1%のゼラチンで洗浄された。サイドフラスコの先を折った後、残りの顕微鏡用スライドをNTB-2写真用乳液 (Eastman Kodak, Rochester, NY)に浸した。4℃で3-4日間反応後、スライドは現像、固定され、そして0.03%のトルエンブルーで染色された。各スライドのスクリーニングは光学顕微鏡 (オリンパス)下で行われた。ROS細胞からのプラスミド-DNAの1プール及びOK細胞からのプラスミド-DNAの2プール、(10,000個の独立クローン)から、夫々、PTH/PTHrプレセプターを発現している3-4個の移入されたCOS細胞が得られた。これらのプールは後に再分割された。サブプールはCOS細胞に移入するのに用いられ、そして個々のクローンは、放射性リガンドを結合することの出来るレセプター蛋白質を発現することが確認された。

【0018】

ヒトのPTH/PTHrプレセプターをエンコードするcDNAとゲノムDNAクローンの分離

ラムダGT10中のヒト腎臓のオリゴdTをプライマーとするcDNAライブラリー (1.7x10⁶ 独立クローン)及びEMBL3 (Sp6/T7) (Clontech, Palo Alto, CA)中のヒト胎盤DNAのゲノムライブラリー (2.5x10⁶ 独立クローン)は、³²P-標識 (ランダムプライマーをプライマーとする標識キ

ット、ベーリンガー、マンハイム、ドイツ) された BamHI / NotI 1.8 kb の制限酵素断片で、ラットの骨の PTH / PTHrP レセプターをコーディング配列の大部分をコードしているものとのブランクハイブリッド形成法 (Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2 版、108-113 頁、Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY、1989) によってスクリーニングされた (図 3)。ニトロセルロースフィルターは、50%ホルムアミド、4xクエン酸ナトリウム生理食塩水 (SSC; 1xSSC: 300mM NaCl, 30mM クエン酸ナトリウム、pH 7.0)、2xデンハルト溶液、10%硫酸デキストラン、100 µg/ml のサケ精子 DNA (最終濃度) を含む前ハイブリッド形成溶液中、42℃で4時間インキュベートした。ハイブリッド形成は、同じ溶液中で42℃で18-24時間行われた。フィルターは、2xSSC/0.1%SDSで室温で30分間、次いで、1xSSC/0.1%SDSで45℃で30分間洗浄した。フィルムは、増強スクリーンを用い、-80℃で18-24時間、露出した。

【0019】

各ライブラリーから、約百万個のクローンがスクリーニングされた。陽性のクローンはブランク法で精製され、ラムダファージ DNA が分離された (Sambrook et al., 上記)。クローン化された挿入断片は、ファージ DNA から、制限酵素エンドヌクレアーゼ HindII および EcoRI (ラムダ GT10 ライブラリー)、あるいは XhoI および SstI (EMBL 3 ライブラリー) を用いて取り出され、次いで適当な脱リン酸化された制限酵素部位を用いて pCDNAI (Invitrogen, San Diego, CA) 中にサブクローンされた。CsCl₂ (密度勾配) で精製されたサブクロンの配列決定は、Sanger ら (Biochem. 74: 5463, 1977) の方法に従い、ジデオキシターミネーション法 (Sequenase バージョン 2 sequencing キット、United States Biochemical Corporation, Cleveland, OH) によって行われた。

【0020】

逆転写とポリメラーゼ連鎖反応 (PCR)

3 µg のヒト腎臓由来のポリ (A) + RNA (Clontech, Palo Alto, CA) を 73.5 µl の水の中で 100℃で30秒インキュベートし、氷冷して反応を静め、20 µl の 5xRT 緩衝液 (1xRT 緩衝液: 40mM トリス塩酸、pH 8.2、40mM KCl、6.6mM MgCl₂、10mM ジチオトレイトールと各 5mM のデオキシヌクレオシド三リン酸 (dNTP))、2 µl (4 単位) の RNasin (Promega Biotech, Madison, WI)、1 µl (80 pmol/µl) のヒト cDNA プライマー H12 (5'-AGATGAGGCTGTGTCAGGT-3'; 配列番号: 14) と 80 単位のトリ骨髄芽球炎ウイルスの逆転写酵素 (Life Sciences, St. Petersburg, FL) に加えた。反応混合物を 42℃で40分間インキュベートした。次いで、10分の1容の最初の鎖を合成する反応混合物は、PCRにより、3mM MgSO₄、200 µM の dNTP、2 単位の Vent ポリメラーゼ (New England Biolab, Beverly, MA) と各 2 µM の正方向と逆方向のプライマー (PCR の条件: 変性、1 分間、94℃; アニール、1 分間、50℃; 延長、72℃で3分間; 40 サイクル) を含む最終容量 100 µl の中で増幅された。

2つの独立した PCR は、以下の2つの異なった正方向のプライマーを用いて行われた: i) 2つの以前にクローン化された PTH / PTHrP レセプター

G C C

(上述) コーディング末端に基づく変性プライマー RK-1 (5'-GGAAATTC CATGGGAGCGGCCCGGAT-3'; 配列番号: 15)、及び、ii) ヒトゲノムクローン HPG1 の 5'-非コーディング領域に基づくプライマー RK-2 (5'-CG

GGATCCCGCGGGCCCTAGGCGGT-3'；配列番号：16）。両PCR反応はヒトのPTH/PTHrPレセプターのコーディング領域の713～731番目のヌクレオチドを現す逆プライマーH26（5'-AGTATAGCGTCCCTTGACGA-3'）を用いた（図4）。PCRの生成物はクレノー酵素により末端を平滑にされ、EcoRVで切断されて、脱リン酸されたpcDNAIにクローン化された。

【0021】

ノーザンブロット分析：総RNAはSaOS-2細胞及びヒト腎臓からグアニジウムチオシアネート法（Chirgwin et al., Biochem. 18:5294, 1979）によって抽出された。ノーザンブロット分析のため、～10μgの総RNAが1.5%/37%ホルムアルデヒドゲル上での電気泳動にかけられ、ニトロセルロースフィルター（Schleicher and Schuell, Keene, NH）にブロットされた。ハイブリッド形成条件はファージライブラリースクリーニングの条件と同じであった（上記参照）。フィルターは、0.5xSSC/0.1%SDSの最終洗浄条件で30分間、60℃で洗浄し、オートラジオグラフィーのために露出した。

【0022】

サザンブロット分析：ヒトゲノムDNAはSDS/プロテイナーゼK法（Gross-Bellard et al., Eur. J. Biochem. 36:32, 1973）を用いて生成された。サザン分析のため、～10μgのDNAがSstI、PvuII及びXhoIによって消化され、0.8%アガロースゲル上の電気泳動にかけられ、ニトロセルロース膜（Schleicher and Schuell, Keene, NH）にブロットされた。ハイブリッド形成条件はファージライブラリースクリーニングの条件と同じであった（上記参照）。フィルターは、0.5xSSC/0.1%SDSの最終洗浄条件で30分間、55℃で洗浄し、オートラジオグラフィーのために露出した。

【0023】

機能分析

COS細胞に発現されたクローン化レセプターの機能的諸性質を特徴づける試験には以下のものが含まれた：

I) PTHとPTHrPの断片及び類似体の結合、

II) PTHとPTHrPの断片及び類似体によるサイクリックAMP蓄積の刺激、

III) PTHとPTHrPの断片及び類似体による細胞内の遊離カルシウムの増大、及び

IV) PTHとPTHrPの断片及び類似体によるイノシトールリン酸代謝の活性化。方法論は次の通りである：

【0024】

ラジオレセプターアッセイ

[Nle⁸, Nle¹⁸, Tyr³⁴] bPTH-(1-34)アミド (NlePTH) 及び [Tyr³⁶] PTHrP (1-36)アミド (PTHrP) は Na¹²⁵I (担体なし、New England Nuclear, Boston, MA) により既報 (Segre et al., J. Biol. Chem. 254:6980, 1979) に従ってヨード化され、逆相HPLCによって精製された。簡略に述べると、標識されたペプチドは0.1%のトリフルオロ酢酸 (TFA) に溶かされ、C₁₈ Sep-pakカートリッジ (Waters Associates, Inc., Milford, MA) にかけて、0.1% TFA中60%アセトニトリル溶液によって溶出された。凍結乾燥後、ラジオリガンドは、次いで、C₁₈-μBondapakカラム (3.9mm x 30cm, Waters Associates) にかけて、0.1% TFA中30-50%のアセトニトリルの直線密度勾配を用い、2ml/分の流速で30分かけて溶出した。ラジオリガンドは、2つのピークに別れて溶出した；最初のピークは約38%のアセトニトリルのところで溶出し、より高い総結合と特異的結合を示したので、この研究に用いられた。比活性は500±75mCi/mgで、これは平均のヨード-ペプチド比1に相当する。

10

20

30

40

50

【0025】

COS-7細胞は15cmのプレートで、DMEM、10%の熱不活性化FBS、10mg/Lゲンタマイシン中、80-90%の密集度まで培養された。DEAE/デキストラン法(Sambrook et al., 上記)により1-2μgのプラスミドDNAを移入した24時間後、細胞をトリプシン処理し、多穴プラスチック皿(直径16あるいは35mm、Costar, Cambridge, MA)に、細胞濃度 5×10^4 細胞/cm²で再配分した。細胞数は移入後わずかに増加したのみであった。更に培養を48時間続けた後、ラジオレセプターアッセイが行われた。培養培地は、研究開始直前、50mMトリス-塩酸(pH7.7)、100mMNaCl、2mMCaCl₂、5mMKCl、0.5%熱変性牛胎児血清(GIBCO)、5%熱変性ウマ血清(KC Biological Inc., Lenexa, KS)を含む緩衝液と交換された。特に指示のない限り、研究は、細胞をこの緩衝液中、15℃、4時間、 4×10^5 cpm/ml (9.6×10^{-11} M)の¹²⁵I-標識のNlePTHあるいはPTHrPとインキュベートして行われた。

【0026】

インキュベーションは、緩衝液を吸引除去し、粘着性細胞を含む培養皿を0.9%NaCl溶液で繰り返し(3回)、15秒間にわたって洗浄することによって終了させた。細胞に結合した放射能は、各ウェルに連続(3回)1NNaOH(200μl)を加えることによって回収された。室温で30分後、このNaOHはガラス管に移された。二回目、三回目の1NNaOH(200μl)による抽出を、一回目のものと合わせ、総放射能はγスペクトロメーター(Packard Instruments, Downers Grove, IL)で測定された。細胞を含みぬ培養皿へのトレイサーの付着は、たとえば容器が培養培地とプレインキュベーションされても、無視出来る程度であった(加えられた総カウントの0.2%以下)。

【0027】

cAMP蓄積の測定

細胞内cAMPの蓄積は既述(Abou-Samra et al., J. Biol. Chem. 262:1129, 1986)のようにして測定された。24穴プレート内の細胞を0.1%BSAと2mMIBMXを含む培地で洗浄した。次いで、細胞はPTHまたはPTHrPと15分間、37℃でインキュベートした。上清を除き、細胞は直ちにプレート全体をドライアイス粉末中に置くことによって凍結した。細胞内cAMPは1mlの50mMHCl中で細胞を融かすことによって抽出され、抗cAMP抗体(例、Sigma, St. Louis, MO)を用い、特異的ラジオイムノアッセイによって分析された。cAMPの代わりにトレーサーとして用いられたcAMP類似体(2'-オモノサクシニル-アデノシン3':5'-サイクリックモノリン酸トシルメチルエステル、Sigmaより購入)は、クロラミンT法によりヨウ素化された。遊離のヨウ素は、ヨウ素化されたcAMP類似体をC18Sep-pakカートリッジ(Waters, Milford, MA)に吸着することによって除去した。

dH₂Oで洗浄後、ヨウ化cAMP類似体はSep-pakカートリッジから40%アセトニトリル(ACN)と0.1%トリフルオロ酢酸(TFA)によって溶出された。ヨウ化cAMP類似体は凍結乾燥され、1mlの0.1%TFAにもどし、C18逆相FPLCカラム(Waters)に注入された。カラムを0.10%ACNの1%TFA溶液で平衡化し、0.1%TFA中、10-30%ACNの密度勾配で溶出した。この操作によりモノヨウ化cAMP類似体を、非ヨウ化cAMP類似体から分離することが可能となる。トレーサーは-20℃で保存する時は、4ヶ月までは安定である。アッセイに用いられた標準品、アデノシン3', 5'-りん酸はSigmaから購入した。試料(1-10μlのHCl抽出液)あるいは標準品(0.04-100fmol/チューブ)を50mM酢酸ナトリウム(pH5.5)で希釈し、トリエチルアミンと無水酢酸の混合物(容量比2:1)10μlでアセチル化した。アセチル化後、cAMP抗血清を、PBS(pH7.4)、5mMEDTA及び1%正常ウサギ血清中に作られた原液(1:4000)から

加えた。トレーサーは、0.1% BSAを含むPBS (pH 7.4) で希釈して加えられた (20,000 cpm/チューブ)。アッセイは4℃で一晩インキュベートした。結合したトレーサーは100 μl のヤギの抗ウサギ抗血清 (1:20、PBS中) 及び1ml の7% ポリエチレングリコール (分子量5000-6000) を加えて沈殿させ、2000 rpmで30分間、4℃で遠心した。上清を除き、結合した放射能をγ-カウンター (Micromedic) で測定した。標準曲線はMicromedicから提供された4-パラメーターRIAプログラムを用いて算定した。典型的な例では、アッセイ感度は0.1 fmol/チューブで、トレーサーの50%を置換する標準濃度は5 fmol/チューブである。

【0028】

cAMP蓄積をアッセイする別法では、PTH/PTHrPレセプターcDNAを移入されたCOS細胞は、プラスチックポリスマンによって、10mM トリス-塩酸 (pH 7.5)、0.2mM MgCl₂、0.5mM エチレングリコールビス (2-アミノエチル) N, N'-四酢酸 (EGTA) (Sigma) と1mM ジチオトレイトール (Sigma) を含む溶液の中に集められる。細胞は緊密に合ったダウンスホモジェナイザーの20ストロークでホモジェナイズし、13,000 x gで15分間4℃で遠心する (Eppendorf, 5412型, Brinkmann Instruments, Inc., Westburg, NY)。原形質膜を含むペレットはダウンスホモジェナイザーで数ストロークにより同じ緩衝液に再度懸濁し、更に同緩衝液で希釈して蛋白質濃度を、Lowryらの方法 (Lowry et al., J. Biol. Chem. 193: 265, 1951) で測定して約1.2 mg/mlとする。約30 μg (25 μl) の膜を、種々の濃度のホルモン、または媒体のみと10分間、37℃ (最終容量、100 μl) で、50mM トリス-塩酸 (pH 7.5)、0.8mM ATP、4 x 10⁶ cpm [α -³²P] ATP (New England Nuclear, Boston, MA)、9mM テオフィリン、4.2mM MgCl₂、26mM KCl、0.12% BSA、及び5mM クレアチンりん酸 (Schwartz/Mann Division, Becton-Dickens & Co., Orangeburg, NY) とクレアチンホスホキナーゼ (Schwartz/Mann) を含むATP再生系とインキュベートする。インキュベーションは、膜懸濁液を加えることによって開始され、100 μl の20mM cAMP、約50,000 cpmの [³H] cAMPと80mM ATPを含む溶液を加えることによって終了させる。反応混合物を煮沸し、生成された [³²P] cAMPはイオン交換カラム (Dowex 50 W-X4, Biorad Lab, Richmond, CA) とアルミナ (Sigma) 上の連続カラムクロマトグラフィーによって精製される。 [³²P] cAMPはβ-シンチレーションカウンター (Packard Instrument Co.) で、 [³²P] cAMPの回収に対する補正をして測定される。

【0029】

細胞内遊離カルシウムの測定

PTH/PTHrPレセプターcDNAを移入された細胞の細胞内カルシウムレベルの測定は、Fura-2 AM (Fura-2のアセトメトキシエステル、Molecular Probes Inc., Eugene, OR) を負荷した細胞を用いて行われた。方法論の詳細は以下の通りである：

COS細胞を塗布したカバーガラスを、Fura-2 AMを負荷し、以下のものを含む (mM濃度) 緩衝液中でインキュベートした：HEPES (N-[2-ヒドロキシエチル] ピペラジン-N'-[2-エタンスルホン酸])、20；CaCl₂、1；KCl、5；NaCl、145；MgSO₄、0.5；NaHCO₃、25；K₂HPO₄、1.4；グルコース、10；およびFura-2 AM (1-[2-(5'-カルボキシオキサゾール-2'-イル)-6-アミノベンゾフラン-5-オキシ]-2-(2'-アミノ-5'-メチルフェノキシ) エタン-N, N, N', N'-四酢酸ペンタアセトキシメチルエステル)、0.5；37℃でpH 7.4、95% 空気と5% CO₂

