

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A) (11)特許出願公表番号

特表2003 - 521894

(P2003 - 521894A)

(43)公表日 平成15年7月22日(2003.7.22)

(51) Int. Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マコード (参考)
C 1 2 N 15/09	ZNA	A 0 1 K 67/027	2 G 0 4 5
A 0 1 K 67/027		A 6 1 K 31/7088	4 B 0 2 4
A 6 1 K 31/7088		39/00	H 4 B 0 6 3
38/00		45/00	4 B 0 6 4
39/00		48/00	4 B 0 6 5

審査請求 未請求 予備審査請求 (全144数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001 - 528209(P2001 - 528209)

(86)(22)出願日 平成12年9月25日(2000.9.25)

(85)翻訳文提出日 平成14年3月15日(2002.3.15)

(86)国際出願番号 PCT/EP00/09584

(87)国際公開番号 W001/025269

(87)国際公開日 平成13年4月12日(2001.4.12)

(31)優先権主張番号 99203140.1

(32)優先日 平成11年9月24日(1999.9.24)

(33)優先権主張国 欧州特許庁(EP)

(31)優先権主張番号 1013140

(32)優先日 平成11年9月24日(1999.9.24)

(33)優先権主張国 オランダ(NL)

(71)出願人 ソルベイ・ファ-マシユ-チカルズ・ベ-
・ブイ

オランダ・エヌエル - 1381シーピー ウエ
- スブ・シージェイバンハウテンラ-ン36

(72)発明者 デレールスニ-ダー, ウイリ

オランダ・エヌエル - 1381シーピー ウエ
- スブ・シージェイバンハウテンラ-ン36

(72)発明者 ベルガー, クラウデア

オランダ・エヌエル - 1381シーピー ウエ
- スブ・シージェイバンハウテンラ-ン36

(74)代理人 弁理士 小田島 平吉

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 新規のヒトG - タンパク質共役型受容体

(57)【要約】

本発明は、新規に同定されたポリヌクレオチド、これらによりコードされるポリペプチドおよびこれらのポリヌクレオチドおよびポリペプチドの使用、およびこれらの製造に関する。さらに具体的には、本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチドは、IGS4 - ファミリーと呼ばれるG - タンパク質共役型受容体ファミリーに関する。本発明は、これらのポリヌクレオチドおよびポリペプチドの作用の阻害または活性化、該ポリペプチドヌクレオチドを含むベクター、該ベクターを含む宿主細胞およびIGS4 - 遺伝子が過剰発現、非発現、過少発現または抑制のいずれかであるトランスジェニック動物 (ノックアウト動物) にも関する。本発明は、さらに該G - タンパク質共役型受容体ファミリーIGS4のアゴニストまたはアンタゴニストとして作用が可能な化合物をスクリーニングする方法およびなかでも精神分裂症、間欠性発作不安 (EPA) 障害、例えば強迫症 (OCD)、心的外傷後ストレス障害 (PTSD)、恐怖症およびパニック、重症抑うつ障害、双極性障害、パーキンソン病、一般不安障害、自閉症、せん妄、多発性硬化症、アルツハイマー病 / 痴呆およびその他の神経変性疾患、重症精神遅滞、運動障害、ハンチントン病、ツレット症候群、チック、振せん、ジストニー、痙攣、食欲不振、食欲

【特許請求の範囲】

【請求項1】 a) 配列番号2、配列番号4、配列番号6または配列番号8記載のIGS4ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列；

b) Centraalbureau voor Schimmelcultures (Baarn、オランダ国)における寄託番号CBS102221号または寄託番号CBS102222号内に含まれるDNA挿入物によりコードされるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、特に配列番号1、配列番号3、配列番号5または配列番号7に相当するヌクレオチド配列；

c) (a)または(b)のヌクレオチド配列に対してその全長にわたって少なくとも80% (好ましくは少なくとも90%)の配列同一性を有するヌクレオチド配列；

d) (a)または(b)または(c)のヌクレオチド配列に相補的であるヌクレオチド配列

からなる群より選ばれたヌクレオチド配列を含んでなる、単離されたポリヌクレオチド。

【請求項2】 ポリヌクレオチドが、配列番号2のIGS4ポリペプチドをコードする配列番号1内に含まれるヌクレオチド配列または配列番号4のIGS4ポリペプチドをコードする配列番号3内に含まれるヌクレオチド配列または配列番号6のIGS4ポリペプチドをコードする配列番号5内に含まれるヌクレオチド配列または配列番号8のIGS4ポリペプチドをコードする配列番号7内に含まれるヌクレオチド配列を含んでなる、請求項1記載のポリヌクレオチド。

【請求項3】 該ポリヌクレオチドが、配列番号1、配列番号3、配列番号5または配列番号7のものに対して、またはCentraalbureau voor Schimmelcultures (Baarn、オランダ国)における寄託番号CBS102221号または寄託番号CBS102222号内に含まれるDNA挿入物の配列に対して、その全長にわたって少なくとも80%が同一であるヌクレオチド配列を含んでなる、請求項1記載のポリヌクレオチド。

【請求項4】 配列番号1、配列番号3、配列番号5または配列番号7のポリヌクレオチドまたはCentraalbureau voor Schimmelcultures (Baarn、オランダ国)

ダ国)における寄託番号CBS102221号または寄託番号CBS102222号内に含まれるDNA挿入物である、請求項3記載のポリヌクレオチド。

【請求項5】 DNAまたRNAである、請求項1から4までに記載のポリヌクレオチド。

【請求項6】 IGS4ニューロメジン受容体タンパク質、好ましくは哺乳類ニューロメジン受容体タンパク質をコードし、該タンパク質がニューロメジンUに対し、好ましくはニューロメジンU-8に対し、ニューロメジンU-23に対しおよび/またはニューロメジンU-25に対し高いアフィニティ結合を示す単離されたヌクレオチド配列。

【請求項7】 IGS4ニューロメジン受容体タンパク質をコードし、該タンパク質が脳、骨格筋、小脳、精巣、脳梁、脊髄、黒質、骨髄、視床、尾状核、脳橋、側坐核、胎児脳、胃、心臓、甲状腺、肺、胸腺、前立腺および/または気管内の発現を示す、請求項6の単離されたヌクレオチド配列。

【請求項8】 IGS4ニューロメジン受容体タンパク質、好ましくは哺乳類ニューロメジン受容体タンパク質をコードし、該タンパク質がニューロメジンUに対し、好ましくはニューロメジンU-8に対し、ニューロメジンU-23に対しおよび/またはニューロメジンU-25に対し高いアフィニティ結合を示し、該タンパク質が脳、骨格筋、小脳、精巣、脳梁、脊髄、黒質、骨髄、視床、尾状核、脳橋、側坐核、胎児脳、胃、心臓、甲状腺、肺、胸腺、前立腺および/または気管内の発現を示し、そして該ヌクレオチド配列が請求項1から5までで定義されたヌクレオチド配列の群より選択されている、単離されたヌクレオチド配列。

【請求項9】 発現系が適合する宿主細胞内に存在する場合に、該発現系が、配列番号2、配列番号4、配列番号6または配列番号8のポリペプチドとまたはCentraalbureau voor Schimmelcultures (Baarn、オランダ国)における寄託番号CBS102221号または寄託番号CBS102222号内に含まれるDNA挿入物によりコードされるポリペプチドと少なくとも80%の同一性を有するアミノ酸配列を含んでなるIGS4ポリペプチドの産生が可能である、発現系を含んでなるDNAまたはRNA分子。

【請求項10】 発現系がニューロメジン受容体タンパク質、好ましくは哺乳類ニューロメジン受容体タンパク質であるアミノ酸配列を含んでなるIGS4ポリペプチドを産生することが可能であり、該タンパク質がニューロメジンUに対し、好ましくはニューロメジンU-8に対し、ニューロメジンU-23に対しおよび/またはニューロメジンU-25に対し高いアフィニティ結合を示し、そして脳、骨格筋、小脳、精巣、脳梁、脊髄、黒質、骨髄、視床、尾状核、脳橋、側坐核、胎児脳、胃、心臓、甲状腺、肺、胸腺、前立腺および/または気管内の発現を示す、該発現系を含んでなる単離されたDNAまたはRNA分子。

【請求項11】 請求項9または10の発現系を含んでなる宿主細胞。

【請求項12】 酵母細胞である、請求項11記載の宿主細胞。

【請求項13】 動物細胞である、請求項11記載の宿主細胞。

【請求項14】 請求項11から13までに記載の細胞から誘導されたIGS4受容体膜調製物。

【請求項15】 ポリペプチドの産生のために十分な条件下で請求項11から13までの宿主を培養しそして培養物からポリペプチドを回収することを含んでなる、IGS4ポリペプチドを製造するための方法。

【請求項16】 適当な培養条件下で、宿主細胞がIGS4ポリペプチドを産生するように、請求項9または10の発現系を用いて宿主細胞を形質転換またはトランスフェクションすることを含んでなる、IGS4ポリペプチドを産生する細胞を製造するための方法。

【請求項17】 配列番号2、配列番号4、配列番号6または配列番号8記載のアミノ酸配列に対してまたはCentraalbureau voor Schimmelcultures (Baarn、オランダ国)における寄託番号CBS102221号または寄託番号CBS102222号内に含まれるDNA挿入物によりコードされるポリペプチドに対してその全長にわたって少なくとも80%が同一であるアミノ酸配列を含んでなる、IGS4ポリペプチド。

【請求項18】 配列番号2、配列番号4、配列番号6または配列番号8記載のアミノ酸配列またはCentraalbureau voor Schimmelcultures (Baarn、オランダ国)における寄託番号CBS102221号または寄託番号CBS1022

22号内に含まれるDNA挿入物によりコードされるアミノ酸配列を含んでなる、請求項17記載のポリペプチド。

【請求項19】 ニューロメジン受容体タンパク質、好ましくは哺乳類ニューロメジン受容体タンパク質のアミノ酸配列を含んでなり、該タンパク質がニューロメジンUに対し、好ましくはニューロメジンU-8に対し、ニューロメジンU-23に対しおよび/またはニューロメジンU-25に対し高いアフィニティ結合を示す、単離されたIGS4ポリペプチド。

【請求項20】 ニューロメジン受容体タンパク質のアミノ酸配列を含んでなり、該タンパク質が脳、骨格筋、小脳、精巣、脳梁、脊髄、黒質、骨髄、視床、尾状核、脳橋、側坐核、胎児脳、胃、心臓、甲状腺、肺、胸腺、前立腺および/または気管内の発現を示す、請求項19記載の単離されたIGS4ポリペプチド。

【請求項21】 ニューロメジン受容体タンパク質、好ましくは哺乳類ニューロメジン受容体タンパク質のアミノ酸配列を含んでなり、該タンパク質がニューロメジンUに対し、好ましくはニューロメジンU-8に対し、ニューロメジンU-23に対しおよび/またはニューロメジンU-25に対し高いアフィニティ結合を示し、該タンパク質が脳、骨格筋、小脳、精巣、脳梁、脊髄、黒質、骨髄、視床、尾状核、脳橋、側坐核、胎児脳、胃、心臓、甲状腺、肺、胸腺、前立腺および/または気管内の発現を示し、そして該アミノ酸配列が請求項17から18までに定義されたアミノ酸配列の群より選択されている、単離されたIGS4ポリペプチド。

【請求項22】 請求項17から21までのIGS4ポリペプチドに対して免疫特異性の抗体。

【請求項23】 (a) 該受容体に対するアゴニストの治療的な有効量を患者に投与し、および/または、

(b) 配列番号2、配列番号4、配列番号6または配列番号8のIGS4ポリペプチドまたはCentraalbureau voor Schimmelcultures (Baarn、オランダ国)における寄託番号CBS102221号または寄託番号CBS102222号内に含まれるDNA挿入物によりコードされるポリペプチドをコードするヌクレオチ

ド配列に対してその全長にわたって少なくとも80%の同一性を有するヌクレオチド配列、またはインビボで該受容体活性の産生を行うような形で該ヌクレオチド配列の一つに対して相補的なヌクレオチド配列を含んでなる、単離されたポリヌクレオチドを患者に提供し、

(c) IGS4ニューロメジン受容体タンパク質、好ましくは哺乳類IGS4ニューロメジン受容体タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含んでなり、該タンパク質がニューロメジンUに対し、好ましくはニューロメジンU-8に対し、ニューロメジンU-23に対しおよび/またはニューロメジンU-25に対し高いアフィニティ結合を示す、単離されたポリヌクレオチドを患者に提供することを含んでなる、請求項17から21までのIGS4ポリペプチドの増強された活性または発現を必要とする患者の治療のための方法。

【請求項24】 (a) 該受容体に対するアンタゴニストの治療的な有効量を患者に投与し、および/または

(b) 該受容体をコードするヌクレオチド配列の発現を阻害する核酸分子を患者に投与し、および/または

(c) リガンドに関して該受容体と競合するポリペプチドの治療的な有効量を患者に投与する

ことを含んでなる、請求項17から21までのIGS4ポリペプチドの活性または発現を阻害する必要性を有する患者の治療のための方法。

【請求項25】 (a) 患者のゲノム内の該IGS4ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列内の突然変異の存在または不在を決定し、および/または

(b) 該患者から誘導された試料内のIGS4ポリペプチド発現の存在または量を分析する

ことを含んでなる、該患者内の請求項17から21までのIGS4ポリペプチドの発現または活性に関連する患者内の疾患または疾患に対する罹患性の診断のための方法。

【請求項26】 (a) IGS4ポリペプチドを産生する細胞を試験化合物と接触させ、そして

(b) 試験化合物がIGS4ポリペプチドの活性化により発生されるシグナルに

影響するかどうかを決定する

ことを含んでなる、請求項17から21までのIGS4ポリペプチドに対するアゴニストを同定するための方法。

【請求項27】 請求項26の方法により同定されるアゴニスト。

【請求項28】 IGS4ニューロメジン受容体タンパク質、好ましくは哺乳類IGS4ニューロメジン受容体タンパク質に対するアゴニストを同定するための方法であって、該タンパク質がニューロメジンUに対し、好ましくはニューロメジンU-8に対し、ニューロメジンU-23に対しおよび/またはニューロメジンU-25に対し高いアフィニティ結合を示し、

(a) IGS4ニューロメジン受容体タンパク質を産生する細胞を試験化合物と接触させ、そして

(b) 試験化合物がIGS4ニューロメジン受容体タンパク質の活性化により発生されるシグナルに影響するかどうかを決定する

ことを含んでなる方法。

【請求項29】 該アゴニストが、中枢神経系(CNS)および末梢神経系(PNS)を含む神経系の障害、胃腸系および/または心臓血管系および/または骨格筋および/または甲状腺の障害、および/または肺疾患、免疫学的疾患および尿生殖系の障害に関して有効である、請求項28記載のIGS4ニューロメジン受容体タンパク質に対するアゴニストを同定するための方法。

【請求項30】 好ましくはアゴニストが、中枢神経系(CNS)および末梢神経系(PNS)を含む神経系の障害、胃腸系および/または心臓血管系および/または骨格筋および/または甲状腺の障害、および/または肺疾患、免疫学的疾患および尿生殖系の障害に関して有効である、請求項28または29の方法により同定されるアゴニスト。

【請求項31】 (a) IGS4ポリペプチドを産生する細胞をアゴニストと接触させ、そして

(b) 該アゴニストにより発生されるシグナルが候補化合物の存在下において減少されるかどうかを決定する

ことを含んでなる、請求項17から21までのIGS4ポリペプチドに対するア

ンタゴニストを同定するための方法。

【請求項32】 請求項31の方法により同定されるアンタゴニスト。

【請求項33】 IGS4ニューロメジン受容体タンパク質、好ましくは哺乳類IGS4ニューロメジン受容体タンパク質に対するアンタゴニストを同定するための方法であって、該タンパク質がニューロメジンUに対し、好ましくはニューロメジンU-8に対し、ニューロメジンU-23に対しおよび/またはニューロメジンU-25に対し高いアフィニティ結合を示し、

(a) IGS4ニューロメジン受容体タンパク質を産生する細胞をアゴニストと接触させ、そして

(b) 該アゴニストにより発生したシグナルが候補化合物の存在下で減少するかどうかを決定する

ことを含んでなる方法。

【請求項34】 該アンタゴニストが、中枢神経系(CNS)および末梢神経系(PNS)を含む神経系の障害、胃腸系および/または心臓血管系および/または骨格筋および/または甲状腺の障害、および/または肺疾患、免疫学的疾患および尿生殖系の障害に関して有効である、請求項33記載のIGS4ニューロメジン受容体タンパク質に対するアンタゴニストを同定するための方法。

【請求項35】 好ましくはアンタゴニストが、中枢神経系(CNS)および末梢神経系(PNS)を含む神経系の障害、胃腸系および/または心臓血管系および/または骨格筋および/または甲状腺の障害、および/または肺疾患、免疫学的疾患および尿生殖系の障害に関して有効である、請求項33または34の方法により同定されるアンタゴニスト。

【請求項36】 請求項16記載の方法により製造される組換え宿主細胞またはIGS4ポリペプチドを発現するその膜。

【請求項37】 a) アミノ酸配列の配列番号2、配列番号4、配列番号6または配列番号8またはCentraalbureau voor Schimmelcultures(Baarn、オランダ国)における寄託番号CBS102221号または寄託番号CBS102222号内に含まれるDNA挿入物によりコードされるアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする核酸配列または該配列の一つの生物学的に活性な部分から本

