

【特許請求の範囲】

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

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

【請求項3】 SEQ ID NO:3 - 25から選択された請求項1の哺乳動物核酸配列の断片。

【請求項4】 請求項1の核酸配列の相補配列。

【請求項5】 請求項3の断片の相補配列。

【請求項6】 高いストリンジェンシー（厳密性）の条件下で、請求項2の哺乳動物核酸配列に若しくはその断片とハイブリダイズするプローブ。

【請求項7】 少なくとも請求項1の核酸配列の断片を含む発現ベクター。

【請求項8】 請求項7の発現ベクターを含む宿主細胞。

【請求項9】 タンパク質を作製する方法であって、

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

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

【請求項10】 サンプルにおいて哺乳動物核酸配列を検出する方法であって、

(a) 請求項6のプローブを前記サンプル内の少なくとも1つの核酸配列とハイブリダイズすることによって、ハイブリダイゼーション複合体を形成するステップと、

(b) 前記ハイブリダイゼーション複合体を検出するステップとを含み、

前記ハイブリダイゼーション複合体の存在が、前記サンプル内の前記哺乳動物核酸配列の存在と相関性を有することを特徴とする哺乳動物核酸配列の検出方法。

【請求項11】 前記ハイブリダイゼーションの前に、前記核酸配列若し

くはその断片を増幅するステップを更に含むことを特徴とする請求項10に記載の方法。

【請求項12】 哺乳動物核酸配列若しくはその断片を用いて、前記核酸と特異的に結合する少なくとも1つの分子を同定するべく、分子のライブラリをスクリーニングする方法であって、

(a) 分子のライブラリを準備するステップと、

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

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

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

【請求項14】 前記核酸配列の活性を調節する請求項13の分子。

【請求項15】 マイクロアレイ上の請求項2の核酸配列。

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

【請求項17】 請求項16のオリゴペプチド。

【請求項18】 タンパク質若しくはその一部を用いて、前記タンパク質と特異的に結合する少なくとも1つの分子を同定するべく、分子のライブラリをスクリーニングする方法であって、

(a) 分子のライブラリを準備するステップと、

(b) 特異的な結合が可能な条件下で、請求項16のタンパク質若しくはその一部を、前記分子のライブラリと結合させるステップと、

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

【請求項19】 前記ライブラリが、DNA分子及びRNA分子、PNA、ペプチド、タンパク質、アゴニスト、アンタゴニスト、抗体、免疫グロブリン、インヒビター及び薬剤から選択されることを特徴とする請求項18のライブラリ。

【請求項20】 前記タンパク質の活性を調節する請求項18の分子。

【発明の詳細な説明】**【0001】****(発明の技術分野)**

本発明は、新規哺乳動物タンパク質の核酸配列及びアミノ酸配列、並びにこれらの配列を用いた細胞増殖異常及び脂質異常の診断及び治療、予防に関連する。

【0002】**(発明の背景)**

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

【0003】

脂肪酸は、リン脂質、糖脂質、ホルモン、及び細胞内メッセンジャーの生成のため、またタンパク質を膜に固着させるため、更に燃料分子として必要である。大抵の細胞は、アセテート基質から脂肪酸を合成することができるが、多くの哺乳動物細胞は、トリグリセリドの加水分解によって脂肪酸を得ることができる。リン脂質は、主に滑面小胞体の表面で合成される。大抵の細胞は脂肪酸を恒常的に合成するが、細胞がそれを必要性とする程度によって合成量が変動する。高速で細胞が分裂している最中は、膜の形成のために大量のリン脂質の産生を必要とする。絶食させた後に、炭水化物が多く脂肪の少ない飼料を与えた動物は、脂肪酸の合成に必要な酵素の量及び活性が著しく増大する。長鎖脂肪酸の合成の増大も、乳房及び前立腺、卵巣、結腸、子宮内膜に発生する新生物を含む多数の一般的な新生物で起こる。脂肪酸の生合成の主な酵素である脂肪酸合成酵素(FAS)の過剰な発現は、乳ガンの予後が悪いことを表し、腫瘍の成長にとって重要であ

ることが分かった (Moncur他(1997) Proc. Natl. Acad. Sci. 95:6989-6994)。

【0004】

脂肪酸の合成に關与する酵素の転写調節は、Spot 14 (S14)タンパク質に關連する。S14は、ホモダイマーの形成に關与するカルボキシ末端の「ジッパー (zipper)」ドメインを有する小さな酸性核タンパク質である。このS14は、代謝燃料として用いるために脂質を産生する授乳哺乳動物組織、白色及び茶色の脂肪組織、肝臓などの組織において発現される。S14の発現は、インスリン、食物炭水化物、グルコース、及び甲状腺ホルモンに応答して増大し、グルカゴン及び絶食、糖尿病に応答して減少する。アンチセンスオリゴヌクレオチドの発現から、S14がFAS及びATPシトレートリアーゼを含む幾つかの脂質生成酵素の組織特異的発現を誘導することが分かった。S14遺伝子は、乳ガンの約20%において増幅される染色体領域である第11染色体の位置q13.5に位置し、幾つかの乳ガン由来細胞株及び原発乳ガンの大多数において発現する (Cunningham他(1998) Thyroid 8:815-825; Liaw and Towle (1984) J. Biol. Chem. 259:7253-7260; Brown他(1997) J. Biol. Chem. 272:2163-2166; and Moncur, supra)。

【0005】

ゼブラフィッシュ原腸形成タンパク質G12は、酸性pH (~4.9)及びほぼ同じ大きさ (~17キロダルトン) を含む特徴をS14と共有する。この2つのタンパク質間の配列類似性は、ジッパードメインを含むカルボキシ末端において最も高い。哺乳動物栄養外胚葉に類似して、細胞のエンベロープ層 (EVL) が広がって、発生中の胚の深い細胞の層を覆う原腸形成中に、G12がEVLの外側に発現する。この時、EVLの頂端膜の代謝回転が増大し、細胞膜に用いられるリン脂質の要求が高まる (Conway (1995) Mech. Dev. 52:383-391; Fink and Cooper (1996) Dev. Biol. 174:180-189)。

【0006】

新規の哺乳動物タンパク質をコードするポリヌクレオチドの発見により、細胞増殖異常及び脂質異常の診断及び治療、予防に有用な新規の組成物を提供することで当分野のニーズに応えることができる。

【0007】

(発明の要約)

本発明は、脂質代謝転写因子(LMTF)である哺乳動物タンパク質をコードするポリヌクレオチドの発見に基づき、細胞増殖異常症及び脂質異常の特徴付け・診断・予防・治療に有用な新規の組成物を提供することで当分野のニーズを満たす。

【0008】

本発明は、SEQ ID NO:1の核酸配列若しくはその断片を含む単離され精製された哺乳動物ポリヌクレオチドを提供する。本発明はまた、ラット及びマウス、サル由来の哺乳動物ポリヌクレオチドに相同な断片を提供する。

【0009】

本発明は更に、高いストリンジェンシーの条件下で、SEQ ID NO:1のポリヌクレオチドとハイブリダイズする単離され精製されたポリヌクレオチド若しくはその断片を提供する。本発明はまた、SEQ ID NO:1のポリヌクレオチドに相補的な単離され精製されたポリヌクレオチドを提供する。一実施態様では、一本鎖相補RNA若しくはDNA分子をプローブとして用いて、高いストリンジェンシーの条件下で、この哺乳動物ポリヌクレオチド若しくはその断片とハイブリダイズする。

【0010】

本発明は更に、核酸を含むサンプルにおいてポリヌクレオチドを検出する方法であって、(a)プローブをサンプルの核酸の少なくとも1つとハイブリダイズしてハイブリダイゼーション複合体を形成するステップと、(b)そのハイブリダイゼーション複合体を検出するステップとを含み、そのハイブリダイゼーション複合体の存在がサンプルのそのポリヌクレオチドの存在と相関性を有する方法を提供する。一実施態様では、この方法は、ハイブリダイゼーションの前にそのポリヌクレオチドを増幅するステップを更に含む。このポリヌクレオチド若しくはその断片は、マイクロアレイ上のエレメント若しくは標的を構成し得る。本発明はまた、ポリヌクレオチド若しくはその断片と特異的に結合する分子のライブラリをスクリーニングする方法であって、分子のライブラリを準備するステップと、特異的な結合が可能な条件下で、請求項1のポリヌクレオチドを複数の分子と結合させるステップと、複数の分子のそれぞれとそのポリヌクレオチドとの結

合を検出して、そのポリヌクレオチドに特異的に結合する少なくとも1つの分子を同定するステップとを含むスクリーニング方法を提供する。このような分子は、ポリヌクレオチド機能の潜在的な制御因子である。

【0011】

本発明はまた、SEQ ID NO:1のポリヌクレオチドの少なくとも断片を含む発現ベクターを提供する。別の実施態様では、この発現ベクターは宿主細胞内に含まれる。

【0012】

本発明は更に、タンパク質を生産する方法であって、宿主細胞を培養してタンパク質を発現させるステップと、そのタンパク質をその宿主細胞から回収するステップとを含むタンパク質生産方法を提供する。本発明はまた、SEQ ID NO:2のアミノ酸配列若しくはその一部を含む単離され精製されたタンパク質を提供する。更に、本発明は、医薬担体と共にSEQ ID NO:2の配列若しくはその断片を有する実質的に精製されたタンパク質を含む医薬組成物を提供する。

【0013】

本発明は更に、そのタンパク質の一部を用いて抗体を産生する方法を提供する。本発明はまた、タンパク質若しくはその一部を用いて、そのタンパク質に特異的に結合する分子をスクリーニングする方法であって、複合体の形成が可能な条件下で、そのタンパク質またはその断片を分子のライブラリと結合するステップと、その複合体を検出するステップとを含み、その複合体の存在がこのタンパク質に特異的に結合する分子の存在を実証する。一実施態様では、この方法で確認された分子がタンパク質の活性を増大する。別の実施態様では、この方法で確認された分子がタンパク質の活性を減少させる。

【0014】

(本発明の記載について)

本発明は、ここに開示した特定の装置及び材料、方法に限定されず、その実施形態を変更できることを理解されたい。また、ここで用いられる用語は、特定の実施例のみを説明する目的で用いるものであり、後述の請求の範囲によってのみ限定され、本発明の範囲を限定することを意図したものではないということも理

解されたい。本明細書及び請求の範囲において単数形を表す「或る」、「その（この等）」は、文脈で明確に示していない場合は複数形を含むことに注意されたい。従って、例えば「或る宿主細胞」は当業者には周知の複数の宿主細胞を含む。

【0015】

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

【0016】

（定義）

「LMTF」は、天然、合成、半合成或いは組換え体など全ての種（特にウシ、ヒツジ、ブタ、マウス、ウマ及びヒトを含む哺乳動物）から得られる、脂質代謝転写因子である実質的に精製されたタンパク質を指す。

【0017】

「媒介物、分子または化合物」は実質的に同じ意味で用いられ、本発明のポリヌクレオチド及びタンパク質と相互作用する、或いは特異的に結合する、またはその発現を調節する。また、「物質、分子または化合物」は、核酸及びタンパク質、炭水化物、脂肪、脂質、有機物質及び無機物質の少なくとも1つを含み得る。

【0018】

「生物学的に活性」は、自然発生或いは組み換え分子、または合成分子の構造的または免疫学的、調節的、化学的な機能を有するタンパク質を指す。

【0019】

「相補的な」は、プリン塩基とプリミジン塩基の水素結合による自然の塩基対形成を指す。例えば、配列A-C-G-Tは、その相補配列T-G-C-A若しくはU-G-C-Aと水素結合する。2つの一本鎖分子の相補性は、ヌクレオチドの幾つかのみが結合

する部分的に相補性、ヌクレオチドの殆ど全てが結合する相補性とがある。核酸鎖間の相補性の程度は、ハイブリダイゼーション及び増幅反応の効率及び強度に影響する。

【0020】

「誘導体」は、化学修飾されたポリヌクレオチド若しくはタンパク質配列を指す。配列の化学修飾には、生物学的活性若しくは分子の寿命を維持するか増大する、アルキル基またはアシル基、アミノ基による水素の置換や、グリコシル化、ポリエチレングリコール化、または類似の任意のプロセスが含まれる。

【0021】

「断片」は、使用可能な機能的特性を維持するポリヌクレオチドのインサイト社クローン若しくは任意の一部を指す。有用な断片には、ハイブリダイゼーション若しくは増幅技術、複製の調節、転写や翻訳に有用なポリヌクレオチドを含む。

【0022】

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

【0023】

「ポリヌクレオチド」は、核酸または核酸配列、オリゴヌクレオチド、ヌクレオチド、またはそれらの任意の断片を指す。また、「ポリヌクレオチド」は、ゲノム若しくは合成起源のDNA或いはRNAの二本鎖若しくは一本鎖であり、炭水化物または脂質、タンパク質、その他の物質と結合して、ペプチド核酸(PNA)等の有用な組成物の形成やトランスフォーメーションなどの特定の作用を行う。「オリゴヌクレオチド」は、アンプリマー(amplimer)及びプライマー、オリゴマー、エレメント、標的、プローブと実質的に同一であり、好ましくは一本鎖である。

【0024】

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

【0025】

「一部」は、任意の目的、特に抗体の一部と特異的に結合する若しくは抗体の産生のための分子や化合物をスクリーニングするために用いられるタンパク質の任意の一部を指す。

【0026】

「サンプル」は、その最も広い意味で用いられる。核酸を含むサンプルは、体液や、細胞抽出物、細胞から単離された染色体、細胞小器官、膜や、溶液中の或いは基板に結合されたゲノムDNAまたはRNA、cDNAや、組織、細胞、組織プリント等を含み得る。

【0027】

その哺乳動物ポリヌクレオチド若しくはタンパク質に「特異的に結合する」分子若しくは化合物は、この哺乳動物タンパク質の活性を安定させる或いは増減させる核酸または炭水化物、脂質、タンパク質、その他の任意の有機分子若しくは無機分子、或いはそれらの組み合わせを含み得る。

【0028】

「実質的に精製された」は、その自然環境から分離した核酸若しくはアミノ酸配列であって、分離即ち単離し、自然の状態では共に存在するその他の成分から少なくとも約60%、好適には約75%、最も好適には、約90%取り除かれたものを指す。

【0029】

「基板」は、ポリヌクレオチド或いはポリペプチドが結合する任意の好適な固体或いは半固体の支持物を指し、膜またはフィルター、チップ、スライド、ウエハ、ファイバー、磁気または非磁気ビーズ、ゲル、毛細管または他のチューブ、プレート、ポリマー、微小粒子が含まれる。この基板は、孔または溝、ピン、チャンネル、細孔を含む様々な表面形態を有する。

【0030】

(発明)

本発明は、新規の哺乳動物タンパク質LMTFをコードする新規の哺乳動物ポリヌクレオチドの発見に基づいた、細胞増殖異常及び脂質異常症の特徴付け・診断・治療・予防におけるそれらの組成物の使用に関する。

【0031】

本発明の哺乳動物タンパク質をコードする核酸は、ラット（オス）生殖組織で異なって発現したインサイト社クローン700145292H1を用いてBLASTによって同定された。コンセンサス配列SEQ ID NO:1は、インサイト社クローン1479946F6、3241390F6、1432520R1、4534217H1、2191992H1、1320132T1、1516707T1、5595953H1及び1988906R6（SEQ ID NO:3 - 11）を重複及び/または伸長して構築した。図1A - 図1Fは、SEQ ID NO:1のコンセンサス配列及びその翻訳を示す。