とを45分間通した。Fura-2 AMを負荷した細胞は、次いで、以下のものを含む(mM濃度で)修正クレブス・ヘンゼライト(KH)緩衝液で洗浄した: HEPES、20; CaCl_2 、1; KCl、5; NaCl、145; MgSO_4 、0.5; Na_2HPO_4 、1; グルコース、5; pH 7.4。エステルの開裂が起きたことをチェックするために、Fura-2 AMインキュベーション後、時間を変えて励起スペクトルを測定した。インキュベーション開始後5分で、励起スペクトルは約360nmにピークがあり、Fura-2 AMの不完全な加水分解を反映していたが、30分を越えると、励起スペクトルはFura-2の特徴である約345nmにピークがあった。

個々の細胞の蛍光を測定するために、カバーガラスを顕微鏡の組織チャンバー(Bio-physica Technologies, Inc., MD)に置いた。チャンバーは、シリコンラバーシールを持つテフロン製の浅い、傾斜のついたコンパートメントからなっていた。カバーガラスはチャンバーの底の役割をした。カバーガラスを所定の場所に密着させるシリコンラバーには、ヒーター/クーラーリングが封じ込められていた。温度はヒーターに0-7.4ボルトを加えることによって、22°C~37°Cの間で変動させた。温度を特定しない限り、実験は37°Cで施行された。チャンバーは倒立顕微鏡(Zeiss IM-35, Thornwood, NY)の載物台に載せた。Fura-2の蛍光のために、コンデンサー(Photon Technologies International (PTI) Inc., NJ)の焦点におかれた75ワットのキセノンアーク灯で励起された。鏡板が透過光分割器と交番する回転チョッパーによって交番される回折格子単色光分光器が、波長選定に使用された。単色光分光器の出力は結集されて一本の共通の光路を形成し、調節可能な虹彩を通して発光源のハウジングを励起した。次いで、光は石英レンズを、そして100倍のニコン蛍光対物レンズを通して二色性の鏡を通して。光量子計算PMT装置による検出が光の出力測定に使用された。データの分析は、MS-DOS操作系を用いるIBM互換性AT/286コンピュータにPTIソフトウェアを使用して行った。データは圧縮二者択一形式に保存、操作された。

【0030】

細胞内のカルシウム濃度は次式に従って計算された: $[\text{Ca}^{2+}]_i = K_d (R - R_{\min}) / (R_{\max} - R) B$ 、ここで、Rは340と380nmにおける細胞の蛍光の比であり; $R_{\max}$ と $R_{\min}$ は、夫々、飽和量のカルシウムと實際上ゼロのカルシウムの存在下の、Fura-2の340と380nm励起波長における蛍光強度の比であり; Bは380nmにおけるゼロカルシウム存在下のFura-2の蛍光の、飽和量のカルシウム存在下の蛍光に対する比であり; K_d はFura-2のカルシウムに対する解離常数である。 $R_{\max}$ を測定するために、実験の終末にイオノマイシンをFura-2を負荷した細胞に加えて細胞外(1mM)と細胞内環境の間の Ca^{2+} を平衡化した。次いで、 $R_{\min}$ を計算するために、1mMのEGTAを細胞浸液に加えた。異なった温度では異なった解離常数が用いられた: 34-37°Cにおいては224nM、及び24-27°Cにおいては135nMである。

【0031】

イノシトールりん酸の測定

PTH/PTHrPレセプターを移入されたCOS細胞におけるイノシトールりん酸の代謝レベルは既報の方法を用いて測定された(Bonventre et al., J. Biol. Chem. 265: 4934, 1990)。

【0032】

結果

分子的性質

2つの別個のクローン(OK-H及びOK-O)は、ともにOK細胞のcDNAライブラリーから分離されたが、およそ2キロベースの長さを持っていた。これらのクローンの決定されたヌクレオチド配列と予想されるアミノ酸配列は、夫々、図1(配列番号: 1)及び図2(配列番号: 2)に示されている。ROS細胞のcDNAライブラリーから分離

された R 1 5 B クローンは、およそ 4 キロベースの長さであった。ラットの骨の P T H / P T H r P レセプターの決定されたヌクレオチド配列と予想されるアミノ酸配列は図 3 (配列番号: 3) に示されている。

【0033】

3 つの c D N A クローンは、イニシエーターメチオニンとして有望な候補者と予想されるメチオニン残基をコードしているコドンを持つという範疇によって完全な長さのものと思われる。これらメチオニンコドンの後ろには、“シグナルペプチド”配列であることを示唆する性質を持つアミノ酸配列 (D N A から演繹して) が続く。3 つのレセプター c D N A はすべて、G-蛋白質関連のレセプターに典型的なモデル、推定の 7 回一貫膜モデルへの“適合”を可能にする位置に終止コドンを持つ。最も重要なことは、3 つのクロン化されたレセプターが、すべて、リガンドと結合して活性化された時、細胞内のエフェクターを活性化する能力を有することである。これらの諸性質は、分離された 3 つのクロンすべてが、完全長の c D N A をエンコードすることを示唆する。

【0034】

図 4 は、O K - O 及び R O S 1 5 B からの c D N A によってコードされているアミノ酸配列間の高度の相同性を示す。これら 2 つのレセプター間には、全体で 8 7 % の相同性があり、7 7 . 8 % のアミノ酸の一致がある。このアミノ酸の長い範囲にわたっての高度の一致は、P T H レセプターのアミノ酸配列が進化の上で高度に保持されていることを証明している。これは、O K - O と R 1 5 B 両者からのデータをヒトを含む他の動物種に外挿することを可能にする。

【0035】

図 5 は、3 つのクロン化された c D N A すべての推定アミノ酸配列を配列相同性に従って一線に整列させたものである。O K - H 配列は O K - O と C-末端尾部を除き同一である。ここで O K - O 配列は全部で 5 8 5 アミノ酸残基を持つが、O K - H 配列は 5 1 5 アミノ酸で止まっている。これは、O K - O 配列と比べて O K - H 配列に欠けているただ 1 個のヌクレオチド (G) に起因し、前者におけるフレームシフトと早期の終止コドンの原因となっている。O K - O と O K - H が 2 つの別個の遺伝子の産物か、あるいは実験室の人為産物かは不明である。

【0036】

G 蛋白質に共役したレセプターのいくつかは、イントロン無しの遺伝子によってコードされている (K o b i l k a e t a l . , N a t u r e 3 2 9 : 7 5 , 1 9 8 7 ; K o b i l k a e t a l . , J . B i o l . C h e m . 2 6 2 : 7 3 2 1 , 1 9 8 7 ; H e c k e r t e t a l . , M o l . E n d o c r i n o l . , 6 : 7 0 , 1 9 9 2 ; K o b i l k a e t a l . , S c i e n c e 2 3 8 : 6 5 0 , 1 9 8 7 ; B o n n e r e t a l . , S c i e n c e 2 3 7 : 5 2 7 , 1 9 8 7 ; S u n a h a r a e t a l . , N a t u r e 3 4 7 : 8 0 , 1 9 9 0) 。ヒトの P T H / P T H r P レセプター c D N A を単離するために、ヒト c D N A ライブラリーとヒトゲノムライブラリーの両者を、ラットの骨の P T H / P T H r P レセプターのコーディング領域の大部分を代表するプローブ (B a m H I / N o t I) を用いてスクリーニングした (図 3) 。ヒト腎臓の c D N A ライブラリーのスクリーニングの結果、クロン H K - 1 が分離されるに至った (図 6) [配列番号: 4] 。ラムダ G T 1 0 の 2 つの E c o R I クローニングサイトの 1 つが、ライブラリー構成の結果、除去されたことが判明したので、c D N A 挿入断片及び 3 7 k b (左) ラムダアームの ~ 2 5 0 b p を含む H i n d I I I / E c o R I フェージ断片を p c D N A I の相当する制限部位にサブクロニングした。D N A 配列決定の結果、クロン化された c D N A は、3' コーディング領域の ~ 1 0 0 0 b p と、A の多い 3' -末端を含む 3' 非コーディング領域の ~ 2 0 0 b p を含むことが判明した。X h o I 部位に対する 5' 側コーディング領域は、次いでライブラリーを再スクリーニングするのに使用され、クロン H K - 2 の分離を導いたが、これは、p c D N A I へのサブスクリーニング後、コーディング領域の ~ 1 4 0 0 b p を含むことが判明した。ライブラリーの第三のスクリーニングに対しては

、HK-2のPvuII/PstIが用いられた； 分離されたクローンHK-3はHK-2と同一であることが判明した。

【0037】

ゲノムライブラリーのスクリーニング（ $\sim 10^6$ pfu）の結果、4つの独立したクローンが分離された。これらのクローンの制限酵素消化断片のサザンブロット分析を正常ゲノムDNAのそれとの比較した結果、1つの15 kbのゲノムクローン、HPG1（また、HG4Aとも呼ばれる）は、SstIで消化された正常のヒトゲノムDNAからの、ハイブリッドを形成するDNA種と同じサイズのSstI/SstI断片を含むことが判明した（下記参照）。SstI/SstI断片を構成するハイブリッドを形成する2.3 kbのSstI/SstI DNA断片と、 ~ 8 kb XhoI断片は、共にpcDNA Iにサブクローニングされた。さらにSstI/SstI DNA断片のサザンブロット分析の結果、ある ~ 1000 bpのBamHI/SstI断片がヒトのPTH/PTHrPレセプターの一部をコードしており、これが、後に、推定のシグナルペプチドと ~ 1000 bpのイントロンによって中断されている5'-非コーディング領域をコードしているエクソンを代表していることが判明した（図7）。

【0038】

コーディング領域の残る ~ 450 ヌクレオチドを分離するために、ヒト腎臓からのポリ(A)+RNAをH12でプライミングの後、逆転写した（図7）。一本鎖合成後、2つの独立したPCRを以下の2つの別個の正方向プライマーを用いて行った： i) 2つの以前にクローン化されたPTH/PTHrPレセプター、OK-OとR15Bの5'-コーディング末端に基づく変性プライマーRK-1、及び、ii) HPG1の5'-非コーディング領域に基づくプライマーRK-2である。H-26が両反応の逆プライマーとして用いられた。サザンブロットおよび制限地図分析によって、ヒトのPTH/PTHrPレセプターをコードしている増幅されたDNAの予想されたサイズが確認された。ヒトのPTH/PTHrPの5'-末端をコードしている平滑末端のPCR生成物は、脱リン酸されたEcoRV部位を用いてpcDNA Iにクローン化された。各PCRクローンの配列分析によって、それらの5'ヌクレオチドの違いは正方向プライマーの配列の違いによることが確認されたが、それ以外は同一の配列であることが明らかとなった。ヒトのPTH/PTHrPレセプターcDNAの両鎖のヌクレオチド配列決定により、593アミノ酸残基を持つ蛋白質をコードしている開放読取り枠が明らかとなった（図6、配列番号：4）。

【0039】

完全長のヒト腎臓のPTH/PTHrPレセプターcDNA、HKrkは、PCRクローン#2とHK-2のBamHI/PvuII断片を用いて構成された。ヒトのPTH/PTHrPレセプターをコードしている完全長のcDNAを用いて、ヒト腎臓とSaOS-2細胞からの総RNA（ $\sim 10 \mu\text{g}$ /レーン）のノーザンブロット分析の結果、 ~ 2.5 kbの1つの主要なハイブリッドを形成するDNA種が明かにされた（図19）。正常のヒトゲノムDNAのXhoI消化物は、同じ完全長のcDNA（図20）でプローブされると、1つの主要な約5.5 kbのハイブリッドを形成する種と、弱くハイブリッドを形成する4と8 kbの2つのDNA種が現れた。これらのデータは、ヒトのPTH/PTHrPレセプターが単一の遺伝子の産物であることを示唆している。完全長のクローンは、次いで、機能的及び生物学的諸性質検討のため、上述の方法によりCOS細胞に一過性に発現された。

【0040】

ヒトのレセプターのオッポサム腎臓のPTH/PTHrPレセプター及びラット骨のPTH/PTHrPレセプターとの比較により、夫々、81%と91%のアミノ酸配列の同一性が明らかになり、結果として非常に類似した疎水性プロットを示した（図8）。すべての細胞外システインは、推定シグナルペプチドにおける2つのシステイン残基を含めて、すべての可能性のある細胞外のN-グルコシル化部位のように、保存されている。ヒトの腎臓とラットの骨のPTH/PTHrPの間で同一でないアミノ酸のいくつかは、ヒト

とオポッサムのレセプターの間では保存されていることが判明した。これらの保存されているアミノ酸残基は、51位のA r gからL e u、58位のA r gからT r p、262位のA r gからH i s、358位のA s pからH i s、422位のI l eからT h r、及び、427位のT h rからL e uである。

【0041】

生物学的諸性質の検討

オポッサムとラットのP T H / P T H r Pレセプターの生物学的性質の機能的特性の検討は一過性に移入されたC O S細胞において、放射性リガンドとして ^{125}I -P T H r Pと ^{125}I -N l e P T Hの両方を用いるラヂオレセプターアッセイ法により、また、リガンドによるc A M Pの蓄積、細胞内遊離カルシウムの増加、及びイノシトールりん酸代謝の促進を測定するバイオアッセイにより、上記の方法によって行われた。

10

【0042】

図9はO K - Hを発現しているC O S細胞が、 ^{125}I -P T H r Pを結合することを示している。これらのデータは、また、無傷のP T H (1-34)、またはアミノ末端で短縮されている(即ち、3-34及び7-34類似体、これらは8位と18位にメチオニンの代わりにN l e置換を、そして34位のフェニルアラニンの代わりにチロシン置換を持っている) P T H類似体が結合の競合阻害剤として用いられた場合、P T H r Pの結合が阻害されることを示している。同様に、O K - Hを発現しているC O S細胞への ^{125}I -N l e P T Hの結合は、P T H r PあるいはP T H r P断片が競合阻害剤として用いられた時、阻害された。これらのデータは、P T HとP T H r Pは共にO K - Hによってコードされているレセプターに結合することを示唆している。

20

【0043】

図10は、O K - Hを発現しているC O S細胞が、N l e P T Hに暴露されると細胞内の遊離カルシウムの濃度を増大するが、O K - OあるいはR 15 Bレセプターを発現し(図12と図14)、N l e P T Hで刺激されているC O S細胞と比べると、増加は程度が低いか(平均=39nm)、あるいは全く無いことを示している。O K - OあるいはR 15 Bを発現しているC O S細胞とは異なり、O K - Hを発現しているC O S細胞はN l e P T Hで刺激された時、イノシトールりん酸の代謝の増加は検出されない(図15)。

【0044】

図11はO K - Oを発現しているC O S細胞が、 ^{125}I -P T H r Pを結合することを示している。これらのデータは、また、P T H r Pの結合が、無傷のP T H (1-34)、またはアミノ末端で短縮されている(即ち、3-34及び7-34類似体、これらは8位と18位にメチオニンの代わりにN l e置換を、そして34位にフェニルアラニンの代わりにチロシン置換を持つ) P T H類似体が結合の競合阻害剤として用いられた場合、阻害されることを示している。同様に、O K - Hを発現しているC O S細胞への ^{125}I -N l e P T Hの結合は、P T H r PあるいはP T H r P断片が競合阻害剤として用いられた時、阻害された。これらのデータは、P T HとP T H r Pが共にO K - Oによってコードされているレセプターに結合することを示唆している。

30

【0045】

図12はO K - Oを発現しているC O S細胞が、N l e P T HとP T H r Pによる刺激後、細胞内の遊離カルシウム濃度及びイノシトールりん酸の代謝速度を増大することを示している(図15)。

40

【0046】

図13はR 15 Bを発現しているC O S細胞が、 ^{125}I -P T H r Pを結合することを示している。これらのデータは、また、P T H r Pの結合が、無傷のP T H (1-34)、またはアミノ末端で短縮されている(即ち、3-34及び7-34類似体、これらは8位と18位にメチオニンの代わりにN l e置換を、そして34位にフェニルアラニンの代わりにチロシン置換を持つ) P T H類似体が結合の競合阻害剤として用いられた場合、阻害されることを示している。同様に、O K - Hを発現しているC O S細胞への ^{125}I -N l e P T Hの結合は、P T H r PあるいはP T H r P断片が競合阻害剤として用