質的になる核酸分子のコーディング部分を、高レベル遺伝子発現または遺伝子が該動物内で通常は発現されない細胞タイプ内での発現を駆動することができる調節配列と連結させ、または

b) アミノ酸配列の配列番号2、配列番号4、配列番号6または配列番号8またはCentraalbureau voor Schimmelcultures (Baarn、オランダ国)における寄託番号CBS102221号または寄託番号CBS102222号内に含まれるDNA挿入物によりコードされるアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする核酸配列または該配列の一つの生物学的に活性な部分から本質的になる核酸分子のコーディング部分を単離および操作し、そして、アミノ酸配列の配列番号2、配列番号4、配列番号6または配列番号8またはCentraalbureau voor Schimmelcultures (Baarn、オランダ国)における寄託番号CBS102221号または寄託番号CBS102222号内に含まれるDNA挿入物によりコードされるアミノ酸配列または該配列の一つの生物学的に活性な部分を有するタンパク質をコードする内在性遺伝子対立遺伝子を完全にまたは部分的に不活性化させるような方法で該動物のゲノム内に該配列を再導入する

工程を含んでなる、遺伝子的に操作したヒト以外の動物を創成する方法。

【請求項38】 (a) 請求項17から21までの1項または配列番号2、配列番号4、配列番号6および配列番号8の1個の受容体を発現する細胞、または請求項17から21までの1項または配列番号2、配列番号4、配列番号6および配列番号8の1個の該受容体の一つを含んでなる受容体膜調製物を、物質の存在および不在において標識ニューロメジンUと接触させ、そして

(b) IGS4へのニューロメジンUの結合を測定する

ことを含んでなる、物質がIGS4受容体の潜在的なリガンドであるかどうかを決定する方法。

【請求項39】 該ポリペプチドが、ニューロメジンU、好ましくはニューロメジンU-8、ニューロメジンU-23および/またはニューロメジンU-25を結合して少なくとも約 $\log EC_{50} = -6$ のアフィニティーを示すことをさらに特徴とする、請求項17から21までのいずれか記載のポリペプチド。

【請求項40】 該ポリペプチドが、ニューロメジンU、好ましくはニュー

ロメジンU - 8、ニューロメジンU - 23および/またはニューロメジンU - 25を結合して少なくとも約 $\log EC_{50} = -9$ のアフィニティーを示すことをさらに特徴とする、請求項17から21までのいずれか記載のポリペプチド。

【発明の詳細な説明】**【0001】****【発明の技術分野】**

本発明は、新規に同定されたポリヌクレオチド、これらによりコードされるポリペプチドおよびこれらのポリヌクレオチドおよびポリペプチドの使用、およびこれらの製造に関する。さらに具体的には、本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチドは、Gタンパク質共役型受容体(GPCR)に関し、これを以後IGS4と呼ぶ。IGS4は2種の多型で存在し、以後IGS4AおよびIGS4Bと呼ぶ。本発明は、これらのポリヌクレオチドおよびポリペプチドの作用の阻害または活性化、該ポリヌクレオチドを含むベクター、これらのベクターを含む宿主細胞およびIGS4遺伝子が過剰発現、非発現、過少発現および/または抑制のいずれかであるトランスジェニック動物(ノックアウト動物)にも関する。本発明は、さらに、該Gタンパク質共役型受容体IGS4のアゴニストまたはアンタゴニストとして作用できる化合物をスクリーニングするための方法、およびIGS4のコグネイトリガンドにも関する。

【0002】**【発明の背景】**

多数の医療的に重要な生物学的過程が、Gタンパク質および/または第二メッセンジャー、例えばcAMPを含むシグナル伝達経路に関与するタンパク質により媒介されることは良く証明されている(Lefkowitz, Nature 1991, 351:353-354)。本明細書中でこれらのタンパク質は、Gタンパク質と一緒に経路に関与するタンパク質と呼ばれる。これらのタンパク質の一部の例は、GPC受容体、例えばアドレナリン作動剤およびドーパミンのためのもの(Kobilka, B.K. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1987, 84:46-50; Kobilka, B.K. et al., Science, 1987, 238:650-656; Bunzow, J.R., et al., Nature, 1988, 336:783-787)、Gタンパク質自体、エフェクタータンパク質、例えばホスホリパーゼC、アデニル酸シクラーゼ、およびホスホジエステラーゼ、およびアクチュエータータンパク質、例えばタンパク質キナーゼAおよびタンパク質キナーゼC(Simon, M.I., et al., Science, 1991, 252:802-8)を含む。

【0003】

例えば、シグナル伝達の一つの形においてGPCRへのホルモン結合の際に、受容体は、ヘテロ三量体状Gタンパク質と相互作用してそしてグアニンヌクレオチド - 結合部位からGDPの分離を誘導する。グアニンヌクレオチドの正常の細胞濃度において、GTPは部位を直ちに満たす。Gタンパク質の α -サブユニットへのGTPの結合は、受容体からGタンパク質の分離およびGタンパク質の $\beta\gamma$ サブユニットへの分離を起こす。次いで、GTPを有する形は、アデニル酸シクラーゼに結合して活性化する。Gタンパク質自体により触媒されるGTPのGDPへの加水分解($\beta\gamma$ サブユニットは固有のGTPアーゼ活性を有する)は、Gタンパク質をその基底の不活性形に返還させる。 $\beta\gamma$ サブユニットのGTPアーゼ活性は、本質的には、オン/オフスイッチを制御する内部時計である。 $\beta\gamma$ サブユニットのGDP結合形は α サブユニットに対する高いアフィニティを有しそしてGDPの α サブユニットとの引き続く再結合は、系を基底状態に返還させる。このように、Gタンパク質は二重の役割、すなわち受容体からエフェクター(この例ではアデニル酸シクラーゼ)へのシグナルを中継する中間体としておよびシグナルの存続期間を制御する時計としての役割を有する。

【0004】

Gタンパク質共役型受容体の膜結合スーパーファミリーは、7個の推定膜貫通ドメインを有するとして特性化されている。ドメインは、細胞外または細胞質ループにより連結された膜貫通らせんを表すと考えられている。Gタンパク質共役型受容体は、広範囲の生物学的活性受容体、例えばホルモン、ウイルス、成長因子および神経受容体を含む。

【0005】

Gタンパク質共役型受容体ファミリーは、CNS障害の治療に使用される神経弛緩性薬剤に結合するドーパミン受容体を含む。このファミリーの成員の別の例は、カルシトニン、アドレナリン作動薬、神経ペプチドY、ソマスタチン、ニューロテンシン、ニューロキニン、カプサイシン、VIP、CGRP、CRF、CKK、ブラジキニン、ガラニン、モチリン、ノシセプチン、エンドテリン、cAMP、アデノシン、ムスカリニン作用薬、アセチルコリン、セロトニン、ヒス

タミン、トロンピン、キニン、濾胞刺激ホルモン、オプシン、内皮分化遺伝子 - 1、ロドプシン、オドラント、およびサイトメガロウイルス受容体を含むが、これらに限定はされない。

【0006】

大部分のGタンパク質共役型受容体は、機能的タンパク質構造を安定化すると考えられているジスルフィド結合を形成する最初の2個の細胞外ループのそれぞれの中に単独保存システイン残基を有する。7個の膜貫通領域は、TM1、TM2、TM3、TM4、TM5、TM6およびTM7と呼ばれる。TM5とTM6とを結合する細胞質ループは、Gタンパク質結合ドメインの主要な成分であろう。

【0007】

大部分のGタンパク質共役型受容体は、第三細胞質ループおよび/またはカルボキシ末端内に潜在的リン酸化部位を含む。数種のGタンパク質共役型受容体、例えば - アドレナリン受容体において、タンパク質キナーゼAおよび/または特定の受容体キナーゼによるリン酸化は、受容体脱感作を媒介する。

【0008】

最近、ある種のGPCRが、カルシトニン受容体様受容体と同様に、受容体活性調節タンパク質(RAMP)と呼ばれる小さい一回貫通膜タンパク質と相互作用するであろうことが発見された。GPCRとある種のRAMPとのこの相互作用は、天然のリガンドがGPCR-RAMPの組合わせに対する関連アフィニティを有しそして複合体の機能的シグナル伝達活性を調節することに決定的である(McLathie, L.M. et al., Nature (1998) 393:333-339)。

【0009】

ある種の受容体に対して、Gタンパク質共役型受容体のリガンド結合部位は、数個のGタンパク質共役型受容体膜貫通ドメインにより形成された親水性ソケットを含んでなり、そのソケットはGタンパク質共役型受容体の疎水性残基により囲まれていると考えられる。それぞれのGタンパク質共役型受容体膜貫通らせんの親水性側は内側に向き、そして極性リガンド-結合部位を形成すると考えられる。TM3は、数種のGタンパク質共役型受容体においてリガンド-結合部位、

例えばT M 3 アスパラギン酸残基を有すると考えられている。T M 5 セリン、T M 6 アスパラギンおよびT M 6 およびT M 7 フェニルアラニンまたはチロシンもリガンド結合に関係する。

【0010】

Gタンパク質共役型受容体は、ヘテロ三量体Gタンパク質により種々の細胞内酵素、イオンチャンネルおよびトランスポーターに細胞内結合できる (Johnson et al., Endoc. Rev., 1989, 10:317-331 参照)。種々のGタンパク質 サブユニットは、特定のエフェクターを優先的に刺激して種々の生物学的機能を細胞内で調節する。Gタンパク質共役型受容体の細胞質内残基のリン酸化は、ある種のGタンパク質共役型受容体のGタンパク質結合の調節のための重要な機構として同定された。Gタンパク質共役型受容体は哺乳類宿主内の多数の部位に見いだされている。

【0011】

主としてGPCRクラスの受容体は、現在既知の薬剤の半分以上を誘導した(Drews, Nature Biotechnology, 1996, 14:1516)。これは、これらの受容体が、治療標的として確立され、証明された経歴を有することを示す。明らかに、精神分裂症、間欠性発作不安(EPA)障害、例えば強迫症(OCD)、心的外傷後ストレス障害(PTSD)、恐怖症およびパニック、重症抑うつ障害、双極性障害、パーキンソン病、一般不安障害、自閉症、せん妄、多発性硬化症、アルツハイマー病/痴呆およびその他の神経変性疾患、重症精神遅滞、運動障害、ハンチントン病、ツレット症候群、チック、振せん、ジストニー、痙攣、食欲不振、食欲亢進、脳卒中、耽溺/依存/渴望、睡眠障害、テンカン、偏頭痛を含むPNS、精神医学およびCNS障害、注意散漫/活動過多障害(ADHD)、心不全、狭心症、不整脈、心筋梗塞、心肥大、低血圧、高血圧 - 例えば本態性高血圧、腎高血圧、または肺高血圧、血栓症、動脈硬化症、脳血管痙攣、クモ膜下出血、脳虚血、脳梗塞、末梢血管疾患、レイノー症を含む心血管疾患、腎臓疾患 - 例えば腎不全、異脂肪症、肥満、嘔吐、過敏性腸症候群(IBS)、炎症性腸疾患(IBD)、胃食道反射疾患(GERD)、運動性障害および遅延空胃腸症状、例えば手術後または糖尿病胃不全麻痺、および糖尿病、潰瘍 - 例えば胃潰瘍を含む胃腸

疾患、下痢、骨そしょう症を含むその他の疾患、炎症、感染症、例えば細菌、真菌、原虫およびウイルス感染症、特にH I V - 1またはH I V - 2による感染症、苦痛、ガン、化学治療誘発障害、腫瘍侵入、免疫疾患、残尿、喘息、アレルギー、関節炎、良性前立腺肥大、内毒素ショック、敗血症、真性糖尿病の合併症、および婦人科障害を含み、これらに限定はされない機能不全または疾患の予防、改善または矯正において役割を演じることができる別の受容体の同定および特性決定のための要求がある。

【0012】

【発明の要旨】

一つの態様では、本発明は、I G S 4ポリペプチド(I G S 4 AおよびI G S 4 Bポリペプチド多型を含む)、ポリヌクレオチドおよび組換え物質およびこれらの製造のための方法に関する。本発明の別の態様は、このようなI G S 4ポリペプチド、ポリヌクレオチドおよび組換え物質の使用のための方法に関する。このような使用は、なかでも精神分裂症、間欠性発作不安(E P A)障害、例えば強迫症(O C D)、心的外傷後ストレス障害(P T S D)、恐怖症およびパニック、重症抑うつ障害、双極性障害、パーキンソン病、一般不安障害、自閉症、せん妄、多発性硬化症、アルツハイマー病/痴呆およびその他の神経変性疾患、重症精神遅滞、運動障害、ハンチントン病、ツレット症候群、チック、振せん、ジストニー、痙攣、食欲不振、食欲亢進、脳卒中、耽溺/依存/渴望、睡眠障害、テンカン、偏頭痛を含むP N S、精神医学およびC N S障害、注意散漫/活動過多障害(A D H D)、心不全、狭心症、不整脈、心筋梗塞、心肥大、低血圧、高血圧 - 例えば本態性高血圧、腎高血圧、または肺高血圧、血栓症、動脈硬化症、脳血管痙攣、クモ膜下出血、脳虚血、脳梗塞、末梢血管疾患、レイノー症を含む心血管疾患、腎臓疾患 - 例えば腎不全、異脂肪症、肥満、嘔吐、過敏性腸症候群(I B S)、炎症性腸疾患(I B D)、胃食道反射疾患(G E R D)、運動性障害および遅延空胃腸症状、例えば手術後または糖尿病胃不全麻痺、および糖尿病、潰瘍 - 例えば胃潰瘍を含む胃腸疾患、下痢、骨そしょう症を含むその他の疾患、炎症、感染症、例えば細菌、真菌、原虫およびウイルス感染症、特にH I V - 1またはH I V - 2による感染症、苦痛、ガン、化学治療誘発障害、腫瘍侵入

、免疫疾患、残尿、喘息、アレルギー、関節炎、良性前立腺肥大、内毒素ショック、敗血症、真性糖尿病の合併症、および婦人科障害のための治療標的としておよび治療のための使用を含み、これに限定はされない。本発明の好ましい使用は、中枢神経系（CNS）および末梢神経系（PNS）を含む神経系の障害、胃腸系および/または心臓血管系および/または骨格筋および/または甲状腺の障害、および/または肺疾患、免疫学的疾患および尿生殖系の障害に関する。

【0013】

さらに別の態様において、本発明は、本発明により提供される物質を用いるアゴニストおよびアンタゴニストの同定のため、および同定された化合物を用いるIGS4平衡失調に関連する状態を治療する方法に関する。本発明のさらに別の態様は、不適当なIGS4活性またはレベルに関連する疾患を検出するための診断アッセイに関する。本発明のさらに別の態様は、IGS4の異常な発現または活性から起きる障害のためのモデルとして挙動する動物に基づく系に関する。本発明により同定される好ましいアゴニストまたはアンタゴニストは、中枢神経系（CNS）および末梢神経系（PNS）を含む神経系の障害、胃腸系および/または心臓血管系および/または骨格筋および/または甲状腺の障害、および/または肺疾患、免疫学的疾患および尿生殖系の障害の治療のために適するものである。

【0014】

本発明は、本発明のIGS4ポリペプチドのコグネイトリガンドの同定にも関する。該IGS4ポリペプチドへの高いアフィニティー結合は、ニューロメジンUとして知られる神経ペプチドについて知られている。

【0015】

【表1】

表1: 配列番号1および配列番号3のIGS4A-DNA

```

5' -
GGCTCAGCTTGAAACAGAGCCTCGTACCAGGGGAGGCTCAGGCCTTGGATTTTAATGTCA
GGGATGGAAAACTTCAGAATGCTTCCTGGATCTACCAGCAGAACTAGAAGATCCATTC
CAGAAACACCTGAACAGCACCGAGGAGTATCTGGCCTTCCTCTGCGGACCTCGGCGCAGC
CACTTCTTCCTCCCGTGTCTGTGGTGTATGTGCCAATTTTTGTGGTGGGGGTCAATTGGC
AATGTCCTGGTGTGCTGGTGAATCTGCAGCACCAGGCTATGAAGACGCCACCAACTAC
TACCTCTTCAGCCTGGCGGTCTCTGACCTCCTGGTCTGCTCCTTGGAAATGCCCTGGAG
GTCTATGAGATGTGGCGCAACTACCCTTTCTTGTTCGGGCCCGTGGGCTGCTACTTCAAG
ACGGCCCTCTTTGAGACCGTGTGCTTCGCCTCCATCCTCAGCATCACACCSTCAGCGTG
GAGCGCTACGTGGCCATCCTACACCCGTTCCGCGCCAAACTGCAGAGCACCCGGCGCCGG
GCCCTCAGGATCCTCGGCATCGTCTGGGGCTTCTCCGTGCTCTTCTCCCTGCCAACACC
AGCATCCATGGCATCAAGTTCCTACTTCCCAATGGGTCCCTGGTCCCAGGTTTCGGCC
ACCTGTACGGTCATCAAGCCCATGTGGATCTACAATTTTCATCATCCAGGTCACCTCCTTC
CTATTCTACCTCCTCCCATGACTGTATCAGTGTCTCTACTACCTCATGGCACTCAGA
CTAAAGAAAGACAAATCTCTTGAGGCAGATGAAGGAATGCAAATATTCAAAGACCCTGC
AGAAAATCAGTCAACAAGATGCTGTTTGTCTTGGTCTTAGTGTTCGCTATCTGTTGGCC
CCGTTCCACATTGACCGACTCTTCTTCAGCTTTGTGGAGGAGTGGAGTGAATCCCTGGCT
GCTGTGTTCAACCTCGTCCATGTGGTGTGAGGTGCTTCTTCTACCTGAGCTCAGCTGTC
AACCCATTATCTATAACCTACTGTCTCGCCGCTTCCAGGCAGCATTCCAGAATGTGATC
TCTTCTTTCCACAAACAGTGGCACTCCAGCATGACCCACAGTTGCCACCTGCCAGCGG
AACATCTTCTGACAGAATGCCACTTTGTGGAGCTGACCGAAGATATAGGTCCCAATTC
CCATGTCAGTCATCCATGCACAACCTCTCACCTCCCAACAGCCCTCTCTAGTGAACAGATG
TCAAGAACAACTATCAAAGCTTCCACTTTAACAAAACCTGAATTCCTTCAGAGCTGACT
CTCCTCTATGCCTCAAACTTCAGAGAGGAACATCCATAATGTATGCCTTCTCATATGA
TATTAGAGAGGTAGAATGGCTCTTACAACCTCATGTACCCATTGCTAGTTTTTTTTTTTAA
ATAAACGTGAAAACCTGAGAGTTAGATCTGGTTTCAAAACCCAAGACTGCCTGATTTTTAG
TTATCTTCCACTATCCTAACTGCCTCATGCCCTTCACTAGTTCATGCCAAGAACGTGA
CTGGAAAGGCATGGCACCTATACCTTGATTAATTTCCATTAATGGAAATGGTTCGTCCTG
AGTCATCTACGTTCCGAGTCAGGCTGTCACTCCTACTA - 3'