【0032】

一実施例では、SEQ ID NO:2のアミノ酸配列LMTFを含むタンパク質は、アミノ酸183個の長さであり、N77残基における1個の潜在的なNグリコシル化部位と、S96及びT162、T169残基における3個の潜在的なプロテインキナーゼCリン酸化部位と、L154及びL168残基における潜在的なロイシンジッパーモチーフとを有する。図2A及び図2Bに示されているように、このタンパク質は、ゼブラフィッシュG12(GI 861207; SEQ ID NO:26)及びマウスS14(GI 1171574; SEQ ID NO:27)と化学的及び構造的類似性を有する。特に、LMTFは、G12タンパク質と48%の同一性、S14と32%の同一性を有する。LMTF及びG12、S14はそれぞれ、LASERGENE software(DNASTAR)を用いて算出した大きさ（それぞれ、20 kDa、7.5 kDa、17 kDa）及び等電点（それぞれ、5.3、5.0、4.8）が類似している。更に、LMTF及びG12、S14は、LMTFのL154及びL161、L168残基におけるジッパーモチーフを含む保存されたロイシン残基を共に有する。

【0033】

表1は、ヒト及びラット、マウス、サル由来の核酸断片、それらの配列範囲、及びSEQ ID NO:1との同一性（%）を示す。列1及び列2は、それぞれの核酸断片に対応するSEQ ID NO及びインサイト社クローン番号を示す。SEQ ID NO:1及びSEQ ID NO:3 - 11の断片は、ここで開示する哺乳動物タンパク質とSEQ ID NO:1225を含む類似配列とを区別したり同定するためのハイブリダイゼーション若しくは増幅技術に有用である。列3は、各断片のヌクレオチドの長さを示す。列4及び5はそれぞれ、断片が由来する生物、及び断片が単離されたインサイト社のcDNAライブラリを示す。列6は、各断片が同一性を示すSEQ ID NO:1のヌクレオ

チド残基の適用範囲を示す。列7は、各断片と列6に示したSEQ ID NO:1のヌクレオチドとの間の配列同一性の程度(%)を示す。

【0034】

ノーザン分析は、様々なライブラリ、特にヒト及びラット、サルの神経組織におけるLMTFの発現を示す。癌や炎症などの細胞増殖に関連した症状においてLMTFが発現することに注目されたい。

【0035】

サル由来SEQ ID NO:12-13及びラット由来SEQ ID NO:14-15、ラット由来SEQ ID NO:16-25を含む哺乳動物断片は、SEQ ID NO:1若しくはSEQ ID NO:3-11の何れかを用いて同定された。これらの断片を用いて、或る種の完全長配列を求めて、これを用いてヒトの疾患を模倣する遺伝子組み換え動物を作り出すことが可能である。これらの断片を用いて、ハイブリダイゼーション及び増幅技術を利用して、動物の毒性検査、臨床検査、及び長期に渡る患者の治療経過をモニタリングすることができる。

【0036】

(本発明の特徴付け及び使用)

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

【0037】

核酸配列をシーケンシングする方法は当分野で周知であり、これを用いて本発明の任意の実施例を行うことができる。この方法は、DNAポリメラーゼIのクレノウフラグメント、T7 SEQUENASE DNAポリメラーゼ、Taq DNAポリメラーゼ、及びTHERMOSEQUENASE DNAポリメラーゼ(Amersham Pharmacia Biotech (APB), Pic

ataway NJ)等の酵素、またはELONGASE増幅システム(Life Technologies, Rockville MD)に見られるような校正エクソヌクレアーゼ及びポリメラーゼの組み合わせを用い得る。配列の準備は、HYDRAマイクロディスペンサー(Robbins Scientific, Sunnyvale CA)、MICROLAB 2200システム(Hamilton, Reno NV)、及びDNA ENGINEサーマルサイクラー(PTC200; MJ Research, Watertown MA)などの装置を用いて自動的に行うのが望ましい。ABI 3700、377若しくは373DNAシーケンシングシステム(PE Biosystems)、及びMEGABACE 1000 DNAシーケンシングシステム(APB)等の装置を用いてシーケンシングを行う。Ausubel(1997; Short Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York NY, unit 7.7) 及びMeyers(1995; Molecular Biology and Biotechnology, Wiley VCH, New York NY, pp. 856-853)に記載されている当分野で周知の様々なアルゴリズムを用いて、シーケンシングした配列を分析することができる。

【0038】

ショットガンシーケンシングを用いて、多数の試料に由来するクローニング挿入断片からより多くの配列を作り出す。ショットガンシーケンシング方法は当分野で周知であり、熱耐性DNAポリメラーゼや非熱耐性DNAポリメラーゼ、目的の核酸配列の隣接領域の一部から選択されたプライマーを用いる。当分野で周知の様々なアルゴリズムやプログラム(Gordon (1998) *Genome Res.* 8:195-202)を用いて、プレフィニッシュ配列(完全には構築されていない配列)を調べる。ベクターやキメラ配列、または欠失配列を含む汚染配列を除去して、プレフィニッシュ配列を完全な配列に構築する。

【0039】

本発明の配列は、当分野で周知の様々なPCR系の方法を用いて伸長することができる。例えば、XL-PCRキット(PE Biosystems)及び入れ子プライマー(nested primer)、市販のcDNA若しくはゲノムDNAライブラリ(Life Technologies; Clontech, Palo Alto CA, respectively)を用いて核酸配列を伸長する。全てのPCR系の方法に用いるプライマーは、OLIGO 4.06ソフトウェア(National Biosciences, Plymouth MN)等の市販のソフトウェアを用いて、ヌクレオチドの長さが約22~30個、G+Cの含有率が約50%以上、約68~72の温度で標的配列とアニールす

るように設計することができる。調節要素を復活させるために配列を伸長する場合、cDNAライブラリよりゲノムライブラリを用いる方が都合が良い。

【0040】

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

【0041】

ハイブリダイゼーションのストリンジェンシー（厳密性）は、プローブのG+Cの含有率、塩濃度、及び温度によって決まる。特に、ストリンジェンシーは、塩の濃度を下げるか或いはハイブリダイゼーションの温度を上げるかして高めることができる。ある膜系のハイブリダイゼーション用の溶液にホルムアミドなどの有機溶媒を加えて、反応が低い温度で起こるようにすることができる。ハイブリダイゼーションは、1%のドデシル硫酸ナトリウム（SDS）を含む5xSSCなどの低いストリンジェンシーの緩衝液で、60 °Cで行うことができるが、核酸配列間に不適正塩基対を含む複合体の形成を許容し得る。続く洗浄は、45 °C（中程度のストリンジェンシー）或いは68 °C（高いストリンジェンシー）の何れかの温度、0.1%

のSDSを含む0.2xSSCなどの高いストリンジェンシーで行う。高いストリンジェンシーでは、ハイブリダイゼーション複合体は、完全に相補的な核酸配列部分のみが持続して保持される。ある膜系のハイブリダイゼーションにおいて、好ましくは35%、最も好ましくは50%のホルムアミドをハイブリダイゼーション溶液に加えてハイブリダイゼーションを行う温度を下げたり、または、SarkosylやTriton X-100などの他の界面活性剤及びサケ精子DNAなどの遮断剤を用いてバックグラウンドシグナルを低減することが可能である。ハイブリダイゼーションの条件や要素については当分野で周知であり、Ausubel (supra) 及びSambrook他(1989) Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Plainview N Y. に記載されている。

【0042】

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

【0043】

ハイブリダイゼーションプローブはまた、自然発生のゲノム配列のマッピングに有用である。配列は特定の染色体や染色体の特定の領域、或いはヒト人工染色体（HAC）、酵母人工染色体（YAC）、細菌人工染色体（BAC）、細菌P1作製物、或いは単一の染色体DNAライブラリなどの人工染色体作製物にマップすることができる。

【0044】

この哺乳動物タンパク質をコード可能な多数のポリヌクレオチド配列をベクターにクローニングして、このタンパク質若しくはその一部を宿主細胞で発現させることができる。このヌクレオチド配列を、DNAシャフリング (Stemmer and Cra meri (1996) USPN5,830,721) や部位特異的変異誘発などの方法によって操作して、新規の制限部位を作り出したり、グリコシル化パターンを変えたり、コドンの読み枠を変えて特定の宿主における発現を増大させたり、スプライスバリエーションを作り出したり、半減期を伸ばすことなどが可能である。この発現ベクターは、転写及び翻訳調節要素 (プロモーター及びエンハンサー、特定の開始シグナル、3'非翻訳領域) を含み得る、特定の宿主における効率から選択された様々な試料である。in vitro組み換えDNA技術及び合成技術及び/または当分野で周知の Sambrook(前出、ch. 4, 8, 16 and 17) に記載された遺伝子組み換え技術を用いて、このベクター及び核酸配列、調節要素を結合することができる。

【0045】

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

【0046】

ポリヌクレオチド配列のルーチンのクローニング及びサブクローニング、増殖は、多機能PBLUESCRIPTベクター (Stratagene, La Jolla CA) 若しくはPSPORT1プラスミド (Life Technologies) を用いて行うことができる。ポリヌクレオチド配列をこれらのベクターの多数のクローニング部位に導入すると、lacZ遺伝子

が破壊され、形質転換された細菌を調べるための比色スクリーニング法が可能となる。更に、これらのベクター用いて、in vitroでの転写、ジデオキシシークエンシング、ヘルパーファージによる一本鎖の調整、クローニングされた配列に入れ子の欠失を作り出すことができる。

【0047】

長期に渡って組み換えタンパク質を産生させるために、同一或いは別のベクター上に選択可能なマーカー遺伝子や可視マーカー遺伝子と共にこのベクターを持続的に細胞株に形質転換することができる。形質転換後、細胞を強化培地で約1～2日の間増殖させてから選択培地に移す。代謝拮抗物質、抗体、除草剤耐性遺伝子を含む選択マーカーは、好適に選択された媒介物に抵抗性を与え、導入配列を確実に発現する細胞の増殖及び回収が可能となる。アントシアニン、緑色蛍光タンパク質(GFP)、グルクロニダーゼ、ルシフェラーゼなどの選択マーカーの発現によって同定された或いは選択培地に生存することによって同定された抵抗性のクローンを、組織培養技術を用いて増殖することができる。可視マーカーはまた、導入された遺伝子によって発現するタンパク質の量を定量するために用いることができる。宿主細胞が目的の哺乳動物ポリヌクレオチドを含むか否かの判定は、DNA-DNA若しくはDNA-RNAハイブリダイゼーション、PCR増幅技術に基づいて行うことができる。

【0048】

宿主細胞は、組み換えタンパク質を目的の形に修飾する能力によって選択することができる。このような修飾には、アセチル化及びカルボキシル化、グリコシル化、リン酸化、脂質化、及びアシル化などが含まれる。「プレプロ」形を切断する翻訳後プロセッシングを用いて、タンパク質のターゲティング、折り畳み及び/または活性を特定することができる。翻訳後の活性のための特定の細胞装置及び特徴のある機構を有する種々の宿主細胞(CHO及びHEK293、W138; American Type Culture Collection (Manassas VA))が、外来タンパク質の正確な修飾及びプロセッシングを確実にするために選択される。

【0049】

精製を容易にするべくベクターに導入する異種部分には、グルタチオンSトラ

ンスフェラーゼ (GST)、カルモジュリン結合ペプチド (CBP)、6-His、FLAG、c-myc等が含まれる。GST及びCBP、6-Hisは、グルタチオン、カルモジュリン、及び金属キレート樹脂などが固定された市販のアフィニティマトリックスを用いて精製される。FLAG及びc-mycは、市販のモノクローナル及びポリクローナル抗体を用いて精製される。目的のタンパク質配列と異種部分との間にタンパク質分解切断部位があると、生成の後の分離が容易になる。組み換えタンパク質の発現及び精製の方法はAusubel (supra, unit 16)に記載され市販されている。

【0050】

タンパク質若しくはその一部は、組み換え方法以外の当分野で周知の化学的方法によっても作製することができる。固相技術を用いるペプチド合成は、バッチ式或いは連続的なフロープロセスによって行うことができる。連続的なフロープロセスは、連続的に アミノ - 及び側鎖保護アミノ酸残基をリンカーを介して不溶性の高分子支持物に追加する。メチルアミン被覆ポリエチレングリコールなどのリンカーを、ポリ (styrene-co-divinylbenzene) に結合させて支持レジンを形成する。このアミノ酸残基は、酸不安定Boc(t-butylloxycarbonyl) 若しくは塩基不安定Fmoc(9-fluorenylmethoxycarbonyl)によって保護されたN- である。保護されたアミノ酸のカルボキシル基をリンカーのアミンに結合して、この残基を固相支持レジんに結合させる。Boc若しくはFmocを用いた場合、トリフルオロ酢酸若しくはピペリジンを用いて保護基を除去する。カップリング試薬若しくは予め活性化されたアミノ酸誘導体を用いて、追加する各アミノ酸を結合された残基に追加してから、レジンを洗浄する。完全長のペプチドは、連続的な保護の停止、誘導体化アミノ酸の結合、dichloromethane及び/またはN-ジメチルホルムアミドでの洗浄によって合成される。ペプチドは、ペプチドカルボキシル末端とリンカーとの間で切断され、ペプチド酸またはペプチドアミドになる (Novabiochem 1997/98 Catalog and Peptide Synthesis Handbook, San Diego CA pp. S1-S20)。ペプチドの自動合成は、ABI 431 A ペプチドシンセサイザー (PE Biosystems) などの装置で行うこともできる。タンパク質またはその一部は調整用の高性能液体クロマトグラフィーによって実質的に精製し、その組成はアミノ酸分析またはシーケンシングによって確認することができる (Creighton (1984) Pro

teins. Structures and Molecular Properties, WH Freeman, New York NY)。

【0051】

ヤギ及びウサギ、ラット、マウス、ヒトなどを含む様々な宿主は、哺乳動物タンパク質若しくはその任意の一部を注入して免疫することができる。フロイントなどのアジュバンド及びミネラルゲル、リゾレシチン、pluronic polyol、ポリアニオン、ペプチド、油乳剤、キーホールリンペットヘモシニアン(KLH)、及びジニトロフェノールなどの表面活性物質を用いて免疫反応を高めることができる。オリゴペプチド、ペプチドまたはタンパク質の一部を用いて、天然のタンパク質の一部と同一である少なくとも約5個のアミノ酸、より好ましくは10個のアミノ酸を含む抗体を誘発させる。オリゴヌクレオチドをKLHなどのタンパク質と融合させて、キメラ分子に対する抗体を産生させる。

【0052】

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

【0053】

別法では、当分野で周知の方法を用いて、上記した一本鎖抗体を産生させる技術で、エピトープ特異的一本鎖抗体を産生させる。哺乳動物タンパク質のエピトープに対して特異的に結合する部位を含む抗体断片を産生させる。限定するものではないが、このような断片には、例えば、抗体分子のペプシン消化によって作製されたF(ab')₂断片及びこのF(ab')₂断片のジスルフィド架橋を減少させて作製したFab断片が含まれる。別法では、Fab発現ライブラリを作製して、目的の特異性を有するモノクローナルFab断片の高速かつ容易な同定ができるようにする(例えば、Huse他(1989) Science 246:1275-1281.を参照)。

【0054】

この哺乳動物タンパク質を用いて、ファージミドまたはBリンパ球免疫グロブ

リン・ライブラリをスクリーニングして、目的の特異性を有する抗体を同定する。確立された特異性を有するモノクローナル抗体或いはポリクローナル抗体のいずれか一方を用いる、競合的結合または免疫アッセイの様々なプロトコルは当分野で周知である。このような免疫アッセイは通常、このタンパク質とその特異的な抗体との複合体を形成させるステップを伴う。2つの非干渉エピトープに反応性のモノクローナル抗体を用いる2部位モノクローナル系免疫アッセイが好ましいが、競合的結合アッセイを用いることもできる (Pound (1998) *Immunochemical Protocols*. Humana Press, Totowa NJ)。