50

いられた時、阻害された。これらのデータは、PTHとPTHrPが共にR15Bによってコードされているレセプターに結合することを示唆している。

【0047】

図14は、R15Bを発現しているCOS細胞が、OK-Oを発現しているCOS細胞が刺激された場合と同程度に細胞内カルシウム濃度を増大することを示している。

【0048】

図15は、R15BあるいはOK-Oを発現しているCOS細胞が、NlePTHあるいはPTHrPによる細胞の刺激後、イノシトール三リン酸(IP_3)とイノシトール二リン酸(IP_2)蓄積の急速な増加によって証明されるように、フォスファチジルイノシトールの加水分解速度を増大することを示している。逆に、OK-Hを発現しているCOS細胞は、NlePTH、あるいはPTHrPによる刺激後も、イノシトール三リン酸とイノシトール二リン酸の蓄積にいかなる増加も検出出来なかった。これらのデータは、R15BとOK-OによってコードされているPTHレセプターはホスホリパーゼCに、恐らく G_p を介して共役していることを示唆する。OK-OとOK-Hの間の唯一の違いはC末端尾部にあるので、これらのデータはOK-OとR15BによってコードされているPTHレセプターのC末端はホスホリパーゼCの活性化に参与していることを強く示唆する。

【0049】

図16は、R15BとOK-Hを発現しているCOS細胞が、NlePTHによる刺激後、cAMP蓄積を増大することを示している。同様の結果は、OK-Oを発現しているCOS細胞においても得られた。cDM18ベクターのみを移入されたCOS細胞ではcAMP刺激は認められなかった。これらのデータは、アデニル酸シクラーゼに共役しているPTHレセプターは、レセプターのC末端の細胞質側の完全長の尾部を必要としないことを示唆している。これらのデータは、OK及びROS細胞のcDNAライブラリーの双方からクローン化された3つのPTH/PTHrPレセプターのすべてが、両ペプチドのアミノ末端リガンドを同等に結合することを示唆している。リガンドによるこれらすべてのレセプターの活性化は、アデニル酸シクラーゼを、恐らくはグアニンヌクレオチド結合蛋白質(G-蛋白質)の1つの活性化を通じて、刺激する(細胞内cAMPの増加によって測定されるように)。G-蛋白質は、三量体ペプチド構造を持ち、そのうち、サブユニットの1つ、アルファは、夫々、別個であるが、他の2つ、ベータとガンマは同一か、または相同性が高い。これらG-蛋白質の1つ、(G_s)はG-アルファ“刺激性”(G-アルファ-s)を含み、これはアデニル酸シクラーゼの活性化に参与する。

【0050】

リガンドのOK-Hへではなく、OK-OとR15Bへの結合もまた、細胞内の遊離カルシウムを増加してイノシトールリン酸の代謝を刺激する。これらの性質は、OK-OとR15Bレセプターのリガンドによる活性化は、共に第二の細胞内エフェクター、ホスホリパーゼCの刺激をもたらすことを強く示唆している。これら活性化されたレセプターとホスホリパーゼCとの共役機構は、 G_s とは全く異なるG-蛋白質であるらしい。対照的に、カルボキシ末端で切り詰められている活性化されたOK-Hレセプターは、活性化された時のその性質が、ホスホリパーゼCを活性化しないか、あるいはホスホリパーゼCを効果のない活性化をすることを示唆する。

【0051】

PTH/PTHrPレセプターのカルボキシ末端尾部の生化学的役割は、鋳型としてR15Bを、そして481位に終止コドン挿入された上流プライマーとを用いる標準PCR技法により、カルボキシ末端短縮ラットレセプターR480を構成することによって、さらに検討された。簡略に述べると、上流プライマーはラットcDNA配列(図3; 配列番号: 3を見よ)の1494-1513番のヌクレオチドに基づく合成オリゴヌクレオチドで、これに終止コドンとXbaIクロニング部位が加えられたものであった。30回のPCRサイクルが行われ、各サイクルは変性92℃、1分; アニール60℃、1分; 延長72℃1分からなっていた。生成物はNsiIとXbaIによって切断され、

ゲル電気泳動によって精製された。R 1 5 Bは、X b a IとN s i Iによって順次消化され、精製されたP C R生成物は、次いで、X b a I-N s i Iで切断されたR 1 5 Bベクターに連結された。その結果出来たプラスミド、R 4 8 0は細菌中で増幅され、配列が決定された。

【0052】

R 4 8 0は、591アミノ酸残基を持つレセプター中のものと同一な480のアミノ酸をコードしている。この短縮cDNAはC O S-7（一過性発現）とC H O細胞（安定発現）に発現された。短縮レセプター、R 4 8 0と自然型レセプター、R Bを発現しているC O S-7とC H O細胞は共にP T H（1-34）を同等の親和性を持って結合する。活性化されると、R 4 8 0は、正常型レセプターと同様にC O S-7とC H O細胞におけるc A M P蓄積を刺激した。正常型レセプターとは対照的に、R 4 8 0はP T Hで刺激された時、C O S-7細胞、あるいはC H O細胞にも[Ca²⁺]イオンの増加を仲介しなかった。これらのデータは、P T H/P T H r PレセプターによるホスホリパーゼCとアデニル酸シクラーゼの活性化に対する分子的要求性はお互いに異なっていることを示唆し、P T H/P T H r Pレセプターのカルボキシ末端尾部のホスホリパーゼCとの、しかしアデニル酸シクラーゼとではない、共役における主要な役割を指摘している。勿論、活性化されたP T H/P T H r Pレセプターが追加のG-蛋白質および/または細胞内のエフェクター分子を活性化する可能性もまたある。

【0053】

クローン化されたヒトのP T H/P T H r Pレセプターを移入されたC O S-7細胞の分析によって、放射標識P T H（1-34）とP T H r P（1-36）（~200,000 c p m）が発現されたレセプターに、R 1 5 B（特異的結合：夫々、8.1+3.5%と7.1+4.1%）を発現しているC O S-7細胞に対して観察されたのと同様の効率（特異的結合：夫々、10.1±3.7%と7.6±6.0%）で結合することが明らかとなった。発現されたヒトP T H/P T H r Pレセプターは、ラット骨のレセプターよりも2倍高い見掛けのK dでP T H（1-34）と結合した：~5 n M対~10 n M（図17）。しかしながら、それらの高度のアミノ酸相同性にも拘らず、2つのレセプターはP T H（3-34）とP T H（7-34）に対する親和性に著しい差異を表した。P T H r P（1-36）はヒトのP T H/P T H r Pレセプターに対し、ラットのレセプターに対するよりも2から4倍低い親和性を示した（H K r Kに対する~35 n M対R 1 5 Bに対する~10 n M）。このことはP T H r P（1-36）がラジオリガンドとして用いられた時の方が、さらに著明であった。P T H（3-34）及びP T H（7-34）に対する親和性は、発現されたH K r Kの方がR 1 5 Bよりも7から35倍も高かった（P T H（3-34）に対して、夫々、~7 n M対~45 n M；P T H（7-34）に対して、夫々、~60 n M対~2000 n M）。いずれかのレセプターを発現しているC O S細胞において、P T H（1-34）とP T H r P（1-36）は共に細胞内の遊離カルシウムとc A M Pの蓄積を同程度に刺激した（図18）。

【0054】

P T H/P T H r Pレセプターの関係

ヒトのP T H/P T H r Pレセプターのアミノ酸配列は、ラット、真獣類動物からの骨P T H/P T H r Pレセプターと比べて、非常に高度の保存を示すが、オポッサム、有袋動物のP T H/P T H r Pレセプターとの配列の相同性はそれほど著明ではない。オポッサムの腎臓及びラットの骨のレセプターのように、ヒトの腎臓のレセプターは、P T HまたはP T H r Pで刺激された時、細胞内のc A M Pと遊離のカルシウムの増加を誘引する。ヒトのP T H/P T H r Pレセプターとオポッサム及びラットの同族体間の高度の相同性にも拘らず、一過性に発現されたヒトのレセプターは、ラットの骨のレセプターとは異なった機能的特徴を持っている。これには、P T H（1-34）に対するやや高い親和性とP T H r P（1-36）に対する著しく低い親和性が含まれる。より高い親和性はP T H（3-34）と特にP T H（7-34）に対して認められ、そのヒトのレセプターに対する親和性はラット骨レセプターと比較して約35倍も高かった。これらの発見は、P T

H／PTHrP類自体の将来の開発に重要な意味を持つかも知れない、それは種得異的な組織は、インビトロでアンタゴニスト（とアゴニスト）の有効性検査に対する適当な組織であることを予言するからである。

【0055】

PTH／PTHrPレセプターの他のレセプターに対する関係

PTHとPTHrPレセプターの生化学的諸性質は、これらがG－蛋白質連携の膜レセプターとして知られている膜レセプター分子群のメンバーであることを示唆している。よく調べられているG－蛋白質レセプターの構造的特徴は、それらがすべて、数個の連続した疎水性アミノ酸からなる少なくとも7つの領域を持ち、これらの領域の各々が原形質膜を貫通するのに十分な長さのものであることである。

【0056】

G－蛋白質連繋の膜レセプターの1つのサブファミリー、糖ペプチドレセプターサブファミリーと呼ばれるものには、糖ペプチドホルモン（甲状腺刺激ホルモン、黄体形成ホルモン、濾胞刺激ホルモン、及び絨毛性性腺刺激ホルモン）によって結合され、活性化されるレセプターが含まれる。これらのレセプターは、すべて以下のような特徴がある：（1）リガンド結合ドメインの一部またはすべてを含むと思われる広範な推定アミノ末端細胞外ドメイン（300アミノ酸残基よりも大）を持ち、（2）著しいアミノ酸相同性を、殊に、7つの推定貫膜ドメインに示すことである。もう1つのサブファミリー、アドレナリン作動性／ムスカリン作動性サブファミリーと呼ばれるものには、カテコールアミン、神経筋伝達物質、及びレチノールのような小分子のリガンドによって活性化されるレセプターが含まれる。これらのレセプターは、すべて、特に7つの推定貫膜ドメインにおける著しいアミノ酸相同性に加えて、比較的短い（25－75アミノ酸）推定アミノ末端細胞外ドメインが特徴である。これらのレセプターのリガンドによる活性化には、多数の貫膜ドメインの内の少なくとも幾つかが関与すると思われる、レセプターのアミノ末端部が関与するとは思われない。

【0057】

ラットのPTH／PTHrPレセプター（図3）の推定アミノ酸配列から推論され得るいくつかの構造的特徴は、PTH／PTHrPが1つのG－蛋白質連繋のレセプターであることを示唆している。アミノ末端は、1つの疎水性ドメイン及び3つの連続したロイシン残基を含むシグナルペプチドの特性を示す。この20－28アミノ酸残基からなるアミノ酸範囲は、他の糖蛋白質レセプターの細胞外ドメインに先行するアミノ末端のように、リーダー配列として役立つのかも知れない。また、推定貫膜ドメインを代表する7つの疎水性部分の集団がある（図19）。

【0058】

オポッサムの腎臓、ラットの骨、及びヒト腎臓のPTH／PTHrPレセプターの予想されるアミノ酸配列は、これらがG－蛋白質連繋のレセプターサブファミリーのいずれにもうまく当て嵌まらないことを示唆している。ラット及びヒトのPTH／PTHrPレセプターの糖ペプチドレセプター及びアドレナリン作動性／ムスカリン作動性サブファミリーとの全般的相同性はおよそ10から20％であるが、貫膜ドメイン内の相同性はこれより幾分高い。後のことは、これらの領域に出て来る疎水性アミノ酸のすべては限られているので、当然のことと予想される。20％相同性は、これらサブファミリーの夫々のメンバーとして一般に受け入れられているレセプター間で見出だされる相同性よりも遥かに低い。加えて、これらの配列には、限られた領域にさえ、強い相同性（即ち、正確に合っているアミノ酸配列）として特徴付けられるようなものを持つ部分は全く存在しない。

【0059】

新たに特性が解明されたセクレチン及びカルシトニンレセプターとの最近の比較（Ishihara et al., EMBO J. 10:1635, 1991; Lin et al., Science 254:1022, 1991）によって、これらのレセプターとPTH／PTHrPレセプターの間には30から40％の同一性のあることが判明している。PTH／PTHrPレセプターはカルシトニンレセプターより10

0 個以上アミノ酸が長いけれども、オポッサム腎臓の PTH/PTHrP レセプター（配列番号：2）とブタ腎臓のカルシトニンレセプター（GenBank 受託番号 M74420）のアミノ酸配列の間には～32%の一致がある。推定貫膜ドメイン V I I の 18 アミノ酸のうち 17 の範囲は同一である。また、4 つの N-連結グルコシル化部位のうち 2 つ、及び 8 つの細胞外システインとして可能性のあるもののうち 7 つの位置が保存されている。2 つのレセプター間の主要な差異は、それらの NH₂-末端と COOH-末端のドメインにあると思われる。ラットのセクレチンレセプター（GenBank 受託番号 X59132）とヒトの PTH/PTHrP レセプターのアミノ酸配列の比較により、推定貫膜ドメイン V I I の 25 のアミノ酸のうち 21 の範囲が一致していて、これら 2 つのレセプター間には 43%の相同性のあることが示唆されている。PTH/PTHrP、カルシトニン、及びセクレチンのレセプター間の類似性は、こいれらが 7 回膜貫通の G 蛋白質に共役してアデニル酸シクラーゼを活性化するレセプターの新しいファミリーを代表することを示唆している。これらレセプターのアミノ酸配列が与えられれば、この道の専門家はこれらの配列を比較し、一致して核酸プローブ設計に役立つ領域を求め、このファミリーに属する他のレセプターの確認と分離に用いることが出来るであろう。

【0060】

クローンの寄託

特許手続きの目的のための微生物寄託についての国際的承認に関するブダペスト条約の約条の下に、cDNA 発現プラスミド R15B、OK-O 及び OK-H；ファージ HPG1；及びヒトのクローンの一部を含むプラスミド（名称 8A6）が、American Type Culture Collection（ATCC）に寄託され、そこでは、夫々の受託番号 ATCC No. 68571, 68572, 68573, 40998, 及び 68570 を付けられている。申請者の指定代理人、The General Hospital Corporation は、ATCC がこの寄託の永続性と、もし、特許が許可された場合には、その容易な分譲を提供する寄託所であることを申し立てる。このように寄託物質の分譲に関するすべての制限は、特許の許可と共に改変されることなく撤去される。物質は特許申請の未決期間中は、37 CFR 1.14 及び 35 U.S.C. 122 の下、コミッショナーによって資格ありと決定された者に分譲される。寄託された物質はあらゆる必要な注意を払って維持され、寄託されたプラスミドの試料提供に対する最も新しい要請後少なくとも 5 年間、そして、いかなる場合でも、寄託の日付後、少なくとも 30 年の期間、あるいは特許の実行期間、いずれか長い方の期間、生存状態で、汚染されないように保存を継続する。申請者の指定代理人は、もし、寄託物の状態のために、要請があっても寄託所が試料を提供出来ないならば、寄託物を取り替える責任のあることを認める。

【0061】

ポリペプチド

本発明によれば、ポリペプチドには、図 1-3 及び 6 に夫々、示されているオポッサム、ラット及びヒトの副甲状腺ホルモンレセプター、及びいかなる他の自然界に存在するレセプターにせよ、これらのレセプターをクローン化して発現するのに用いられたものに類似の方法により、あるいは、ここに記述されている配列の 1 つの全体または 1 部をプローブとして利用する方法によって生成され得るものを含む。さらに、副甲状腺ホルモン、または副甲状腺ホルモン関連蛋白質に対する結合能のある PTH レセプターの類似体あるいは断片も本発明の範囲内にある。

【0062】

興味ある特異なレセプター類似体には、同類アミノ酸置換によってのみ異なる、例えば、同じクラスの他の代わりに 1 アミノ酸の置換（例えば、グリシンの代わりにバリン；リジンの代わりにアルギニン、等）、あるいは、1 つ、またはそれ以上の非同類アミノ酸の置換、欠失、また副甲状腺ホルモン、または副甲状腺ホルモン関連蛋白質に結合するレセプターの能力を破壊しない位置にされた挿入によってのみ異なるアミノ酸配列を持つ完全長、あるいは部分長のレセプター蛋白質が含まれる。

【0063】

特に関心のある特異なレセプター断片には、これらに限られるわけではないが、レセプターの部分で、一次アミノ酸配列からChou-Fasman法（例えば、Chou and Fasman, Ann. Rev. Biochem. 47: 251, 1978参照）のような疎水性／親水性計算法を用いて細胞外であると推定されたものが含まれる。親水性ドメイン、特に少なくとも10個のアミノ酸からなる疎水性区間（参照、貫膜ドメイン）は、細胞外ドメインの有力な候補者として現れて来る。図21は、1つのPTHレセプターの細胞外、細胞内及び貫膜ドメインの予測される配置を図示している。

【0064】

特定のPTHレセプター断片の例には、R15Bクローンの推定アミノ酸配列に由来する以下のアミノ酸配列（標準の一字記号で示されている）が含まれている：

細胞外ドメイン：

RP-1: TNETREREREVFDRLGMIYTVG (配列番号：5)
 RP-2: YLYSGFTLDEAERLTEEEL (配列番号：6)
 RP-3: VTFFLYFLATNYYWILVEG (配列番号：7)
 RP-4: Y-RATLANTGCWDLSSGHKKWI IQVP (配列番号：8)
 RP-5: PYTEYSGTLWQIQMHYEM (配列番号：9)
 RP-6: DDVFTKEEQIFLLHRAQA (配列番号：10)