```

【0016】

【表2】

表2: 配列番号5および配列番号7のIGS4B-DNA

```

5' -
GGCTCAGCTTGAAACAGAGCCTCGTACCAGGGGAGGCTCAGGCCTTGGATTTTAATGTCA
GGGATGGAAAACTTCAGAATGCTTCCTGGATCTACCAGCAGAACTAGAAGATCCATTC
CAGAAACACCTGAACAGCACCGAGGAGTATCTGGCCTTCCTCTGCGGACCTCGGCGCAGC
CACTTCTTCTCCCGTGTCTGTGGTGTATGTGCCAATTTTGTGGTGGGGTTCATTGGC
AATGTCCTGGTGTGCCTGGTGATCTGCAGCACCGGCTATGAAGACGCCACCAACTAC
TACCTCTTCAGCCTGGCGGTCTCTGACCTCCTGGTCTGCTCCTTGAATGCCCTGGAG
GTCTATGAGATGTGGCGCAACTACCCCTTCTTGTTCGGGCCCCGTGGGCTGCTACTCAAG
ACGGCCCTCTTTGAGACCGTGTGCTTCGCCTCCATCCTCAGCATCACCACCGTCAGCGTG
GAGCGCTACGTGGCCATCCTACACCCGTTCCGCGCCAACTGCAGAGCACCCGGCGCCGG
GCCCTCAGGATCCTCGGCATCGTCTGGGGCTTCTCCGTGCTTCTCCCTGCCAACACC
AGCATCCATGGCATCAAGTTCCTACTTCCCAATGGGTCCCTGGTCCCAGGTTCCGGCC
ACCTGTACGGTCATCAAGCCCATGTGGATCTACAATTTTCATCATCCAGGTCACCTCCTTC
CTATTCTACCTCCTCCCATGACTGTCATCAGTGTCTTACTACCTCATGGCACTCAGA
CTAAAGAAAGACAAATCTCTTGAGGCAGATGAAGGGAATGCAAATATTCAAAGACCTGCG
AGAAAATCAGTCAACAAGATGCTGTTTGTCTTGGTCTTAGTGTGTTGCTATCTGTTGGCC
CCGTTCCACATGACCGACTCTTCTTCAGCTTTGTGGAGGAGTGGACTGAATCCCTGGCT
GCTGTGTTCAACCTCGTCCATGTGGTGTGAGGTGCTTATTCTACCTGAGCTCAGCTGTC
AACCCCATTTATCTATAACCTACTGTCTCGCCGCTTCCAGGCAGCATTCCAGAATGTGATC
TCTTCTTCCACAAACAGTGGCACTCCAGCATGACCCACAGTTGCCACCTGCCAGCGG
AACATCTTCTGACAGAATGCCACTTTGTGGAGCTGACCGAAGATATAGGTCCCCAATTC
CTATGTCAGTCATCCGTGCACAACTCTCACCTCCCAACAGCCCTCTCTAGTGAACAGATG
TCAAGAACAAACTATCAAAGCTTCCACTTTAACAACAACTGAATTCTTTCAGAGCTGACT
CTCCTCTATGCCTCAAACTTCAGAGAGGAACATCCCATAATGTATGCCTTCTCATATGA
AATTAGAGAGGTAGAATGGCTCTTACAACCTCATGTACCCATTGCTAGTTTTTTTTTTTA
ATAAACGTGAAAACCTGAGAGTTAGATCTGGTTTCAAAACCCAAAGACTGCCTGATTTTTAG
TTATCTTCCACTATCCTAACTGCCTCATGCCCTTCACTAGTTCATGCCAAGAACGTGA
CTGGAAAGGCATGGCACCTATACCTTGATTAATTTCCATTAATGGAAATGGTTCGTCTTG
AGTCATCTACGTTCCGAGTCAGGCTGTCACTCCTACTA-3'

```

【0017】

【表3】

表3: 配列番号9および配列番号11のIGS4A-64-DNA

```

5' -
GGCTCAGCTTGAAACAGAGCCTCGTACCAGGGGAGGCTCAGGCCTTGGATTTTAATGTCA
GGGATGGAAAACTTCAGAATGCTTCCTGGATCTACCAGCAGAAACTAGAAGATCCATTC
CAGAAACACCTGAACAGCACCCGAGGAGTATCTGGCCTTCTCTGCGGACCTCGGCGCAGC
CACTTCTTCTCCCGTGTCTGTGGTGTATGTGCCAATTTTTGTGGTGGGGTCAATTGGC
AATGTCCTGGTGTGCCTGGTGATTCTGCAGCACCAGGCTATGAAGACGCCCACTACTAC
TACCTCTTCAGCCTGGCGGTCTCTGACCTCCTGGTCTCTCCTTGGAAATGCCCTGGAG
GTCTATGAGATGTGGCGCAACTACCCTTTCTTGTTCGGGCCCGTGGGCTGCTACTTCAAG
ACGGCCCTCTTTGAGACCGTGTGCTTCGCCTCCATCCTCAGCATCACCACCGTCAGCGTG
GAGCGCTACGTGGCCATCTACACCCGTTCCGCGCCAAACTGCAGAGCACCCGGCGCCGG
GCCCTCAGGATCCTCGGCATCGTCTGGGGCTTCTCCGTGCTCTTCTCCCTGCCAACACC
AGCATCCATGGCATCAAGTTCCACTACTTCCCAATGGGTCCCTGGTCCCAGGTTCCGGCC
ACCTGTACGGTCATCAAGCCCATGTGGATCTACAATTTTCATCATCCAGGTCACCTCCTTC
CTATTCTACCTCTCCCATGACTGTCATCAGTGTCTCTACTACCTCATGGCACTCAGA
CTAAAGAAAGACAAAATCTCTTGAGGCAGATGAAGGGAATGCAAATATCAAAGACCTTGC
AGAAAATCAGTCAACAAGATGCTGTCTTTGTGGAGGAGTGGAGTGAATCCCTGGCTGCTG
TGTTCAACCTCGTCCATGTGGTGTGTCAGGTGTCTTCTTCTACCTGAGCTCAGCTGTCAACC
CCATTATCTATAACCTACTGTCTCGCCGCTTCCAGGCAGCATTCCAGAATGTGATCTCTT
CTTTCCACAAACAGTGGCACTCCAGCATGACCCACAGTTGCCACCTGCCAGCGGAACA
TCTTCTGACAGAATGCCACTTTGTGGAGCTGACCGAAGATATAGGTCCCAATTCCCAT
GTCAGTCATCCATGCACAACCTCTCACCTCCCAACAGCCCTCTCTAGTGAACAGATGTCAA
GAACAAACTATCAAAGCTTCCACTTTAACAAAACCTGAATTCTTTCAGAGCTGACTCTCC
TCTATGCCTCAAACTTCAGAGAGGAACATCCATAATGTATGCCTTCTCATATGATATT
AGAGAGGTAGAATGGCTCTTACAACCTCATGTACCCATTGCTAGTTTTTTTTTTAATAA
ACGTGAAAACCTGAGAGTTAGATCTGGTTTCAAACCCAAGACTGCCTGATTTTGTAGTTAT
CTTTCCACTATCCTAACTGCCTCATGCCCTTCACTAGTTCATGCCAAGAACGTGACTGG
AAAGGCATGGCACCTATACCTTGATTAATTTCCATTAATGGAAATGGTTCGTCCTGAGTC
ATCTACGTTCCGAGTCAGGCTGTCACTCCTACTA-3'

```

【0018】

【表4】

表4：配列番号2および配列番号4のIGS4A-タンパク質(括弧内のアミノ酸3個を含まず)

```
(MSG) MEKLNASWIYQQKLEDPFQKHLNSTEEYLAFLCGPRRSHFFLPVSVVYVPIFVVGV
IGNVLVCLVILQHQAMKTPTNYLFLSLAVSDLLVLLLGMPLEVYEMWRNYPFLFGPVGCY
FKTALFETVCFASILSITTVSVERYVAILHPPRAKLQSTRRRALRILGIVWGFSVLFSLP
NTSIHGKIKFHYFPNGSLVPGSATCTVIKPMWIYNFIIQVTSFLFYLLPMTVISVLYYLMMA
LRLKKDKSLEADEGNANIQRPCRKSVNKMLFVLVLFVAICWAPFHIDRLFFSFVEEWSES
LAAVFNLVHVVSQVFFYLSSAVNPIIYNLLSRRFQAAFQNVISSFHKQWHSQHDPQLPPA
QRNIFLTECHFVELTEDIGPQFPCQSSMHNSHLPTALSSEQMSRTNYQSFHFNK
```

【0019】

【表5】

表5：配列番号6および配列番号8のIGS4B-タンパク質(括弧内のアミノ酸3個を含まず)

```
(MSG) MEKLNASWIYQQKLEDPFQKHLNSTEEYLAFLCGPRRSHFFLPVSVVYVPIFVVGV
IGNVLVCLVILQHQAMKTPTNYLFLSLAVSDLLVLLLGMPLEVYEMWRNYPFLFGPVGCY
FKTALFETVCFASILSITTVSVERYVAILHPPRAKLQSTRRRALRILGIVWGFSVLFSLP
NTSIHGKIKFHYFPNGSLVPGSATCTVIKPMWIYNFIIQVTSFLFYLLPMTVISVLYYLMMA
LRLKKDKSLEADEGNANIQRPCRKSVNKMLFVLVLFVAICWAPFHIDRLFFSFVEEWTES
LAAVFNLVHVVSQVLFYLSSAVNPIIYNLLSRRFQAAFQNVISSFHKQWHSQHDPQLPPA
QRNIFLTECHFVELTEDIGPQFLCQSSVHNSHLPTALSSEQMSRTNYQSFHFNK
```

【0020】

【表6】

表6：配列番号10および配列番号12のIGS4B-64-タンパク質(括弧内のアミノ酸3個を含まず)

```
(MSG) MEKLNASWIYQQKLEDPFQKHLNSTEEYLAFLCGPRRSHFFLPVSVVYVPIFVVGV
IGNVLVCLVILQHQAMKTPTNYLFLSLAVSDLLVLLLGMPLEVYEMWRNYPFLFGPVGCY
FKTALFETVCFASILSITTVSVERYVAILHPPRAKLQSTRRRALRILGIVWGFSVLFSLP
NTSIHGKIKFHYFPNGSLVPGSATCTVIKPMWIYNFIIQVTSFLFYLLPMTVISVLYYLMMA
LRLKKDKSLEADEGNANIQRPCRKSVNKMLSLWRSQVNPWLLCSTSSMWCQVSSST
```

【0021】

【定義】

以下の定義は、本明細書中にしばしば使用される一部の用語の理解を助けるた

めに記載される。

【0022】

「IGS4」は、なかでも、配列番号2または配列番号4（IGS4A）および配列番号6または配列番号8（IGS4B）中に記載のアミノ酸配列を含んでなるポリペプチドまたはその変種を呼ぶ。特に好ましくはIGS4Bのポリペプチドである。

【0023】

「受容体活性」または「受容体の生物学的活性」は、該IGS4の代謝または生理的機能と呼び、同様の活性または改善された活性または低下した望ましくない副作用を有するこれらの活性を含む。該IGS4の抗原性および免疫原性活性も含まれる。

【0024】

「IGS4遺伝子」は、配列番号1、配列番号3、配列番号5または配列番号7中に記載のヌクレオチド配列を含んでなるポリヌクレオチドまたはこれらの変種および/またはこれらの相補体と呼ぶ。

【0025】

本明細書中に使用される「抗体」は、ポリクローナルおよびモノクローナル抗体、キメラ、一本鎖、および人体適応化された抗体、ならびにFab断片を含み、これにはFabまたはその他の免疫グロブリン発現ライブラリーの産生物も含まれる。

【0026】

「単離された」は、「人手により」本来（天然）の状態から改変および/または本来の環境から分離されたことを意味する。従って、本来的に存在する「単離された」組成物または物質が「単離」されると、その当初の環境から変化または移動または両方を受ける。例えば、本来的に生きた動物内に存在するポリヌクレオチドまたはポリペプチドは「単離」されていないが、しかしその本来の状態と一緒に存在する物質から分離された同じポリヌクレオチドまたはポリペプチドは「単離され」ており、このように本明細書中で用語が使用される。

【0027】

「ポリヌクレオチド」は、一般に、非修飾RNAもしくはDNAまたは修飾RNAもしくはDNAであってもよいあらゆるポリリボヌクレオチドまたはポリデオキシリボヌクレオチドを呼ぶ。「ポリヌクレオチド」は、一本鎖および二本鎖状DNA、一本鎖および二本鎖の領域の混合であるDNA、一本鎖および二本鎖状RNA、および一本鎖および二本鎖の領域の混合であるRNA、一本鎖またはさらに典型的には二本鎖または一本鎖および二本鎖の領域の混合であってもよいDNAおよびRNAを含んでなるハイブリッド分子を含むが、これに限定はされない。さらに「ポリヌクレオチド」は、RNAもしくはDNAまたはRNAおよびDNAの両方を含んでなる三本鎖領域も含んでもよい。用語ポリヌクレオチドは、1個またはそれ以上の修飾塩基を含むDNAまたはRNAおよび安定性またはその他の理由のために修飾された骨格を有するDNAまたはRNAも含む。「修飾された」塩基は、例えばトリチル化された塩基および通常ではない塩基、例えばイノシンを含む。種々の修飾がDNAおよびRNAに対して行われ、従って、「ポリヌクレオチド」は、化学的、酵素的または代謝的に修飾された、典型的に天然に見いだされるポリヌクレオチドの形、ならびにウイルスおよび細胞のDNAおよびRNA特性の化学的の形を包含する。「ポリヌクレオチド」は、しばしばオリゴヌクレオチドと呼ばれる比較的短いポリヌクレオチドも包含する。

【0028】

「ポリペプチド」は、たがいにペプチド結合または変形ペプチド結合、すなわちペプチドアイソスターで結合された2個またはそれ以上のアミノ酸を含んでなるあらゆるペプチドまたはタンパク質を呼ぶ。「ポリペプチド」は、一般にペプチド、オリゴペプチドまたはオリゴマーと呼ばれる短鎖、および一般にタンパク質と呼ばれるさらに長い鎖、および/またはこれらの組み合わせを呼ぶ。ポリペプチドは、20個の遺伝子コードアミノ酸以外のアミノ酸を含んでもよい。「ポリペプチド」は、天然の過程、例えば翻訳後プロセッシングにより、または当該技術分野では周知の化学的修飾技術のいずれかにより修飾されたアミノ酸配列を含む。このような修飾は基本的教科書中およびさらなる長大な論文中ならびに大量の研究文献中に十分に記載されている。修飾は、ペプチド骨格、アミノ酸側鎖およびアミノまたはカルボキシル末端を含むポリペプチドのあらゆる場所で起きるこ