【0055】

多種多様な標識化及び接合技術は当分野で周知であり、様々な核酸及びアミノ酸、抗体のアッセイに用いられ得る。標識した分子の合成は、 ^{32}P -dCTPまたはCy3-dCTP、Cy5-dCTPなどの標識したヌクレオチドまたは ^{35}S メチオニンなどのアミノ酸 (APB) の組み込みのためのAPBキット或いはPromega (Madison WI)を用いて行うことができる。核酸及びアミノ酸は、BIODIPYまたはFITC (Molecular Probes, Eugene OR)などの試薬を使い、様々な物質 (蛍光剤または化学発色剤、色素産生剤など)を用いて、それらの分子中に存在するアミン及びチオールまたは他の基に化学接合させることで直接標識することができる。

【0056】

(診断)

本発明のポリヌクレオチド、その断片やオリゴヌクレオチド、相補的なRNA及びDNA分子、PNAを用いて、遺伝子発現の変化、mRNAの不在/存在、発現の過剰或いは不足を検出して定量したり、治療中のmRNAレベルをモニタリングすることができる。LMTFの発現の変化に関連する症状や疾患、または異常症の中には、細胞増殖異常症が含まれ、限定するものではないが、その中には日光性角化症及びアテローム性動脈硬化、滑液包炎、硬変、肝炎、混合型結合組織病、骨髄線維症、発作性夜間ヘモグロビン尿症、真性多血症、乾癬、原発性血小板血症、並びに腺癌及び白血病、リンパ腫、黒色腫、骨髄腫、肉腫、及び奇形癌、具体的には、副腎、膀胱、骨、骨髄、脳、乳房、頸部、胆嚢、神経節、消化管、心臓、腎臓、肝臓、肺、筋肉、卵巣、膵臓、副甲状腺、陰茎、前立腺、唾液腺、皮膚、脾臓、精

巢、胸腺、子宮の癌などが含まれ、また、脂質代謝異常も含まれ、その中には、脂肪肝、胆汁うっ滞、原発性胆汁性肝硬変、カルニチン欠乏症、カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ欠乏症 (carnitine palmitoyltransferase deficiency)、ミオアデニレートデミナーゼ欠乏症 (myoadenylate deaminase deficiency)、hypertriglyceridemia、ファブリー病などの脂質貯蔵病、ゴーシェ病、ニーマンピック病、変染色性白質ジストロフィー、副腎性白質ジストロフィー、 G_{M2} にガングリオシドーシス、セロイドリポフスチン症、無リポ蛋白血症、タンジアー病、リポ蛋白過剰血症、糖尿病、脂肪異栄養症、脂肪腫症、急性皮下脂肪組織炎、播種性脂肪組織壊死症、有痛脂肪症、リポイド副腎過形成、リポイドネフローゼ、脂肪腫、高コレステロール血症、高トリグリセリド血症を伴った高コレステロール血症、原発性低リポ蛋白血症 (primary hypoalphalipoproteinemia)、低甲状腺症 (hypothyroidism)、腎臓病、肝疾患、レシチン-コレステロールアシルトランスフェラーゼ欠乏症、脳腱黄色腫症、低コレステロール血症、テイサックス病、サンドホフ病、高脂血症、脂肪過剰血症、脂質筋障害、肥満症が含まれる。診断アッセイに、ハイブリダイゼーションまたは増幅技術を用いて、患者からの生物学的サンプルの遺伝子発現レベルを標準的なサンプルの値と比べて遺伝子発現の変化を検出する。質的または量的なこのような比較法は当分野で周知である。

【0057】

例えば、核酸配列を標準的な方法で標識して患者からの生物学的サンプルに加える。ハイブリダイゼーション複合体が形成されるインキュベーションの後、このサンプルを洗浄し、標識或いはそのシグナルの量を定量して標準値と比較する。患者のサンプルにおける標識の量が標準値と比べて異なっている場合は、関連する症状や疾患、または異常症の存在が示唆される。

【0058】

遺伝子発現に関連する症状や疾患、または異常症の診断のための基準を設けるために、正常或いは標準的な発現プロフィールを確立する。この発現プロフィールは、動物やヒトなどの正常な被検体から採取した生物学的サンプルを、ハイブリダイゼーションまたは増幅に好適な条件下で、ある配列またはその断片と結合

させることによって確立することができる。標準的なハイブリダイゼーションは、正常な検体から得た値と、既知の量の実質的に生成されたポリヌクレオチドが用いられる実験値と比較することによって定量することができる。このように求めた標準値を、特定の症状を有する、または疾患や異常症の患者のサンプルから得た値と比較することができる。標準値と特定の症状に関連する値との偏差が症状の診断に用いられる。

【0059】

またこのようなアッセイを用いて、動物実験や臨床検査における特定の治療計画の効果を評価する、または患者個人の治療をモニタリングすることができる。症状が確認されると治療プロトコルを開始し、通常ベースで診断アッセイを繰り返して、被験者における発現のレベルが正常な患者に示される値に近づき始めたか否かを調べることが可能である。連続して行ったアッセイから得た結果を用いて、数日から数ヶ月の範囲の治療の効果を調べることができる。

【0060】

(治療)

哺乳動物LMTFのある領域と、ゼフラフィッシュG12及びマウスSpot14のある領域との間に、例えば配列及びモチーフの文脈に化学的及び構造的類似性が存在する。更に、発現は、神経組織に密接に関連し、細胞増殖及び炎症の疾患においてある役割を果たすと考えられる。発現若しくは活性の増大に関連する症状の治療においては、発現または活性を低下させることが望ましい。また、発現または活性の低下に関連する症状の治療においては、発現または活性を増大させることが望ましい。

【0061】

一実施例において、本発明の哺乳動物タンパク質の発現または活性の変化に関連する症状の治療または予防のために、患者にこの哺乳動物タンパク質またはその断片や誘導体を投与することが可能である。限定するものではないが、このような疾患の中には細胞増殖異常症が含まれ、その中には日光性角化症及びアテローム性動脈硬化、滑液包炎、硬変、肝炎、混合型結合組織病、骨髓線維症、発作性夜間ヘモグロビン尿症、真性多血症、乾癬、原発性血小板血症、並びに腺癌及

び白血病、リンパ腫、黒色腫、骨髄腫、肉腫、及び奇形癌、具体的には、副腎、膀胱、骨、骨髄、脳、乳房、頸部、胆嚢、神経節、消化管、心臓、腎臓、肝臓、肺、筋肉、卵巣、膵臓、副甲状腺、陰茎、前立腺、唾液腺、皮膚、脾臓、精巣、胸腺、子宮の癌などが含まれ、また、脂質代謝異常も含まれ、その中には、脂肪肝、胆汁うっ滞、原発性胆汁性肝硬変、カルニチン欠乏症、カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ欠乏症 (carnitine palmitoyltransferase deficiency)、ミオアデニレートデミナーゼ欠乏症 (myoadenylate deaminase deficiency)、hypertriglyceridemia、ファブリー病などの脂質貯蔵病、ゴーシェ病、ニーマンピック病、変染色性白質ジストロフィー、副腎性白質ジストロフィー、 G_M_2 にガングリオシドーシス、セロイドリポフスチン症、無リポ蛋白血症、タンジアー病、リポ蛋白過剰血症、糖尿病、脂肪異栄養症、脂肪腫症、急性皮下脂肪組織炎、播種性脂肪組織壊死症、有痛脂肪症、リポイド副腎過形成、リポイドネフローゼ、脂肪腫、高コレステロール血症、高トリグリセリド血症を伴った高コレステロール血症、原発性低リポ蛋白血症 (primary hypoalphalipoproteinemia)、低甲状腺症 (hypothyroidism)、腎臓病、肝疾患、レシチン-コレステロールアシルトランスフェラーゼ欠乏症、脳腱黄色腫症、低コレステロール血症、テイサックス病、サンドホフ病、高脂血症、脂肪過剰血症、脂質筋障害、肥満症が含まれる。

【0062】

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

【0063】

更なる実施例では、この哺乳動物タンパク質の活性を調節するアゴニストを患者に投与して、限定するものではないが上記した疾患を含むこのタンパク質の発現または活性の変化に関連する疾患の治療または予防を行うことが可能である。

【0064】

更なる実施例では、この哺乳動物タンパク質またはその一部や誘導体を発現可

能なベクターを患者に投与して、限定するものではないが上記した疾患を含むタンパク質の発現または活性の変化に関連する疾患の治療または予防を行うことが可能である。

【0065】

別の実施例では、この哺乳動物タンパク質のアнтаゴニスト或いはインヒビターを患者に投与して、このタンパク質の発現または活性の変化に関連する疾患の治療または予防を行うことが可能である。一実施態様では、この哺乳動物タンパク質と特異的に結合する抗体をアンタゴニストとして直接用いるか、或いはこの哺乳動物タンパク質を発現する組織や細胞に薬剤を送達するためのターゲティングまたは送達機構として間接的に用いることもできる。

【0066】

更なる実施例では、この哺乳動物タンパク質をコードするポリヌクレオチドの相補配列を発現するベクターを患者に投与して、限定するものではないが上記した疾患を含むこのタンパク質の発現または活性の変化に関連する疾患の治療または予防を行うことが可能である。

【0067】

本発明の任意の核酸またはその相補的な配列、ベクター、タンパク質、アゴニスト、アンタゴニスト、抗体を他の薬剤と共に投与することができる。併用療法に用いる薬剤の選択は、当業者が従来薬学原理に従って行うことができる。薬剤を併用することによって、それぞれの薬剤の用量を少なくても、特定の疾患の予防または治療において相乗的な効果をあげることが可能である。

【0068】

遺伝子の発現は、この哺乳動物タンパク質をコードする遺伝子の調節や5'領域、または調節領域に相補的な配列またはアンチセンス分子(DNAまたはRNA、PNA)を設計し、これを用いて調節することができる。転写開始部位に対して設計されたオリゴヌクレオチドが望ましい。同様に、ポリメラーゼまたは転写因子、調節分子の結合を阻止する三重らせん塩基対合を用いることによって、阻害することができる(Gee他 In: Huber and Carr (1994) *Molecular and Immunologic Approaches*, Futura Publishing, Mt. Kisco NY, pp. 163-177.)。また、相補的

な配列を設計して、リボソームとmRNAとの結合を阻害することによって翻訳を阻害することができる。

【0069】

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

【0070】

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

【0071】

この哺乳動物タンパク質をコードする核酸配列を用いて、分子のライブラリをスクリーニングし、特異的な結合親和性を調べる。このアッセイを用いて、生物学的サンプルにおける核酸配列の活性を調節するDNA分子及びRNA分子、PNA、ペプチド、転写因子を含むタンパク質、エンハンサー、リプレッサーなどのライブラリをスクリーニングすることができる。このアッセイには、分子のライブラリ

を準備するステップと、特異的な結合が可能な条件下で、分子のライブラリとこの哺乳動物核酸配列またはその断片とを結合させるステップと、特異的な結合を検出して、この核酸配列と特異的に結合する少なくとも1つの分子を同定するステップとが含まれる。

【0072】

同様に、様々なスクリーニングアッセイで、この哺乳動物タンパク質またはその一部を用いて分子のライブラリをスクリーニングすることができる。このようなスクリーニングに用いられるこのタンパク質の一部は、溶液中に遊離しているか、或いは生物若しくは非生物の基板（例えば細胞表面上）に固定されているか、または細胞内に存在し得る。このタンパク質と分子との特異的な結合を測定することができる。スクリーニングするライブラリの種類によって、このアッセイを選択して、このタンパク質に特異的に結合するDNAまたはRNA、PNA分子、アゴニスト、アンタゴニスト、抗体、免疫グロブリン、インヒビター、ペプチド、タンパク質、薬剤とを同定することができる。微量の検査化合物を用いる微量アッセイを利用するハイスループット型の方法は、USPN5,876,946に記載され、酵素阻害または受容体結合を調べるために多数の分子をスクリーニングすることができる。

【0073】

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

【0074】

治療効果のある薬用量とは、症状や状態を改善するタンパク質やインヒビターの量である。このような薬剤の治療効果や毒性は、細胞培養または実験動物における標準的な薬学的方法、例えばED50（服用に対して集団の50%に医薬的效果がある）及びLD50（服用に対して集団の50%に致命的である）によって決めるこ

とができる。毒性と治療効果の容量比は、治療指数であり、LD50 / ED50と表すことができる。高い治療指数を示す医薬組成物が好ましい。細胞培養アッセイ及び動物実験から得たデータを用いて、ヒトに対する服用量の範囲を調整する。

【0075】

(モデル系)

ヒトに相当する暴露条件で、動物モデルがヒトに類似の毒物反応を示すバイオアッセイに動物モデルを用いることが可能である。哺乳類が最も一般的なモデルであり、大抵の毒物研究は、低コストで入手が容易であり、基準毒素が豊富であることから、ラット、又はマウスなどの齧歯類で主に行われる。同系齧歯類は、目的の遺伝子の過剰或いは過少な発現の生理学的な原因を調査するのに便利なモデルであり、病気の診断及び治療方法の開発にも有用である。特定の遺伝子発現する同系齧歯類は、その遺伝子によって発現されるタンパク質の便利なタンパク質源となり得る。

【0076】

中毒学とは、生物系における物質の影響を研究する学問である。殆どの毒物研究はラットまたはマウスを用いて行い、物質の有害作用がヒトに起こるかどうかが推定する。生理学上及び行動、恒常性プロセス、致死率における質的及び量的変化を観察して、安全性または有毒反応のプロフィールを作成し、その薬剤に曝露された後のヒトの健康状態を評価する。

【0077】

毒物検査は、1回、複数回、または長期にわたる検体の薬剤曝露の効果を測定する。反応の程度は、曝露の経路（接触、経口摂取、注射、吸入）、検体の年齢、遺伝子構成、性、健康状態によって異なる。毒物運動学の研究（toxicokinetic studies）では、検体組織における物質の吸収及び分配、代謝、貯蔵、排泄の追跡し、毒物動態学の研究（toxicodynamic studies）では、検体組織における物質の存在による生物学的反応をグラフにする。

【0078】

遺伝子毒物学は、物質が遺伝子の突然変異を引き起こす能力を同定し分析する。遺伝毒性物質は通常、核酸との相互作用を促進する一般的な化学的或いは物理

的特性を有し、突然変異した染色体が子孫に受け継がれるのが最大の害である。毒物学の研究は、受胎前の両親のどちらか一方、または妊娠中の母、発生段階の生物に投与された場合の、子孫における構造的或いは機能的な異常の頻度を増加させる薬剤を同定する。これらの試験ではマウス及びラットを用いる場合が最も多いが、これはマウス及びラットは、生殖周期が短く、統計的必要性を満たす多数の生物を出産する能力による。

【0079】

実験動物における全ての毒物学研究には、投与するために物質の形態を調整すること、投与経路を選択すること、薬理学的目的の種に類似の種を選択することが含まれる。投与濃度を変えて、曝露に関連し、検出して測定する投与量に関連する効果範囲を調べる。

【0080】

急性毒物の検査では、物質の検体への一回の投与量に基づいて、その物質による症状または致死率を決定する。1) 開始時の服用範囲を決定する実験と、2) 有効な投与量の範囲を狭める実験と、3) 用量応答曲線を決定する実験の3つの実験が行われる。

【0081】

長期に渡る毒性検査は、薬剤の投与を繰り返して行う。このような検査では、通常はラット及びイヌを用いて、分類学上異なった種からデータを収集する。発癌物質を除いて、物質を高い投与量濃度で3～4ヶ月間、毎日投与することで、成体動物における殆どの毒性の形態が明らかになるという研究結果が多くある。

【0082】

一年或いはそれ以上の長期に渡る慢性毒性検査は、物質に毒性がないことを証明するためか、或いは発癌性の可能性を実証するために行われる。ラットで検査が行われる場合、少なくとも3つの検査グループと、1つの対照グループとが用いられる。これらラットは、最初から最後までである間隔でモニタリングされる。