細胞内ドメイン：

RPi-7: FFRLHCTRNY (配列番号：11)
 RPi-8: EKKYLWGFTL (配列番号：12)
 RPi-9: VLATKLRETNA GRCDTRQQYRKLLK (配列番号：13)

これらの断片はKeutmannらの方法（*Endocrinology* 117: 1230, 1984）によって合成され、HPLCによって精製された。

【0065】

ポリペプチドの発現

本発明によるポリペプチドは、本発明の細胞レセプターの一部または全体をコードしている配列を持つ組換え核酸から、なにか適切な発現系、例えば、適当な宿主細胞（原核あるいは真核）の、適当な発現伝達体（例、pcDNA1）内の組換え核酸による突然変異を用いて、発現することにより生成することが可能である。正確にいかなる細胞を用いるかは、本発明にとって重要ではない。しかしながら、本発明のポリペプチドがPTH／PTHrPレセプターの全体または一部を含む場合には、以下の宿主細胞が好適である：COS細胞、LLC-PK1細胞、OK細胞、AtT20細胞、及びCHO細胞。移入の方法及び発現伝達体の選択は選ばれた宿主系に依存する。哺乳類細胞の移入の方法は、例えば、Ausubel et al. (*Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York, 1989)に記載されており、発現伝達体は、例えば、*Cloning Vectors: A Laboratory Manual* (P. H. Pouwels et al., 1985, 補遺、1987)に論じられているものから選んでもよい。安定に移入された細胞は、レセプターDNAを宿主細胞の染色体に組み込むことによって作ることが出来る。適当なDNAは、pcDNA, pcDNA1-Neo、あるいは他の適切なプラスミドに挿入され、次いで、細胞は、このプラスミドにより、psV-2-Neo、あるいはpsV-2-DHFRとの共同移入をして、あるいはしないで、標準電気が孔、りん酸カルシウム、及び／あるいはDEAE／デキストラン技法によって移入される。移入された細胞の選択は、累進的に上昇するレベルのG418 (*Geneticin*, GIBCO)、そしてもし必要ならば、メトトレキサートを用いて行われる。

【0066】

本発明のポリペプチドをコードしているDNA配列は、また、原核宿主細胞にも発現することが出来る。細胞のレセプター、あるいはレセプター断片をコードしているDNAは、原核細胞宿主における発現をもたらすことの出来る制御シグナルに作動可能に連結されたベクター上を運ばれる。もし希望ならば、コーディング配列は、その5'-末端に、発現された蛋白質の宿主細胞の周辺腔への分泌をもたらし、それによって蛋白質の回収とその後の精製を容易にすることの出来る既知のシグナル配列をなにかコードしている配列を含むものも出来る。最も頻繁に用いられる原核細胞は種々の E. coli の株である。しかし、他の微生物の株もまた使用してよい。プラスミドベクターは、複製起点、選択可能なマーカー、及び宿主微生物に適合する株に由来する制御配列を含むものが用いられる。例えば、E. coli は、pBR322、これはBoliver et al. (Gene 2: 95, 1977) によって、3つの自然界に存在するプラスミド、そのうち2つは Salmonella の株から、1つは E. coli から分離されたものであるが、に由来する断片を用いて構成されたプラスミドであるが、その誘導体を用いて変異させることが出来る。pBR322は、アンピシリン及びテトラサイクリン耐性由来の遺伝子を含み、そのため、希望する発現ベクターの構築において、保持され、あるいは破壊され得る多数の選択可能なマーカーを提供する。一般に用いられる原核細胞の制御配列（また、“調節因子”とも呼ばれる）は、ここでは、随意的にオペレーター、リボソーム結合部位配列と共に、転写開始のためのプロモーターを含むものと定義される。蛋白質の発現を指令するために一般に用いられるプロモーターには、ラムダー由来のPLプロモーター及びN-遺伝子リボソーム結合部位 (Simatake et al., Nature 292: 128, 1981) ばかりでなく、β-ラクタマーゼ（ペニシリナーゼ）、ラクトース (lac) (Chang et al., Nature 198: 1056, 1977) 及びトリプトファン (Trp) プロモーター系 (Goeddel et al., Nucl. Acids Res. 8: 4057, 1980) も含まれる。

【0067】

本発明の細胞レセプター蛋白質は、以下のような性質を持っているので、細胞内に発現すると、それは細胞膜へ、部分的には膜を貫通して移動し、その結果、その一部は膜に埋め込まれて止まり、一部は細胞外に伸展し、一部は細胞内に止まる。このような埋め込まれた細胞レセプターを持つ形質転換された細胞は、それ自身、本発明の方法の中で用いられてもよく、あるいは、レセプター蛋白質は膜から抽出され、精製されることも可能である。

【0068】

無傷の蛋白質を細胞膜に繋ぎ止める責任を負う蛋白質の疎水性部分を欠くペプチド断片は、発現しても、膜に埋め込まれることは期待されない。これらが細胞内に止まるか、あるいは細胞外培地に分泌されるかは、分泌を促進する機構（例えば、シグナルペプチド）が含まれているか、否かによる。もし、分泌されれば、本発明のポリペプチドは培地から収穫することが出来る。もし、そうでなければ、細胞は解体して、所期のポリペプチドは細胞の全内容から分離しなければならない。発現される可能性のあるポリペプチドの特殊例は、限界はないが、以下のものが含まれる：

1) 図3に示されるようなラットの骨のPTH/PTHrPレセプターの、推定リーダー配列を含む、アミノ酸1-192からなるアミノ末端部分。

2) 図3に示されるようなラットの骨のPTH/PTHrPレセプターの、推定リーダー配列を除外した、アミノ酸27-192からなるアミノ酸末端部分。 3) 図3に示されるようなラットの骨の完全長のPTH/PTHrPレセプター。

4) PR-1（上記のような）。

5) PR-2（上記のような）。

【0069】

本発明のポリペプチドは、アフィニティークロマトグラフィーを用いて容易に精製するこ

とが出来る。これらのポリペプチドの抗体、あるいはレセプター特異的リガンド（例、PTH／PTHrPレセプターに対するホルモンPTHとPTHrP）は、セファロース 4 CNBr-活性化セファロース（Pharmacia）のような固相支持体に共有結合し、本発明のポリペプチドをなんらかの混入物質から分離するのに用いてもよい。一般的には、1mgのリガンドあるいは抗体がCNBrで活性化されたセファロースと4℃で17-20時間（振盪下）インキュベートされる。セファロースは、1Mトリス塩酸（pH8）で洗浄して過剰の活性部位をブロックする。セファロース-PTH、セファロース-PTHrP、あるいはセファロース-抗体は、次いで、粗ポリペプチドとりん酸緩衝食塩液（pH7.4）中、4℃で2時間インキュベートされる（振盪下）。セファロースは、次いで、一般的にはカラムに充填され、入念にPBSで洗浄され（一般的にはカラム容の10倍）、水で希釈した塩酸（pH1.85）で溶出される。溶出液は、次いで、凍結乾燥により濃縮され、その純度は、例えば、逆層HPLCで検査される。

10

【0070】

抗細胞レセプター抗体

本発明の細胞レセプターあるいはレセプター断片は、専門家にはよく知られているなにか通常の方法によって、ポリクローナル抗体を産生する方法、及びモノクローナル抗体を産生する方法を含め、抗体を産生するのに用いることが出来る。例えば、PTHレセプターの推定アミノ酸配列は、他のG蛋白質連鎖レセプターに見出される領域に類似した細胞外と細胞内と思われる領域（図21を見よ）を点々配置した数個の貫膜（即ち、疎水性）ドメインを持つと思われる蛋白質構造を示している。この情報は、レセプター蛋白質の、細胞外に露出している見込みがあり、従って*in vivo*で抗体に提示されるであろう領域の選択を手引きするために用いることが出来る。このような領域の1つ、あるいはさらに多くを表現する短いペプチドを合成し（例えば、化学的に、あるいは組換えDNA技法により）、ポリクローナル、あるいはモノクローナル抗体を産生するために動物（例えば、ウサギ、あるいはマウス）を免疫するのに用いることが出来る。例えば、上記のPTH／PTHrPレセプターのペプチドのあるもの（RP-1、RP-5、及びRP-6）は、標準の技法を用いて化学的に合成され、以下の手順によりウサギにポリクローナル抗体を産生するのに用いられた：

20

【0071】

完全フロイントアジュバントで乳化された所定のペプチドの標品をウサギに皮内に注射する。追加免疫は、不完全あるいは完全アジュバントで、1月間隔で注射される。

30

抗体価は2つの方法のいずれかを用いて評価される。第一に、抗体を1%正常ウサギ血清で連続希釈し、¹²⁵I-標識PTH／PTHrPレセプター断片と常法（例えば、Siegret al., 上記）により24時間、4℃でインキュベーションする。結合した¹²⁵I-標識PTH／PTHrPレセプター断片は、非結合のものから、100μlの第二抗体（抗ウサギIgG、Sigma）を20倍に希釈したもの及び1mlの5%ポリエチレングリコールを加え、次いで、2000rpmで30分、4℃で遠心することによって分離される。上清を除去し、ペレットをγカウンターで、放射活性の分析をする。第二の方法では、自然型の（例えば、ROS 17/2.8、OK、SaOS-2細胞）あるいは組換え（R15B、OK-OあるいはOK-Hを移入されたCOS細胞あるいはCHO細胞）PTH／PTYHrPレセプターを発現している細胞系が、連続希釈された抗体と4℃、20℃、あるいは37℃で1-4時間インキュベートされる。細胞をPBSで（3回）洗浄し、¹²⁵I-標識（NEM、Dupont）あるいはFITC-標識（Sigma）の第二抗体と2時間、4℃でインキュベートする。洗浄後（PBSで3回）、細胞は0.1MNaOHで溶解してγカウンターで測定されるか（もし、¹²⁵I-標識の第二抗体が用いられた時）、あるいは1%パラフォルムアルデヒドで固定し、蛍光顕微鏡法で検査された（もし、FITC-標識の第二抗体が用いられた時）。

40

【0072】

抗体を生成するもう1つの方法は、抗原として細胞（例えば、レセプターをコードしているDNAを移入されたCOA細胞のような哺乳類の細胞）の表面に発現されている本発

50

明の無傷の細胞レセプター蛋白質を利用する。このような細胞は、常法、例えば、DEAE-デキストラン移入法により、細胞レセプターの高度の発現をコードし、且つ、指令することの出来るベクターを用いて生成することが出来る。例えば、PTH/PTHrPレセプターに特異的なモノクローナル抗体は以下の手順で生成される。

【0073】

ラットの組換えPTHレセプターを細胞表面に高度に発現している無傷のCOS細胞をBalb-cマウス(Charles River Laboratories, Wilmington, MA)の腹腔内(IP)に注射する。マウスは4週ごとにIP注射により追加免疫を受け、融合の3日前に、静脈内(IV)追加免疫により超免疫される。このマウスから脾臓細胞を分離し、ミエローマ細胞と常法により融合する。ハイブリドーマは、標準のヒポキサンチン/アミノプテリン/チミン(HAT)培地で常法に従って選別される。PTHレセプターを認識する抗体を分泌するハイブリドーマは、最初、細胞あたりPTHレセプターのコピーを元来豊富に発現する細胞系(POS17/2.8あるいはOK細胞)で、標準の免疫的技法を用いてスクリーニングして確認される。PTHレセプターに結合することの出来る抗体を生成するこれらのハイブリドーマは培養して、サブクローニングされる。次いでモノクローナル抗体の性質を新たに検討するために、ラゾオレセプター及びcAMP刺激アッセイを用いる二次スクリーニングを行うことが出来る(以下参照)。

【0074】

PTHレセプターアンタゴニスト及びアゴニストのスクリーニング

本発明のポリペプチド及び抗体ならびに他の化合物は、PTH競合性、及びアンタゴニスト的あるいはアゴニスト的な性質について、ここに記載のアッセイを用いてスクリーニングすることが出来る。

【0075】

一例をあげると、無傷の細胞上のPTHレセプターを認識するこれらの抗体は、PTHあるいはPTHrPとPTH/PTHrPレセプターへの結合に対し競合する能力についてスクリーニングされる。細胞表面にPTHレセプターを発現している細胞は、¹²⁵I-PTH類似体である¹²⁵I-NlePTHあるいは¹²⁵I-PTHrPと、試料のポリクローナルあるいはモノクローナル抗体の存在下、4時間、15℃でインキュベートされる。使用される抗体は、粗抗血清、細胞培地、あるいは腹水由来のものか、あるいは精製された形のものである。インキュベーション後、細胞は結合緩衝液(例えば、生理食塩水)で洗浄、融解され、ガンマカウンターを用いて放射活性を定量分析される。PTHレセプターへのPTH類似体の結合を低減する抗体は、競合的、低減しないものは非競合的と分類される。

【0076】

抗体及びポリペプチドを含め、化合物は、それらのアゴニストあるいはアンタゴニストとしての性質につき、上記のcAMP蓄積、細胞内カルシウム、及び/あるいはイノシトールリン酸のアッセイを用いてスクリーニングすることが出来る。細胞表面上にPTHレセプターを発現している細胞は、PTH、PTHレセプター抗体、あるいは両者を組み合わせたものと、2mM IBMX(3-イソブチル-1-メチルキサンチン、Sigma, St. Louis, MO)の存在下、5-60分間、37℃でインキュベートされる。サイクリックAMPの蓄積は、上述のように、特異的ラジオイムノアッセイによって測定される。PTHレセプターへの結合に対してPTHと競合し、且つ、PTHのcAMP蓄積に対する効果を阻害する化合物は、競合的PTHアンタゴニストと見做される。反対に、PTHレセプターへのPTHの結合と競合しないが、なお、PTHによるcAMP蓄積促進を阻害する(恐らくは、レセプター活性化部位を妨害することにより)化合物は、非競合的アンタゴニストと見做される。PTHレセプターへの結合に対しPTHと競合し、PTHの存在あるいは非存在下にcAMPの蓄積を刺激する化合物は競合的アゴニストである。PTHレセプターへの結合に対してPTHと競合しないが、PTHの存在あるいは非存在下に、なお、cAMP蓄積を刺激する能力があるか、あるいはPTH単独に

よって観察されるよりも高い蓄積を刺激する化合物は、非競合的アゴニストと見做される。

【0077】

使用例

本発明のポリペプチド、抗体、及び他の化合物は、本発明の細胞レセプターとその特異的リガンド間の相互作用に関連すると特徴づけられるような疾病の診断、分類、予後、及び／あるいは処置に有用である。例えば、高カルシウム血症及び低カルシウム血症のいくつかの型は、PTH及びPTHrPとPTH／PTHrプレセプター（複数）間の相互作用に関連している。高カルシウム血症は、血清のカルシウムレベルに異常な上昇のある状態である；それは、しばしば、副甲状腺機能亢進症、骨粗鬆症、乳腺、肺、及び前立腺の癌腫、食道の頭部及び頸部の類表皮癌、多発性骨髄腫、及び副腎腫を含む他の病気に関連している。低カルシウム血症は、血清カルシウムレベルが異常に低い状態であり、例えば、甲状腺手術後に起こる有効PTHの不足から生じることがある。

【0078】

初めの例では、本発明の化合物は、診断薬の製造に用いられ、これらは、高カルシウム血症を診断し、種々の高カルシウム状態を区別する、即ち、PTHあるいはPTHrPによって媒介される高カルシウム血症（例えば、副甲状腺機能亢進症及び悪性の体液性高カルシウム血症）を、これらの因子を含めぬ病気（例えば、骨に直接接触している悪性腫瘍の存在によって媒介される局所的骨軟化症、及び破骨細胞活性化因子（インターロイキン）、リンホトキシン、カルシトリオール、タイプEプロスタグランディン、及びビタミンD様ステロールのような体液性因子の増大によって媒介されるいくつかの希少型悪性腫瘍関連の高カルシウム血症）から区別するために用いられる。

【0079】

診断の1つの方法においては、血清の総カルシウム及び／あるいはイオン化されたカルシウムのレベルは、本発明のPTHあるいはPTHrPアンタゴニストの投与の前後に常法によって測定される。PTHあるいはPTHrP関連の高カルシウム血症は、本発明のアンタゴニストの投与後の血清カルシウムレベルの低下として検出することが出来る。対照的に、PTHあるいはPTHrP以外の因子によって媒介される高カルシウム血症状態に対しては、血清カルシウムレベルはアンタゴニストの投与後でさえ、不変のままの筈である。