とができる。同じ形式の修飾が、与えられたポリペプチド中の種々の部位において同一または異なる程度で存在してもよいことが認められる。また、与えられたポリペプチドは多数の形式の修飾を含んでもよい。ポリペプチドは、ユビキチン化の結果として分枝してもよく、そしてこれらは分枝を有するかまたは有していない環状であってもよい。環状、分枝状および分枝環状ポリペプチドは、翻訳後の天然のプロセッシングからもたらされてもよくまたは合成法により作製されてもよい。修飾は、アセチル化、アシル化、ADPリボシル化、アミド化、フラビンの共有結合付加、ヘム部分の共有結合付加、ヌクレオチドまたはヌクレオチド誘導体の共有結合付加、脂質または脂質誘導体の共有結合付加、ホスホチジルイノシトールの共有結合付加、架橋、環化、ジスルフィド結合形成、脱メチル化、共有結合架橋の形成、シスチンの形成、ピログルタミン酸の形成、ホルミル化、ガンマカルボキシル化、グリコシル化、GPIアンカー形成、ヒドロキシル化、ヨウ素化、メチル化、ミリストイル化、酸化、タンパク質分解プロセッシング、リン酸化、プレニル化、ラセミ化、セレノイル化、硫酸化、タンパク質へのアミノ酸のトランスファーRNA媒介付加例えばアルギニル化、およびユビキチン化を含む。例えば、「タンパク質 - 構造および分子的性質」(PROTEINS-STRUCTURE AND MOLECULAR PROPERTIES, 2nd Ed., T.E. Creighton, W.H. Freeman and Company, New York, 1993)および「翻訳後タンパク質修飾- 前途および予想」(Wold, F., Posttranslational Protein Modifications: Perspectives and Prospects, pgs. 1-12 in POSTTRANSLATIONAL COVALENT MODIFICATION OF PROTEINS, B.C. Johnson, Ed. Academic Press, New York, 1983)、「タンパク質修飾および非タンパク質補因子の分析」(Seifter et al., "Analysis for protein modifications and nonprotein cofactors", Meth. Enzymol. (1990) 182:626-646)および「タンパク質合成：翻訳後修飾および熟成」(Ratten et al., "Protein Synthesis: Posttranslational Modifications and Aging", Ann. NY Acad. Sci. (1992) 663:48-62)を参照。

【0029】

本明細書中に使用される用語としての「変種」は、比較するポリヌクレオチドまたはポリペプチドとはそれぞれ異なるが、本質的な性質、例えば本質的な生物

学的、構造的、調節的または生化学的性質は保持するポリヌクレオチドまたはポリペプチドである。ポリヌクレオチドの典型的な変種は、他の比較ポリヌクレオチドとはヌクレオチド配列が異なる。変種のヌクレオチド配列中の変化は、比較ポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチドのアミノ酸配列を改変してもしなくてもよい。ヌクレオチド変化は、アミノ酸置換、付加、欠失、融合および切断を比較配列によりコードされるポリペプチド中にもたらしてもよく、これは以下に考察する。ポリペプチドの典型的な変種は、アミノ酸配列が他の比較ポリペプチドと異なる。一般に、相違は、比較ポリペプチドおよび変種の配列が全体的には密接に類似しそして多くの領域で一致している程度に限定される。変種および比較ポリペプチドは、アミノ酸配列内であらゆる組み合わせにより1個またはそれ以上の置換、付加、および欠失で異なってもよい。置換または挿入されたアミノ酸残基は、遺伝子暗号によりコードされるものであってもなくてもよい。ポリヌクレオチドまたはポリペプチドの変種は、天然に存在する例えば対立遺伝子変種であってもよく、またはこれは天然に存在するとは知られていない変種であってもよい。ポリヌクレオチドおよびポリペプチドの非-天然存在変種は、突然変異誘発技術または直接合成により作製されてもよい。

【0030】

「同一性」は、ヌクレオチド配列またはアミノ酸配列の同一性の尺度である。一般に、配列は最高度の一致が得られるように整列される。「同一性」それ自体は、当該技術分野で認められた意味を有しそして公開された技術を用いて算出できる。例えば下記参照：「コンピューターによる分子生物学」(COMPUTATIONAL MOLECULAR BIOLOGY, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, New York, 1988); 「バイオコンピューティング: 情報学およびゲノムプロジェクト」(BIOCOMPUTING: INFORMATICS AND GENOME PROJECTS, Smith, D.W., ed., Academic Press, New York, 1993); 「配列データのコンピューター分析、第一部」(COMPUTER ANALYSIS OF SEQUENCE DATA, PART 1, Griffin, A.M., and Griffin, H.G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994); 「分子生物学における配列解析」(SEQUENCE ANALYSIS IN MOLECULAR BIOLOGY, von Heinje, G. Academic Press, 1987); および「配列解析プライマー」(SEQUENCE ANALYSIS PRIMER, Gribskov, M. and De

vereux, J., eds., M. Stockton Press, New York, 1991)。2個のパリヌクレオチドまたはポリペプチド配列の間の同一性を測定する多数の方法が存在するけれども、用語「同一性」は、当該技術分野の熟練者には周知である(Carillo, H., and Lipton, D., SIAM J. Applied Math., (1988) 48:1073)。2個の配列の間の同一性または類似性を決定するために一般的に使用される方法は、「大型コンピューターへのガイド(Guide to Huge Computers, Martin J. Bishop, ed., Academic Press, San Diego, 1994) およびCarillo, H., and Lipton, D., SIAM J. Applied Math, (1988) 48:1073 中に開示されたものを含むが、これに限定はされない。同一性および類似性を決定するための方法は、コンピュータープログラム中にコード化されている。2個の配列間の同一性および類似性を決定するための好ましいコンピュータープログラム法は、GCGプログラムパッケージ(Devereux, J. et al., Nucleic Acids Research (1984) 12(1):387)、BLASTP、BLASTN、FASTA(Atschul, S.F. et al., J. Molec. Biol. (1990) 215:403)を含むが、これに限定はされない。用語「相同」は、「同一性」に置換してもよい。

【0031】

説明として、配列番号1の比較ヌクレオチド配列に対して少なくとも例えば95%「同一性」を有するヌクレオチド配列を有するパリヌクレオチドとは、パリヌクレオチドのヌクレオチド配列が、パリヌクレオチド配列が配列番号1の比較ヌクレオチド配列のヌクレオチド100個それぞれに対して5個以下のヌクレオチド相違を含んでもよいことを除いて、比較配列と同一であることを意味する。換言すると、比較ヌクレオチド配列に対して少なくとも95%同一であるヌクレオチド配列を有すパリヌクレオチドを得るためには、比較配列中のヌクレオチドの5%以下が欠失または他のヌクレオチドにより置換されてもよいか、または比較配列中の全ヌクレオチドの5%以下の数のヌクレオチドが比較配列内に挿入されてもよいか、または比較配列内の全ヌクレオチドのいずれかの5%以下のヌクレオチドの数において欠失、挿入および置換の組み合わせがあってもよい。比較配列のこれらの変異は、比較ヌクレオチド配列の5または3末端位置においてまたはこれらの末端位置の間のいかなる位置でも、比較配列中のヌクレオチドの間

で個別に、または比較配列内の1個またはそれ以上の連続基内のヌクレオチドのいずれかに散布して起きてもよい。

【0032】

同様に、例えば、配列番号2の比較アミノ酸配列に対して少なくとも95%「同一性」を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドとは、ポリペプチド配列が配列番号2の比較配列のアミノ酸100個のそれぞれに対して5個以下のアミノ酸変化を含んでもよいことを除いてポリペプチドのアミノ酸配列が比較配列と同一であること意味する。換言すると、比較アミノ酸配列に少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を有するポリペプチドを得るためには、比較配列内のアミノ酸残基の5%以下が欠失または他のアミノ酸で置換されていてもよい、または比較配列内の全アミノ酸残基の5%以下の数のアミノ酸が比較配列中に挿入されてもよい。比較配列のこれらの変更は、比較アミノ酸配列のアミノもしくはカルボキシ末端位置においてまたはこれらの末端位置の間のあらゆる位置で、比較配列内の残基間に個別にまたは比較配列内の1個またはそれ以上の隣接基内のいずれかに散在して存在してもよい。

本発明のポリペプチド

一つの態様では、本発明は、IGS4ポリペプチド(またはIGS4タンパク質も含む)に関する。IGS4ポリペプチドは配列番号2、配列番号4、配列番号6および配列番号8のポリペプチドおよびCentraalbureau voor Schimmelcultures (Baarn、オランダ国)に1999年9月24日付けで寄託された寄託番号CBS102221号または寄託番号CBS102222号内に含まれるDNA挿入物によりコードされるアミノ酸配列を有するポリペプチド;ならびに配列番号2、配列番号4、配列番号6または配列番号8のアミノ酸配列を含んでなるポリペプチドおよびCentraalbureau voor Schimmelcultures (Baarn、オランダ国)において寄託番号CBS102221号または寄託番号CBS102222号内に含まれるDNA挿入物によりコードされるアミノ酸配列を有するポリペプチド、および配列番号2、配列番号4、配列番号6または配列番号8のものと少なくとも80%同一性を有するアミノ酸配列を含んでなるポリペプチドおよび/またはCentraalbureau voor Schimmelcultures (Baarn、オランダ国)において寄

託番号CBS102221号または寄託番号CBS102222号内に含まれるDNA挿入物によりコードされるアミノ酸配列をその全長にわたって有し、そしてさらに好ましくは、配列番号2、配列番号4、配列番号6および配列番号8に少なくとも90%同一、そしてその上にさらに好ましくは少なくとも95%同一を該アミノ酸配列と有するポリペプチドを含む。さらに、少なくとも97%同一、特に少なくとも99%同一であるものが高度に好ましい。IGS4ポリペプチド内には、配列番号2、配列番号4、配列番号6または配列番号8のアミノ酸配列を有するポリペプチドと少なくとも80%同一性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドまたはCentraalbureau voor Schimmelcultures (Baarn、オランダ国)において寄託番号CBS102221号または寄託番号CBS102222号内に含まれるDNA挿入物によりコードされるアミノ酸配列をその全長にわたって有し、そしてさらに好ましくは、配列番号2、配列番号4、配列番号6または配列番号8に少なくとも90%同一、そしてその上にさらに好ましくは少なくとも95%同一性を有するポリペプチドも含む。さらに、少なくとも97%同一、特に少なくとも99%同一であるものが高度に好ましい。好ましくは、IGS4ポリペプチドは受容体の少なくとも一つの生物学的活性を示す。

【0033】

本発明の別の態様では、IGS4ポリペプチドは、さらに大きいタンパク質、例えば融合タンパク質の一部であってもよい。分泌またはリーダー配列、プロ配列、精製において支援する配列、例えば重複ヒスチジン残基を含む追加のアミノ酸配列、検出を支援する配列、例えば抗原性ペプチドタグ(例えばヘマグルチニン(HA)タグ)または組換え物産生のための追加の配列を含むとしばしば有利である。

【0034】

IGS4ポリペプチドの断片も本発明中に含まれる。断片とは、上記のIGS4ポリペプチドのアミノ酸配列の一部ではあるが全体ではないものと同様のアミノ酸配列を有するポリペプチドである。IGS4ポリペプチドと同様に、断片は「自立」、すなわちこれらが部分または領域を形成するさらに大きいポリペプチド内で、最も好ましくは単独の連続領域を含んでなってもよい。本発明のポリ

ペプチド断片の代表的な例は、例えば、IGS4ポリペプチドのアミノ酸番号約1-20、21-40、41-60、61-80、81-100、および101から末端までよりの断片を含む。この範囲内で、「約」は一方または両端のいずれかにおける数個、5、4、3、2または1個のアミノ酸ほど大きいかまたは小さい特定の列挙の範囲を含む。

【0035】

好ましい断片は、例えば、アミノ末端を含む残基の一連の連続物もしくはカルボキシ末端を含む残基の一連の連続物の欠失、またはアミノ末端を含むものおよびカルボキシ末端を含むものの残基の2個の連続物の欠失を除き、IGS4ポリペプチドのアミノ酸配列を有する末端切断ポリペプチドを含む。本発明による末端切除ポリペプチドの例は、それぞれ配列番号9ならびに配列番号11のポリペプチドによりコードされる配列番号10および配列番号12のポリペプチドである。構造的または機能的属性、例えばアルファらせんおよびアルファらせん形成性領域、ベータシートおよびベータシート形成性領域、ターンおよびターン形成性領域、コイルおよびコイル形成性領域、親水性領域、疎水性領域、アルファ両性領域、ベータ両性領域、フレキシブル領域、表面形成性領域、基質結合領域、および高抗原指数領域を含んでなる断片により特徴付けられる断片も好ましい。その他の好ましい断片は、生物学的活性の断片である。生物学的活性の断片は、受容体活性を媒介するものであり、類似した活性もしくは改善された活性を有するか、または低下した望ましくない活性を有するものを含む。動物中特にはヒト中で抗原性または免疫原性であるものも含まれる。

【0036】

従って、本発明のポリペプチドは、配列番号2、配列番号4、配列番号6または配列番号8のものと少なくとも80%同一であるアミノ酸配列を有するポリペプチドおよび/またはCentraalbureau voor Schimmelcultures (Baarn、オランダ国)において寄託番号CBS102221号または寄託番号CBS102222号内に含まれるDNA挿入物によりコードされるアミノ酸配列を有するポリペプチド、または相当する断片に少なくとも80%同一であるこれらの断片を含む。好ましくは、これらのポリペプチド断片のすべては、抗原活性を含む受容体の

生物学的活性を保持する。定義された配列および断片の変種も本発明の一部を形成する。好ましい変種は、保存的アミノ酸置換により比較物とは異なるもの、すなわち別または類似した特性の残基を置換するものである。典型的なこのような置換は、Ala、Val、LeuおよびIleの間、SerとThrとの間、酸残基AspとGluとの間、AsnとGlnとの間、および塩基性残基LysとArgとの間、または芳香族残基PheとTyrとの間である。特に好ましくは、数個、5～10個、1～5個または1～2個のアミノ酸が、いずれかの組み合わせで置換、欠失、または追加されている変種である。

【0037】

本発明のポリペプチドに関して、これらがニューロメジンUに対して、特にニューロメジンU-8(8アミノ酸のオリゴペプチド)、ニューロメジンU-23(23アミノ酸のオリゴペプチド)および/またはニューロメジンU-25(25アミノ酸のオリゴペプチド)に対して高いアフィニティー結合を示すことが見いだされた。本発明の範囲内で、用語「高いアフィニティー」は、少なくとも-6.00以下(約600nM)のlogEC₅₀値、好ましくは-7.00以下(約55nM)のlogEC₅₀値、さらに好ましくは-9.00以下(約500pM～1.2nM)のlogEC₅₀値、そして最も好ましくは-10.00以下(約50～100pM)のlogEC₅₀値を示すリガンド結合を記述すると理解される。

【0038】

神経ペプチドニューロメジンUの2種の形、ニューロメジンU-8およびニューロメジンU-25は、文献中に子宮刺激性および高血圧性ペプチドとして記載され(Minamino et al., (1985), Biochem. Biophys. Res. Commun. 130:1078-1085)、最初にブタ脊髄から単離された。23アミノ酸のオリゴペプチドであるニューロメジンU-23に関しては、例えば、Okimura et al., Pept. Chem.(1995), Vol. Date 1994, 32:321-324; Salmon et al., J. Biol. Chem. (2000), 275(7), 4549-4554参照のこと。ニューロメジンU(NMU)は、その後、多数の種類、例えばラット(NMU-23)、ヒト(NMU-25)、カエル(NMU-25)、イヌ(NMU-8およびNMU-25)、ラビット(NMU-25)、お

よびチキン (NMU - 25) から単離された。これにより、Domin et al., は、特異性ラジオイムノアッセイを用いるラット、ブタ、モルモットおよびヒト組織抽出物中のニューロメジンU様免疫反応性の特性化を記載した(1986, Biochem. Biophys. Res. Commun. 140:1127-34)。ラット回腸からのニューロメジンU - 23の一次構造をColon et al. (1988, J. Neurochem. 51:988-911) が確定した。Minamino et al. (1988, Biochem. Biophys. Res. Commun. 156:355-360)は、主として免疫アフィニティークロマトグラフィーおよびラジオイムノアッセイをブタニューロメジンU - 8に対して用いて小腸からラットニューロメジンUを単離し、そしてラットニューロメジンUのアミノ酸配列をマイクロ配列分析により決定しそして構造を合成して確認した。ブタニューロメジンUのC - 末端ヘプタペプチドアミド構造は完全にラットニューロメジンU中でも保存されているけれども、ペプチドの残部は、ブタニューロメジンUと比較してアミノ酸9個の交替およびアミノ酸2個の欠失を示した。ニューロメジンUの分布、一次構造、および相対的生物学的活性は、カエル類のラナ・テンポラリア(*Rana temporaria*)においてDomin et al. (1989, J. Biol. Chem. 264:20881-20885) により決定され、全体の配列がブタおよびラットの両者のニューロメジンUと著しい配列類似性を示すイコサペプチドであることを示した。別の研究Domin et al.(1992, Regul. Pept. 41:1-8) では、チキンからのニューロメジンUの鳥類相同体が精製された。マイクロ配列分析は、ペプチドがアミノ酸残基25個の長さであり、そしてチキンニューロメジンUはブタペプチドとその生物作用活性C - 末端領域で著しい配列類似性を示すと特徴付けられた。イヌニューロメジンU - 25の単離、構造特性決定および薬剤活性は、O'Hara et al. (1991 Peptides 12:11-15)により記載された。さらに、ラビットニューロメジンU - 25に対して、これが翻訳後プロセシング部位の保存が欠損していることが見いだされた(Kage et al., 1991, Regul. Pept. 33:191-198) 。従って、ラビットニューロメジンU内で、ブタおよびイヌニューロメジンU - 25内で見いだされたArg 16 - Arg 17の2塩基残基プロセシング部位はArg - Glyにより置換されているが、しかしこの潜在的な単一塩基プロセシング部位は腸内の切断酵素により利用されないことが見いだされた。