【0083】

目的の遺伝子を過剰或いは過少に発現する遺伝子組換え齧歯類は、同系交配され、ヒト疾患モデルとして、治療薬検査或いは毒物検査を行うために用いられる

(例えば、van Beusechem and Valerio, In: Murray (1992) *Transgenesis: Applications of Gene Transfer*, John Wiley & Sons Ltd. Chichester, England, pp. 283-289を参照)。ラットモデルやマウスモデルを作製するために、ヒトの疾患を模倣するある候補遺伝子を強力なプロモーターに結合して、受精卵に注入し、その卵を偽妊娠のメスに移す。このプロモーターは、胚発生中或いは生後に、特異的な組織において特定の時期に活性化され得る。導入遺伝子の発現を、実験的薬物療法の前後及びその最中に、表現型または組織特異的mRNAの発現を分析してモニタリングする。導入遺伝子がヒト疾患モデルとして用いられる例には、家族性アルツハイマー病における突然変異アミロイド前駆体タンパク質及びアポリポタンパク質の研究がある。

【0084】

齧歯類胚から単離された胚性幹細胞 (ES) は、胚を形成する可能性を維持している。ES細胞が担体となる胚の中に導入された場合、正常な発生を再開し、生きて生まれる動物の全ての組織に貢献する。ES細胞は、ある実験的なノックアウト及びノックイン齧歯類系を作製するために好ましい細胞である。マウス129/SvJ細胞株などのマウスES細胞は、マウスの初期の胚から採取され、当分野で周知の培養条件のもとで増殖される。ノックアウト系に用いるベクターには、*in vivo*で転写及び/又は翻訳を乱すマーカー遺伝子配列を含むように改変された疾患遺伝子候補が含まれる。ES細胞は、当分野で周知の電気穿孔法及びリボソーム輸送、マイクロインジェクションなどの形質転換方法によってベクターに導入される。齧歯類の内在性遺伝子が、細胞分裂の際の相同組み換え及び組み込みによって改変された疾患遺伝子に置換される。次に、形質転換されたES細胞が、所定の条件下で選択され同定され、C57/BL/6マウス系などのマウス細胞胚盤胞に微量注入されるのが好ましい。この胚盤胞を偽妊娠メスに外科的に導入すると、生まれたキメラ子孫に遺伝子型が受け継がれ、交配によってヘテロ接合系またはホモ接合系が作り出される。

【0085】

また、ES細胞を用いて、神経細胞及び造血系、心筋細胞などの*in vitro*の様々な細胞型及び組織の違いを研究する (Bain 他 (1995) *Dev. Biol.* 168:342-35

7; Wiles and Keller (1991) Development 111:259-267; and Klug 他 (1996) J . Clin. Invest. 98:216-224)。最近の研究により、ヒト胚盤胞由来のES細胞もまた、in vitroで操作して、内胚葉及び中胚葉、外胚葉性の細胞型を含む8つの別の細胞系譜に分化できることが実証された(Thomson (1998) Science 282:1145-1147)。

【0086】

上記したように、本明細書の配列表に示したヌクレオチド配列を既知の技術に用いたが単なる具体例であり、それらが当業者に周知のある技術に限定して用いられることを意味するものではない。更に、新規の技術が当分野で現在既知のヌクレオチド配列に依存するのであれば、本明細書に示すこれらの配列を、まだ開発されていない分子生物学技術に用いることも可能である。

【0087】

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

【0088】

胚発達の初期段階に現れる分化全能性のES細胞を用いてノックインヒト化動物(ブタ)又はヒトの疾患の遺伝子組み換え動物モデル(マウス又はラット)を作り出すことが可能である。ノックイン技術では、ヒト遺伝子のある領域を動物ES細胞に注入し、そのヒトの配列を組み換えによって動物細胞ゲノムの中に組み込む。ヒト遺伝子が組み込まれた全能性ES細胞は、上記したように操作する。ヒトの症状に類似の情報を収集するべく、この同系動物の研究及び処置が行われる。これらの方法を用いて、幾つかのヒトの疾患のモデル系を作り出す(例えば、Lee 他 (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. 95:11371-11376; Baudoin 他 (199

8) Genes Dev. 12:1202-1216; and Zhuang 他 (1998) Mol. Cell Biol. 18:3340-3349)。

【0089】

この動物実験の分野は、生理学及び遺伝学、化学、薬理学、統計学等の基本科学の方法論及びデータを取り扱う。これらのデータは、ヒトの健康に関連し得る非ヒト霊長類における治療薬の効果を評価するの際に重要である。ワクチン及び薬剤の評価においてサルをヒトの代わりに用いる。これらの応答は、類似の条件下でのヒトへの暴露に相当する。カニクイザル (*Macaca fascicularis*, *M. mulatta*) 及び一般的なマーマセット (*Callithrix jacchus*) は、これらの研究に用いられる最も一般的な非ヒト霊長類 (NHP) である。NHPの群体作り及び維持には多大な費用が掛かるため、初期の研究及び毒物学的な研究は、通常は齧歯類モデルで行われる。薬物嗜癖などの行動を調べる研究では、NHPは最良の実験動物である。更に、個々のNHP及びヒトは、多くの薬剤及び毒物に対して様々な感受性を示し、これらの物質に対して「高代謝型」と「低代謝型」に分類できる。したがって、NHPは、酵素のチトクロームP-450ファミリーによって作用する物質の代謝及び毒性の研究にとって好ましいモデルである。

【0090】

更なる実施例では、限定するものではないが、トリプレット遺伝子コード及び特異的な塩基形成相互作用などの特性を含む、現在知られているヌクレオチド配列の特性に新しい技術が依存する場合は、この哺乳類タンパク質をコードするヌクレオチド配列が、まだ開発中の任意の分子生物学技術に用いることが可能である。引用した全ての特許及び出版物は、本明細書の一部とする。

【0091】

【実施例】

本発明は、記載した特定の装置及び装置、物質、方法に限定されるものではないことを理解されたい。特定の実施例について説明したが、同等の実施例を用いて本発明を具現することも可能である。本発明の範囲は、前記請求の範囲によってのみ限定されるものであって、記載した実施例によって限定されるものではない。以下に記載の実施例は、本発明を例示するためのものであって本発明を限定

するものではない。例示目的で、ヒト脳梁cDNAライブラリCORPNOT02を記載する。

【0092】

1 代表的なcDNA配列の調整

ヒト脳梁cDNAライブラリCORPNOT02は、アルツハイマー病で死亡した74歳の白人男性(標本 #RA95-09-0670; International Institute for the Advancement of Medicine, Exton PA)から入手した組織から作製した。冷凍組織をPOLYTRON ホモジナイザー (PT-3000; Brinkmann Instruments, Westbury, NY)を用いて、グアニジニウムイソチオリアネート溶液中でホモジナイズして溶解した。その溶解物を、BL8-70M超遠心分離機 (Beckmann Instruments) でSW28ロータを用いて、5.7 M CsClクッションにおいて、毎秒25,000の回転の速度、周囲温度で18時間かけて遠心分離した。RNAを酸性フェノール (pH 4.7) で抽出し、0.3 M 酢酸ナトリウム及び2.5倍量のエタノールを用いて沈殿させ、RNAを含まない水に再懸濁し、DNアーゼ (Life Technologies) で処理した。前述のように、RNAの抽出及び沈澱を繰り返した。

【0093】

メッセンジャーRNA (mRNA) を、OLIGOTEXキット (QIAGEN, Valencia CA)を用いて単離してcDNAライブラリを作製した。このmRNAは、mRNAのポリA尾部における第一鎖cDNAの合成を開始するように設計されたNotIアダプタープライマーを含むSUPERSCRIPトプラスミドシステム (Life Technologies) の推奨プロトコルに従って処理した。二本鎖cDNAの末端を平滑化し、EcoRIアダプターを結合した後、この作製物をNotI (New England Biolabs, Beverly MA) で消化した。このcDNAをSEPHAROSE CL-4Bカラム (APB) 上で分画し、400 bpを超えるcDNAをpINCYトプラスミド (Incyte Pharmaceuticals) のNotI及びEcoRI部位に結合した。この組み換えトプラスミドを、コンピテントDH5 細胞 (Life Technologies) またはELECTROMAX DH10B細胞 (Life Technologies) の中に導入して形質転換した。

【0094】

トプラスミドDNAは、REAL Prep 96 Plasmid kit (QIAGEN, Inc.) を用いてその細胞から放出させ精製した。推奨プロトコルを用いたが、以下の点を変更した。

(1) 25mg/lのカルベニシリン及び0.4%のグリセロールを含む1mlの滅菌Terrific Broth (Life Technologies)において細菌を培養した。(2) 接種後、培溶液を19時間インキュベートし、この細胞を0.3mlの溶解緩衝液に溶解した。(3) イソプロパノール沈殿を行った後、プラスミドDNAのペレットを0.1mlの蒸留水に再懸濁した。このプロトコルの終了後にこのサンプルを96ウェルブロックに移して4℃で保管した。

【0095】

MICROLAB 2200システム (Hamilton, Reno NV) 若しくはHYDRAマイクロディスプレイ (Robbins Scientific, Sunnyvale CA) の何れか一方と、DNA ENGINE サーマルサイクラー (MJ Research) を組み合わせて用いて、cDNAを調製した。このcDNAの配列を、ABI PRISM 377 (PE Biosystems) 若しくはMEGABACE 1000 (APB) シークエンシングシステムの何れか一方を用いて、Sanger, F.及びAR. Coulson (J. Mol. Biol. (1975) 94:441-448) の方法でシークエンシングした。大抵の単離物は、標準的なABIプロトコル及びキット (PE Biosystems) に従ってシークエンシングした。0.25x ~ 1.0xの濃度の溶液を用いた。或いは、Amersham Pharmacia Biotech製の溶液及び色素を用いてcDNAをシークエンシングしてもよい。

【0096】

2 この配列の同定及び伸長、構築、解析

ZOOSEQデータベース (Incyte Pharmaceuticals) からのインサイト社クローン700145292を用いて、LIFESEQデータベース (Incyte Pharmaceuticals) からのインサイト社クローン5595953を同定した。インサイト社クローン5595953で発現する初めにパスして伸長したcDNA、SEQ ID NO:3-11を、Phred/Phrap若しくはCONSED (Green, University of Washington, Seattle WA)、GCG 断片構築システム (Genetics Computer Group (GCG), Madison WI) を用いて構築した。PROソフトウェア (Hitachi Software Engineering) を用いて、構築した配列のオープンリーディングフレームを調べ、コーディング領域を翻訳した。完全長のヌクレオチド配列及び核酸配列を、LASERGENEソフトウェア (DNASTAR) を用いてBLASTでGenBank データベース、SwissProt、BLOCKS、PRINTS、Prosite、及びPFAM等のデータベースに対して問い合わせて解析した。アミノ酸配列の機能解析は、MOTIFS (GCG) 及びH

MMアルゴリズムを用いて行った。アミノ酸配列の抗原性指数 (Jameson-Wolf解析) は、LASERGENEソフトウェア(DNASTAR)を用いて決めた。次に、BLASTを用いてクローン及び構築した配列を全ての哺乳動物ライブラリに渡って比較し、相同な核酸配列、SEQ ID NO:12 - 25を同定した。

【0097】

3 配列類似性

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

【0098】

4 ノーザン分析

ノーザン分析は、遺伝子の転写物の存在を検出するために用いられる実験用技術であり、特定の細胞種或いは組織からのRNAが結合されている膜への標識されたヌクレオチド配列のハイブリダイゼーションを伴う。

【0099】

BLASTに用いる類似のコンピュータ技術を用いて、GenBank或いはLIFESEQ (Incyte Pharmaceuticals) のようなヌクレオチドデータベース内の同一或いは関連する分子を検索する。この配列ベースの解析は多くの膜系ハイブリダイゼーションより非常に速度が速い。さらにコンピュータ検索の感度を変更して、任意の特定の一致が、厳密な一致或いは相同的一致の何れかとして分類されるかを確定することができる。検索の基準は、(%配列同一性 × %最大BLASTスコア) / 100として定義される積スコアである。積スコアは、2つの配列間の類似度及び配列一致の長さの両方を考慮する。例えば、積スコア40の場合、その一致は1 ~ 2% 誤差の範囲内で正確であり、70ではその一致は正確であろう。類似若しくは関

連する分子は通常、8～40の範囲の積スコアを示す分子を選択することにより同定される。

【0100】

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

【0101】

5 ポリヌクレオチドの伸長

SEQ ID NO:1の核酸配列は、オリゴヌクレオチドプライマーを用いてインサイトクローンを伸長して作製した。一方のプライマーは既知の断片の5'の伸長を開始するために合成し、他方のプライマーは既知の断片の3'の伸長を開始するために合成した。開始プライマーは、OLIGO 4.06ソフトウェア(National Biosciences)を用いて、約22～約30個のヌクレオチドの長さ、約50%以上のG+Cの含量で、かつ約68～72の温度で標的配列にアニールするように設計した。ヘアピン構造及びプライマー-プライマー二量体が生じないようにした。選択されたヒトcDNAライブラリを用いてこの配列を伸長した。2段階以上の伸長が必要な場合は、追加の或いは入れ子の組みのプライマー(nested primer)を設計する。

【0102】

PCRをPTC-200(MJ Research, Inc.)用いて96ウェルブロックプレートで行って、高い忠実度で増幅した。反応混合液は、鋳型DNA及び200 nmolの各プライマー、 Mg^{2+} と $(NH_4)_2SO_4$ とβ-メルカプトエタノールを含む緩衝液、Taq DNAポリメラーゼ(Amersham Pharmacia Biotech)、ELONGASE酵素(Life Technologies)、Pfu DNAポリメラーゼ(Stratagene)を含む。プラスミドから選択したプライマーの組に対して以下のパラメーターで増幅を行った。

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

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

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

【0103】

各ウェルのDNA濃度は、1x TE及び0.5 µlの希釈していないPCR産物に溶解した100 µlのPICOGREEN定量試薬(0.25% (v/v); Molecular Probes)を不透明な蛍光光度計プレート(Corning Science Products, Corning NY)の各ウェルに分配してDNAが試薬と結合できるようにして測定する。このプレートをFluoroskan II (Labsystems Oy, Helsinki, Finland)でスキャンして、サンプルの蛍光を計測してDNAの濃度を定量化する。反応混合物の5~10 µlのアリコットを1%のアガロースミニゲル上での電気泳動によって解析し、何れの反応物が配列を伸長することに成功したかを決定する。

【0104】

伸長した配列を脱塩及び濃縮してから384ウェルプレートに移し、CviJIコレラウィルスエンドヌクレアーゼ(Molecular Biology Research, Madison WI)で消化し、pUC 18ベクター(APB)に再連結する前に音波処理またはせん断を行った。シ

ヨットガンシークエンシングのために、消化した断片を低濃度(0.6~0.8%)のアガロースゲル上に分離して、UV光で可視化して断片を切断し、寒天をAgar ACE (Promega)で消化/除去した。T4リガーゼ(New England Biolabs, Beverly MA)を用いて伸長した断片をpUC 18ベクター(Amersham Pharmacia Biotech)に再連結し、Pfu DNAポリメラーゼ(Stratagene)で制限部位の伸び出しを処理してコンピテント大腸菌細胞に形質移入した。形質転換された細胞を選択して抗生物質を含む培地に移し、それぞれのコロニーを切りとって、384ウェルプレートにおいてLB/2Xカルベニシリン培養液で、37℃で一晩培養した。

【0105】

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

- ステップ1 94℃で3分間
- ステップ2 94℃で15秒
- ステップ3 60℃で1分間
- ステップ4 72℃で2分間
- ステップ5 ステップ2、3、及び4を29回繰り返す
- ステップ6 72℃で5分間
- ステップ7 4℃で保管。