【0080】

本発明の他の診断的応用として、PTHあるいはPTHrPに関連する癌、例えば、悪性の体液性高カルシウム血症に関連する癌、を診断するために、及び、癌治療の間、PTHあるいはPTHrPのレベルを監視するために、生物試料中のPTHあるいはPTHrPのレベルの測定が可能となる。この方法には、本発明の組換え副甲状腺ホルモンレセプターの、組織試料に存在するPTHあるいはPTHrPへの結合を、ここに記述されている結合アッセイを用いて、測定することが含まれている。結合のレベルは、直接測定することも出来る（例えば、放射標識をしたPTHレセプターを用い、内在性PTHに結合する放射能をアッセイすることによって）。代わりに、試料（例えば、組織切片）へのPTHレセプターの結合は、組織切片をPTHレセプターに特異的な抗体で、標準の免疫技法（Clin et al., Hybridoma 5: 339, 1986）を用い染色して追跡することが出来る。

【0081】

第三の診断的アプローチでは、細胞系を（Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Publishers, New York, 1987に記載されている方法により）適当なプロモーターに連結されたPTHレセプター遺伝子で安定に移入することが出来る。代わりに、PTH／PTHrプレセプターは、真核のベクター、即ち、pcDNA Iから発現され、そして変異DHFR遺伝子を共移入して、メトトレキサート選択（Simonsen et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 80

：2495-2499、1983）を経てさらに遺伝子の増幅を可能にすることが出来る。遺伝子のこのような高度の発現によって、PTHあるいはPTHrPに超感受性である不滅の細胞系が生成される。このような細胞は、PTHあるいはPTHrPの血液レベルを検出するための特に有用な手段を提供する。このような細胞系は、上昇したPTHあるいはPTHrPレベルを伴う状態（例えば、上記の状態）、あるいは、PTHあるいはPTHrPの異常に低いレベルを伴う状態（例えば、上記の状態）の診断に用いることが出来る。このような細胞系は、また、高カルシウム血症あるいは低カルシウム血症の治療の間に、夫々、PTHあるいはPTHrPレベルの退行あるいは増昇の監視に有用である。

【0082】

高カルシウム血症の疑いのある患者は、本発明の化合物を用いて治療してもよい。症状は突如として現れることがあり、逆転しなければ致命的なこともあり得るので早急な介入が重要である。1つの応用において、血清カルシウムレベルは、PTHあるいはPTHrPのアンタゴニストを含む、即座の治療の1コースで安定化する。このようなアンタゴニストには、PTHレセプター媒介による細胞の活性化に介入することが決定されている（ここに記述のアッセイにより）本発明の化合物が含まれる。アンタゴニストを投与するために、適当な抗体あるいはペプチドは、一般に、生理食塩水のような適当な担体中に調剤することによって薬剤の製造に用いられ、PTHレセプターへのPTHあるいはPTHrPの結合に対し適切な競合を提供する用量で、静脈内注射される（例えば、血清カルシウムレベルを10mg/dl以下に下げるのに十分な用量）。代表的な用量は、一日当たり、体重1kgにつき、抗体あるいはペプチド、1ngから10mgである。治療は、許容カルシウムレベル（即ち、レベルは10.1mg/dl以下）の長期維持のため、必要な時は反復してもよい。これは、高カルシウム血症の切っ掛けとなる、根底にある病状の緊急処置に必要なかも知れない、あるいは、それは、例えば、骨粗鬆症のような病状の長期にわたる処置に用いてもよい。

【0083】

他の応用において、本発明の方法に従ってアゴニストであると特徴付けづけられている本発明の化合物は、治療上、例えば、副甲状腺の部分的あるいは完全な外科的除去からおこる低カルシウム血症の処置に用いられる。アゴニストは、適当な担体（例えば、生理食塩水）中で調剤され、血清のカルシウムを許容レベル（即ち、およそ8mg/dl）までの上昇をもたらす用量で、出来れば静脈内投与されるのが望ましい。有用な用量範囲は、1日、体重1kg当たり、アゴニスト1ngから10mgである。適切な血清カルシウムレベルを維持するために必要な場合、処置を繰り返すことも出来る。長期の処置は、副甲状腺切除を受けた患者に必要なことがある。

【0084】

本発明の核酸もまた治療のために用いることが出来る。PTHレセプターmRNA（あるいはPTHレセプターmRNAにアンチセンスであるRNAを表現する核酸構成）にアンチセンスであるオリゴヌクレオチドは、抗癌治療として用いられることもある。このアプローチは、例えば、PTHレセプター、PTHあるいはPTHrPの量あるいは活性を増大するゲノムの再配列あるいは増幅から生じる高カルシウム血症に対して有用である。この方法には、in vivoで、アンチセンスオリゴヌクレオチドを癌細胞に挿入することが含まれている。アンチセンス鎖は、内在性PTHレセプターmRNAとハイブリッドを形成して、蛋白質の翻訳を妨害し、それによって、このような細胞におけるPTHレセプターの生成を低下させ、PTH/PTHrP関連の腫瘍増殖を抑制する。アンチセンスの設計及び宿主細胞への挿入方法は、例えば、Weinberg et al., U.S. 特許番号4,740,463に記載されており、ここでは引用して組み込まれている。本発明のOK-H, OK-O及びR15BPTH/PTHrPレセプターの生化学的特徴の検討は、PTHのそのレセプターとの相互作用によって引き起こされることが現在知られている2つの伝達経路は別個のものであり、分別されるかも知れないことを示している。これらレセプターの予想アミノ酸配列は、イノシトールリン酸代謝を検出可能な程度に

活性化するには見えないOK-Hは、OK-OあるいはR15Bよりも70アミノ酸分短いことを示唆している。本発明の配列とここに開示されている情報を用いて、いかなる動物種からのPTH/PTHrPレセプター遺伝子にせよ、これをクローン化、次いで改変して（例えば、部位特異的変異誘発により）、ホスホリパーゼCを活性化しないPTH/PTHrPレセプターを生成することが出来る。このことは、骨の再吸収及び骨の造成を含め、PTHによって仲介される種々の作用を分別する可能性を示すものであり、骨粗鬆症のような骨の疾病の治療に対して大きな重要性を持つ。

【0085】

PTHレセプターをコードしている本発明の核酸は、また、選択された組織特異的プロモーター及び／あるいはエンハンサーに連鎖し、その結果生じたハイブリッド遺伝子を、常法により（例えば、Leder et al., U. S. 特許番号4, 736, 866に記述され、ここには参照して組み込まれているような）、初期の分化段階にある動物の胚（例えば、受精した卵母細胞）に導入して形質転換した動物を作り出し、選択した組織（例えば、骨のオステオカルシンプロモーター）にPTHレセプターを高レベルで発現することが出来る。この様なプロモーターは、形質転換動物におけるPTHレセプターの組織特異的発現を指令するために用いられる。利用されるPTHレセプターの型は、用いられる動物種のものに類似のPTHレセプターをコードしている型、あるいは、それは、別種のPTHレセプター類自体をコードすることも出来る。1つの特例において、形質転換されたニワトリが、ニワトリの輸卵管に高レベルの発現を指令するプロモーターからPTHレセプターを発現するように工作された。このような動物は、高いカルシウム含量と、従ってより固い殻を持つ卵を産むことが期待される。

【0086】

他の実施態様

他の実施態様は、以下の特許請求の範囲内にある。例えば、本発明の核酸には、トリ、あるいは有袋類、げっ歯類、またはヒトのような哺乳類を含むいかなる脊椎動物種にせよ、これらから本来分離された遺伝子、あるいはcDNAあるいはRNAを包含する。オポッサム、ラット、及びヒトのような多様な動物種からのPTHレセプターに対して証明された高度の相同性は、ここに開示されたPTHレセプターの分離方法が、多様な動物種からの関連した細胞レセプターの分離に広く応用されることを示唆している。

【図 1 A】

TGGGCACAGC CACCCTGTTG GTAGTCCAGG GGCCAGCCCA CTGAGCTGGC ATATCAGCTG 50
 GTGGCCCCGT TGGACTCGGC CCTAGGGAAC GGCGGCG ATG GGA GCG CCC CGG ATC 115
 Met Gly Ala Pro Arg Ile
 TCG CAC AGC CTT GCC TTG CTC CTC TGC TGC TCC GTG CTC AGC TCC GTC 140
 Ser His Ser Leu Ala Leu Leu Leu Cys Cys Ser Val Leu Ser Ser Val
 TAC GCA CTG GTG GAT GCC GAT GAT CTC ATA AGC AAG GAG CAG CAG ATC 215
 Tyr Ala Leu Val Asp Ala Asp Val Ile Thr Lys Glu Glu Gln Ile
 ATT CTT CTG CGC AAT GCC CAG GCC CAG TGT GAG CAG CGC CTG AAA GAG 235
 Ile Leu Leu Arg Asn Ala Gln Ala Gln Cys Glu Arg Leu Lys Glu
 GTC CTC AGG GTC CCT GAA CTT GCT GAA TCT GCC AAA GAC TGG ATG TCA 307
 Val Leu Arg Val Pro Glu Leu Ala Glu Ser Ala Lys Asp Trp Met Ser
 AGG TCT GCA AAG ACA AAG AAG GAG AAA CCT GCA GAA AAG CTT TAT CCC 335
 Arg Ser Ala Lys Thr Lys Lys Glu Lys Pro Ala Glu Lys Leu Tyr Pro
 CAG GCA GAG GAG TCC AGG GAA GTT TCT GAC AGG AGC CGG CTG CAG GAT 403
 Gln Ala Glu Glu Ser Arg Glu Val Ser Asp Arg Ser Arg Leu Gln Asp
 GGC TTC TGC CTA CTT GAG TGG AAC AAC ATT GTG TGC TGC CCT GCT GGA 431
 Gly Phe Cys Leu Pro Glu Trp Asp Asn Ile Val Cys Trp Pro Ala Gly
 GTG CCC GGC AAG GTG GTG GCC GTG CCC TGC CCC GAC TAC TTC TAC GAC 499
 Val Pro Gly Lys Val Val Val Pro Cys Pro Asp Tyr Phe Trp Asp
 TTC AAC CAC AAA GGC CGA GCC TAT CGG CGC TGT GAC AGC AAT GGC AGC 547
 Phe Asn His Lys Gly Arg Ala Tyr Arg Arg Cys Asp Ser Asn Gly Ser
 TGG GAG CTG GTG CTT GGG AAC AAC CGG ACA TGG GCG AAT TAC AGC GAA 595
 Trp Glu Leu Val Pro Gly Asn Asn Arg Thr Trp Ala Asn Tyr Ser Glu
 TGT GTC AAG TTT CTG ACC AAC GAG ACC CGG GAA CGG GAA GTC TTT GAT 643
 Cys Val Lys Phe Leu Thr Asn Glu Thr Arg Glu Arg Glu Val Phe Asp

【図 1 B】

CGC CTC GGA ATG ATC TAC ACT GTG GGC TAC TCC ATC TCT CTG GGC TCC 691
 Arg Leu Gly Met Ile Tyr Thr Val Val Gly Tyr Ser Ile Ser Leu Gly Ser
 CTC ACT GTG GCT GTG CTG ATT CTG GGT TAC TTT AGG AGG TTA CAT TGC 739
 Leu Thr Val Ala Val Leu Ile Leu Gly Tyr Phe Arg Arg Leu His Cys
 ACC CGA AAC TAC ATT CAC ATG CAT CTC TTC GTG TCC TTT ATG CTC CGG 787
 Thr Arg Asn Tyr Ile His Met His Leu Phe Val Ser Phe Met Leu Arg
 GCT GTA AGC ATC TTC ATC AAG GAT CCT GTG CTC TAC TCG GGG GTT TCC 835
 Ala Val Ser Ile Phe Ile Lys Asp Ala Val Leu Tyr Ser Gly Val Ser
 ACA GAT GAA ATC GAG CGC ATC ACC GAG GAG GAG CTG AGG GCC TTC ACA 883
 Thr Asp Glu Ile Glu Arg Ile Thr Glu Glu Leu Arg Ala Phe Thr
 GAG CCT CCC CCT GCT GAC AAG GCG GGT TTT GTG GGC TGC AGA GTG CGG 931
 Glu Pro Pro Pro Ala Asp Lys Ala Gly Phe Val Gly Cys Arg Val Ala
 GTA ACC GTC TTC CTT TAC TTC CTC ACC ACC AAC TAC TAC TGG ATC CTG 979
 Val Thr Val Phe Leu Tyr Phe Leu Thr Thr Asn Tyr Tyr Trp Ile Leu
 GTG GAA GGC CTC TAC CTT CAC AGC CTC ATC TTC ATG GCT TTT TTC TCT 1027
 Val Glu Gly Leu Tyr Leu His Ser Leu Ile Phe Met Ala Phe Phe Ser
 GAG AAA AAG TAT CTC TGG GGT TCC ACA TTA TTT GGC TGG GGC CTC CCT 1075
 Glu Lys Lys Tyr Leu Trp Gly Phe Thr Leu Phe Gly Thr Leu Ala Pro
 GGC CTC TTT CTC CTT GTG TGC TGC CTC TCC GTG AGG GCT ACA CTG GCC AAC 1123
 Ala Val Phe Val Ala Val Trp Val Thr Val Arg Ala Thr Leu Ala Asn
 ACT GAG TGC TGG GAC CTG AGT TCC GCG AAT AAG AAA TGG ATC ATA CAG 1171
 Thr Glu Cys Trp Asp Leu Ser Ser Gly Asn Lys Lys Trp Ile Ile Gln
 GTG CCC ATC CTG GCA GCT ATT GTG CTC AAC TTT ATT CTT TTT ATC AAT 1219
 Val Pro Ile Leu Ala Ala Ile Val Val Val Asn Phe Ile Leu Phe Ile Asn
 ATA ATC AGA GTC CTG GCT ACT AAA CTC CGG GAG ACC AAT GCA GGG AGA 1267
 Ile Ile Arg Val Leu Ala Thr Lys Leu Arg Glu Thr Asn Ala Gly Arg

【図 1 C】

TGT GAC ACG AGG CAA CAG TAT AGA AAG CTC CTG AAG TCC ACG CTA GTC 1315
 Cys Asp Thr Arg Gln Gln Tyr Arg Lys Leu Leu Lys Ser Thr Leu Val
 CTC ATG CCG CTA TTT GGG GTG CAC TAC ATC GTC TTC ATG GCC ACG CCG 1353
 Leu Met Pro Leu Phe Gly Val His Tyr Ile Val Phe Met Ala Thr Pro
 TAC ACA GAA GTA TCA CCA GGC ATT CTT TGG CAA GTC CAA ATG CAC TAT GAA 1411
 Tyr Thr Glu Val Ser Gly Ile Leu Trp Gln Val Gln Met His Tyr Glu
 ATG CTC TTC AAT TCA TTC CAG GGA TTT TTC GTT GCC ATT ATA TAC TGT 1459
 Met Leu Phe Asn Ser Phe Gln Gly Phe Phe Val Ala Ile Ile Tyr Cys
 TTC TGC AAT GGA GAG GTA CAA GCA GAG ATC AAG AAG TCA TGG AGC CGA 1507
 Phe Cys Asn Gly Glu Val Gln Ala Glu Ile Lys Lys Ser Trp Ser Arg
 TGG ACC CTG GCC TTG GAC TTC AAG CGG AAG GCC AGT GGC AGC AGT 1555
 Trp Thr Leu Ala Leu Asp Phe Lys Arg Lys Ala Arg Ser Gly Ser Ser
 ACC TAC AGC TAT GGC CCC ATG GTG TCA CAT ACA AGT GTC ACC AAT GTG 1603
 Thr Tyr Ser Tyr Gly Pro Met Val Ser His Thr Ser Val Thr Asn Val
 GGA CTT CGA GGG GGC TGG CTT TGT CCC TCA GGC CTC GAC TAGCTCTGG 1652
 Gly Pro Arg Gly Gly Trp Pro Cys Pro Ser Ala Leu Asp
 GGCTGGAGCC AGTSCCAATG GCCATCAGCA GTTGCTTGGC TATGTGAAGC ATGGTTCCAT 1710
 TTCTGAGAAC TCATTGCGCTT CTTCTGGGCG AGAGCTTGGC ACCAAGATG ACGGATATCT 1770
 CAATGGCTCT GGACTTTATG AGCCAATGGT TGGGGAACAG CCCCCTCCAC TCTTGAGGA 1830
 GGAGAGAGAG ACAGTCATGT GACCCATATC 1882