【0039】

研究した種の中で、ペプチドのC - 末端における5アミノ酸は、ほとんどすべて保存されていることが見いだされ、この領域が大きい重要性を有することを示唆する。従って、哺乳類ニューロメジンは、共通のC - 末端配列「- P h e - L e u - P h e - A r g - P r o - A r g - A s n - アミド」を共有し、これは生物学的活性にとって本質的であると考えられる。NMUは胃腸管内および中枢神経系(CNS)内の両方に存在する。ラット内では、ニューロメジン(NMU)の最高濃度は回腸内で見いだされ、次いで下垂体、視床下部、脊髄、甲状腺、および尿生殖管内であった。免疫組織学的研究は、内臓内のNMU免疫活性が神経繊維内、主として筋層間および粘膜下神経叢内、および胃を除くすべての粘膜内のみ見いだされ、一方内分泌細胞内にはNMU免疫活性が見いだされないことを示した。ラット脳内では、NMU免疫活性は、小脳を除く脳の繊維内に広く見いだされた。NMU前駆体をコードするヒトおよびラット遺伝子が単離された。両方共にC - 末端およびその他の潜在的なペプチド産物をでは中間部分においてNMUをコードする(Lo et al., 1992, J. Mol. Endocrinol. 6:1538-1544; Austin et al., 1995, J. Mol. Endocrinol. 14:157-169)。高いアフィニティーNMU結合は、ラット子宮内で検出され、そしてGTP - Sに感受性であることが分かり(Nandha et al., 1993, Endocrinology 133:483-486)、これはNMUのための受容体がG - タンパク質共役型受容体であろうと示唆する。しかしながら、NMUの生理学的役割はほとんど未知である。ニューロメジンUは、平滑筋の強力な収縮を起こし、動脈血圧を上昇させ、腸管イオン輸送を変性し、そして低い量では副腎皮質の機能および成長を刺激する。NMUは、上部腸動脈および門脈内の血流を低下させ、一方脾臓組織内で血流をわずかに増加させることも示された。

【0040】

さらに、国際特許出願WO90/01330号によると、ニューロメジンU - 8およびU - 25は、胃腸の障害の治療に適合、例えば、胃腸管への血流の選択的低下、胃腸出血および食後高血圧の治療に有用であると記載されている。

【0041】

本発明のIGS4ポリペプチドは、ニューロメジンUに対応するG-タンパク質共役型受容体としてまたはこれに十分に類似したリガンドとして同定された。従って、IGS4受容体、特にニューロメジンUに対応するIGS4B受容体は、ニューロメジンUおよびこれに十分に類似した他のリガンド、ならびに関連疾患の生理学的機構の理解を大いに援助となる。

【0042】

本発明のポリペプチドの組織分布および発現レベルは図5～8に示され、これから熟練した専門家は、発現の定位および関連性を推測できる。例えば、本発明のポリペプチドの組織分布に関して、例えば、特に本発明のIGS4ポリペプチドが中程度のレベル(MTEプロットでは精巣内の発現を100%とし、定量的RT-PCR分析では脊髄内を100%としてそれぞれ比較)で例えば脳、骨格筋、小脳、胸腺、骨髄、甲状腺、気管、視床、黒質、脳梁、尾状核、脳橋、側坐核、胎児脳および胃内、および意味があるレベル(定量的RT-PCR分析で検出できる場合に)で心臓、肺および前立腺内で発現されることが、MTE(多重組織発現)分析、ノーザンプロット分析および定量的RT-PCR発現分析により見いだされた。例えば、精巣または脊髄内での発現値の少なくとも20%が最高発現(100%と設定)とは遠いと考えられる場合に、発現レベルは中程度と考えられる。例えば発現が少なくとも定量的RT-PCR分析により検出できた場合に、発現レベルは意味があると考えられる。あらゆる器官で示された発現レベルは、器官を構成する特定の組織および細胞タイプ内の発現レベルの平均値であると考えられる。従って、発現レベルが器官に関して丁度意味があると思われた場合に、これは、特定の領域内、例えば器官の特定の組織および/または細胞タイプにおける局所的な中程度あるいは高い発現レベルでも必ずしも除外するものではない。

【0043】

これらの結果は、IGS4ポリペプチドが好ましくは中枢神経系(CNS)および末梢神経系(PNS)を含む神経系内、胃腸系内および/または心臓血管系内および/または骨格筋内および/または甲状腺内、および/または肺疾患、免疫学的疾患および尿生殖器官系の障害において役割を演ずることを示唆する。

【0044】

従って、本発明の別の態様は、ニューロメジン受容体タンパク質、好ましくは哺乳類ニューロメジン受容体タンパク質のアミノ酸配列を含んでなる単離されたIGS4ポリペプチドに関し、該タンパク質はニューロメジンUに対し、好ましくはニューロメジンU-8に対し、ニューロメジンU-23に対しおよび/またはニューロメジンU-25に対し高いアフィニティー結合を示す。特に、ニューロメジン受容体タンパク質のアミノ酸配列を含んでなる単離されたIGS4ポリペプチドは、脳、骨格筋、小脳、精巣、脳梁、脊髄、黒質、骨髄、視床、尾状核、脳橋、側坐核、胎児脳、胃、心臓、甲状腺、肺、胸腺、前立腺および/または気管内での発現(ノーザンおよび/またはMTEおよび/または定量的RT-PCR分析により少なくとも検出なものを)を示すタンパク質である。この態様の變形において、本発明は、ニューロメジン受容体タンパク質、好ましくは哺乳類ニューロメジン受容体タンパク質のアミノ酸配列を含んでなる単離されたIGS4ポリペプチドに関し、該タンパク質はニューロメジンUに対し、好ましくはニューロメジンU-8に対し、ニューロメジンU-23に対しおよび/またはニューロメジンU-25に対し高いアフィニティー結合を示し、該タンパク質は脳、骨格筋、小脳、精巣、脳梁、脊髄、黒質、骨髄、視床、尾状核、脳橋、側坐核、胎児脳、胃、心臓、甲状腺、肺、胸腺、前立腺および/または気管内での発現(ノーザンおよび/またはMTEおよび/または定量的RT-PCR分析により少なくとも検出なものを)を示し、そして該アミノ酸配列は上記にすでに定義したアミノ酸配列の群より選ばれる。

【0045】

本発明のIGS4ポリペプチドは、あらゆる適当な方法で作製できる。このようなポリペプチドは、単離された天然に存在するポリペプチド、組換え作製されたポリペプチド、合成して作製されたポリペプチド、またはこれらの方法の組み合わせで作製されたポリペプチドを含む。このようなポリペプチドの作製方法は、当該技術分野では周知である。

本発明のポリヌクレオチド

本発明の別の態様はIGS4ポリヌクレオチドに関する。IGS4ポリヌクレ

オチドは、IGS4ポリペプチド(IGS4AおよびIGS4Bを含む)および断片をコードする単離されたポリヌクレオチド、およびこれに密接に関連するポリヌクレオチドを含む。さらに具体的には、本発明のIGS4ポリヌクレオチドは、配列番号2または配列番号4のIGS4Aポリペプチドおよび配列番号6または配列番号8のIGS4Bポリペプチドをそれぞれコードする配列番号1、配列番号3、配列番号5または配列番号7中に含まれるヌクレオチド配列を含んでなるポリヌクレオチド、配列番号1、配列番号3、配列番号5または配列番号7の特定の配列を有するポリヌクレオチドおよびCentraalbureau voor Schimmelcultures (Baarn、オランダ国)において寄託番号CBS102221号および寄託番号CBS102222号内に含まれるDNA挿入物に本質的に相当するポリヌクレオチドを含む。

【0046】

IGS4ポリヌクレオチドは、配列番号2、配列番号4、配列番号6または配列番号8のIGS4ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列に対してその全長にわたって少なくとも80%同一性を有するヌクレオチド配列を含んでなるポリヌクレオチド、配列番号1、配列番号3、配列番号5または配列番号7のものにその全長にわたって少なくとも80%同一であるヌクレオチド配列を含んでなるポリヌクレオチドおよびCentraalbureau voor Schimmelcultures (Baarn、オランダ国)において寄託番号CBS102221号および寄託番号CBS102222号内に含まれるDNA挿入物に本質的に相当するポリヌクレオチドをさらに含む。

【0047】

これに関して、少なくとも90%同一のポリヌクレオチドが特に好ましく、そして少なくとも95%同一のものがさらに好ましい。さらに、少なくとも97%のものが高度に好ましく、少なくとも98-99%のものが最も高度に好ましく、少なくとも99%のものが最も好ましい。IGS4ポリヌクレオチドとして、配列番号1、配列番号3、配列番号5または配列番号7内に含まれるヌクレオチド配列に対しましてCentraalbureau voor Schimmelcultures (Baarn、オランダ国)において寄託番号CBS102221号および寄託番号CBS102222

号内に含まれるDNA挿入物に対して十分な同一性を有するヌクレオチド配列も、増幅のためまたはプローブまたはマーカーとしての使用のために使用可能な条件下でハイブリダイズするために含まれる。本発明は、これらのIGS4ポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチドも提供する。

【0048】

本発明のIGS4は、Gタンパク質共役型受容体ファミリーの他のタンパク質に構造的に関連し、これは公開データベース中のBLASTサーチの結果により示される。表1のアミノ酸配列(配列番号2)は、約46%同一性(BLAST使用、Altschul S.F. et al., [1997], Nucleic Acids Res. 25:3389-3402)をその長さの大部分(316アミノ酸残基)において、ヒトオーファンG-タンパク質共役型受容体(受入(Accession)番号#O43664, Tan et al., Genomics 52(2):223-229(1998))と有する。27%相同(アミノ酸残基61-349にわたって)をラットニューロテンシン1受容体(受入番号#P20789, Tanaka et al., Neuron 4:847-854(1990))と有する。表1のヌクレオチド配列(配列番号1)は、約63%同一性がオーファンG-タンパク質共役型受容体と、ヌクレオチド残基120-864にある(受入番号#AF044600、タンパク質配列O43664に相当)。さらに、53%同一性がヒト成長ホルモン分泌促進物質と残基94-1137にわたってある(Howard A.D. et al., Science 273:974-977(1996))。従って、本発明のIGS4ポリペプチドおよびポリヌクレオチドは、なかでもこれらの相同ポリペプチドおよびポリヌクレオチドに類似した生物学的機能/性質を有すると予想され、そしてこれらの有用性は当該技術分野のすべての熟練者には明白である。

【0049】

本発明のポリヌクレオチドは、天然資源、例えばゲノムDNAから得ることができる。特に、縮重(degenerated)PCRプライマーは、特定のGPCR遺伝子サブファミリー内で保存された領域をコードするように設計できる。縮重プライマーを用いるゲノムDNAまたはcDNA上のPCR増幅反応は、考慮している遺伝子ファミリーの数種のメンバー(公知および新規の両方)の増幅をもたらす(ゲノム鋳型を用いる場合には、縮重プライマーは同じエクソン内に位置しなけ

ればならない) (Libert et al., Science, 1989, 244:569-572)。本発明のポリヌクレオチドは、周知で商業的に利用できる技術を用いて合成もできる(例えばF.M. Ausbel et al. 2000, Current Protocols in Molecular Biology)。

【0050】

配列番号2、配列番号4、配列番号6または配列番号8のIGS4ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列は、配列番号1(ヌクレオチド番号55~1299)または配列番号3(ヌクレオチド番号64~1299)、または配列番号5(ヌクレオチド番号55~1299)または配列番号7(ヌクレオチド番号64~1299)中にそれぞれ含まれる配列をコードするポリペプチドと一致してもよいが、またはこれは、遺伝子コードの重複(縮重)の結果として、配列番号1、配列番号3、配列番号5または配列番号7内に含まれるポリペプチドをコードする配列と比較して変化を示す異なるヌクレオチド配列であってもよいが、しかしそれぞれ配列番号2、配列番号4、配列番号6または配列番号8のポリペプチドもコードする異なるヌクレオチド配列であってもよい。

【0051】

本発明の別の態様は、IGS4ニューロメジン受容体タンパク質をコードし、好ましくは哺乳類ニューロメジン受容体タンパク質をコードする単離されたヌクレオチド配列に関し、該タンパク質は、ニューロメジンUに対し、好ましくはニューロメジンU-8に対し、ニューロメジンU-23に対しおよび/またはニューロメジンU-25に対し高いアフィニティー結合を示す。特に、単離されたヌクレオチド配列は、脳、骨格筋、小脳、精巣、脳梁、脊髄、黒質、骨髄、視床、尾状核、脳橋、側坐核、胎児脳、胃、心臓、甲状腺、肺、胸腺、前立腺および/または気管内で発現(ノーザンおよび/またはMTEおよび/または定量的RT-PCRを用いて少なくとも検出可能であるもの)を示すタンパク質であるIGS4ニューロメジン受容体タンパク質をコードする。この態様の変形では、本発明は、IGS4ニューロメジン受容体タンパク質をコードする、好ましくは哺乳類ニューロメジン受容体タンパク質をコードする単離されたヌクレオチド配列に関し、該タンパク質は、ニューロメジンUに対し、好ましくはニューロメジンU-8に対し、ニューロメジンU-23に対しおよび/またはニューロメジンU

- 25 に対し高いアフィニティー結合を示し、該タンパク質が、脳、骨格筋、小脳、精巣、脳梁、脊髄、黒質、骨髄、視床、尾状核、脳橋、側坐核、胎児脳、胃、心臓、甲状腺、肺、胸腺、前立腺および/または気管内で発現(ノーザンおよび/またはMTEおよび/または定量的RT-PCRを用いて少なくとも検出可能であるもの)を示し、そして該ヌクレオチド配列は上記にすでに定義したヌクレオチド配列の群より選ばれたヌクレオチド配列である。

【0052】

本発明のポリヌクレオチドがIGS4ポリペプチドの組換え産生に使用される場合には、ポリペプチドは成熟ポリペプチドのためのコーディング配列またはその断片それ自体、成熟ポリペプチドのためのコーディング配列または他のコーディング配列を有する読み取り枠内の断片、例えばリーダーまたは分泌配列、プレ-、またはプロ-またはプレプロ-タンパク質配列またはその他の融合ペプチド部分をコードするものを含んでもよい。例えば、融合ポリペプチドの精製を容易とするマーカー配列がコードされることができ、本発明のこの実施におけるある好ましい態様では、マーカー配列はヘキサ-ヒスチジンペプチドであり、これはpQEベクター(Qiagen, Inc.)内に提供され、そしてGentz et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1989) 86:821-824に記載されており、またはHAタグである。ポリヌクレオチドは、非-コーディング5'および3'配列、例えば転写された非-翻訳配列、スプライシングおよびポリアデニル化シグナル、リボソーム結合部位およびmRNAを安定化する配列を含んでもよい。

【0053】

さらに好ましい態様は、その中で数個、5-10、1-5、1-3、1-2または1個のアミノ酸残基があらゆる組み合わせで置換、欠失または付加された、配列番号2、配列番号4、配列番号6または配列番号8のIGS4ポリペプチドのアミノ酸配列を含んでなるIGS4変種をコードするポリヌクレオチドである。

【0054】

本発明のポリヌクレオチドは、遺伝子産物のクローニング、プロセッシング、および/または発現の変化を含むが、これに限定はされない種々の目的のためにI

GS4コード化配列を改変するために、当該技術分野では一般に公知の方法を用いて操作することができる。ランダムフラグメンテーションによるDNAシャフリングおよび遺伝子断片および合成オリゴヌクレオチドのPCR再構築を、ヌクレオチド配列を操作するために使用してもよい。例えば、オリゴヌクレオチド媒介の部位指定突然変異誘発は、アミノ酸置換の創成、新規の制限部位の創成、修飾（例えばグリコシル化またはリン酸化）パターンの改変、コドン優先の変化、スプライス変種の製造などの変異を導入するために使用してもよい。

【0055】

本発明は、さらに、本明細書中に以上に記載した配列にハイブリダイズするポリヌクレオチドに関する。これに関して、本発明は、ストリンジентな条件下で本明細書中に以上に記載したポリヌクレオチドにハイブリダイズするポリヌクレオチドに特に関する。本明細書中に使用される用語「ストリンジент条件」は、少なくとも80%、そして好ましくは少なくとも90%、そしてさらに好ましくは少なくとも95%、それ以上に好ましくは少なくとも97%、特に少なくとも99%の一致が配列間で存在する場合にのみハイブリダイゼーションが起きることを意味する。

【0056】

配列番号1、配列番号3、配列番号5または配列番号7またはその断片中に含まれるヌクレオチド配列に一致または十分に同一である本発明のポリヌクレオチドは、cDNAおよびゲノムDNAのためのハイブリダイゼーションプローブとして、全長cDNAとIGS4をコードするゲノムクローンとを単離しそしてIGS4遺伝子に高度の配列類似性を有する他の遺伝子（ヒト以外の種からの相同体またはオルソログ体をコードする遺伝子を含む）のcDNAおよびゲノムクローンを単離するために使用してもよい。当該技術分野の熟練者は、このようなハイブリダイゼーション技術を熟知している。典型的にはこれらのヌクレオチド配列は、比較物のものと80%同一、好ましくは90%同一、さらに好ましくは95%同一である。プローブは、一般に、少なくとも5個のヌクレオチド、そして好ましくは少なくとも8個のヌクレオチド、そしてさらに好ましくは少なくとも10個のヌクレオチド、もっと好ましくは少なくとも12個のヌクレオチド、特