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

【0106】

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

【0107】

6 プローブの標識化及びハイブリダイゼーション分析

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

【0108】

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

【0109】

cDNAプローブ配列は、鋳型mRNAから作製される。5 µgのmRNAを1 µgのランダムプライマー(Life Technologies)と混合し、70℃で10分間インキュベートしてから凍結乾燥する。この凍結乾燥したサンプルを、dNTP混合物及び[γ - 32 P]dCTP、ジチオスレイトール、MMLV逆転写酵素(Stratagene)を含む50 µlの1x第1鎖緩衝液(cDNA Synthesis system; Life Technologies)に再懸濁し、42℃で1~2時間インキュベートする。インキュベートした後、プローブを42 µlの

蒸留水で希釈して95℃で3分間加熱し、その後氷上で冷却する。プローブのmRNAをアルカリ分解によって除去する。このプローブを中和し、PROBEQUANT G-50 MicroColumn (APB)を用いて変性したmRNAや組み込まれなかったヌクレオチドを除去する。放射性核種 $[^{32}\text{P}]$ dCTPの代わりにCy3-dCTP或いはCy5-dCTP等の標識ヌクレオチド(APB)でプローブを標識することもできる。

【0110】

ハイブリダイゼーションは、0.5Mリン酸ナトリウム(pH7.2)及び7%SDS、1 mM EDTAを含むハイブリダイゼーション緩衝液において65℃で行う。ハイブリダイゼーション緩衝液において、基板を少なくとも2時間65℃でインキュベートした後、この緩衝液をプローブ配列を含む新しい緩衝液10 mlに取り替える。65℃で18時間インキュベートした後、ハイブリダイゼーション緩衝液を除去し、最大40 mMのリン酸ナトリウム及び1%SDS、1 mM EDTA、65℃の条件に徐々にストリンジェンシーを増しながら、連続的に基板を洗浄する。膜にハイブリダイズした放射線標識したプローブによって生成されるシグナルを検出するために、この基板をPHOSPHORIMAGERカセット(APB)に曝し、そのイメージをIMAGEQUANTデータ解析ソフトウェア(APB)を用いて解析する。マイクロアレイにハイブリダイズした蛍光プローブによって生成されるシグナルを検出するために、この基板を共焦点レーザー顕微鏡検査によって検査し、GEMTOOLS遺伝子発現解析ソフトウェア(Incyse Pharmaceuticals)を用いてイメージを修正し解析する。

【0111】

7 相補的ポリヌクレオチド

本ポリヌクレオチドに相補的な配列、或いはその断片を用いて、遺伝子の発現を検出したり、低下させたり、阻害することができる。約15~約30個の塩基対からなるオリゴヌクレオチドの使用について記載するが、それより小さい或いは大きい配列の断片の場合でも実質的に同じ方法を用いることができる。オリゴヌクレオチドは、SEQ ID NO:1若しくはその断片、SEQ ID NO:3-9を用いて、Oligo4.06ソフトウェア(National Biosciences)で設計する。プロモーターの結合を阻害して転写を阻害するためには、相補的なヌクレオチドは、最もユニークな5'配列、最も好ましくはオープンリーディングフレームの開始コドンの前の約

10個のヌクレオチドに結合するように設計する。翻訳を阻害するためには、相補的なオリゴヌクレオチドは、本哺乳動物タンパク質をコードするmRNAにリボソームが結合するのを阻害するように設計する。

【0112】

8 本哺乳動物タンパク質の発現

本哺乳動物タンパク質の発現及び精製は、細菌若しくはウイルスを基にした発現系を用いて行うことができる。細菌で発現させるために、抗生物質耐性遺伝子とcDNAを高レベルで転写させる誘導性プロモーターとを含むベクターにcDNAをサブクローニングする。このようなプロモーターには、lacオペレーター調節要素に関連するT5またはT7バクテリオファージプロモーター及びtrp-lac(tac)ハイブリッドプロモーターが含まれるが、これらに限定されるものではない。組換えベクターを、BL21(DE3)などの好適な細菌宿主に形質転換する。抗生物質耐性細菌が、イソプロピル-Dチオガラクトピラノシド(IPTG)で誘発されるとこの哺乳動物タンパク質を発現する。真核細胞での発現は、一般にバキュロウイルスとして知られているAutographica californica核多面性ウイルス(AcMNPV)をSpodoptera frugiperda (Sf9)昆虫細胞に感染させて行う。バキュロウイルスの非必須ポリヘドリン遺伝子を、相同組換え或いは転移プラスミドの媒介を伴う細菌媒介遺伝子転移の何れかによって、この哺乳動物cDNAと置換する。ウイルスの感染力は維持され、強いポリヘドリンプロモーターによって高いレベルでcDNAが転写される

大抵の発現系では、この哺乳動物タンパク質が、精製の細胞溶解物からの組換え融合タンパク質の親和性ベースの精製が素早く1回で行うことができるGSTまたはFLAGとの融合タンパク質として合成される。GSTによって、タンパク質の活性及び抗原性を維持する条件下で、固定されたグルタチオン上での融合タンパク質の精製が可能となる(APB)。精製の後、GST部分をこの哺乳動物タンパク質から蛋白分解的に特定の操作部位で切断できる。アミノ酸8個のペプチドからなるFLAGによって、市販のモノクローナル及びポリクローナル抗FLAG抗体(Eastman Kodak)を用いたイムノアフィニティー精製が可能となる。6個の連続するヒスチジン残基のストレッチである6-Hisによって、金属キレート樹脂(QIAGEN)上での精

製が可能となる。タンパク質の発現及び精製の方法は、Ausubel (1995, 前出, ch 10, 16)に記載されている。これらの方法で精製したこの哺乳動物タンパク質を直接用いて以下のアッセイを行うことができる。

【0113】

9 機能的アッセイ

タンパク質の機能は、哺乳動物細胞培養系においてLMTFをコードする配列の生理学的に高レベルでの発現によって評価する。このポリヌクレオチドを、強力なサイトメガロウイルスプロモーターを含むpCMV SPORT™ベクター(Life Technologies.)にサブクローニングする。5 ~ 10 µgのこの組換えベクターを、内皮或いは造血由来のヒト細胞株に電気穿孔法によって形質転換する。更に、蛍光マーカーとなるCD64-GFP (Clontech)をコードする配列を含む1 ~ 2 µgのプラスミドを同時に形質転換して、フローサイトメトリーで形質転換細胞を同定する。

【0114】

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

【0115】

1.0 LMTFに特異的な抗体の生産

ポリアクリルアミドゲル電気泳動法(PAGE; 例えば、Harrington, M.G. (1990) Methods Enzymol. 1816 - 3088-495を参照)で実質的に精製されたLMTFを用いて、標準的なプロトコルでウサギを免疫して抗体を産生させる。

【0116】

別法では、LMTFのアミノ酸配列をLASERGENEソフトウェア(DNASTAR)を用いて解析し、免疫原性の高い領域を決定する。C末端付近或いは隣接する親水性領域内のエピトープなどの免疫原性エピトープを選択して合成し、これを用いて当分野で周知の方法で抗体を量産させる(例えば、前出のAusubel, 1995, 11章を参照)

。

【0117】

通常、約15個の残基の長さのエピトープを、fmoc法のケミストリを用いるABI 431Aペプチドシンセサイザ(PE Biosystems)で合成し、N-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステルを用いた反応によりKLH(Sigma-Aldrich)に結合させて、免疫原性を高める。フロイントの完全アジュバントにおけるエピトープ-KLH複合体でウサギを免疫する。十分な時間が経過した後、得られた抗血清で抗ペプチド活性を検査する。この検査には、このペプチドをプラスチックに結合し、1%ウシ血清アルブミン(BSA)を用いてブロックし、ウサギ抗血清と反応させ、洗浄し、さらに放射性ヨウ素標識されたヤギ抗ウサギIgGと反応させる。当分野で周知の方法を用いて抗体力価及び形成された複合体の収量を測定する。

【0118】

1.1 特異的抗体を用いる自然発生タンパク質の精製

自然発生或いは組換え哺乳動物タンパク質を、このタンパク質に特異的な抗体を用いるイムノアフィニティークロマトグラフィにより実質的に精製する。イムノアフィニティークラムは、CNBr-活性化SEPHAROSEレジン(APB)とその抗体とを共有結合させることにより形成する。このタンパク質を含む培養液をイムノアフィニティークラムに通し、このタンパク質を優先的に吸着できるように、界面活性剤の存在下で高イオン強度緩衝液でそのカラムを洗浄する。結合後、抗体とこのタンパク質との結合を切るように、そのカラムを緩衝液(pH 2~3)、或いは高濃度の尿素やチオシアネートイオンで溶出させ、このタンパク質を回収する。

。

【0119】

1.2 本ポリヌクレオチド若しくはタンパク質と特異的に結合する分子のスクリーニング

この核酸配列やその断片、或いは本タンパク質やその断片を、³²P-dCTP、Cy3-dCTP、Cy5-dCTP(APB)、またはBIODIPYやFITC(Molecular Probes)でそれぞれ標識する。予め好適な基板上に配列した候補分子のライブラリを、標識した核酸配

列若しくはタンパク質の存在下でインキュベートする。インキュベートした後、基板を洗浄し、特異的な結合或いは複合体形成を示唆する標識が保持している基板上の全ての部分をアッセイし、結合している分子を同定する。様々な濃度の核酸若しくはタンパク質で得られたデータを用いて、標識した核酸若しくはタンパク質と候補分子との親和性を計算する。

【0120】

1.3 タンパク質活性の実証

LMTFの活性は、レポーター遺伝子の発現を調節する能力によって測定することができる。このアッセイには、大腸菌 ガラクトシダーゼ酵素 (LacZ) をコードする配列の上流につながれた転写因子応答性要素からなるレポーター遺伝子の作製が含まれる。LMTFをコードする配列を、高レベルでcDNAを発現させる強力なプロモーターを含む哺乳動物発現ベクターにサブクローニングする。このベクターには、サイトメガロウイルスプロモーターをそれぞれ含むPCMV SPORT (Life Technologies)及びPCR 3.1 (Invitrogen, Carlsbad CA)を用いることができる。このような組換えベクター及びレポーター遺伝子作製物を、リポソーム製剤や電気穿孔法を用いて好ましくは神経由来のヒト細胞株に同時に形質転換する。レポーター遺伝子のみで形質転換されたコントロール細胞と比較したLMTF形質転換細胞におけるガラクトシダーゼ酵素の活性の量が、LMTF遺伝子産物によって調節された転写量に正比例する。

【0121】

(表の簡単な説明)

表1は、SEQ ID NO:1と相同なヒト及びラット、マウス、サル由来のEST、ヌクレオチドの長さ、由来、SEQ ID NO:1と重複する領域、SEQ ID NO:1との同一性(%)を示す。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> INCYTE GENOMICS, INC.
 YUE, Henry
 KASER, Matthew, R.
 BAUGHN, Mariah, R.

<120> LIPID METABOLISM TRANSCRIPTION FACTOR

<130> PC-0004 PCT

<140> To Be Assigned

<141> Herewith

<150> 09/318,978

<151> 1999-05-26

<160> 27

<170> PERL Program

<210> 1

<211> 2092

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<223> Incyte ID No.: 5595953

<400> 1

gggcctttta	tctcgggtgct	gccgggggag	gcgggaggag	gagacaccag	gggtggccct	60
gagcgccggc	gacacctttc	ctggactata	aattgagcac	ctgggatggg	tagggggcca	120
acgcagtcac	cgccgtccgc	agtcacagtc	cagccactga	ccgcagcagc	gcccttgcgt	180
acagccgctt	gcagcgagaa	cactgaattg	ccaacgagca	ggagagtctc	aaggcgcaag	240
aggaggccag	ggctcgaccc	acagagcacc	ctcagccatc	gcgagtctcc	ggcgcccaa	300
gccaggagaa	gccgcccata	ccgcagggcc	ggtctgccag	cgagacgaga	gttggcgagg	360
gcggaggagt	gccgggaatc	ccgccacacc	ggctatagcc	aggccccag	cgcgggcctt	420
ggagagcgcg	tgaagcgggg	catccccttg	accgggccga	ccatcccctg	gcccctgcgt	480
ccctcgcctc	caacgtccgc	gcggccaacca	tgatgcaaat	ctgcgacacc	tacaaccaga	540
agcactcgct	ctttaacgcc	atgaatcgct	tcattggcgc	cgatgaacac	atggaccaga	600
cggtgatggt	gcccagcttg	ctgcgcgacg	tgcccctggc	tgaccccggg	ttagacaacg	660
atgttggcgt	ggaggtaggc	gycagtgggg	gctgcctgga	ggagcgcacg	ccccagctc	720
ccgactcggg	aagcgccaat	ggcagctttt	tcgcgccctc	tcgggacatg	tacagccact	780
acgtgcttct	caagtccatc	cgcaacgaca	tcgagtgggg	ggtcctgcac	cagccgcctc	840
caccggctgg	gagcgaggag	ggcagtgctt	ggaagtccaa	ggacatcctg	gtggacctgg	900
gccacttgga	gggtgcggac	gccggcgaag	aagacctgga	acagcagttc	cactaccacc	960
tgccgcccgt	gcacactgtg	ctctcgaaac	tcacgcgcaa	agccaacatc	ctcactaaca	1020
gatacaagca	ggagatcggc	ttcggcaatt	ggggccactg	aggcgtggcg	cccgctggcg	1080
cccagcacct	tcttcgaacc	atctcaccct	ctctcattcc	tcaaagcttt	ttttttttt	1140
cctggctggg	gggcccgaag	ggcagactgc	aaactggggg	gctgcgtacg	tgccaggaggc	1200
gcggtggggc	tgctgtggag	agggggccac	gtgtgagaga	gaagaaaatg	gtggcccggag	1260
atgggagggc	ccaaggaacc	tcctggggag	gggcctgcat	tcctatgctg	tggaatggg	1320
actgggctga	cgcccctgac	tcagcctgtg	cctttcctgg	ggtttctttt	ctgttctttt	1380
cgaggagag	ggcccagaaa	ggggccatac	cagggcggcg	cgctgggttg	ccacacttgg	1440
gaaagcagcc	cgagactggg	tgctggggaa	ggcggggggc	gtagcctccc	gccgcccctg	1500
ggttgggccc	gtggaggccc	agcgcttgct	aggattgcat	cagttttcct	gtttgacta	1560
tttctttttg	taacattggc	cctgtgtgaa	gtatttcgaa	tcctcctcct	gctctgaaac	1620
ttcagcgatt	ccattgtgat	aagcgcacaa	acagcactgt	ctgtcggtaa	tcggtaactac	1680
tttattaatg	atthctctgt	acaactgtata	gtagtctctat	ggcaccacca	ccccatccct	1740
ttcgtgccac	tcccgtcccc	accocccccc	cagtgtgtat	aagctggcat	ttcgcagct	1800
tgtacgtagc	ttgccactca	gtgaaaataa	taacattatt	atgagaaagt	ggacttaacc	1860
gaaatggaac	caactgacat	tcctatcgtgt	tgtacataga	atgatgaagg	gttcactgt	1920
tggtgtatgt	cttaaattta	tttaaaactt	tttttaatcc	agatgtagac	tatatcttaa	1980
aaaataaaaa	agcaaatgtg	tcaactaaat	tggacaagcg	ctgggtcctc	attaatctgc	2040
caatgaatgg	tttcgtcatt	aaataaaaaat	caatttaatt	gatttactag	ca	2092

<210> 2
 <211> 183
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> Incyte ID No.: 5595953