【図 2 A】

TGGGCACAGC CACCCTGTTG GTAGTCCAGG GGCCAGCCCA CTGAGCTGGC ATATCAGCTG 60
 GTGGCCCCGT TGGACTCGGC CCTAGGGAAC GGCGGCG ATG GGA GCG CCC CGG ATC 115
 Met Gly Ala Pro Arg Ile
 TCG CAC AGC CTT GCC TTG CTC CTC TGC TGC TCC GTG CTC AGC TCC GTC 163
 Ser His Ser Leu Ala Leu Leu Leu Cys Cys Ser Val Leu Ser Ser Val
 TAC GCA CTG GTG GAT GCC GAT CAT CTC ATA ACG AAG GAG GAG CAG ATC 211
 Tyr Ala Leu Val Asp Ala Asp Val Ile Thr Lys Glu Glu Gln Ile
 ATT CTT CTG CGC AAT GCC CAG GCC CAG TGT GAG CAG CGC CTG AAA GAG 259
 Ile Leu Leu Arg Asn Ala Gln Ala Gln Cys Glu Gln Arg Leu Lys Glu
 GTC CTC AGG GTC CCT GAA CTT GCT GAA TCT GCC AAA GAC TGG ATG TCA 307
 Val Leu Arg Val Pro Glu Leu Ala Glu Ser Ala Lys Asp Trp Met Ser
 AGG TCT GCA AAG ACA AAG AAG GAG AAA CCT GCA GAA AAG CTT TAT CCC 355
 Arg Ser Ala Lys Thr Lys Lys Glu Lys Pro Ala Glu Lys Leu Tyr Pro
 CAG GCA GAG GAG TCC AGG GAA GTT TCT GAC AGG AGC CGG CTG CAG GAT 403
 Gln Ala Glu Glu Ser Arg Glu Val Ser Asp Arg Ser Arg Leu Gln Asp
 GGC TTC TGC CTA CTT GAG TGG GAC AAC ATT GTG TGC TGG CTT GCT GGA 451
 Gly Phe Cys Leu Pro Glu Trp Thr Thr Ile Val Cys Trp Pro Ala Gly
 GTG CCC GGC AAG GTG GTG GCC TTT TCC TGC CCC GAC TAC TTC TAC GAC 499
 Val Pro Gly Lys Val Val Ala Val Cys Pro Asp Tyr Phe Tyr Asp
 TTC AAC CAC AAA GGC CGA GCC TAT TGG CGC TGT GAC AGC AAT GGC AGC 547
 Phe Asn His Lys Gly Arg Ala Tyr Arg Arg Cys Asp Ser Asn Gly Ser
 TGG GAG CTG GTG CTT GGG AAC AAC CGG ACA TGG GCG AAT TAC AGC GAA 595
 Trp Glu Leu Val Pro Gly Asn Asn Arg Thr Trp Ala Asn Tyr Ser Glu
 TGT GTC AAG TTT CTG ACC AAC GAG ACC CGG GAA CGG GAA GTC TTT GAT 643
 Cys Val Lys Phe Leu Thr Asn Glu Thr Arg Glu Arg Glu Val Phe Asp

【図 2 B】

CGC CTC GGA ATG ATC TAC ACT GTG GGC TAC TCC ATC TCT CTG GGC TCC 591
Arg Leu Gly Met Ile Tyr Thr Val Gly Tyr Ser Ile Ser Leu Gly Ser
185 190 195

CTC ACT GTC GCT GTG CTG ATT CTG GGT TAC TTT AGG AGG TTA CAT TGC 111
Leu Thr Val Ala Val Leu Ile Leu Gly Tyr Phe Arg Arg Leu His Cys
200 205 210

ACC CGA AAC TAC ATT CAC ATG CAT CTC TTC GTG TCC TTT ATG CTC CGG 787
Thr Arg Asn Tyr Ile His Met His Leu Phe Val Ser Phe Met Leu Arg
215 220 225 230

GCT GTA AGC ATC TTC ATC AAG GAT GCT GTG CTC TAC TCG GGG GTT TCC 111
Ala Val Ser Ile Phe Ile Lys Asp Ala Val Leu Tyr Ser Gly Val Ser
235 240 245

ACA GAT GAA ATC GAG CGC ATC ACC GAG GAG GAG CTG AGG GCC TTC ACA 583
Thr Asp Glu Ile Glu Arg Ile Thr Glu Glu Glu Leu Arg Ala Phe Thr
250 255 260

GAG CCT CCC CCT GCT GAC AAG GCG GGT TTT GTG GGC TGC AGA GTG GCG 931
Glu Pro Pro Pro Ala Asp Lys Ala Gly Phe Val Gly Cys Arg Val Ala
265 270 275

GTA ACC GTC TTC CTT TAC TTC CTG ACC ACC AAC TAC TAC TGG ATC CTG 979
Val Thr Val Phe Leu Tyr Phe Leu Thr Thr Asn Tyr Tyr Trp Ile Leu
280 285 290

GTG GAA GGC CTC TAC CTT CAC AGC CTC ATC TTC ATG GCT TTT TTC TCT 1027
Val Glu Gly Leu Tyr Leu His Ser Leu Ile Phe Met Ala Phe Phe Ser
295 300 305 310

GAG AAA AAG TAT CTC TGG GGT TTC ACA TTA TTT GGC TGG GGC CTC CCT 1075
Glu Lys Lys Tyr Leu Trp Gly Phe Thr Leu Phe Gly Trp Gly Leu Pro
315 320 325

GCC GTG TTT GTC GCT GTC TGG GTG ACC GTG AGG GCT ACA CTG GCC AAC 1111
Ala Val Phe Val Ala Val Trp Val Thr Val Arg Ala Thr Leu Ala Asn
330 335 340

ACT GAG TGC TGG GAC CTG AGT TCG GGG AAT AAG AAA TGG ATC ATA CAG 1171
Thr Glu Cys Trp Asp Leu Ser Ser Gly Asn Lys Lys Trp Ile Ile Glu
345 350 355

GTG CCC ATC CTG GCA GCT ATT GTG GTG AAC TTT ATT CTT TTT ATC AAT 1219
Val Pro Ile Leu Ala Ala Ile Val Val Asn Phe Ile Leu Phe Ile Asn
360 365 370

ATA ATC AGA GTC CTG GCT ACT AAA CTC CGG GAG ACC AAT GCA GGG AGA 1267
Ile Ile Arg Val Leu Ala Thr Lys Leu Arg Glu Thr Asn Ala Gly Arg
375 380 385 390

【図 2 C】

TGT GAC ACG AGG CAA CAG TAT AGA AAG CTG CTG AAG TCC ACG CTA GTC 1315
Cys Asp Thr Arg Glu Gln Tyr Arg Lys Leu Leu Lys Ser Thr Leu Val
395 400 405

CTC ATG CCG CTA TTT GGG GTG CAC TAC ATC GTC TTC ATG GGC ACG CCG 1363
Leu Met Pro Leu Phe Gly Val His Tyr Ile Val Phe Met Ala Thr Pro
410 415 420

TAC ACA GAA GTA TCA GGG ATT CTT TGG CAA GTC CAA ATG CAC TAT GAA 1411
Tyr Thr Glu Val Ser Gly Ile Leu Trp Gln Val Gln Met His Tyr Glu
425 430 435

ATG CTC TTC AAT TCA TTC CAG GGA TTT TTC GTT GCC ATT ATA TAC TGT 1459
Met Leu Phe Asn Ser Phe Gln Gly Phe Phe Val Ala Ile Ile Tyr Cys
440 445 450

TTC TGC AAT GGA GAG GTA CAA GCA GAG ATC AAG AAG TCA TGG AGC CGA 1507
Phe Cys Asn Gly Glu Val Gln Ala Glu Ile Lys Lys Ser Trp Ser Arg
455 460 465 470

TGG ACC CTG GCC TTG GAC TTC AAG CGG AAG GCC CGG AGT GGC AGC AGT 1555
Trp Thr Leu Ala Leu Asp Phe Lys Arg Lys Ala Arg Ser Gly Ser Ser
475 480 485

ACC TAC AGC TAT GGC CCC ATG GTC TCA CAT ACA AGT GTC ACC AAT GTG 1603
Thr Tyr Ser Tyr Gly Pro Met Val Ser His Thr Ser Val Thr Asn Val
490 495 500

GGA CCT CGA GGG GGG CTG GCC TTT TCC CTC AGC CCT CGA CTA GCT CCT 1651
Gly Pro Arg Gly Gly Leu Ala Leu Ser Leu Ser Pro Arg Leu Ala Pro
505 510 515

GGG GCT GGA GCC AGT GGC AAT GGC CAT GAC CAG TTG CCT GGC TAT GTG 1699
Gly Ala Gly Ala Ser Ala Asn Gly His His Gln Leu Pro Ser Ser Gly Pro Glu
520 525 530

AAG CAT GGT TCC ATT TCT GAG AAC TCA TTT GGT TCA TCT GGC CCA GAG 1747
Lys His Gly Ser Ile Ser Glu Asn Ser Leu Pro Ser Ser Ser Gly Pro Glu
535 540 545 550

CCT GGC ACC AAA GAT GAC GGG TAT CTC AAT GGC TCT GGA CTT TAT GAT 1795
Pro Gly Thr Lys Asp Asp Gly Tyr Leu Asn Gly Ser Gly Leu Tyr Glu
555 560 565

CCA ATG GTT GGG GAA CAG CCC GCT CCA CTC CTG GAG GAG GAG AGA GAG 1843
Pro Met Val Gly Glu Gln Pro Pro Pro Leu Leu Glu Glu Glu Arg Glu
570 575 580

ACA GTC ATG TGACCCATAT C 1863
Thr Val Met
585

【図 3 A】

GGCGGGGGCC GGGGGGGCA GCTGGAGGC CGGGGGGGC TCCCCGAGG GAGCGGGCCC 60
TAGGGCGTGG CG ATG GGG GGC GGC ATC GCA CCC AGC CTG GCG CTC 108
Met Gly Ala Ala Arg Ile Ala Pro Ser Leu Ala Leu
1 5 10

CTA CTC TGC TGC CCA GTG CTC AGC TCC GCA TAT GCG CTG GTG GAT GCG 111
Leu Leu Cys Cys Pro Val Leu Ser Ser Ala Tyr Ala Leu Val Asp Ala
15 20 25

GAC GAT GTC TTT ACC AAA GAG GAA CAG ATT TTC CTG CTG CAC CGT GCC 204
Asp Asp Val Phe Thr Lys Glu Glu Gln Ile Phe Leu Leu His Arg Ala
30 35 40

CAG GCG CAA TGT GAC AAG CTG CTC AAG GAA GTT CTG CAC ACA GCA GCC 211
Gln Ala Gln Cys Asp Lys Leu Leu Lys Glu Val Leu His Thr Ala Ala
45 50 55 60

AAC ATA ATG GAG TCA GAC AAG GGC TGG ACA CCA GCA TCT ACG TCA GGG 200
Asn Ile Met Glu Ser Asp Lys Gly Trp Thr Pro Ala Ser Thr Ser Gly
65 70 75

AAG CCC AGG AAA GAG AAG GCA TCG GGA AAG TTC TAC CCT GAG TCT AAA 248
Lys Pro Arg Lys Glu Lys Ala Ser Gly Lys Phe Tyr Pro Glu Ser Lys
80 85 90

GAG AAC AAG GAC GTG CCC ACC GGC AGC AGG GCG AGA GGG GGT CCC TGT 396
Glu Asn Lys Asp Val Pro Thr Gly Ser Arg Arg Gly Arg Pro Cys
95 100 105

CTG CCC GAG TGG GAC AAC ATC GTT TGC TGG CCA TTA GGG GCA CCA GGT 444
Leu Pro Glu Trp Asp Asn Ile Val Cys Trp Pro Leu Gly Ala Pro Gly
110 115 120

GAA GTG GTG GCA GTA COT TGT CCC CAT TAC ATT TAT GAC TTC AAT CAC 491
Glu Val Val Ala Val Pro Cys Pro Asp Tyr Ile Tyr Asp Phe Asn His
125 130 135 140

AAA GGC CAT GGC TAC AGA CGC TGT SAC CGC AAT GGC AGC TGG GAG GTG 540
Lys Gly His Ala Tyr Arg Arg Cys Asp Arg Asn Gly Ser Trp Glu Val
145 150 155

GTT CCA GGG CAC AAC CGG ACG TGG GCC AAC TAC AGC GAG TGC CTC AAG 588
Val Pro Gly His Asn Arg Thr Trp Thr Ala Asn Tyr Ser Glu Cys Leu Lys
160 165 170

TTC ATG ACC AAT GAG ACG CGG GAA CGG GAG GTA TTT GAC CGC CTA GAC 636
Phe Met Thr Asn Glu Thr Arg Glu Arg Glu Val Phe Asp Arg Leu Gly
175 180 185

ATG ATC TAC ACC GTG GGA TAC TCC ATG TCT CTC GGC TCC CTC ACG GTG 684
Met Ile Tyr Thr Val Gly Tyr Ser Met Ser Leu Ala Ser Leu Thr Val
190 195 200

【図 3 B】

GCT GTG CTC ATC CTG GCC TAT TTT AGG CGG CTG CAC TGC ACG CGC AAC 732
Ala Val Leu Ile Leu Ala Tyr Phe Arg Arg Leu His Cys Thr Arg Asn
205 210 215 220

TAC ATC CAC ATG CAC ATG TTC CTG TCG TTT ATG CTG CGC GCC GCG AGC 780
Tyr Ile His Met His Met Phe Leu Ser Phe Met Leu Arg Ala Ala Ser
225 230 235

ATC TTC GTG AAG GAC GCT GTG CTC TAC TCT GGC TTC ACG CTG GAT GAG 828
Ile Phe Val Lys Asp Ala Val Leu Tyr Ser Gly Phe Thr Leu Asp Glu
240 245 250

GCC GAG CGC CTC ACA GAG GAA GAG TTG CAC ATC ATC GCG CAG GTG CCA 876
Ala Glu Arg Leu Thr Glu Glu Glu Leu His Ile Ile Ala Glu Val Pro
255 260 265

CCT CGC CGC GCC GCT GCC GCC GTA GGC TAC GCT GGC TGC CGC GTG GCG 924
Pro Pro Pro Ala Ala Ala Val Gly Tyr Ala Gly Cys Arg Val Ala
270 275 280

GTG ACC TTC TTC CTC TAC TTC CTG GCT ACC AAC TAC TAC TGG ATT CTG 972
Val Thr Phe Phe Leu Tyr Phe Leu Ala Thr Asn Tyr Tyr Trp Ile Leu
285 290 295 300

GTG GAG GGG CTG TAC TTG CAC AGC CTC ATC TTC ATG GCC TTT TTC TCA 1020
Val Glu Gly Leu Tyr Leu His Ser Leu Ile Phe Met Ala Phe Phe Ser
305 310 315

CTG AAG AAG TAC CTG TGG GGC TTC ACC ATC TTT GGC TGG GGT CTA CCG 1068
Glu Lys Lys Tyr Leu Trp Gly Phe Thr Ile Phe Gly Trp Gly Leu Pro
320 325 330

CTG GTC TCC GTC GCT GTG TGG GTC GGT CTC AGA GCA ACC TTG GCC AAC 1116
Ala Val Phe Val Ala Val Trp Val Glu Val Arg Ala Thr Leu Ala Asn
335 340 345

ACT GGG TGG TGG CAT CTG AGC TCC GGG AAC AAG AAG TGG ATC ATC CAG 1164
Thr Gly Cys Trp Asp Leu Ser Ser Ile His Lys Lys Trp Ile Ile Gln
350 355 360

GTG CCC ATC CTG GCA TCT GTT GTG CTC AAC TTC ATC CTT TTT ATC AAC 1212
Val Pro Ile Leu Ala Ser Val Val Leu Asn Phe Ile Leu Phe Ile Asn
365 370 375 380

ATC ATC CGG GTG CTT GGC ACT AAG CTT GGG GAG ACC AAT GCG GGC CGG 1260
Ile Ile Arg Val Leu Ala Thr Lys Leu Arg Glu Thr Asn Ala Gly Arg
385 390 395

TGT GAC ACC AGG CAG CAG TAC CGG AAG CTS CTC AGG TCC ACG TTG GTG 1308
Cys Asp Thr Arg Gln Gln Tyr Arg Lys Leu Leu Arg Ser Thr Leu Val
400 405 410