には少なくとも15個のヌクレオチドを含んでなる。最も好ましくは、このようなプローブは少なくとも30個のヌクレオチドを有しそして少なくとも50個のヌクレオチドを有してもよい。特に好ましいプローブは、30から50個の範囲内のヌクレオチドである。

【0057】

一つの態様は、ヒト以外の種からの相同体またはオルソログ体を含むIGS4ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを得るために、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で、配列番号1、配列番号3、配列番号5または配列番号7またはその断片を有する標識プローブを用いる適当なライブラリーのスクリーニング、および全長DNAならびに該ポリヌクレオチド配列を含むゲノムクローンを単離する段階を含んでなる。このようなハイブリダイゼーション技術は当該技術分野の熟練者には周知である。ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件は、上記に定義されたもの、または42 で、50%ホルムアミド、5xSSC(150mM NaCl、15mMクエン酸三ナトリウム)、50mMリン酸ナトリウム(pH7.6)、5xデンハート溶液、10%硫酸デキストラン(w/v)、および20μg/ml変性せん断サケ精子DNAを含む溶液中で一晩インキュベーションし、次いで0.1xSSC中、約65 でフィルターを洗浄する条件と定義される。

【0058】

本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチドは、動物およびヒト疾患に対する治療法および診断法の発見のための研究用試薬および材料として使用してもよい。

ベクター、宿主細胞、発現

本発明は、ポリヌクレオチドまたは本発明のポリヌクレオチドを含んでなるベクター、および本発明のベクターを用いて遺伝子的に操作された宿主細胞および組換え技術による本発明のポリペプチドの産生にも関する。細胞を含まない翻訳系も、本発明のDNA構築物から誘導されたRNAを用いるこのようなタンパク質の産生に使用できる。

【0059】

組換え産生のために、宿主細胞は、本発明のポリヌクレオチドのための発現系またはこれらの部分を組み込むために遺伝子的に操作できる。宿主細胞内へのポリヌクレオチドの導入は、多数の標準的実験マニュアル、例えば「分子生物学における基本的方法」(Davis et al., BASIC METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY(1986))および「分子クローニング：実験マニュアル」(Sambrook et al., MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989))に記載された方法、例えばリン酸カルシウムトランスフェクション、DEAE-デキストラン媒介トランスフェクション、トランスヴェクション(transvection)、マイクロ注入、カチオン性脂質媒介トランスフェクション、電気穿孔法、形質導入、スクレイプ負荷(scrape loading)、バリスティック導入(Ballistic introduction)または感染により行うことができる。

【0060】

適当な宿主の代表的な例は、細菌細胞、例えば連鎖球菌属、ブドウ状球菌、大腸菌、ストレプトミセス属および枯草菌細胞、真菌細胞、例えば酵母細胞およびアスペルギルス属細胞、昆虫細胞、例えばショウジョウバエS2およびスポドプテラ(Spodoptera) Sf9細胞、動物細胞、例えばCHO、COS、HeLa、C127、3T3、BHK、HEK293およびボウズ・メラノーマ(Bowes melanoma)細胞、および植物細胞を含む。

【0061】

広範な各種の発現系が使用できる。このような系は、なかでも、染色体、エピソームおよびウイルス誘導系、例えば細菌プラスミドから、バクテリオファージから、トランスポゾンから、酵母エピソームから、挿入因子から、酵母染色体因子から、ウイルス、例えばバキュロウイルス、パポバウイルス、例えばSV40、ワクシニアウイルス、アデノウイルス、鶏痘ウイルス、仮性狂犬病ウイルスおよびレトロウイルスから誘導されたベクター、およびこれらの組み合わせから誘導されたベクター、例えばプラスミドおよびバクテリオファージ遺伝因子、例えばコスミドおよびファジェミドから誘導されたものを含む。発現系は、発現を調節ならびに発生する制御領域を含んでもよい。一般に、宿主中にポリペプチド

を産生するためのポリヌクレオチドを維持、増殖または発現するために適するあらゆる系またはベクターを使用してもよい。適当なヌクレオチド配列は、各種の周知で慣用の技術、例えば「分子クローニング：実験マニュアル」(Sambrook et al., MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL、上記)に記載のものいずれを用いても発現系内に挿入してもよい。

【0062】

小胞体の内腔内へ、細胞周辺腔内へまたは細胞外環境内への翻訳されたタンパク質の分泌のために、適当な分泌シグナルを所望のポリペプチド内に組み込んでよい。これらのシグナルは、ポリペプチドに内在性であってもよくまたは非相同性シグナル、例えば異なる種から誘導されたものであってもよい。

【0063】

スクリーニングアッセイで使用するためにIGS4ポリペプチドを発現すべき場合に、一般にポリペプチドが細胞の表面で産生されることが好ましい。このイベントにおいて、細胞をスクリーニングアッセイに使用する前に採取してもよい。IGS4ポリペプチドのアフィニティーまたは機能的活性が受容体活性調節タンパク質(RAMP)により変性される場合に、細胞表面における関係するRAMPの同時発現が好ましいと考えられ、しばしば要求される。このイベントの場合にも、IGS4ポリペプチドおよび関係するRAMPを発現する細胞の採取がスクリーニングアッセイ使用の前に要求される。IGS4ポリペプチドが培地内に分泌される場合には、培地は、ポリペプチドを回収および精製するために回収できる。細胞内で産生される場合には、ポリペプチドを回収する前に細胞を先ず溶解しなければならない。IGS4ポリペプチドを発現する膜は、当該技術分野の熟練者に周知の方法により回収できる。一般にこのような方法は、IGS4ポリペプチドを発現する細胞の採取および例えば限定はされないがポッターリング(pottering)のような方法により細胞をホモジナイズすることを含む。膜は懸濁液を一回または数回洗浄して回収してもよい。

【0064】

IGS4ポリペプチドは、硫酸アンモニウムまたはエタノール沈降、酸抽出、アニオンまたはカチオン交換クロマトグラフィー、ホスホセルロースクロマトグ

ラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィーおよびレクチンクロマトグラフィーを含む周知の方法により組換え細胞培養物から回収および精製できる。最も好ましくは、高速液体クロマトグラフィーが精製に用いられる。タンパク質をリフォールディングするための周知の技術は、ポリペプチドが単離および/または精製の間に変性される場合に活性コンホメーションを再生するために使用してもよい。

診断アッセイ

本発明は、診断試薬としての使用のためのIGS4ポリヌクレオチドの使用にも関する。機能不全と関連するIGS4遺伝子の変異形の検出は、IGS4の過少発現、過剰発現または改変された発現からもたらされる疾患または疾患への罹病性の診断に追加またはこれを決定することができる診断手段を提供する。このイベントにおいても、関連する受容体活性調節タンパク質の同時発現は、所望の品質の診断アッセイを得るために要求できる。IGS4遺伝子内に変異を有する個体を、種々の技術によりDNAレベルで検出してもよい。

【0065】

診断のための核酸は、患者の細胞から、例えば血液、尿、唾液、組織生検または剖検物質から得てもよい。ゲノムDNAは検出のために直接使用してもよくまたは分析の前にPCRまたはその他の増幅技術を使用して酵素的に増幅してもよい。RNAまたはcDNAを同様の方法で使用してもよい。欠失および挿入は、正常の遺伝子型と比較して増幅産物の大きさの変化により検出できる。点変異は、増幅したDNAを標識IGS4ヌクレオチド配列にハイブリダイズして同定できる。完全にマッチした配列は、RNアーゼ消化によりまたは融解温度の相違により mismatch二本鎖から区別できる。DNA配列の相違は、変性剤を加えまたは加えないゲル内のDNA断片の電気泳動の移動性の改変により、または直接のDNA配列決定により検出してもよい。例えばMyers et al., Science (1985) 230:1242 参照。特定の位置における配列変化は、ヌクレアーゼ保護アッセイ、例えばRNアーゼおよびS1保護または化学切断法により解明してもよい。Cotton et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1985) 85: 4397-4401参照。別の態様で

は、IGS4ヌクレオチド配列またはその断片を含んでなるオリゴヌクレオチドプローブのアレイを例えば遺伝子変異の効率的なスクリーニングを行うために構築することができる。アレイ技術の方法は周知であり、そして一般的な用途を有しそして遺伝子発現、遺伝子連結、および遺伝子変化を含む分子遺伝学における各種の問題を解明するために使用できる（例えばM. Chee et al., Science, Vol 274, pp610-613(1996) 参照）。

【0066】

診断アッセイは、記載の方法によるIGS4遺伝子内の変異の検出を通じて、精神分裂症、間欠性発作不安（EPA）障害、例えば強迫症（OCD）、心的外傷後ストレス障害（PTSD）、恐怖症およびパニック、重症抑うつ障害、双極性障害、パーキンソン病、一般不安障害、自閉症、せん妄、多発性硬化症、アルツハイマー病/痴呆およびその他の神経変性疾患、重症精神遅滞、運動障害、ハンチントン病、ツレット症候群、チック、振せん、ジストニー、痙攣、食欲不振、食欲亢進、脳卒中、耽溺/依存/渴望、睡眠障害、テンカン、偏頭痛を含むPNS、精神医学およびCNS障害、注意散漫/活動過多障害（ADHD）、心不全、狭心症、不整脈、心筋梗塞、心肥大、低血圧、高血圧 - 例えば本態性高血圧、腎高血圧、または肺高血圧、血栓症、動脈硬化症、脳血管痙攣、クモ膜下出血、脳虚血、脳梗塞、末梢血管疾患、レイノー症を含む心血管疾患、腎臓疾患 - 例えば腎不全、異脂肪症、肥満、嘔吐、過敏性腸症候群（IBS）、炎症性腸疾患（IBD）、胃食道反射疾患（GERD）、運動性障害および遅延空胃腸症状、例えば手術後または糖尿病胃不全麻痺、および糖尿病、潰瘍 - 例えば胃潰瘍を含む胃腸疾患、下痢、骨そしょう症を含むその他の疾患、炎症、感染症、例えば細菌、真菌、原虫およびウイルス感染症、特にHIV-1またはHIV-2による感染症、苦痛、ガン、化学治療誘発障害、腫瘍侵入、免疫疾患、残尿、喘息、アレルギー、関節炎、良性前立腺肥大、内毒素ショック、敗血症、真性糖尿病の合併症、および婦人科障害への罹病性を診断または決定するための方法を提供する。本発明により、診断アッセイは、特に、中枢神経系（CNS）および末梢神経系（PNS）を含む神経系の障害、胃腸系および/または心臓血管系および/または骨格筋および/または甲状腺の障害および/または肺疾患、免疫学的疾患

および尿生殖系障害への罹病性を診断または検出するための方法を提供する。

【0067】

さらに、精神分裂症、間欠性発作不安（EPA）障害、例えば強迫症（OCD）、心的外傷後ストレス障害（PTSD）、恐怖症およびパニック、重症抑うつ障害、双極性障害、パーキンソン病、一般不安障害、自閉症、せん妄、多発性硬化症、アルツハイマー病/痴呆およびその他の神経変性疾患、重症精神遅滞、運動障害、ハンチントン病、ツレット症候群、チック、振せん、ジストニー、痙攣、食欲不振、食欲亢進、脳卒中、耽溺/依存/渴望、睡眠障害、テンカン、偏頭痛を含むPNS、精神医学およびCNS障害、注意散漫/活動過多障害（ADHD）、心不全、狭心症、不整脈、心筋梗塞、心肥大、低血圧、高血圧 - 例えば本態性高血圧、腎高血圧、または肺高血圧、血栓症、動脈硬化症、脳血管痙攣、クモ膜下出血、脳虚血、脳梗塞、末梢血管疾患、レイノー症を含む心血管疾患、腎臓疾患 - 例えば腎不全、異脂肪症、肥満、嘔吐、過敏性腸症候群（IBS）、炎症性腸疾患（IBD）、胃食道反射疾患（GERD）、運動性障害および遅延空胃腸症状、例えば手術後または糖尿病胃不全麻痺、および糖尿病、潰瘍 - 例えば胃潰瘍を含む胃腸疾患、下痢、骨そしょう症を含むその他の疾患、炎症、感染症、例えば細菌、真菌、原虫およびウイルス感染症、特にHIV-1またはHIV-2による感染、苦痛、ガン、化学治療誘発障害、腫瘍侵入、免疫疾患、残尿、喘息、アレルギー、関節炎、良性前立腺肥大、内毒素ショック、敗血症、真性糖尿病の合併症、および婦人科障害は、患者より誘導された試料からIGS4ポリペプチドまたはIGS4 mRNAの異常な低下または増加したレベルから決定することを含んでなる方法により診断できる。特に、中枢神経系（CNS）および末梢神経系（PNS）を含む神経系の障害、胃腸系および/または心臓血管系および/または骨格筋および/または甲状腺の障害および/または肺疾患、免疫学的疾患および尿生殖系障害は、患者より誘導された試料からIGS4ポリペプチドまたはIGS4 mRNAの異常な低下または増加したレベルから決定することを含んでなる方法により診断できる。低下または増加した発現は、ポリヌクレオチドの定量のために当該技術分野では周知のあらゆる方法、例えばPCR、RT-PCR、RNアーゼ保護、ノーザンブローディングおよびその他のハイブリ

ダイゼーション法を用いてRNAレベルで測定できる。宿主から誘導された試料中のタンパク質、例えばIGS4のレベルを決定するために使用できるアッセイ技術は、当該技術分野の熟練者には周知である。このようなアッセイ方法は、ラジオイムノアッセイ、競合的結合アッセイ、ウエスタンブロット分析およびELISAアッセイを含む。

【0068】

別の態様では、本発明は疾患、特に精神分裂症、間欠性発作不安(EPA)障害、例えば強迫症(OCD)、心的外傷後ストレス障害(PTSD)、恐怖症およびパニック、重症抑うつ障害、双極性障害、パーキンソン病、一般不安障害、自閉症、せん妄、多発性硬化症、アルツハイマー病/痴呆およびその他の神経変性疾患、重症精神遅滞、運動障害、ハンチントン病、ツレット症候群、チック、振せん、ジストニー、痙攣、食欲不振、食欲亢進、脳卒中、耽溺/依存/渴望、睡眠障害、テンカン、偏頭痛を含むPNS、精神医学およびCNS障害、注意散漫/活動過多障害(ADHD)、心不全、狭心症、不整脈、心筋梗塞、心肥大、低血圧、高血圧 - 例えば本態性高血圧、腎高血圧、または肺高血圧、血栓症、動脈硬化症、脳血管痙攣、クモ膜下出血、脳虚血、脳梗塞、末梢血管疾患、レイノー症を含む心血管疾患、腎臓疾患 - 例えば腎不全、異脂肪症、肥満、嘔吐、過敏性腸症候群(IBS)、炎症性腸疾患(IBD)、胃食道反射疾患(GERD)、運動性障害および遅延空胃腸症状、例えば手術後または糖尿病胃不全麻痺、および糖尿病、潰瘍 - 例えば胃潰瘍を含む胃腸疾患、下痢、骨そしょう症を含むその他の疾患、炎症、感染症、例えば細菌、真菌、原虫およびウイルス感染症、特にHIV-1またはHIV-2による感染症、苦痛、ガン、化学治療誘発障害、腫瘍侵入、免疫疾患、残尿、喘息、アレルギー、関節炎、良性前立腺肥大、内毒素ショック、敗血症、真性糖尿病の合併症、および婦人科障害の治療または疾患への罹病性に対する診断キットに関し、これは

(a) IGS4ポリヌクレオチド、好ましくは配列番号1、配列番号3、配列番号5または配列番号7のヌクレオチド配列、またはその断片、および/または

(b) (a)のものに対して相補的なヌクレオチド配列、および/または

(c) IGS4ポリペプチド、好ましくは配列番号2、配列番号4、配列番号6

または配列番号8のポリペプチド、またはその断片、および/または
(d) IGS4ポリペプチドに対する抗体、好ましくは配列番号2、配列番号4、配列番号6または配列番号8のポリペプチドに対する抗体、および/または
(e) IGS4ポリペプチドの関連する生物学的または抗原的性質のために必要なRAMPポリペプチド
を含んでなる。

【0069】

このようないずれもキットでも、(a)、(b)、(c)、(d)または(e)は本質的な成分を含んでなってもよいことが認められる。好ましくは、本発明は、中枢神経系(CNS)および末梢神経系(PNS)を含む神経系の障害、胃腸系および/または心臓血管系および/または骨格筋および/または甲状腺の障害および/または肺疾患、免疫学的疾患および尿生殖系障害の疾患または疾患への罹病性を診断または決定するための診断キットに関する。

染色体アッセイ

本発明のヌクレオチド配列は、染色体同定のためにも価値がある。配列は、個別のヒト染色体上の特定の位置に特異的に標的設定されそしてこれとハイブリダイズできる。本発明による染色体の関連配列の地図作製は、これらの配列を遺伝子関連疾患と関連させるために重要な第一段階である。配列が正確に染色体位置に場所決定された場合に、染色体上の配列の物理的位置は、遺伝子地図データと相関できる。このようなデータは、例えばV. McKusick, Mendelian Inheritance in Man (Johns Hopkins University Welch Medical Libraryからオンラインで入手可能)内に見いだされる。次いで、同じ染色体領域に場所決定された遺伝子と疾患との関係は、連鎖分析により同定される(物理的に隣接した遺伝子の同時遺伝)。