<400> 2
 Met Met Gln Ile Cys Asp Thr Tyr Asn Gln Lys His Ser Leu Phe
 1 5 10 15
 Asn Ala Met Asn Arg Phe Ile Gly Ala Val Asn Asn Met Asp Gln
 20 25 30
 Thr Val Met Val Pro Ser Leu Leu Arg Asp Val Pro Leu Ala Asp
 35 40 45
 Pro Gly Leu Asp Asn Asp Val Gly Val Glu Val Gly Gly Ser Gly
 50 55 60
 Gly Cys Leu Glu Glu Arg Thr Pro Pro Val Pro Asp Ser Gly Ser
 65 70 75
 Ala Asn Gly Ser Phe Phe Ala Pro Ser Arg Asp Met Tyr Ser His
 80 85 90
 Tyr Val Leu Leu Lys Ser Ile Arg Asn Asp Ile Glu Trp Gly Val
 95 100 105
 Leu His Gln Pro Pro Pro Pro Ala Gly Ser Glu Glu Gly Ser Ala
 110 115 120
 Trp Lys Ser Lys Asp Ile Leu Val Asp Leu Gly His Leu Glu Gly
 125 130 135
 Ala Asp Ala Gly Glu Glu Asp Leu Glu Gln Gln Phe His Tyr His
 140 145 150
 Leu Arg Gly Leu His Thr Val Leu Ser Lys Leu Thr Arg Lys Ala
 155 160 165
 Asn Ile Leu Thr Asn Arg Tyr Lys Gln Glu Ile Gly Phe Gly Asn
 170 175 180
 Trp Gly His

<210> 3
 <211> 502
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> unsure
 <222> 317, 363, 393, 402, 421, 432, 458, 461, 463, 470
 <221> unsure
 <222> 478, 482, 494
 <223> a or g or c or t, unknown, or other

<220>
 <221> misc_feature
 <223> Incyte ID No.: 1479946F6

<400> 3
 gggcctttta tctcgggtgct gccggggggag gcggggaggag gagacaccag ggggtggccct 60
 gagcgcgggc gacacetttc ctggactata aattgagcac ctgggatggg tagggggcca 120
 acgcatacacc gccgtccgca gtcacagtcc agccaactgac cgcagcagcg cccttgcgta 180
 nagccgcttg cagcgagaac actgaattgc caacgagcag gagagtctca aggcgcaaga 240
 ggaggccagg ggctcgaccc acagagcacc ctcagccatc gccgagtttc gggcgccaaa 300
 gccaggagaa gccgccnato ccgcaaggcc cggtctgcca gcgagacgag attggcgagg 360
 gcngaagagt gccgggaatc ccgccacacc ggntatagca anccccagc gcgggctttg 420
 naaacgcctg angcgggcat ccttgaccg gcgacatncc ntncctgcn tctcgggntc 480
 ancttcgggc gcancatatt ac 502

<210> 4
 <211> 529
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> unsure
 <222> 48, 172, 214, 348, 364, 414, 417, 428, 430, 436
 <221> unsure
 <222> 471, 491, 495, 503, 511, 523
 <223> a or g or c or t, unknown, or other

<220>
 <221> misc_feature
 <223> Incyte ID No.: 3241390F6

<400> 4
 gcgagtttcc gggcgccaaa gccaggagaa gccgcccac cgcaggnca ggtctgccag 60
 cgagacgaga gttggcgagg gccgaggagt gccgggaatc ccgccacacc ggctatagcc 120
 aggcccccag cgcgggcctt ggagagcgcg tgaaggcggg catccccttg anccggccga 180
 ccateccccgt gccctgctt ccctgcctc caangtccgc gccgccacca tgatgcaaat 240
 ctgagacacc tacaaccaga agcactcgct ctttaacgcc atgaatcgct tcattggcgc 300
 cgtgaacaac atggaccaga cggatgatgt gccagcttg tgcgcgagnt gccctggct 360
 gacncgggt tagacaacga tgttggcgtg gaggtaagcg gcaatggcgg cttncctgag 420
 gagcgcangn cccanttcc cactcgga agcgcgaatg gagctttttt nggggcctct 480
 tggggacaat nttanaagcc aantaagtgg nttctcaaag ttncatccg 529

<210> 5
 <211> 562
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> unsure
 <222> 288, 289, 291, 293, 313, 434, 514, 560
 <223> a or g or c or t, unknown, or other

<220>
 <221> misc_feature
 <223> Incyte ID No.: 1432520R1

<400> 5
 gacggatgat gtgcccagct tgctgcgcga cgtgccctg gctgacccc ggttagacaa 60
 cgatgttggc gtggaggtag gccggcagtg cggctgcctg gaggagcgca cgcgccagct 120
 ccccactcg ggaagcgcca atggcagctt ttctgcgcc tctcgggaca tgtacagcca 180
 ctacgtgctt ctcaagtcca tccgcaacga catcgagtgg ggggtcctgc accagccgcc 240
 tccaccggt gggagcgagg agggcagtg ctggaagtcc aaggacannc ngntggacct 300
 gggccacttg ganggtgcgg acgcccgcga agaagacctg gaacagcagt tccactacca 360
 cctgcgcggg ctgcacactg tgtctcgaaa ctacgcgca aagccaacat cctcactaac 420
 agtacaagca ggantcggtt cggaaattgg ggcaactgag cgtggcgcgc gtggctgccc 480
 agaacttttc gaccatctaa cctctctatt cctnaagctt ttttttttcc cggctggggg 540
 cggagggcaa ctgcaaatn gg 562

<210> 6
 <211> 254
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> unsure
 <222> 80, 215, 238, 239, 242, 243, 244, 249
 <223> a or g or c or t, unknown, or other

<220>
 <221> misc_feature
 <223> Incyte ID No.: 4534217H1

```

<400> 6
gggcagactg caaactgggg ggctgcgtac gtgcaggagg cgcggtgggg ctgcgtggag 60
gagggggcca cgtgtgagan agaagaaaat ggtggccgga gatgggaggg cccaaggaac 120
ctcctgggag ggggcctgca ttctatgttg gtgggaatgg gactgggctg acgcctgca 180
ttcagcctgt gcctttcctg gggtttcttt tctgntcttt tcggaggaga aggcccgna 240
annngccana ccaa 254

```

```

<210> 7
<211> 238
<212> DNA
<213> Homo sapiens

```

```

<220>
<221> unsure
<222> 19, 133
<223> a or g or c or t, unknown, or other

```

```

<220>
<221> misc_feature
<223> Incyte ID No.: 2191992H1

```

```

<400> 7
cgcggtgggg ctgcgtggng gagggggcca cgtgtgagag agaagaaaat ggtggccgga 60
gatgggaggg cccaaggaac ctctgggag ggggcctgca ttctatgttg gtgggaatgg 120
gactgggctg acnccctgca ttcagcctgt gcctttcctg gggtttcttt tctgttcttt 180
tcggaggaga gggcccgaga aggggccata ccagggcgcg gcgctggggt gccacact 238

```

```

<210> 8
<211> 661
<212> DNA
<213> Homo sapiens

```

```

<220>
<221> unsure
<222> 2, 5, 65, 68, 70, 75, 96, 104, 107, 110, 116, 131
<221> unsure
<222> 194, 195, 198, 199, 200, 204, 225, 227, 235, 309
<221> unsure
<222> 469, 534, 536, 559, 563, 591, 603, 604, 612, 619
<221> unsure
<222> 632, 657
<223> a or g or c or t, unknown, or other

```

```

<220>
<221> misc_feature
<223> Incyte ID No.: 1320132T1

```

```

<400> 8
tnganttaaa aaaagtttta aataaattta agacatacca acaacagtgg aaaccttcat 60
cattntangn acaanacgat agaatgtcag ttgggmccat ttcngtnaan tccacnttct 120
cataataatg ntattatctt cactgagtgg caagctacgt acaagctggc gaaatgccag 180
cttatacaca ctgnngtnnn ggtngggacg ggagtggcac gaaangnatg gggtngggggt 240
gccataggac tactatacag tgtaacagaa aatcattaat aaagtagtac cgattaccga 300
cagacagtnc tgtttgtgcg cttatcacia tggaatcgct gaagtttcag agcaaggagg 360
agattcgaaa tacttcacac agggccaatg ttacaaaaag aaatagtgca aacaggaaaa 420
ctgatgcaat cctagcaacg cctgggcctc caccggccca accgcaggnt gcgggaggct 480
acgcgcccgc ccttcccag caccagctc cgggctgctt tcccagtggt tgcnanocaa 540
cgccgcgccc tggatttgn cctctcggg cctttctctc gaaaagaacc ngaaaagaacc 600
ccnngaaagg cncaggetna attcagggcg tnaccaggtt ccattocccac caactnngat 660
t 661

```

```

<210> 9
<211> 624
<212> DNA
<213> Homo sapiens

```

```

<220>
<221> unsure
<222> (302)...(307), 330, 331, 334, 560, 572, 574, 577
<221> unsure
<222> 593, 609
<223> a or g or c or t, unknown, or other

<220>
<221> misc_feature
<223> Incyte ID No.: 1516707T1

<400> 9
atTTTTatTTt aatgacgaaa ccattcattg gcagattaat gaggaccaga cgettttcca 60
atTTtagttga cacatttget tttttatTTt ttagaatata gtctacatct ggattaaaaa 120
aagtttttaa taaattttaa acatacaaca acagtggaac ccttcatcat tctatgtaca 180
acacgataga atgtcagttg gttccatttc ggtfaagtcc actttctcat aataatgtta 240
ttattttcac tgagtggcaa gctacgtaca agctggcgaa atgccagctt atacacactg 300
gnnnnnnggt ggggacggga gtggcacgan angnatgggg tgggggtgcc ataggactac 360
tatacagtgT aacagaaaaT cattaataaa gtagtaccga ttaccgacag acagtgctgt 420
ttgtgcgctt atcacaatgg aatcgctgaa gtttcagagc aaggaggaga ttcgaaatac 480
ttcacacagg gccaatgtta caaaaagaaa tagtgcaaac aggaaaactg atgcaatcct 540
agcaacgcct gggcctccan cggcccaacc gnangcngcg ggaggctacg cgncccgcct 600
ccccagcanc cagctccggg gtgt 624

<210> 10
<211> 252
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> unsure
<222> 186, 189, 195, 196, 200, 204, 208, 213, 222, 226
<221> unsure
<222> 228, 236, 244, 248, 251
<223> a or g or c or t, unknown, or other

<220>
<221> misc_feature
<223> Incyte ID No.: 5595953H1

<400> 10
atttcgaate tctctcttgc totgaaactt cagcgattcc attgtgataa ggcgacaaaac 60
agcactgtct gtcggtaate ggtactactt tattaatgat tttctgttac actgtatagt 120
agtcctatgg cacccccacc ccataccttt cgtgccactc ccgtccccac ccccacccca 180
gggggntang cgggnmtttt gcengetnga cgnagctggc cnctcngnga aaatantacc 240
tttnttgngg ng 252

<210> 11
<211> 302
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> unsure
<222> 89, 186, 251, 252, 254, 255, 258, 259, 260, 267, 268
<221> unsure
<222> 278, 281, 283, 286, 291, 292, 294, 297
<223> a or g or c or t, unknown, or other

<220>
<221> misc_feature
<223> Incyte ID No.: 1988906R6

```

<400> 11
ggacttaacc gaaatggaac caactgacat tctatcgtgt tgtacataga atgatgaagg 60
gttccactgt tgttgtatgt cttaaattna tttaaaactt tttttaatcc agatgtagac 120
tatattctaa aaaataaaaa agcaaatgtg tcaactaaat tggacaagcg tctggctctc 180
attaanctgc caatgaatgg tttcgtcatt aaataaaaaat caatttaatt gatttactag 240
caaaagtaga nnannaannn aaaaaanna aaaaaaanac naangntaac nntnccnaaa 300
aa 302

<210> 12
<211> 144
<212> DNA
<213> *Macaca fascicularis*

<220>
<221> unsure
<222> 25
<223> a or g or c or t, unknown, or other

<220>
<221> misc_feature
<223> Incyte ID No.: 700712962H1

<400> 12
ctcgatgtcg ccgggggagg cgggnggagg agacaccagg ggtggcctg agcaccggcg 60
acaccttcc tggactataa attgagcacc tgggatgggt aggggtcaa cgcacaccg 120
cggcccgag tcacagtccg gcc 144

<210> 13
<211> 274
<212> DNA
<213> *Macaca fascicularis*

<220>
<221> unsure
<222> 19, 253
<223> a or g or c or t, unknown, or other

<220>
<221> misc_feature
<223> Incyte ID No.: 700715135H1

<400> 13
gacgccaaag ccaggagang ccgcccatcc cgcaggtccg gttctgccag cgagacgaga 60
gttggcgagg gcggaggagt gccgggaatc ccgccacacc ggctatagcc aggcccccag 120
cgcgggcctt ggagagagcg tgaaggcggg catccctttg acccgccga ccatcccgt 180
gtctctgct ccctgcgctc cagcggccgc gggccacca tgatgcaaat ctgcgacacc 240
tacaaccaga agnactcgtc ctttaacggc atga 274

<210> 14
<211> 273
<212> DNA
<213> *Mus musculus*

<220>
<221> unsure
<222> 245
<223> a or g or c or t, unknown, or other

<220>
<221> misc_feature
<223> Incyte ID No.: 701253541H1

<400> 14
 cccgggtaca tgtacagcca ctacgtgctg ctcaagtcca tccgcaatga tatcgagtgg 60
 ggagtcctgc accagccttc gtctccgocg gccgggagcg aggagagcac ctggaagccc 120
 aaggacatcc tgggtgggct gagtcacttg gagagcgcg atgcggcgag gaagatctgg 180
 agcagcagtt ccactaccac ctgcgcgggc tgcacaccgt gctctccaaa ctcaaccgaa 240
 aagcnaacat cctcaccatt agatacaagc agg 273

<210> 15
 <211> 250
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

<220>
 <221> unsure
 <222> 45
 <223> a or g or c or t, unknown, or other

<220>
 <221> misc_feature
 <223> Incyte ID No.: 701252210H1

<400> 15
 ctttttgtaa cagtgaccct gtottaagtc tttcagatct ctttnctttg aaacttcgtc 60
 gattccattg tgataagcgc acaaacagca ctgttggtaa ccgggtactac tttattaatg 120
 atttctgtt acactgtaca gtagtctctgt ggcaccctat ccctttcacg ccaccctcc 180
 cccgcctgtg tgtgtaaact ggcgatgtgc cagctaggat gaagcttgc actcggctag 240
 cgaaaataat 250

<210> 16
 <211> 272
 <212> DNA
 <213> Rattus norvegicus

<220>
 <221> unsure
 <222> 56, 64, 67, 84, 209, 234, 249
 <223> a or g or c or t, unknown, or other

<220>
 <221> misc_feature
 <223> Incyte ID No.: 700545683H1

<400> 16
 gaccttttat ctgtgctgct ggaggaggta ggaggaggag acatcagggg tggcntggg 60
 gcgnctngga cacctatcct ggantataaa ttgagcacct gggatgcagc agggggccga 120
 agcagccacc atcaccata ctcacagtcc gatcagtgac cgcagcagcg cccttgggca 180
 gccaccgtgc cgcaactacg agcactgana accaggggat ttgcgagtgc aagngatcaa 240
 ggctagacnc aaccacctac catcctcgtg ag 272

<210> 17
 <211> 257
 <212> DNA
 <213> Rattus norvegicus

<220>
 <221> misc_feature
 <223> Incyte ID No.: 700145292H1

<400> 17
 gcaactcgag cactgagaac caggggattt cgcagtgcaa gagatcaagg ctagaccxaa 60
 ccacctaaca tctcgtgag ccaaagctta gagcagccgc gcatcaggaa gggctgaact 120
 gagacagaag gaagagttag agagggcgga gaaggatctg ggaatccagt cacaccggct 180

tcaagcagggc tcccgccatt agcgtttgaa ggcgggcacg gccagaggtc tatctcggtg 240
taccagtgtc cctgtgt 257