【図 3 C】

CTC	GTG	CCG	CTC	Thr	GGT	GTG	CAC	TAC	ACC	GTG	TTC	ATG	GCC	TTG	CCG	1356
Leu	Val	Pro	Leu	Phe	Gly	Ala	His	Tyr	Thr	Ala	Phe	Met	Leu	Cat	Tat	
415					420					425						
TAC	ATC	GAG	CTG	TCA	GGG	Ala	TTG	TGG	CAG	ATC	CAG	ATG	CAT	TAT	GAG	1874
Tyr	Thr	Glu	Val	Ser	Gly	Leu	Tyr	GCG	Gln	Ile	Gln	Met	His	Tyr	Glu	
430				435					440					445		
ATC	CTC	TTC	AAC	TCC	TTC	CAG	GGA	TTT	TTT	GTC	ATC	ATA	TAC	TGT		1452
Met	Leu	Phe	Asn	Ser	Phe	Gln	Gly	Phe	Phe	Val	Ala	Ile	Ile	Tyr	Cys	
				450					455				460			
TTC	TGC	AAT	GGT	GAG	GTG	CAG	GCA	GAG	ATT	AGG	AAG	TCA	TGG	AGC	CGC	1507
Phe	Cys	Asn	Gly	Gly	Val	Gln	Ala	Glu	Ile	Arg	Lys	Ser	Trp	Ser	Arg	
			465					470				475				
TGG	ACA	CTG	GGG	TTG	GAC	TTC	AAG	CGC	AAA	GCA	CGA	AGT	GGG	AGT	AGC	1546
Trp	Leu	Ala	Leu	Ala	Asp	Phe	Lys	Arg	Lys	Ala	Arg	Ser	Gly	Ser	Ser	
480							485					490				
AGC	TAC	AGC	TAT	GGC	CCA	ATG	GTG	TCT	CAC	ACG	AGT	GTG	ACC	AAT	GTG	1596
Ser	Tyr	Ser	Tyr	Gly	Pro	Met	Val	Ser	His	Thr	Ser	Val	Thr	Asn	Val	
495					500						505					
GGC	CCG	CGT	GCA	GGA	CTC	AGC	CTC	CCC	CTC	AGC	CCC	CGC	CTG	CCT	CCT	1644
Gly	Pro	Arg	Ala	Gly	Leu	Ser	Leu	Pro	Leu	Ser	Pro	Arg	Leu	Pro	Pro	
510					515				520					525		
GCC	ACT	ACC	AAT	GGC	CAC	TCC	CAG	CTG	CCT	GGC	CAT	GCC	AAG	CCA	GGG	1692
Ala	Thr	Thr	Asn	Gly	His	Ser	Gln	Leu	Pro	Gly	His	Ala	Lys	Pro	Gly	
				530					535					540		
GCT	CCA	GCC	ACT	GAG	ACT	GAA	ACC	CTA	CCA	CTC	ACT	ATG	GGG	GTT	CCC	1740
Ala	Pro	Ala	Thr	Alu	Thr	Glu	Thr	Glu	Thr	Pro	Val	Thr	Met	Ala	Val	
			545					550					555			
AAG	GAC	GAT	GCA	TTC	TCT	AAC	GGC	TTC	TGC	TCA	GGC	TTG	GAT	GAG	GAG	1782
Lys	Asp	Asp	Gly	Phe	Leu	Asn	Gly	Ser	Cys	Ser	Gly	Leu	Asp	Glu	Glu	
			560				565					570				
GCC	TCC	GGG	TCT	CGC	CGG	CCG	CCG	CCA	TTG	TTG	CAG	GAA	GGA	TGG	GAA	1836
Ala	Ser	Gly	Ser	Ala	Arg	Pro	Pro	Pro	Leu	Leu	Gln	Gly	Gly	Trp	Glu	
			575				580					585				
ACA	GTC	ATG	TGACTGGGCA	CTAGGGGGGT	AGACTGTGTC	CTGGGGCACA	1885									
Thr	Val	Met	590													
TGGACAGATG	GACCAAGAG	CCAAGTGTTC	GGTGGTGTTC	TATTCGGGAT	CTGACACAG	1945										
AAGATAACAA	AAGGAAAATG	CAAGTGGACG	AAGCAGAGAA	GAAGGAAGAT	GTTTTCAGG	2005										
AATTAAATAT	TTTCTCTGAG	TTCGATGATG	AGGCACAAG	GAAGGC												

【図 4】

```

1  NGAARIPASLLALLCCVLSSAVLVADDDVFTKEEIQITLLRHAQAQCDK  50
1  NGAFRISHSLLALLCCSVLSSVTLVADDDVFTKEEIQITLLRHAQAQCEQ  50
51  LLKEVRLHTAANINSDRGVFTASTSGKPRKREKASGKPYFESKENRDPVFT  100
51  RLKVLFLV.VPELASLAA...HRSKARTKEEPAEKLYPQAEESREVR  97
101  SRRRGECFLPFDWNIIVCHPGLGAGTGVAVVCPDDIYDPNNHKGAVRACRD  150
101  SRLQDGFCLPFDWNIIVCHPAGVGTGVAVVCPDDIYDPNNHKGAVRACRDS  147
151  NGSWEVPGGNRTWANYSECLRPHTNTREREVPDRLGIMTYTGVYSHSLSA  200
148  NGSWEVPGGNRTWANYSECVPLNETHREVPDRLGIMTYTGVYSISLG  197
201  SLTAVVLILAYFARLHCTNINYIHNNHLPGLPRAAISIFVKDVLVYSOFTL  250
198  SLTAVVLILAYFARLHCTNINIRHMLFVPLSGKRAVISIFKDAVLVYSOST  247
251  DEAEERLTSEELHIAQVPPPPAAAGVAGYCAVWTFYFLFATHNYTWIL  300
248  DEERITTEELRAFTE...PPPADKAGVGGCAVWTFYFLFATHNYTWIL  294
301  VEGLYLHSLIPFAFFSEKKYLWGFTFLCGGLFVAVFVAVWVVRATLANTG  350
295  VEGLYLHSLIPFAFFSEKKYLWGFTFLCGGLFVAVFVAVWVVRATLANTE  344
351  CWDLSSGGRKRWIIOVPIILASVLVNLPIFINIIRVLTAKLRETNAGRCNTR  400
345  CWDLSCGNKRWIIOVPIILAVNLPILFINIIRVLTAKLRETNAGRCNTR  394
401  QYQRKLLASTLVLPLFGVHYTFHALPTYSVGLTQIQNHNYHNLNIST  450
395  QYQRKLLASTLVLPLFGVHYIVFPAFTYTESGLTQIQNHNYHNLNIST  444
451  CGFVVAIITYCFNGEVOAEIKKSWSRKTALADFKKRAKSGSSSYSGPHV  500
445  CGFVVAIITYCFNGEVOAEIKKSWSRKTALADFKKRAKSGSSSYSGPHV  494
501  SITSYTVNGFAGLSLPLSPRLPFL...ATTGHSOLPGRAKAPGAPATETE  547
495  SITSYTVNGFAGGLASLSPLAPAGAGASNGHOLFPGGQHSIENSL  544
541  TLTPVAVPDKDQDGLNGSCDLEASGASAPPLPDGQHTVM...  591
545  PSSGPEPTQDGDYGLNG...SGLYEPNVG...DTPPLLEERTTTH...  586

```

ギャップウェイト:	3.000	平均適合:	0.540
レンジスウェイト:	0.100	平均不適合:	-0.396
特性:	712.2	長さ:	595
比:	1.215	ギャップ:	6
相同性パーセント:	87.113	固有パーセント:	77.835

【图 5】

R15	NGAAR1APSL	ALLCCCPVLS	SYVALVADDD	VITKEEQIIL	LHRAGAQCXDK	50	
OkO	NGAPRISMSL	ALLCCCPVLS	SYVALVADDD	VITKEEQIIL	LHRAGAQCXDK	50	
OkH	NGAPRISMSL	ALLCCCPVLS	SYVALVADDD	VITKEEQIIL	LHRAGAQCXDK	50	
	----- A -----						
R15	LLKEVLWTPA	WNESDQKWT	PASTSGKPRK	EKASGKFPYE	SKENKDVPTG	100	
OkO	RLKEVL.VP	ELAESARDW.	.NRSRAKTRK	EKPAEKLVPQ	AESRESVSDR	97	
OkH	RLKEVL.VP	ELAESARDW.	.NRSRAKTRK	EKPAEKLVPQ	AESRESVSDR	97	
	----- B -----						
R15	SRRAAGAPCLP	EWONIVCWPL	GAPGEVVAVF	CPDVIYDFNH	KGRAYTRCNR	150	
OkO	SRLODGFCLP	EWONIVCWPL	GAPGEVVAVF	CPDVIYDFNH	KGRAYTRCNS	147	
OkH	SRLODGFCLP	EWONIVCWPL	GAPGEVVAVF	CPDVIYDFNH	KGRAYTRCNS	147	
	----- B -----						
	N	N	N	N	N		
R15	NGSWEVVPGH	NRTWANYSEC	LKFNTNETRE	REVFDRLGNI	YTVGYSHSLA	200	
OkO	NGSWELVPGH	NRTWANYSEC	VKFLNTNETRE	REVFDRLGNI	YTVGYSHSLC	197	
OkH	NGSWELVPGH	NRTWANYSEC	VKFLNTNETRE	REVFDRLGNI	YTVGYSHSLC	197	
	----- C -----						
R15	SLTVAVLILIA	YFRRLHCTNR	YIHHRHFLSF	MLRAASIFVK	DAVLYSGFTL	250	
OkO	SLTVAVLILIA	YFRRLHCTNR	YIHHRHFLSF	MLRAASIFVK	DAVLYSGFTL	247	
OkH	SLTVAVLILIG	YFRRLHCTNR	YIHHRHFLSF	MLRAASIFVK	DAVLYSGVST	247	
	----- D -----						
	----- E -----						
R15	DEAERITEEE	LHIAAGVFPF	FAAAAVGYAG	CRVAUTVFLY	PLATNTHYIL	300	
OkO	DEIERITEEE	LRAFTE..P	FPADKAGPV	CRVAUTVFLY	PLATNTHYIL	294	
OkH	DEIERITEEE	LRAFTE..P	FPADKAGPV	CRVAUTVFLY	PLATNTHYIL	294	
	----- E -----						
R15	VEGLYLHSLI	THAFFSEKRY	LGWFTLFGWG	LPAAVVAWV	GYRATLANTG	350	
OkO	VEGLYLHSLI	THAFFSEKRY	LGWFTLFGWG	LPAAVVAWV	GYRATLANTG	344	
OkH	VEGLYLHSLI	THAFFSEKRY	LGWFTLFGWG	LPAAVVAWV	GYRATLANTG	344	
	----- F -----						
	----- G -----						
R15	CWDLSSGNKK	WIIQVPILAS	VVNMFLPILN	IIEVLATLKL	ETNAGACDTR	400	
OkO	CWDLSSGNKK	WIIQVPILAS	VVNMFLPILN	IIEVLATLKL	ETNAGACDTR	394	
OkH	CWDLSSGNKK	WIIQVPILAS	VVNMFLPILN	IIEVLATLKL	ETNAGACDTR	394	
	----- H -----						
R15	QOYKRLKST	LVLNPLFGVN	YIVFPAFTFT	EVSGILMQVG	MYEHFLFNSF	450	
OkO	QOYKRLKST	LVLNPLFGVN	YIVFPAFTFT	EVSGILMQVG	MYEHFLFNSF	446	
OkH	QOYKRLKST	LVLNPLFGVN	YIVFPAFTFT	EVSGILMQVG	MYEHFLFNSF	446	
	----- I -----						
R15	QGFVVAIIYK	FCNGEVOAEI	KSWSNRWTLA	LDPFRKRAAS	SSSYTGYFNH	500	
OkO	QGFVVAIIYK	FCNGEVOAEI	KSWSNRWTLA	LDPFRKRAAS	SSSYTGYFNH	494	
OkH	QGFVVAIIYK	FCNGEVOAEI	KSWSNRWTLA	LDPFRKRAAS	SSSYTGYFNH	494	
	----- J -----						
R15	SHTSVTNVGP	RAGLSLPLSP	RLPP...ATT	NGSGLPGBA	EPGAFATETE	547	
OkO	SHTSVTNVGP	RAGLSLPLSP	RLAPGAGASA	NGGHOLPGV	KSGSISENLS	544	
OkH	SHTSVTNVGP	RGG.....	NCPASA	LD		515	
	----- K -----						
R15	TLFVTHAVPK	DDGFLNGSSS	GLAEASGSA	RPFPLLOZGN	EYTN	591	
OkO	PSGGEPTGKT	DDGVLNG..S	GLYEPNIA	RPFLLKEZRE	EYTN	588	

【图 6 A】

bits : enzymes: SACs

February 27, 1992 18:30 ..

[illegible]

【图 6 C】

	1232	1141
	1142	1201
	1202	1261
	1262	1321
	1322	1381
	1382	1441
	1442	1501
	1502	1561
	1562	1621
	1622	1681

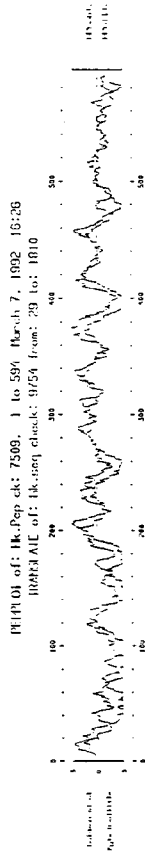
【图 7】

Genetic map of the pTZ19 vector showing various restriction sites and features. The map includes a 2 kb scale bar, a 1 kb scale bar, and a 1 kb scale bar. Key features include the RK-1 (BamHI), RK-2 (SstI), and RK-3 (XhoI) regions. The map also shows the positions of the pTZ19 (BamHI), pTZ19 (SstI), and pTZ19 (XhoI) plasmids. The map is divided into three main sections: the coding region (RK-1), the non-coding region (RK-2), and the promoter region (RK-3). The coding region contains the lacZ gene, which is used for blue-white screening. The non-coding region contains the origin of replication (ori) and the tetracycline resistance gene (tetR). The promoter region contains the pTZ19 promoter, which drives the expression of the lacZ gene. The map also shows the positions of various restriction sites, including BamHI, SstI, XhoI, PstI, and XbaI. The map is labeled with 'PCR産物' (PCR product) and 'PCR生成分' (PCR product).

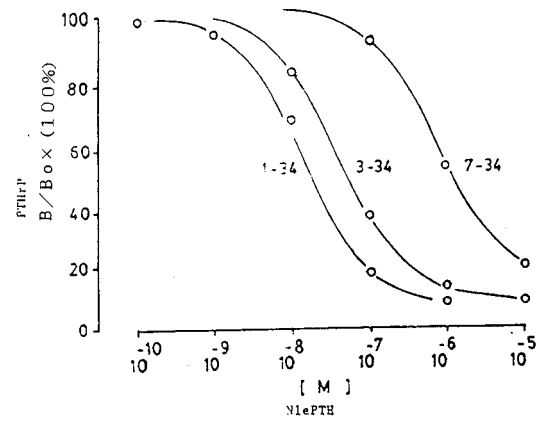
Enzymes that do cut:

SacI

【図 8】

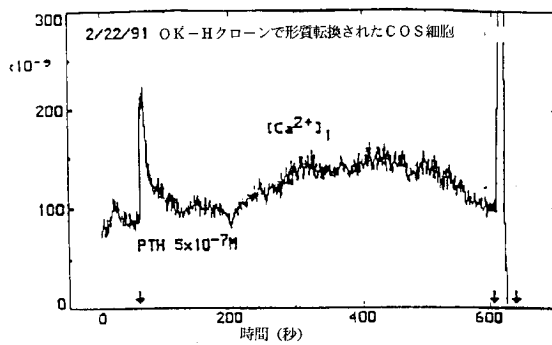


【図 9】

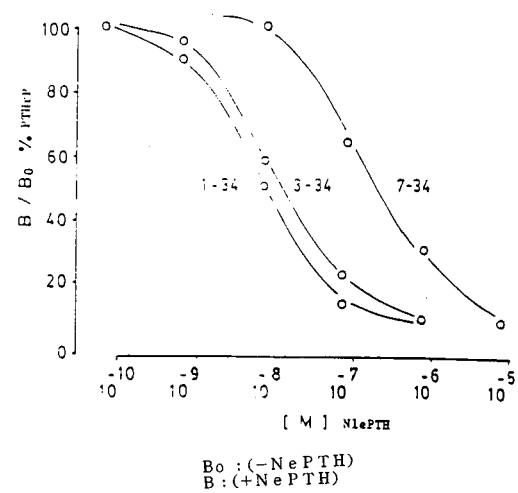


B₀ : 特異的結合 (-NlePTH)
 B : 実測値 (+NlePTH)