【0070】

影響および非影響個体間のcDNAまたはゲノム配列の相違も決定できる。変異が影響を受けた個体の一部またはすべてに観察されるがしかしいずれの正常個体内には観察されない場合には、変異は疾患の原因因子であろう。

抗体

本発明のポリペプチドもしくはこれらの断片もしくはこれらの類似体、または関連RAMPと一緒に要求される場合にこれらを発現する細胞は、IGS4ポリペプチドに対して免疫特異性に抗体を産生する免疫原として使用してもよい。用語「免疫特異性」は、抗体が、従来技術の他の関連ポリペプチドへのこれらのアフィニティーよりも本質的に大きい本発明のポリペプチドへのアフィニティーを有することを意味する。

【0071】

IGS4ポリペプチドに対して生成した抗体は、ポリペプチドまたはエピトープ-保持断片、類似体または細胞を動物、好ましくはヒト以外に慣用のプロトコールを用いて投与して得てもよい。モノクローナル抗体の作製のために、連続細胞株培養により産生される抗体を供給するあらゆる技術を使用してもよい。その例は、ハイブリドーマ技術(Kohler, G. and Milstein, C., Nature (1975) 256: 495-497)、トリオーマ技術、ヒトB-細胞ハイブリドーマ技術(Kozbor et al., Immunology Today (1983) 4:72) およびEBV-ハイブリドーマ技術(Cole et al., MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY, pp77-96, Alan R. Liss, Inc., 1985)を含む。

【0072】

上記の抗体は、ポリペプチドを発現するクローンを単離もしくは同定するためまたはアフィニティークロマトグラフィーによりポリペプチドを精製するために使用してもよい。

【0073】

IGS4ポリペプチド自体に対する抗体、またはIGS4ポリペプチド-RAMP複合体に対する抗体は、精神分裂症、間欠性発作不安(EPA)障害、例えば強迫症(OCD)、心的外傷後ストレス障害(PTSD)、恐怖症およびパニック、重症抑うつ障害、双極性障害、パーキンソン病、一般不安障害、自閉症、せん妄、多発性硬化症、アルツハイマー病/痴呆およびその他の神経変性疾患、重症精神遅滞、運動障害、ハンチントン病、ツレット症候群、チック、振せん、ジストニー、痙攣、食欲不振、食欲亢進、脳卒中、耽溺/依存/渴望、睡眠障害、テンカン、偏頭痛を含むPNS、精神医学およびCNS障害、注意散漫/活動

過多障害 (ADHD)、心不全、狭心症、不整脈、心筋梗塞、心肥大、低血圧、高血圧 - 例えば本態性高血圧、腎高血圧、または肺高血圧、血栓症、動脈硬化症、脳血管痙攣、クモ膜下出血、脳虚血、脳梗塞、末梢血管疾患、レイノー症を含む心血管疾患、腎臓疾患 - 例えば腎不全、異脂肪症、肥満、嘔吐、過敏性腸症候群 (IBS)、炎症性腸疾患 (IBD)、胃食道反射疾患 (GERD)、運動性障害および遅延空胃腸症状、例えば手術後または糖尿病胃不全麻痺、および糖尿病、潰瘍 - 例えば胃潰瘍を含む胃腸疾患、下痢、骨そしょう症を含むその他の疾患、炎症、感染症、例えば細菌、真菌、原虫およびウイルス感染症、特には HIV - 1 または HIV - 2 による感染症、苦痛、ガン、化学治療誘発障害、腫瘍侵入、免疫疾患、残尿、喘息、アレルギー、関節炎、良性前立腺肥大、内毒素ショック、敗血症、真性糖尿病の合併症、および婦人科障害を治療するために使用してもよい。好ましくは、本発明の抗体は、中枢神経系 (CNS) および末梢神経系 (PNS) を含む神経系の障害、胃腸系および / または心臓血管系および / または骨格筋および / または甲状腺の障害および / または肺疾患、免疫学的疾患および尿生殖系障害を治療するために使用してもよい。

動物

本発明の別の態様は、IGS4 の異常な発現または活性から起きる障害のためのモデルとして挙動するヒト以外の動物に基づく系に関する。ヒト以外の動物に基づくモデル系は、IGS4 遺伝子の活性をさらに特徴付けるために使用してもよい。このような系は、IGS4 に基づく疾患、例えば精神分裂症、間欠性発作不安 (EPA) 障害、例えば強迫症 (OCD)、心的外傷後ストレス障害 (PTSD)、恐怖症およびパニック、重症抑うつ障害、双極性障害、パーキンソン病、一般不安障害、自閉症、せん妄、多発性硬化症、アルツハイマー病 / 痴呆およびその他の神経変性疾患、重症精神遅滞、運動障害、ハンチントン病、ツレット症候群、チック、振せん、ジストニー、痙攣、食欲不振、食欲亢進、脳卒中、耽溺 / 依存 / 渴望、睡眠障害、テンカン、偏頭痛を含む PNS、精神医学および CNS 障害、注意散漫 / 活動過多障害 (ADHD)、心不全、狭心症、不整脈、心筋梗塞、心肥大、低血圧、高血圧 - 例えば本態性高血圧、腎高血圧、または肺高血圧、血栓症、動脈硬化症、脳血管痙攣、クモ膜下出血、脳虚血、脳梗塞、末梢

血管疾患、レイノー症を含む心血管疾患、腎臓疾患 - 例えば腎不全、異脂肪症、肥満、嘔吐、過敏性腸症候群 (I B S)、炎症性腸疾患 (I B D)、胃食道反射疾患 (G E R D)、運動性障害および遅延空胃腸症状、例えば手術後または糖尿病胃不全麻痺、および糖尿病、潰瘍 - 例えば胃潰瘍を含む胃腸疾患、下痢、骨そしょう症を含むその他の疾患、炎症、感染症、例えば細菌、真菌、原虫およびウイルス感染症、特にはH I V - 1またはH I V - 2による感染症、苦痛、ガン、化学治療誘発障害、腫瘍侵入、免疫疾患、残尿、喘息、アレルギー、関節炎、良性前立腺肥大、内毒素ショック、敗血症、真性糖尿病の合併症、および婦人科障害を治療できる化合物を同定するために設計されたスクリーニング戦略の一部として使用してもよい。特には、この系は、中枢神経系 (C N S) および末梢神経系 (P N S) を含む神経系の障害、胃腸系および / または心臓血管系および / または骨格筋および / または甲状腺の障害および / または肺疾患、免疫学的疾患および尿生殖系障害の I G S 4 に基づく障害を治療できる化合物を同定するために設計されたスクリーニング戦略の一部として使用してもよい。この方法で、動物に基づくモデルは、I G S 4 の異常な発現または活性の障害の治療において有効であるような薬剤化合物、治療および介入を同定するために使用してもよい。さらにこのような動物モデルは、動物患者内の $L D_{50}$ および $E D_{50}$ を決定するために使用してもよい。これらのデータは、潜在的 I G S 4 障害治療の生体内効力を決定するために使用してもよい。

【 0 0 7 4 】

異常な I G S 4 発現または活性に基づく I G S 4 に基づく障害の動物に基づくモデル系は、非 - 組換え動物ならびに組換え操作トランスジェニック動物の両方を含んでもよい。

【 0 0 7 5 】

I G S 4 障害のための動物モデルは、例えば遺伝子モデルを含んでもよい。I G S 4 に基づく障害類似症候群を示す動物モデルは、例えば I G S 4 配列、例えば上記のもののような配列を、当該技術分野の熟練者に周知のトランスジェニック動物作製のための技術と組み合わせて使用して操作してもよい。例えば、I G S 4 配列は、関係する動物のゲノム内に導入、そして過剰発現および / または非

発現であってもよく、または内在性 I G S 4 配列が存在する場合には、これらを過剰発現、非発現のいずれでもよく、または、その代わりに、I G S 4 遺伝子発現を過少発現または不活性化するために破壊してもよい。

【0076】

I G S 4 遺伝子配列を過剰発現または非発現とするために、I G S 4 遺伝子配列のコーディング部分は、高レベル遺伝子発現または関係する動物種内で遺伝子が正常では発現されない細胞種内での発現を駆動することが可能な調節配列に連結されてもよい。このような調節領域は、当該技術分野の熟練者には周知であり、そして不当に多くの実験を行わないで使用してもよい。

【0077】

内在性 I G S 4 遺伝子配列の過少発現のために、このような配列を単離および操作して、関係する動物のゲノム内に再導入された場合に、内在性 I G S 4 遺伝子対立遺伝子が不活性化、すなわち「ノックアウト」されてもよい。好ましくは、操作された I G S 4 遺伝子配列は、遺伝子標的法を介して、例えば動物ゲノム内へ操作された I G S 4 遺伝子配列の組込みの際に内在性 I G S 4 配列が破壊されるように導入される。遺伝子標的法は本項内で以下に考察する。

【0078】

マウス、ラット、ラビット、リス、モルモット、ブタ、小型ブタ、ヤギ、およびヒト以外の霊長類、例えばヒヒ、サル、および類人猿を含むが、これに限定はされないあらゆる種の動物を、I G S 4 関連障害の動物モデルを作製するために使用してもよい。

【0079】

当該技術分野で公知のあらゆる技術は、I G S 4 導入遺伝子を動物内に導入してトランスジェニック動物の創始株を作製するために使用してもよい。このような技術は、前核ミクロ注入(Hoppe, P.C. and Wagner, T.E. 1989, 米国特許(US)第4,873,191号);レトロウイルス媒介の生殖細胞系内への遺伝子導入(van der Putten et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:6148-6152, 1985);胚幹細胞内での遺伝子標的法(Thompson et al., Cell 56:313-321, 1989);胚の電気穿孔(Lo, Mol. Cell. Biol. 3:1803-1814, 1983);および精子媒介遺伝子導入(Lavitra

no et al., Cell 57:717-723, 1989) 等を含み、これらに限定はされない。このような技術の概説は、Gordon, Transgenic Animals, Intl. Rev. Cytol. 115:171-229, 1989 に記載され、これをその全体を引用して本明細書に編入する。

【0080】

本発明は、すべてのこれらの細胞内に I G S 4 導入遺伝子を有するトランスジェニック動物、ならびに一部であるがすべてではない細胞内に導入遺伝子を有する動物、すなわちモザイク動物を提供する (例えば Jakobovitz, Curr. Biol. 4: 761-763, 1994 に記載の技術参照)。導入遺伝子は、単独の導入遺伝子として、またはコンカテマー、例えば頭 - 頭タンデムまたは頭 - 尾タンデム内に組み込まれてもよい。導入遺伝子は、例えばラスコラの教示 (Lasko, M. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:6232-6236, 1992) に従って、特定の細胞種内に選択的に導入、そして活性化されてもよい。

【0081】

このような細胞タイプ特異性活性化のために必要な調節配列は、関係する特定の細胞種に依存し、そして当該技術分野の熟練者には明らかである。

【0082】

I G S 4 導入遺伝子を内在性 I G S 4 遺伝子の染色体部位内に組み込むことを望む場合には、遺伝子標的法が好ましい。要約すると、この技術を用いる場合には、関係する内在性 I G S 4 遺伝子に相同なあるヌクレオチド配列 (例えばマウス I G S 4 遺伝子のヌクレオチド配列) を含むベクターを、染色体配列との相同組換えを介して、内在性 I G S 4 遺伝子または遺伝子対立遺伝子のヌクレオチド配列内に組み込み、そしてその機能を破壊する目的で設計する。導入遺伝子は、特定の細胞タイプ内に選択的に導入されてもよく、これによりその細胞タイプ内でのみ関係する内在性遺伝子を不活性化し、これは例えばグラの教示に従う (Gu, H. et al., Science 265:103-106, 1996)。このような細胞タイプ特異性不活性化のために必要な調節配列は、関係する特定の細胞種に依存し、そして当該技術分野の熟練者には明らかであろう。

【0083】

トランスジェニック動物が作製されると、組換え I G S 4 遺伝子およびタンパ

ク質の発現を標準技術を用いてアッセイしてもよい。最初のスクリーニングは、導入遺伝子の組込みが起きたかどうかをアッセイするために動物組織を分析するために、サザンブロット分析またはPCR技術により行ってもよい。トランスジェニック動物の組織内のIGS4導入遺伝子のmRNA発現のレベルは、動物から得た組織試料のノーザンブロット分析、in situ ハイブリダイゼーション技術、およびRT-PCRを含むがこれに限定はされない技術を用いて評価してもよい。標的遺伝子-発現組織の試料を、関係する標的遺伝子導入遺伝子産物に対して特異性の抗体特異性を用いて免疫細胞化学的に評価してもよい。容易に検出できるレベルでIGS4遺伝子mRNAまたはIGS4導入遺伝子ペプチドを発現するIGS4トランスジェニック動物(標的遺伝子産物エピトープに対する抗体を用いて免疫細胞化学的に検出)を、次いでさらに、特徴的なIGS4に基づく障害症候群を示すこれらの動物を同定するために続いて評価してもよい。

【0084】

IGS4トランスジェニック創始動物(すなわち、関係する細胞または組織内にIGS4タンパク質を発現し、そしてこれは好ましくは、IGS4に基づく障害の症候群を示す動物)が作製されると、特定の動物のコロニーを作製するためにこれらを育種、同系交配、異系交配、または交雑交配してもよい。このような育種戦略の例は、分離した株を確立するために1種を越える組込み部位を有する創始動物の異系交配、それぞれのIGS4導入遺伝子の付加発現の効果のために高いレベルで関係するIGS4導入遺伝子が発現する複合IGS4トランスジェニックを産生するための分離した株の同系交配、増加した発現およびDNA分析による動物のスクリーニングの考えられる必要性を除くために、与えられた組込み部位に対して同型接合の動物を作製するための異型接合トランスジェニック動物の交雑、複合異型接合または同型接合株を作製するための別々の同型接合株の交雑、IGS4導入遺伝子の発現およびIGS4様症候群の発生に対する対立遺伝子変性の効果を検討するための種々の同系交配遺伝子背景への動物の育種を含むがこれらの限定はされない。このような方法の一つは、IGS4関連障害様症候群、例えば上記のものを示すF1世代を作製するために、IGS4トランスジェニック創始動物と野生型株との交雑である。次いで、異型接合標的遺伝子トラ

ンスジェニック動物が生育可能である場合に、異型接合株を発生させるために、F1世代を同型交配してもよい。

ワクチン

本発明の別の態様は、哺乳類内に免疫学的反応を誘導するための方法に関し、これは、哺乳類にIGS4ポリペプチドまたはその断片を、所要の場合には抗体および/またはT細胞免疫反応を発生するために適するRAMPポリペプチドと一緒に投与（例えば接種）して、なかでも精神分裂症、間欠性発作不安（EPA）障害、例えば強迫症（OCD）、心的外傷後ストレス障害（PTSD）、恐怖症およびパニック、重症抑うつ障害、双極性障害、パーキンソン病、一般不安障害、自閉症、せん妄、多発性硬化症、アルツハイマー病/痴呆およびその他の神経変性疾患、重症精神遅滞、運動障害、ハンチントン病、ツレット症候群、チック、振せん、ジストニー、痙攣、食欲不振、食欲亢進、脳卒中、耽溺/依存/渴望、睡眠障害、テンカン、偏頭痛を含むPNS、精神医学およびCNS障害、注意散漫/活動過多障害（ADHD）、心不全、狭心症、不整脈、心筋梗塞、心肥大、低血圧、高血圧 - 例えば本態性高血圧、腎高血圧、または肺高血圧、血栓症、動脈硬化症、脳血管痙攣、クモ膜下出血、脳虚血、脳梗塞、末梢血管疾患、レイノー症を含む心血管疾患、腎臓疾患 - 例えば腎不全、異脂肪症、肥満、嘔吐、過敏性腸症候群（IBS）、炎症性腸疾患（IBD）、胃食道反射疾患（GERD）、運動性障害および遅延空胃腸症状、例えば手術後または糖尿病胃不全麻痺、および糖尿病、潰瘍 - 例えば胃潰瘍を含む胃腸疾患、下痢、骨そしょう症を含むその他の疾患、炎症、感染症、例えば細菌、真菌、原虫およびウイルス感染症、特にはHIV-1またはHIV-2による感染症、苦痛、ガン、化学治療誘発障害、腫瘍侵入、免疫疾患、残尿、喘息、アレルギー、関節炎、良性前立腺肥大、内毒素ショック、敗血症、真性糖尿病の合併症、および婦人科障害から該動物を保護することを含んでなる。本発明のさらに別の態様は、哺乳類内に免疫学的反応を誘導するための方法に関し、これは該動物を疾患から保護するための抗体を産生する免疫学的反応を誘導するために、IGS4ポリペプチドを生体内でのIGS4ポリヌクレオチドの発現を指令するベクターを介して供給することを含んでなる。特には、本発明は、IGS4ポリペプチドまたはその断片を必要な場合

にはRAMPポリペプチドと一緒に、抗体および/またはT細胞免疫反応を起こすために適当なように哺乳類に接種して、該動物を中枢神経系(CNS)および末梢神経系(PNS)を含む神経系の障害、胃腸系および/または心臓血管系および/または骨格筋および/または甲状腺の障害および/または肺疾患、免疫学的疾患および尿生殖系障害から保護する方法を含む哺乳類内の免疫学的反応を誘導するための方法に関する。