<210> 18
<211> 239
<212> DNA
<213> Rattus norvegicus

<220>
<221> unsure
<222> 16, 68
<223> a or g or c or t, unknown, or other

<220>
<221> misc_feature
<223> Incyte ID No.: 700861443H1

<400> 18
gacagaagga agagtnagag agggcgggaga aggatctggg aatccagtca caccggcttc 60
aagcaggntt cccggcatta gcgtttgaag ggcgggcacg ccagaggctc atctcgggtg 120
accagtgtcc ctgtgtttcc gcgcccgcgc gccaccatg atgcaaatct gcgacacata 180
caaccagaag cactcgcctc ttaacgccat gaatcgttc attggcggcg tgaacaaca 239

<210> 19
<211> 302
<212> DNA
<213> Rattus norvegicus

<220>
<221> misc_feature
<223> Incyte ID No.: 700225363H1

<400> 19
gtccctgtgt ttcgcgccc gctcggccac catgatgcaa atctcggaca catacaacca 60
gaagcactcg ctctttaacg ccatgaatcg cttcattggc gcggtgaaca acatggacca 120
gacgggtgatg gtgcccagtc tgctcgcgga tgtaccctcg tccgagccgg atctagacaa 180
cgaggtcagc gtggaggtag gcggcagtgg cagctgcctg gaggagcgca cgaccocggc 240
cccaagcccg ggcagcgcca atggaagcct tttcgcgccc tcccgggaca tgtacagcca 300
ct 302

<210> 20
<211> 286
<212> DNA
<213> Rattus norvegicus

<220>
<221> unsure
<222> 62, 283
<223> a or g or c or t, unknown, or other

<220>
<221> misc_feature
<223> Incyte ID No.: 700643425H1

<400> 20
ggaccagacg gtgatgggtc ccagtctgct gcgcgatgta cccctgtccg agccggatct 60
anacaacgag gtcagcgtgg aggtaggcgg cagtggcagc tgccctggagg agcgcacgac 120
cccggcccga agcccgggca gcgccaatgg aagctttttc gcgccctccc gggacatgta 180
cagccactac gtgctgctca agtccatccg caacgatatt gagtggggag tctctgacaa 240
gccttcgtcc ccgcccggctg ggagtgagga gggcacctgg aancec 286

<210> 21
 <211> 285
 <212> DNA
 <213> Rattus norvegicus

<220>
 <221> unsure
 <222> 72, 103, 154, 172, 224, 263, 264, 283
 <223> a or g or c or t, unknown, or other

<220>
 <221> misc_feature
 <223> Incyte ID No.: 700525920H1

<400> 21
 gtgctgctca agtccatcgc caacgatatt gagtggggag tctcgcacca gccttgcgtc 60
 cccgcgggct gngagtgagg agtggcacct ggaagcccaa ggcacatcctg gtgggcctga 120
 gccacttggg gagcacggat gcggggcgagg aagntctgga gcagcagttc cncctaccac 180
 tggcggggct gcacaccgtg ctctccaaac tcaccogcaa agcnaacatc cttacaaca 240
 gatacaagca ggagatcggc ttnntaatgg gggccattga ggngg 285

<210> 22
 <211> 270
 <212> DNA
 <213> Rattus norvegicus

<220>
 <221> unsure
 <222> 87
 <223> a or g or c or t, unknown, or other

<220>
 <221> misc_feature
 <223> Incyte ID No.: 700773927H1

<400> 22
 ggccaacatc cttaccaaca gatacaagca ggagatcggc ttcagtaatt ggggccactg 60
 agggcggggt gtccccgctg cccagcncct tctcgggtcg gctctaccac cccctctct 120
 ttctccaaa ctatctctt cctgggttg gggcggaag ggcacgctgt aaagttgggc 180
 tgtgtacttg gtggggtttg tgtggagaaa acagagcaga gagcagagga aatatcgcca 240
 gagagggggg ttcaaagacc cccggagggc 270

<210> 23
 <211> 283
 <212> DNA
 <213> Rattus norvegicus

<220>
 <221> misc_feature
 <223> Incyte ID No.: 700513679H1

<400> 23
 ggaactgggc cgatgtcctt cattcagcct gtgcctttct tggggtttct tttctctttt 60
 tctttccgga agagaagggc ctgagaaaagg gccatgccag ggcacagcgc tgggttgcca 120
 cacttgggag ggcagcttct agctgggtgc tcgggggagg cggggcacag cctcctgccc 180
 gccctgcttt gagctgcaag aggaggcctt ggcgttgcta ggattgcgtc agttttcctg 240
 tttgcactat ttctttttgt aacagtgacc ctgtcttaag tat 283

<210> 24
 <211> 266

```

<212> DNA
<213> Rattus norvegicus

<220>
<221> misc_feature
<223> Incyte ID No.: 700767486H1

<400> 24
tttcagatct ttttgctttg aaacttcgtc gattccattg tgataagcgc acaagcagca 60
ctgttggtaa ccggtaactac tttattaatg attttctggt acactgtaca gtagtcctat 120
ggcaccocat ccctttcagc ccaccctcc cccaccocgt gtgtgtaaac tggtagcgtg 180
ccagctagga tgaagcttgc cactcggeca gcgaaaataa taacattatt gtgagaaagt 240
ggatttatct aaagtgaac caactg 266

<210> 25
<211> 199
<212> DNA
<213> Rattus norvegicus

<220>
<221> unsure
<222> 8, 36, 40
<223> a o r g o r c o r t, unknown, or other

<220>
<221> misc_feature
<223> Incyte ID No.: 700327166H1

<400> 25
agccactngg ccagcgaaaa taataacatt attgtnagan agtggattta tctaattggaa 60
ccaactgaca ttctatctgt gttgtacgta gaatgatgaa gggctccact gttgttatat 120
gtcttgttta tttaaaactt tttttaatc cagatgtaga ctatattcta aaaaataaaa 180
gctcagatgt gttaaccac 199

<210> 26
<211> 152
<212> PRT
<213> Danio rerio

<300>
<308> g861207

<400> 26
Met Gln Met Ser Glu Pro Leu Ser Gln Lys Asn Ala Leu Tyr Thr
1 5 10 15
Ala Met Asn Arg Phe Leu Gly Ala Val Asn Asn Met Asp Gln Thr
20 25 30
Val Met Val Pro Ser Leu Leu Arg Asp Val Pro Leu Asp Gln Glu
35 40 45
Lys Glu Gln Gln Lys Leu Thr Asn Asp Pro Gly Ser Tyr Leu Arg
50 55 60
Glu Ala Glu Ala Asp Met Tyr Ser Tyr Tyr Ser Gln Leu Lys Ser
65 70 75
Ile Arg Asn Asn Ile Glu Trp Gly Val Ile Arg Ser Glu Asp Gln
80 85 90
Arg Arg Lys Lys Asp Thr Ser Ala Ser Glu Pro Val Arg Thr Glu
95 100 105
Glu Glu Ser Asp Met Asp Leu Glu Gln Leu Leu Gln Phe His Leu
110 115 120
Lys Gly Leu His Gly Val Leu Ser Gln Leu Thr Ser Gln Ala Asn
125 130 135

```

```

Asn Leu Thr Asn Arg Tyr Lys Gln Glu Ile Gly Ile Ser Gly Trp
      140      145      150
Gly Gln

```

```

<210> 27
<211> 150
<212> PRT
<213> Mus musculus

```

```

<300>
<308> g1171574

```

```

<400> 27
Met Gln Val Leu Thr Lys Arg Tyr Pro Lys Asn Cys Leu Leu Thr
  1      5      10
Val Met Asp Arg Tyr Ser Ala Val Val Arg Asn Met Glu Gln Val
  20     25     30
Val Met Ile Pro Ser Leu Leu Arg Asp Val Gln Leu Ser Gly Pro
  35     40     45
Gly Gly Ser Val Gln Asp Gly Ala Pro Asp Leu Tyr Thr Tyr Phe
  50     55     60
Thr Met Leu Lys Ser Ile Cys Val Glu Val Asp His Gly Leu Leu
  65     70     75
Pro Arg Glu Glu Trp Gln Ala Lys Val Ala Gly Asn Glu Thr Ser
  80     85     90
Glu Ala Glu Asn Asp Ala Ala Glu Thr Glu Glu Ala Glu Glu Asp
  95    100    105
Arg Ile Ser Glu Glu Leu Asp Leu Glu Ala Gln Phe His Leu His
 110    115    120
Phe Cys Ser Leu His His Ile Leu Thr His Leu Thr Arg Lys Ala
 125    130    135
Gln Glu Val Thr Arg Lys Tyr Gln Glu Met Thr Gly Gln Val Leu
 140    145    150

```

【図面の簡単な説明】

【図1A】

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

【図1B】

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

【図1C】

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

【図1D】

MACDNASIS PROソフトウェア(Hitachi Software Engineering, South San Fran

cisco CA)を用いて作成した、哺乳動物タンパク質のアミノ酸配列 (SEQ ID NO:2) をコードする核酸配列 (SEQ ID NO:1) を示す。

【図1E】

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

【図1F】

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

【図2A】

LASERGENEソフトウェア(DNASTAR, Madison WI)のマルチシーケンス・アライメント・プログラムを用いて作成した、SEQ ID NO:2と、G12 (GI 861207; SEQ ID NO:26) 及びSpot 14 (GI 1171574; SEQ ID NO:27) との間の化学的及び構造的類似性を示す。SEQ ID NO:2のアミノ酸配列の45残基から59残基までを用いて抗体を産生することが可能である。

【図2B】

LASERGENEソフトウェア(DNASTAR, Madison WI)のマルチシーケンス・アライメント・プログラムを用いて作成した、SEQ ID NO:2と、G12 (GI 861207; SEQ ID NO:26) 及びSpot 14 (GI 1171574; SEQ ID NO:27) との間の化学的及び構造的類似性を示す。SEQ ID NO:2のアミノ酸配列の45残基から59残基までを用いて抗体を産生することが可能である。

【表1】

表 1

検体 SEQ ID NO.	インサイト社 クローン番号	スクレオチド の長さ	由来	ライブラリ	残基の適用範囲	同一性 (%)
3	1479946F6	502	ヒト	CORPNOT02	1 - 502	n/a(未入手)
4	3241390F6	529	ヒト	COLAUCT01	281 - 801	n/a(未入手)
5	1432520R1	562	ヒト	BEPINON01	599 - 1178	n/a(未入手)
6	4534217H1	254	ヒト	OVARNOT12	1152 - 1414	n/a(未入手)
7	2191992H1	238	ヒト	THYRTUT03	1200 - 1437	n/a(未入手)
8	1320132T1	661	ヒト	BLADNOT04	1299 - 1957	n/a(未入手)
9	1516707T1	624	ヒト	PANCTTUT01	1445 - 2070	n/a(未入手)
10	5595953H1	252	ヒト	COLCDIT03	1592 - 1845	n/a(未入手)
11	1988906R6	302	ヒト	LUNGAST01	1851 - 2092	n/a(未入手)
12	700712962H1	144	カニクイザル	MNBNOT02	12 - 156	92.4
13	700715135H1	274	カニクイザル	MNBCNOT01	292 - 564	93.1
14	701253541H1	273	マウス	MOLUDIT07	560 - 1032	71.2
15	701252210H1	250	マウス	MOLUDIT07	1564 - 1831	81.0
16	700545683H1	272	ドブネズミ	RASPNOT01	1 - 271	52.2
17	700145292H1	257	ドブネズミ	RAPRNOT01	191 - 488	44.7
18	700861443H1	239	ドブネズミ	RABGNOT02	338 - 591	63.2
19	700225363H1	302	ドブネズミ	RAKINOT01	479 - 780	86.4
20	700643425H1	286	ドブネズミ	RABUNOT01	593 - 879	81.1
21	700525920H1	285	ドブネズミ	RABMNOT01	783 - 1066	77.2
22	700773927H1	270	ドブネズミ	RABGNOT01	1001 - 1197	54.8
23	700513679H1	283	ドブネズミ	RASNNOT01	1318 - 1594	72.1
24	700767486H1	266	ドブネズミ	RAHYNOT01	1594 - 1876	73.7
25	700327166H1	199	ドブネズミ	RASNNOT01	1813 - 2008	74.4

【 1 A 】

5' GGGCC TTT TAT CTC GGT GCT GCC GGG GGA GGC GGC AGG AGG AGA CAC CAG GGG TGG 11 20 29 38 47 56
 CCC TGA GCG CCG GCG ACA CCT TTC CTG GAC TAT AAA TTG AGC ACC TGG GAT GGG 65 74 83 92 101 110
 TAG GGG GCC AAC GCA GTC ACC GCC GTC CGC AGT CAC AGT CCA GCC ACT GAC CGC 119 128 137 146 155 164
 AGC AGC GCC CTT GCG TAC AGC CGC TTG CAG CGA GAA CAC TGA ATT GCC AAC GAG 173 182 191 200 209 218
 CAG GAG AGT CTC AAG GCG CAA GAG GAG GCC AGG GCT CGA CCC ACA GAG CAC CCT 227 236 245 254 263 272
 CAG CCA TCG CGA GTT TCC GGG CGC CAA AGC CAG GAG AAG CCG CCC ATC CCG CAG 281 290 299 308 317 326
 GGC CGG TCT GCC AGC GAG ACG AGA GTT GCC GAG GGC GGA GGA GTG CCG GGA ATC 335 344 353 362 371 380

【 1 B 】

389 CAC CGG CTA TAG CCA GGC CCC CAG CGC GGG CCT TGG AGA GCG CGT GAA 434
 CCG CCA CAC CGG CTA TAG CCA GGC CCC CAG CGC GGG CCT TGG AGA GCG CGT GAA 425
 443 GGG CAT CCC CTT GAC CCG GGC GGC CAT CCC CGT GGC CCT GCG TCC CTG CGC 488
 GGC GGG CAT CCC CTT GAC CCG GGC GGC CAT CCC CGT GGC CCT GCG TCC CTG CGC 479
 497 GTC CTC TTT AAC GCC GCG ACC ATG ATG CAA ATC TGC GAC ACC TAC AAC CAG AAG 542
 TCC AAC GTC CTC TTT AAC GCC GCG ACC ATG ATG CAA ATC TGC GAC ACC TAC AAC CAG AAG 533
 551 L F N A M N R F I G A V N N M D 596
 CAC TCG CTC TTT AAC GCC ATG AAT CGC TTC ATT GGC GCC GTG AAC AAC ATG GAC 596
 CAC TCG CTC TTT AAC GCC ATG AAT CGC TTC ATT GGC GCC GTG AAC AAC ATG GAC 587
 605 V M V V P S L L R D V V P L A D P G 650
 CAG ACG GTG ATG GTG CCC AGC ATG TTT CGC GAC GTG CCC CTG GCT GAC CCC GGG 650
 CAG ACG GTG ATG GTG CCC AGC ATG TTT CGC GAC GTG CCC CTG GCT GAC CCC GGG 641
 659 AAC GAT GTT GGC GTG GAG GTA GGC GGC AGT GGC GGC TGC CTG GAG GAG 704
 TTA GAC AAC GAT GTT GGC GTG GAG GTA GGC GGC AGT GGC GGC TGC CTG GAG GAG 704
 L D N D V G V E V G G S G G C L E E 704
 713 CCC CCA GTC CCC GAC TCG GGA AGC GCC AAT GGC AGC TTT TTC GCG CCC 758
 CGC ACG CCC CCA GTC CCC GAC TCG GGA AGC GCC AAT GGC AGC TTT TTC GCG CCC 749
 R T P P V P P D S G S A N G S F F A P 758