【図 10】

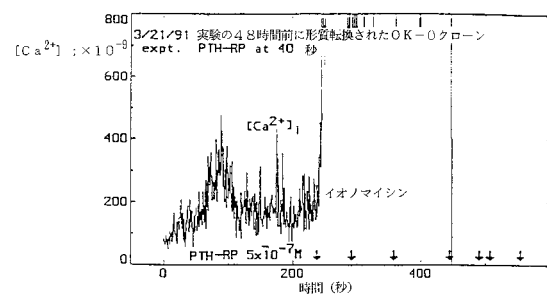


【図 11】



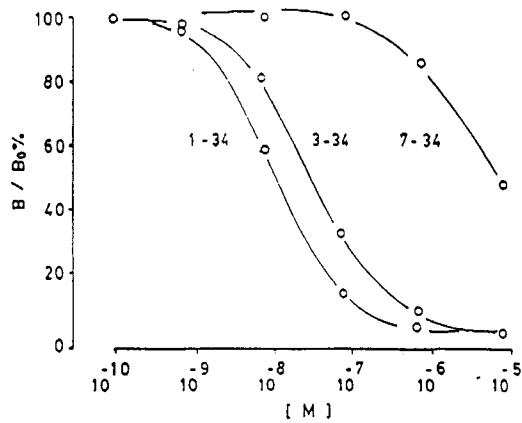
B₀ : (-NlePTH)
 B : (+NlePTH)

【図 12】



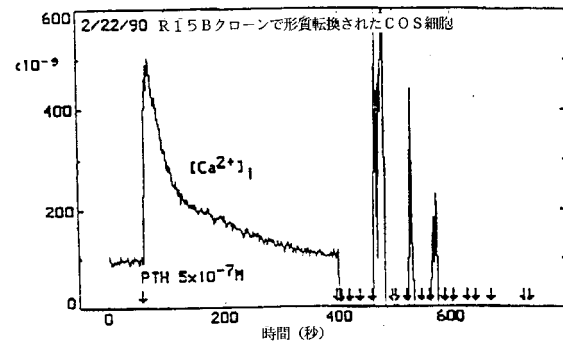
PTH-RP : PTH関連蛋白質

【図 1 3】

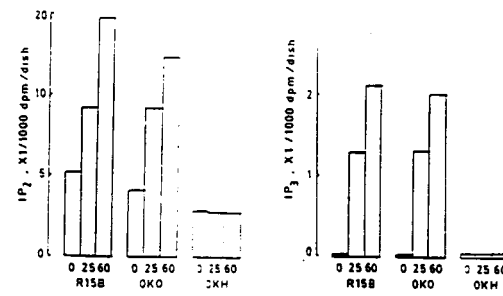


B_0 (-PTH analogu)
 B (+PTH analogu)

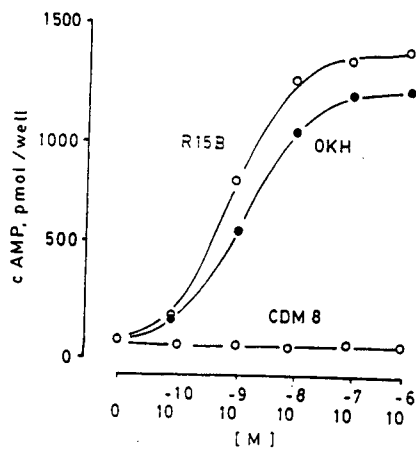
【図 1 4】



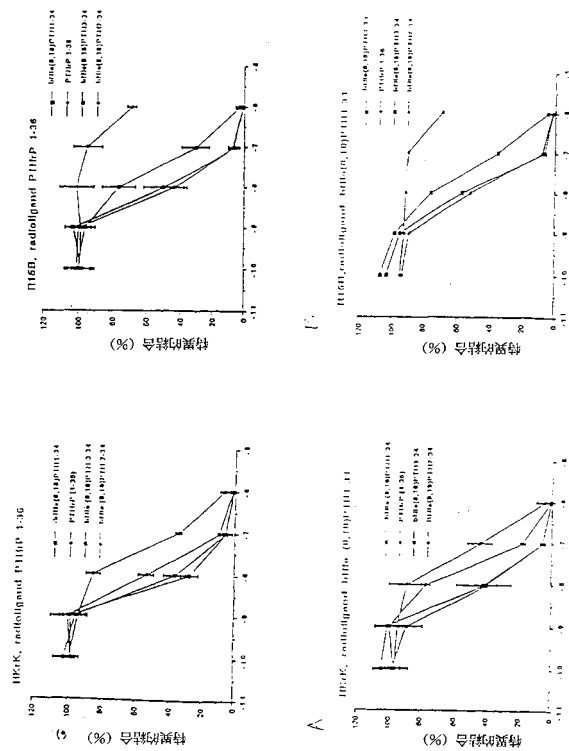
【図 1 5】



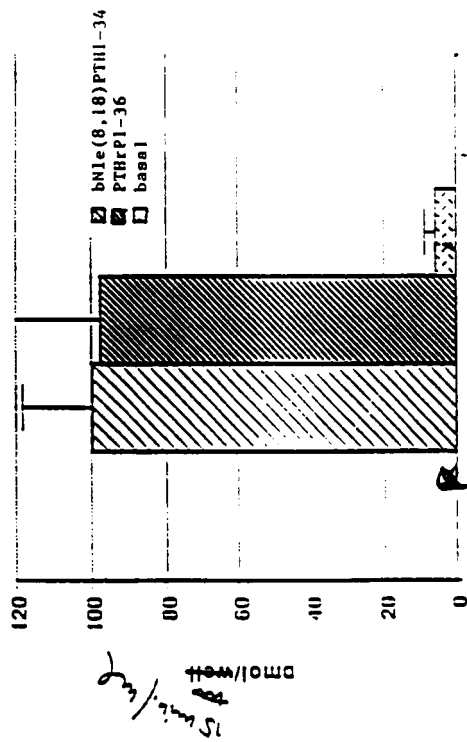
【図 1 6】



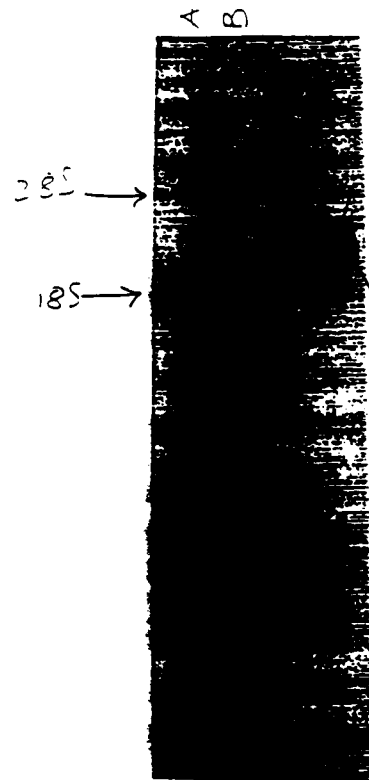
【図 1 7】



【図 18】



【図 19】

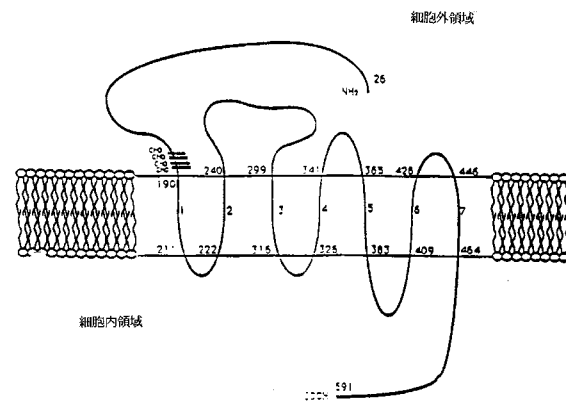


【図 20】



【図 21】

ラットの骨のPTH/PTHrPレセプター



【配列表】

2010004889000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成21年9月15日(2009.9.15)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

配列番号1、3及び4からなる群より選択される全長アミノ酸配列よりは少ないアミノ酸を含むポリペプチドであって、各々、配列番号1、3または4のアミノ酸配列からなるポリペプチドの抗原性を有するポリペプチド。

【請求項2】

請求項1記載のポリペプチドであって、

- (a) TNETREREVFDRLGMIYTVG(配列番号5)、
 - (b) YLYSGFTLDEAERLTEEEEL(配列番号6)、
 - (c) VTFFLYFLATNYWILVEG(配列番号7)、
 - (d) Y-RATLANTGCWDLSSGHKKWIIQVP(配列番号8)、
 - (e) PYTEYSGTLWQIQMHYEM(配列番号9)、
 - (f) DDVFTKEEQIFLLHRAQA(配列番号10)、
 - (g) FFRLHCTRNY(配列番号11)、
 - (h) EKKYLWGFTL(配列番号12)、又は
 - (i) VLATKLRETNAGRCDTQQYRKLLK(配列番号13)、
- を含むポリペプチド。

【請求項3】

副甲状腺ホルモンまたは副甲状腺ホルモン関連蛋白質と結合し得るポリペプチドである、請求項2に記載のポリペプチド。

【請求項4】

副甲状腺ホルモンレセプターへの結合において副甲状腺ホルモンと競合する能力のある化合物を同定する方法であって、

- (a) 候補化合物の存在下及び非存在下のそれぞれにおいて、請求項3記載のポリペプチドを副甲状腺ホルモンと接触させる工程、及び
- (b) 前記候補化合物の存在下における前記ポリペプチドの副甲状腺ホルモンへの結合レベルを、前記候補化合物の非存在下における前記ポリペプチドの副甲状腺ホルモンへの結合レベルと比較する工程を含み、

前記候補化合物の存在下における結合レベルが、候補化合物の非存在下における結合レベルよりも低い場合に、前記候補化合物が前記レセプターへの結合において前記副甲状腺ホルモンと競合する能力のあることが示される方法。

【請求項5】

副甲状腺ホルモンレセプターへの結合において副甲状腺ホルモン関連蛋白質と競合する能力のある化合物を同定する方法であって、

- (a) 候補化合物の存在下又は非存在下で請求項3記載のポリペプチドを副甲状腺ホルモン関連蛋白質と接触させる工程、及び
- (b) 前記候補化合物の存在下における前記ポリペプチドの副甲状腺ホルモン関連蛋白質への結合レベルを前記候補化合物の非存在下における前記ポリペプチドの副甲状腺ホルモン関連蛋白質への結合レベルと比較する工程を含み、

前記候補化合物の存在下における結合レベルが、候補化合物の非存在下の結合レベルよりも低い場合に、前記候補化合物が前記レセプターへの結合において前記副甲状腺ホルモ

ン関連蛋白質と競合する能力のあることが示される方法。

【請求項 6】

薬学的に許容される担体中に請求項3記載のポリペプチドを含む高カルシウム血症治療用組成物。

【請求項 7】

請求項6記載の治療用組成物であって、哺乳動物の血液中のカルシウムレベルを低減させる効果的な投与量又は、副甲状腺ホルモンまたは副甲状腺ホルモン関連蛋白質による副甲状腺ホルモンレセプターの活性化を抑制し得る効果的な投与量に構成されている、高カルシウム血症治療用組成物。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I			テーマコード (参考)	
C 1 2 P	21/02	(2006.01)	C 1 2 P	21/02	C	4 C 0 8 4	
C 0 7 K	14/705	(2006.01)	C 0 7 K	14/705		4 C 0 8 5	
A 0 1 K	67/027	(2006.01)	A 0 1 K	67/027		4 H 0 4 5	
A 6 1 K	38/00	(2006.01)	A 6 1 K	37/02			
A 6 1 K	39/395	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	D		
A 6 1 K	45/00	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	N		
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 K	45/00			
A 6 1 P	19/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 1 1		
A 6 1 P	7/06	(2006.01)	A 6 1 P	19/00			
A 6 1 P	13/12	(2006.01)	A 6 1 P	7/06			
A 6 1 P	1/04	(2006.01)	A 6 1 P	13/12			
A 6 1 P	21/00	(2006.01)	A 6 1 P	1/04			
A 6 1 P	25/00	(2006.01)	A 6 1 P	21/00			
A 6 1 P	5/20	(2006.01)	A 6 1 P	25/00			
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	5/20			
G 0 1 N	33/15	(2006.01)	A 6 1 P	35/00			
G 0 1 N	33/50	(2006.01)	G 0 1 N	33/15	Z		
G 0 1 N	33/84	(2006.01)	G 0 1 N	33/50	Z		
C 1 2 Q	1/68	(2006.01)	G 0 1 N	33/84	Z		
			C 1 2 Q	1/68	A		

- (72)発明者 アボウサムラ アブダルバディ
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 プレインビル フォー コロニアルウエイ
- (72)発明者 ジャプナー ハラルド
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ボルトン エイト ハリスストリート
- (72)発明者 ポッツ ジョーン テー ジュニア
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ウェストニュートン チェスナットストリート 1 2 9
- (72)発明者 シパニ アーネスティーナ
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ボストン フォー ロングフェロープレイス アプト 1
0 0 4

F ターム(参考) 2G045 AA40 CA25 DA36 DB07
4B024 AA01 AA11 BA63 CA04 DA06 EA04 GA11 HA11
4B063 QA01 QQ08 QQ42
4B064 AG20 CA02 CA19 CC24 CE12 DA01 DA13
4B065 AA26X AA93Y AB01 AC14 BA02 CA24 CA44 CA46
4C084 AA01 AA02 AA19 BA01 BA08 BA17 BA18 BA19 CA53 CA59
NA14 ZA03 ZA55 ZA66 ZA81 ZA94 ZA96 ZB26
4C085 AA13 AA14 BB06 EE01 GG01
4H045 AA10 AA20 AA30 CA40 DA50 EA20 EA50 FA74 GA26

专利名称(译)	甲状旁腺激素受体和编码它的DNA		
公开(公告)号	JP2010004889A	公开(公告)日	2010-01-14
申请号	JP2009188644	申请日	2009-08-17
[标]申请(专利权)人(译)	总医院集团		
申请(专利权)人(译)	总医院集团		
[标]发明人	セグレギノブイ クロネンベルグヘンリーエム アボウサムラアブダルバディ ジャプナーハラルド ポッツジョーンテージュニア シパニアースティーナ		
发明人	セグレ ギノ ブイ クロネンベルグ ヘンリー エム アボウサムラ アブダルバディ ジャプナー ハラルド ポッツ ジョーン テー ジュニア シパニ アースティーナ		
IPC分类号	C12N15/09 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12P21/02 C07K14/705 A01K67/027 A61K38/00 A61K39/395 A61K45/00 A61P43/00 A61P19/00 A61P7/06 A61P13/12 A61P1/04 A61P21/00 A61P25/00 A61P5/20 A61P35/00 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/84 C12Q1/68 A61K39/00 A61P3/00 A61P3/02 A61P3/14 A61P5/12 C07K5/00 C07K7/06 C07K7/08 C07K14/435 C07K14/635 C07K14/72 C07K16/00 C07K16/28 C12N1/00 C12N15/113 C12N15/12 C12N15/85 C12P21/08 C12Q1/02 C12R1/91 G01N33/53 G01N33/566 G01N33/68 G01N33/78		
CPC分类号	A01K2217/05 A01K2227/30 A01K2267/02 A61K38/00 A61P1/04 A61P3/00 A61P3/02 A61P3/14 A61P13/12 A61P19/00 A61P21/00 A61P25/00 A61P35/00 C07K14/635 C07K14/705 C07K14/72 C07K14/721 C07K16/2869 C12N15/1138 C12N15/8509 G01N33/78 G01N33/84 G01N2800/04 G01N2800/046		
FI分类号	C12N15/00.A C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.A C12P21/02.C C07K14/705 A01K67/027 A61K37/02 A61K39/395.D A61K39/395.N A61K45/00 A61P43/00.111 A61P19/00 A61P7/06 A61P13/12 A61P1/04 A61P21/00 A61P25/00 A61P5/20 A61P35/00 G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/84.Z C12Q1/68.A A61K38/00 A61K38/08 A61K38/10 A61K38/16 C07K7/04 C12N15/00.AZN.A C12N15/113.140.P C12N15/113.140.Z C12N15/85.P C12N15/85.Z C12N5/00.101 C12N5/10		
F-TERM分类号	2G045/AA40 2G045/CA25 2G045/DA36 2G045/DB07 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA63 4B024/CA04 4B024/DA06 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA11 4B063/QA01 4B063/QQ08 4B063/QQ42 4B064/AG20 4B064/CA02 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/CE12 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA26X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA01 4C084/AA02 4C084/AA19 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA17 4C084/BA18 4C084/BA19 4C084/CA53 4C084/CA59 4C084/NA14 4C084/ZA03 4C084/ZA55 4C084/ZA66 4C084/ZA81 4C084/ZA94 4C084/ZA96 4C084/ZB26 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BB06 4C085/EE01 4C085/GG01 4H045/AA10 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/CA40 4H045/DA50 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74 4H045/GA26		
代理人(译)	清水初衷		
优先权	07/681702 1991-04-05 US		
	JP4790836B2		

摘要(译)

要解决的问题：提供和利用甲状旁腺激素受体。 解决方案：编码甲状旁腺激素受体的DNA，重组和合成甲状旁腺激素受体多肽及其片段，抗甲状旁腺激素受体和受体片段的抗体，甲状旁腺激素受体作用的拮抗剂或者通过利用这些化合物筛选拮抗作用和诊断和治疗。 【选择图】无