【 1 D 】

1145 1154 1163 1172 1181 1190
 TTT TCC TGG CTG GGC GGG AAG GGC AGA CTG CAA ACT GGG GGG CTG CGT ACC

 1199 1208 1217 1226 1235 1244
 TGC AGG AGG CGC GGT GGG GCT GCG TGG AGG AGG GGG CCA CGT GTG AGA GAG AAG

 1253 1262 1271 1280 1289 1298
 AAA ATG GTG GCC GGA GAT GGG AGG GCC CAA GGA ACC TCC TGG GAG GGG GCC TGC

 1307 1316 1325 1334 1343 1352
 ATT CTA TGT TGG TGG GAA TGG GAC TGG GCT GAC GCC CTG CAT TCA GCC TGT GCC

 1361 1370 1379 1388 1397 1406
 TTT CCT GGG GTT TCT TTT CTG TTC TTT TCG GAG GAG AGG GCC CGA GAA GGG GCC

 1415 1424 1433 1442 1451 1460
 ATA CCA GGG CGC GGC GCT GGG TTG CCA CAC TTG GGA AAG CAG CCC GGA GCT GGG

 1469 1478 1487 1496 1505 1514
 TGC TGG GGA AGG CGG GGC GCG TAG CCT CCC GCC GGC CTG CGG TTG GGC CGG TGG

【 図 1 E 】

1523 1532 1541 1550 1558 1568
 AGG CCC AGG CGT TGC TAG GAT TGC ATC AGT TTT CCT GTT TGC ACT ATT TCT TTT

1577 1586 1595 1604 1613 1622
 TGT AAC ATT GGC CCT GTG TGA AGT ATT TCG AAT CTC CTT GCT CTG AAA CTT

1631 1640 1649 1658 1667 1676
 CAG CGA TTC CAT TGT GAT AAG CGC ACA AAC AGC ACT GTC TGT CGG TAA TCG GTA

1685 1694 1703 1712 1721 1730
 CTA CTT TAT TAA TGA TTT TCT GTT ACA CTG TAT AGT AGT CCT ATG GCA CCC CCA

1739 1748 1757 1766 1775 1784
 CCC CAT CCC TTT CGT GCC ACT CCC GTC CCC ACC CCC ACC CCA GTG TGT ATA AGC

1793 1802 1811 1820 1829 1838
 TGG CAT TTC GCC AGC TTG TAC GTA GCT TGC CAC TCA GTG AAA ATA ATA ACA TTA

1847 1856 1865 1874 1883 1892
 TTA TGA GAA AGT GGA CTT AAC CGA AAT GGA ACC AAC TGA CAT TCT ATC GTG TTG

1901 1910 1919 1928 1937 1946
 TAC ATA GAA TGA TGA AGG GTT CCA CTG TTG TTG TAT GTC TTA AAT TTA TTT AAA

1955 1964 1973 1982 1991 2000
 ACT TTT TTT AAT CCA GAT GTA GAC TAT ATT CTA AAA AAT AAA AAA GCA AAT GTG

2009 2018 2027 2036 2045 2054
 TCA ACT AAA TTG GAC AAG CGT CTG GTC CTC ATT AAT CTG CCA ATG AAT GGT TTC

2063 2072 2081 2090
 GTC ATT AAA TAA AAA TCA ATT TAA TTG ATT TAC TAG CA 3'

118	G S A W K S K D I L V D L G H L E G A D A G E E D L E Q Q F	5595953
88	E D Q R R K K D T S A S - E P V R T E E S D M D L E Q L L	GI 861207
90	S E A - - E N D A A E T E E A E E D R I S E E L D L E A Q F	GI 1171574
148	H Y H L R G L H T V L S K L T R K A N I L T N R Y K Q E I G	5595953
117	Q F H L K G L H G V L S Q L T S Q A N N L T N R Y K Q E I G	GI 861207
118	H L H F C S L H H I L L T H L T R K A Q E V T R K Y Q E - - -	GI 1171574
178	F G N W G H	5595953
147	I S G W G Q	GI 861207
145	M T G Q V L	GI 1171574

【國際調查報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		In national Application No PCT/US 00/13393
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N15/12 C07K14/47 C12Q1/68 G01N33/68		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C07K C12N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) BIOSIS, WPI Data, EPO-Internal, EMBL		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE EMBL 'Online! Accession number AI466689, 16 March 1999 (1999-03-16) MARRA M.: "mg89d03.y1 Soares mouse embryo NbME13.5 14.5 Mus musculus cDNA clone" XP002146647	1-11,15
Y	abstract	12,16-18
X	DATABASE EMBL 'Online! Accession number AI265680, 17 November 1998 (1998-11-17) MARRA M.: "uj05a06.x1 Sugano mouse liver mlia Mus musculus cDNA clone " XP002146648	1-11,15
Y	abstract	12,16-18
	--- -/-	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.
* Special categories of cited documents:		
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *&* document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 6 September 2000		Date of mailing of the international search report 29/09/2000
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5618 Patentaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Gurdjian, D

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 Int'l Application No
 PCT/US 00/13393

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE EMBL 'Online! Accession number AI451837, 8 October 1998 (1998-10-08) MARRA M.: XP002146649	1-11,15
Y	abstract	12,16-18
X	DATABASE EMBL 'Online! Accession number AI322566, 29 December 1998 (1998-12-29) MARRA M.: "mi44f12.y1 Soares mouse embryo NbME13.5 14.5 Mus musculus cDNA clone" XP002146650	1-11,15
Y	abstract	12,16-18
X	DATABASE EMBL 'Online! Accession number AI386129, 29 January 1999 (1999-01-29) MARRA M.: "mq07d01.y1 Soares 2NbMT Mus musculus cDNA clone" XP002146763	1-11,15
Y	abstract	12,16-18
X	DATABASE EMBL 'Online! Accession number AAQ34768, 26 August 1996 (1996-08-26) MARRA M.: "mi44f12.r1 Soares mouse embryo NbME13.5 14.5 Mus musculus cDNA clone" XP002146651	1-11,15
Y	abstract	12,16-18
Y	CONWAY GREG: "A novel gene expressed during zebrafish gastrulation identified by differential RNA display." MECHANISMS OF DEVELOPMENT, vol. 52, no. 2-3, 1995, pages 383-391, XP000939100 ISSN: 0925-4773 cited in the application the whole document	12,16-18

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マ-コ-ト' (参考)	
C 1 2 N	1/21	C 1 2 P	21/02	C 4 C 0 8 4
	5/10	C 1 2 Q	1/68	A 4 H 0 4 5
C 1 2 P	21/02	G 0 1 N	33/15	Z
C 1 2 Q	1/68		33/50	Z
G 0 1 N	33/15		33/53	M
	33/50		33/566	
	33/53	A 6 1 P	1/16	
	33/566		3/04	
// A 6 1 K	38/00		3/06	
A 6 1 P	1/16		3/10	
	3/04		5/38	
	3/06		7/00	
	3/10		13/02	
	5/38		13/12	
	7/00		17/06	
	13/02		35/00	
	13/12	C 1 2 N	15/00	Z N A A
	17/06		5/00	A
	35/00	A 6 1 K	37/02	

(81)指定国 E P (A T , B E , C H , C Y ,
 D E , D K , E S , F I , F R , G B , G R , I E , I
 T , L U , M C , N L , P T , S E) , O A (B F , B J
 , C F , C G , C I , C M , G A , G N , G W , M L ,
 M R , N E , S N , T D , T G) , A P (G H , G M , K
 E , L S , M W , S D , S L , S Z , T Z , U G , Z W
) , E A (A M , A Z , B Y , K G , K Z , M D , R U ,
 T J , T M) , A E , A L , A M , A T , A U , A Z ,
 B A , B B , B G , B R , B Y , C A , C H , C N , C
 U , C Z , D E , D K , E E , E S , F I , G B , G D
 , G E , G H , G M , H R , H U , I D , I L , I N ,
 I S , J P , K E , K G , K P , K R , K Z , L C , L
 K , L R , L S , L T , L U , L V , M D , M G , M K
 , M N , M W , M X , N O , N Z , P L , P T , R O ,
 R U , S D , S E , S G , S I , S K , S L , T J , T
 M , T R , T T , U A , U G , U S , U Z , V N , Y U
 , Z A , Z W

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

F ターム(参考) 2G045 AA34 AA35 BB50 CB01 DA13
DA36 FB01 FB02 FB03 FB07
JA01
4B024 AA01 AA11 BA80 CA04 CA12
DA02 EA02 HA14 HA17
4B063 QA01 QA08 QA19 QQ08 QQ43
QQ52 QR32 QR35 QR55 QR62
QR77 QS25 QS34 QX02 QX07
4B064 AG01 CA19 DA01 DA13
4B065 AA90X AA93Y AB01 CA24
CA44 CA46
4C084 AA06 AA07 CA56 DC50 NA14
ZA452 ZA702 ZA752 ZA812
ZA892 ZB262 ZB272 ZC332
ZC352
4H045 AA10 AA20 BA10 CA45 EA20
EA50 FA74

专利名称(译)	脂质代谢转录因子		
公开(公告)号	JP2003501026A	公开(公告)日	2003-01-14
申请号	JP2001500755	申请日	2000-05-15
[标]申请(专利权)人(译)	洞察Genomics公司		
申请(专利权)人(译)	洞察基因组公司		
[标]发明人	ユエヘンリー カイザーマシューアール ボーグンマライアアール		
发明人	ユエ、ヘンリー カイザー、マシュー・アール ボーグン、マライア・アール		
IPC分类号	G01N33/50 A61K38/00 A61P11/16 A61P3/04 A61P3/06 A61P3/10 A61P5/38 A61P7/00 A61P13/02 A61P13/12 A61P17/06 A61P35/00 A61P35/02 C07K14/47 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12N15/12 C12P21/02 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/566		
CPC分类号	A61P11/16 A61P13/02 A61P13/12 A61P17/06 C07K14/4702		
FI分类号	A61P35/02 C07K14/47 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02.C C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.M G01N33/566 A61P11/16 A61P3/04 A61P3/06 A61P3/10 A61P5/38 A61P7 /00 A61P13/02 A61P13/12 A61P17/06 A61P35/00 C12N15/00.ZNA.A C12N5/00.A A61K37/02		
F-TERM分类号	2G045/AA34 2G045/AA35 2G045/BB50 2G045/CB01 2G045/DA13 2G045/DA36 2G045/FB01 2G045 /FB02 2G045/FB03 2G045/FB07 2G045/JA01 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA80 4B024/CA04 4B024/CA12 4B024/DA02 4B024/EA02 4B024/HA14 4B024/HA17 4B063/QA01 4B063/QA08 4B063 /QA19 4B063/QQ08 4B063/QQ43 4B063/QQ52 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QR77 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QX02 4B063/QX07 4B064/AG01 4B064/CA19 4B064 /DA01 4B064/DA13 4B065/AA90X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/CA24 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA06 4C084/AA07 4C084/CA56 4C084/DC50 4C084/NA14 4C084/ZA452 4C084/ZA702 4C084 /ZA752 4C084/ZA812 4C084/ZA892 4C084/ZB262 4C084/ZB272 4C084/ZC332 4C084/ZC352 4H045 /AA10 4H045/AA20 4H045/BA10 4H045/CA45 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74		
优先权	09/318978 1999-05-26 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)	<p>63000 111 112 113 114 115 116 117 118 119 120 121 122 123 124 125 126 127 128 129 130 131 132 133 134 135 136 137 138 139 140 141 142 143 144 145 146 147 148 149 150 151 152 153 154 155 156 157 158 159 160 161 162 163 164 165 166 167 168 169 170 171 172 173 174 175 176 177 178 179 180 181 182 183 184 185 186 187 188 189 190 191 192 193 194 195 196 197 198 199 200 201 202 203 204 205 206 207 208 209 210 211 212 213 214 215 216 217 218 219 220 221 222 223 224 225 226 227 228 229 230 231 232 233 234 235 236 237 238 239 240 241 242 243 244 245 246 247 248 249 250 251 252 253 254 255 256 257 258 259 260 261 262 263 264 265 266 267 268 269 270 271 272 273 274 275 276 277 278 279 280 281 282 283 284 285 286 287 288 289 290 291 292 293 294 295 296 297 298 299 300 301 302 303 304 305 306 307 308 309 310 311 312 313 314 315 316 317 318 319 320 321 322 323 324 325 326 327 328 329 330 331 332 333 334 335 336 337 338 339 340 341 342 343 344 345 346 347 348 349 350 351 352 353 354 355 356 357 358 359 360 361 362 363 364 365 366 367 368 369 370 371 372 373 374 375 376 377 378 379 380 381 382 383 384 385 386 387 388 389 390 391 392 393 394 395 396 397 398 399 400 401 402 403 404 405 406 407 408 409 410 411 412 413 414 415 416 417 418 419 420 421 422 423 424 425 426 427 428 429 430 431 432 433 434 435 436 437 438 439 440 441 442 443 444 445 446 447 448 449 450 451 452 453 454 455 456 457 458 459 460 461 462 463 464 465 466 467 468 469 470 471 472 473 474 475 476 477 478 479 480 481 482 483 484 485 486 487 488 489 490 491 492 493 494 495 496 497 498 499 500 501 502 503 504 505 506 507 508 509 510 511 512 513 514 515 516 517 518 519 520 521 522 523 524 525 526 527 528 529 530 531 532 533 534 535 536 537 538 539 540 541 542 543 544 545 546 547 548 549 550 551 552 553 554 555 556 557 558 559 560 561 562 563 564 565 566 567 568 569 570 571 572 573 574 575 576 577 578 579 580 581 582 583 584 585 586 587 588 589 590 591 592 593 594 595 596 597 598 599 600 601 602 603 604 605 606 607 608 609 610 611 612 613 614 615 616 617 618 619 620 621 622 623 624 625 626 627 628 629 630 631 632 633 634 635 636 637 638 639 640 641 642 643 644 645 646 647 648 649 650 651 652 653 654 655 656 657 658 659 660 661 662 663 664 665 666 667 668 669 670 671 672 673 674 675 676 677 678 679 680 681 682 683 684 685 686 687 688 689 690 691 692 693 694 695 696 697 698 699 700 701 702 703 704 705 706 707 708 709 710 711 712 713 714 715 716 717 718 719 720 721 722 723 724 725 726 727 728 729 730 731 732 733 734 735 736 737 738 739 740 741 742 743 744 745 746 747 748 749 750 751 752 753 754 755 756 757 758 759 760 761 762 763 764 765 766 767 768 769 770 771 772 773 774 775 776 777 778 779 780 781 782 783 784 785 786 787 788 789 790 791 792 793 794 795 796 797 798 799 800 801 802 803 804 805 806 807 808 809 810 811 812 813 814 815 816 817 818 819 820 821 822 823 824 825 826 827 828 829 830 831 832 833 834 835 836 837 838 839 840 841 842 843 844 845 846 847 848 849 850 851 852 853 854 855 856 857 858 859 860 861 862 863 864 865 866 867 868 869 870 871 872 873 874 875 876 877 878 879 880 881 882 883 884 885 886 887 888 889 890 891 892 893 894 895 896 897 898 899 900 901 902 903 904 905 906 907 908 909 910 911 912 913 914 915 916 917 918 919 920 921 922 923 924 925 926 927 928 929 930 931 932 933 934 935 936 937 938 939 940 941 942 943 944 945 946 947 948 949 950 951 952 953 954 955 956 957 958 959 960 961 962 963 964 965 966 967 968 969 970 971 972 973 974 975 976 977 978 979 980 981 982 983 984 985 986 987 988 989 990 991 992 993 994 995 996 997 998 999 1000</p>
-------	---

本发明提供了哺乳动物核酸序列及其片段。本发明还涉及这些核酸序列在模型系统中用于表征，诊断，评估，治疗和预防与这些哺乳动物核酸序列表达有关的状况和疾病的用途。本发明进一步提供表达载体和宿主细胞，用于产生由该哺乳动物核酸序列编码的蛋白质。