【0085】

本発明の別の態様は、哺乳類宿主内に導入された場合に、IGS4ポリペプチドに対する哺乳類内の免疫学的反応を誘導する免疫学的/ワクチン調剤(組成物)に関し、ここでその組成物はIGS4ポリペプチドまたはIGS4遺伝子を含んでなる。このような免疫学的/ワクチン調剤(組成物)は、治療用の免疫学的/ワクチン調剤または予防用の免疫学的/ワクチン調剤のいずれかであってもよい。ワクチン調剤は、さらに適当なキャリアーを含んでなってもよい。IGS4ポリペプチドは胃内で分解されることがあるので、これは好ましくは非経口的に投与される(皮下、筋肉内、静脈内、皮内などの注射を含む)。非経口投与のために適する調剤は、抗酸化剤、緩衝剤、静菌剤および調剤をレシピエントの血液と等張性とするための溶質を含んでもよい水性および非水性滅菌注射液剤、および懸濁剤または増粘剤を含んでもよい水性および非水性滅菌懸濁液を含む。調剤は、単位投与または複数投与容器、例えば封をしたアンプルおよびバイアル内に存在してもよく、そして使用の直前に滅菌液体キャリアーを加えるだけでよい凍結乾燥状態で貯蔵してもよい。ワクチン調剤は、調剤の免疫原性を増強するためのアジュバント系、例えば水中油系およびその他の当該技術分野では公知の系を含んでもよい。用量はワクチンの活性に依存しそして日常的な試験により容易に決定できる。

スクリーニングアッセイ

本発明のIGS4ポリペプチドは、受容体を結合しそして本発明の受容体ポリペプチドを活性化(アゴニスト)または活性化を阻害(アンタゴニスト)する化合物のためのスクリーニングプロセス中に使用してもよい。従って、本発明のポリペプチドは、小分子基質および例えば細胞、細胞を含まない調製物、化学ライ

ブラリー、および天然産物混合物内のリガンドの結合を評価するために使用してもよい。これらの基質およびリガンドは、天然の基質およびリガンドであってもまたは構造的または機能的疑似体であってもよい。

【0086】

I G S 4 ポリペプチドは、病理学を含む生物学的機能の原因となる。従って、一方ではI G S 4 を刺激し、そして他方ではI G S 4 の機能を阻害できる化合物および薬剤を発見することが望ましい。一般に、アゴニストは精神分裂症、間欠性発作不安 (E P A) 障害、例えば強迫症 (O C D)、心的外傷後ストレス障害 (P T S D)、恐怖症およびパニック、重症抑うつ障害、双極性障害、パーキンソン病、一般不安障害、自閉症、せん妄、多発性硬化症、アルツハイマー病/痴呆およびその他の神経変性疾患、重症精神遅滞、運動障害、ハンチントン病、ツレット症候群、チック、振せん、ジストニー、痙攣、食欲不振、食欲亢進、脳卒中、耽溺/依存/渴望、睡眠障害、テンカン、偏頭痛を含むP N S、精神医学およびC N S 障害、注意散漫/活動過多障害 (A D H D)、心不全、狭心症、不整脈、心筋梗塞、心肥大、低血圧、高血圧 - 例えば本態性高血圧、腎高血圧、または肺高血圧、血栓症、動脈硬化症、脳血管痙攣、クモ膜下出血、脳虚血、脳梗塞、末梢血管疾患、レイノー症を含む心血管疾患、腎臓疾患 - 例えば腎不全、異脂肪症、肥満、嘔吐、過敏性腸症候群 (I B S)、炎症性腸疾患 (I B D)、胃食道反射疾患 (G E R D)、運動性障害および遅延空胃腸症状、例えば手術後または糖尿病胃不全麻痺、および糖尿病、潰瘍 - 例えば胃潰瘍を含む胃腸疾患、下痢、骨そしょう症を含むその他の疾患、炎症、感染症、例えば細菌、真菌、原虫およびウイルス感染症、特にはH I V - 1またはH I V - 2による感染症、苦痛、ガン、化学治療誘発障害、腫瘍侵入、免疫疾患、残尿、喘息、アレルギー、関節炎、良性前立腺肥大、内毒素ショック、敗血症、真性糖尿病の合併症、および婦人科障害のような病状のための治療および予防の目的に使用される。アンタゴニストは、精神分裂症、間欠性発作不安 (E P A) 障害、例えば強迫症 (O C D)、心的外傷後ストレス障害 (P T S D)、恐怖症およびパニック、重症抑うつ障害、双極性障害、パーキンソン病、一般不安障害、自閉症、せん妄、多発性硬化症、アルツハイマー病/痴呆およびその他の神経変性疾患、重症精神遅滞、運動

障害、ハンチントン病、ツレット症候群、チック、振せん、ジストニー、痙攣、食欲不振、食欲亢進、脳卒中、耽溺/依存/渴望、睡眠障害、テンカン、偏頭痛を含むPNS、精神医学およびCNS障害、注意散漫/活動過多障害(ADHD)、心不全、狭心症、不整脈、心筋梗塞、心肥大、低血圧、高血圧 - 例えば本態性高血圧、腎高血圧、または肺高血圧、血栓症、動脈硬化症、脳血管痙攣、クモ膜下出血、脳虚血、脳梗塞、末梢血管疾患、レイノー症を含む心血管疾患、腎臓疾患 - 例えば腎不全、異脂肪症、肥満、嘔吐、過敏性腸症候群(IBS)、炎症性腸疾患(IBD)、胃食道反射疾患(GERD)、運動性障害および遅延空胃腸症状、例えば手術後または糖尿病胃不全麻痺、および糖尿病、潰瘍 - 例えば胃潰瘍を含む胃腸疾患、下痢、骨そしょう症を含むその他の疾患、炎症、感染症、例えば細菌、真菌、原虫およびウイルス感染症、特にHIV-1またはHIV-2による感染症、苦痛、ガン、化学治療誘発障害、腫瘍侵入、免疫疾患、残尿、喘息、アレルギー、関節炎、良性前立腺肥大、内毒素ショック、敗血症、真性糖尿病の合併症、および婦人科障害のような病状のための種々の治療および予防に使用してもよい。特に、本発明は、受容体を結合しそしてIGS4ニューロメジン受容体タンパク質、好ましくは哺乳類IGS4ニューロメジン受容体タンパク質を活性化(アゴニスト)または活性化を阻害(アンタゴニスト)する化合物のためのスクリーニングプロセス中に使用してもよく、該タンパク質は、ニューロメジンUに対し、好ましくはニューロメジンU-8に対し、ニューロメジンU-23に対しおよび/またはニューロメジンU-25に対し高いアフィニティ結合を示す。これらのスクリーニングアッセイは、中枢神経系(CNS)および末梢神経系(PNS)を含む神経系の障害、胃腸系および/または心臓血管系および/または骨格筋および/または甲状腺の障害および/または肺疾患、免疫学的疾患および尿生殖系障害に関して有効な化合物をスクリーニングするために特に適する。

【0087】

一般に、このようなスクリーニング手順は、本発明の受容体ポリペプチドをその表面に発現しそして、必須の場合にはその表面にRAMPの同時発現をするために適する細胞の製造を含む。このような細胞は、哺乳類、酵母、ショウジョウ

バエまたは大腸菌からの細胞を含む。次いで、受容体を発現する細胞（または発現された受容体を含む細胞膜）を試験化合物と接触させ、結合、または機能性反応の刺激もしくは阻害を観察する。

【0088】

一つのスクリーニング技術は、受容体活性化により起きる細胞外 pH、細胞内 pH、または細胞内カルシウム変化を測定する系内での本発明の受容体を発現する細胞（例えばトランスフェクションされた CHO 細胞）の使用を含む。この技術において、化合物を本発明の受容体ポリペプチドを発現する細胞と接触させてもよい。第二メッセンジャー反応、例えばシグナル伝達、pH 変化、またはカルシウムレベルの変化を次いで測定して、潜在的化合物が受容体を活性化または阻害するかどうかを決定する。

【0089】

別の方法は、受容体 - 媒介シグナル、例えば cAMP 蓄積および / またはアデニル酸シクラーゼ活性の調節を決定することによる受容体阻害剤に関するスクリーニングを含む。このような方法は、真核細胞を本発明の受容体を用いてトランスフェクションして細胞表面上に受容体を発現させることを含む。次いで、細胞を潜在的アンタゴニストの存在下で本発明の受容体に対するアゴニストに暴露する。潜在的アンタゴニストが受容体を結合しこれにより受容体結合を阻害する場合には、アゴニスト媒介シグナルが調節されるであろう。

【0090】

本発明の受容体に対するアゴニストまたはアンタゴニストを検出する別の方法は、引用することにより本明細書中に編入される米国特許 (US) 第 5,482,835 号に記載の酵母に基づく技術である。

【0091】

アッセイは、単なる候補化合物の試験結合でもよく、ここで受容体を有する細胞への接着は、候補化合物と直接または間接に結合した標識によるか、または標識競合物との競合を含むアッセイにより検出される。さらに、これらのアッセイは、候補化合物が受容体の活性化により発生するシグナルをもたらすかどうかを試験してもよく、これにはその表面に受容体を有する細胞に適する検出系を用い

る。活性化の阻害剤は、一般に、既知のアゴニストの存在下でアッセイされ、そして候補化合物の存在によるアゴニストによる活性化に対する効果を観察される。

【0092】

従って、本発明のIGS4受容体にリガンド結合を示す候補化合物をスクリーニングしてもよい。本発明の範囲内で、用語「リガンド結合」は、少なくとも -6.00 以下(約 600 nM)の $\log EC_{50}$ 値、好ましくは -7.00 以下(約 55 nM)の $\log EC_{50}$ 、さらに好ましくは -9.00 以下(約 $500\text{ pM} \sim 1.2\text{ nM}$)の $\log EC_{50}$ 、および最も好ましくは -10.00 以下(約 $50 \sim 100\text{ pM}$)の $\log EC_{50}$ を示すIGS4受容体へのアフィニティーを有する化合物を記述すると理解される。

【0093】

従って、本発明の一つの態様は、物質が、

(a) 上記に定義したIGS4ニューロメジン受容体の一つもしくは配列番号2、配列番号4、配列番号6および配列番号8の受容体の一つを発現する細胞、または上記に定義した該IGS4ニューロメジン受容体の一つもしくは配列番号2、配列番号4、配列番号6および配列番号8の受容体の一つを含んでなる受容体膜調製物を標識したニューロメジンUと、物質の存在または不在下で接触させ、そして

(b) IGS4へのニューロメジンUの結合を測定することを含んでなるIGS4受容体の潜在的リガンドであるかどうかを決定する方法に関する。

【0094】

さらに、アッセイは、混合物を形成するためにIGS4ポリペプチドを含む溶液と候補化合物とを混合し、混合物中のIGS4活性を測定し、そして混合物のIGS4活性を標準と比較する段階を単に含んでなってもよい。

【0095】

IGS4 cDNA、タンパク質およびタンパク質に対する抗体は、細胞内のIGS4 mRNAおよびタンパク質の産生に対する添加した化合物の効果を検

出するためのアッセイを構成するために使用してもよい。例えば、ELISAは、当該技術分野に公知の標準方法によりモノクローナルおよびポリクローナル抗体を用いてIGS4タンパク質の分泌または細胞関連レベルを測定するために構築されてもよく、そしてこれは適当に操作された細胞または組織からのIGS4の産生を阻害または促進するであろう薬剤（それぞれアンタゴニストまたはアゴニストとも呼ばれる）を発見するために使用できる。スクリーニングアッセイを行うための標準方法は、当該技術分野では周知である。

【0096】

潜在的IGS4アンタゴニストの例は、抗体または、ある場合にはIGS4のリガンド、例えばリガンドの断片に密接に関係したオリゴヌクレオチドまたはタンパク質、または受容体に結合するが反応は行わないで、受容体の活性を阻止する小分子を含む。

【0097】

従って、別の態様では、本発明は、IGS4ポリペプチドに対するアゴニスト、アンタゴニスト、リガンド、受容体、基質、酵素など、または

(a) IGS4ポリペプチド、好ましくは配列番号2、配列番号4、配列番号6または配列番号8のもの、

(b) IGS4ポリペプチド、好ましくは配列番号2、配列番号4、配列番号6または配列番号8のものを発現する組換え細胞、

(c) IGS4ポリペプチド、好ましくは配列番号2、配列番号4、配列番号6または配列番号8のものを発現する細胞膜、または

(d) IGS4ポリペプチド、好ましくは配列番号2、配列番号4、配列番号6または配列番号8のものに対する抗体

を含んでなるIGS4ポリペプチドの産生を低下、増加および/または促進する化合物を同定するためのスクリーニングキットに関する。

【0098】

あらゆるこのようなキット内に、(a)、(b)、(c)または(d)は本質的な成分を含んでなってもよいことが認められる。

予防および治療方法

本発明は、IGS4活性の過剰および/または不十分な量の両方に関連する異常な状態を治療するための方法を提供する。

【0099】

IGS4の活性が過剰な場合には、数種の方法が利用できる。一つの方法は、以上に記載した阻害化合物（アンタゴニスト）を、薬剂的に許容できるキャリアーと一緒に、IGS4へのリガンドの結合を遮断することにより、またはRAM Pポリペプチドまたは第二シグナルとの相互作用を阻害することにより活性化を阻害し、これにより異常状態を緩和するために有効な量を患者の投与することを含んでなる。

【0100】

他の方法では、内在性IGS4と競合してリガンドをまだ結合できるIGS4ポリペプチドの可溶性の形を投与してもよい。このような競合物の典型的な態様は、IGS4ポリペプチドの断片を含んでなる。

【0101】

さらに別の方法では、内在性IGS4をコードする遺伝子の発現は、発現遮断技術を用いて阻害できる。既知のこのような技術は、内部産生または別途に投与されるアンチセンス配列の使用を含む。例えばO'Conner, J. Neurochem. (1991) 56:560 in Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression, CRC Press, Boca Raton, Florida USA (1988)参照。あるいは、遺伝子と三重らせんを形成するオリゴヌクレオチドを供給できる。例えばLee et al., Nucl eic Acids Res. (1979) 6:3073; Cooney et al., Science (1988) 241:456; Der van et al., Science (1991) 251: 1360参照。これらのオリゴマーは、それ自体を投与できるかまたは関連するオリゴマーを生体内で発現できる。合成したアンチセンスまたは三重らせんオリゴヌクレオチドは、修飾された塩基または修飾された骨格を含んでなってもよい。後者の例は、メチルホスホナート、ホスホロチオアートまたはペプチド核酸骨格を含む。このような骨格は、ヌクレアーゼによる分解からの保護を与えるためにアンチセンスまたは三重らせんオリゴヌクレオチド内に組み込まれ、これは当該技術分野には周知である。これらまたはその他の修飾された骨格を用いる合成されたアンチセンスおよび三重らせん分子は、本

発明の一部を形成する。

【0102】

さらに、IGS1ポリペプチドの発現は、IGS1 mRNA配列に特異性のリボザイムを用いて回避してもよい。リボザイムは、天然または合成であることができる触媒活性RNAである(例えばUsman et al., Curr. Opin. Struct. Biol. (1996) 6(4), 527-33 参照)。合成リボザイムは、選択された位置で特異的にIGS1 mRNAを開裂し、これによりIGS1 mRNAの機能性ポリペプチド内への翻訳を避けるように設計できる。リボザイムは天然リン酸リボース骨格および天然塩基、例えばRNA分子中に通常見いだされるものを用いて合成してもよい。あるいは、リボヌクレアーゼ分解からの保護を与えるように、リボザイムは非天然骨格、例えば2'-O-メチル RNAを用いて合成してもよくそして修飾塩基を含んでもよい。

【0103】

IGS4およびその活性の低い発現に関連する異常な状態を治療するために、種々の方法も利用できる。一つの方法は、IGS4を活性化する化合物、すなわち上記のようなアゴニストの治療的に有効な量を薬剂的に許容できるキャリアーと一緒に患者に投与して、これにより異常な状態を緩和することを含んでなる。あるいは、患者内の関連細胞によるIGS4の内在的産生を行うために遺伝子治療を利用してもよい。例えば、本発明のポリヌクレオチドは、上記に考察した複製欠失レトロウイルスベクター内の発現に関して操作してもよい。次いでレトロウイルス発現構築物を単離して、そして本発明のポリペプチドをコードするRNAを含むレトロウイルスプラスミドベクターを用いて形質導入したパッケージング細胞内に導入してもよく、これによりパッケージング細胞は関係する遺伝子を含む感染性ウイルス粒子を産生する。これらの産生体細胞は、生体内における細胞の操作および生体内におけるポリペプチドの発現のために患者に投与してもよい。遺伝子治療の概説については、Human Molecular Genetics, Strachan T. and Read A.P., BIOS Scientific Publishers, Ltd(1986) 中の「遺伝子治療およびその他の分子遺伝子に基づく治療方法」の第20章(Chapter 20, Gene Therapy and other Molecular Genetic-based Therapeutic Approaches) およびその中の

引用文献を参照のこと。

【0104】

上記のあらゆる治療方法は、例えば哺乳類、例えばイヌ、ネコ、ウシ、ウマ、ラビット、サル、および最も好ましくはヒトを含む、このような治療が必要なあらゆる患者に適用してもよい。

調剤および投与

ペプチド、例えばIGS4ポリペプチドの可溶性形、およびアゴニストおよびアンタゴニストペプチドまたは小分子は、適当な薬剤キャリアーと組み合わせて調剤してもよい。このような調剤は、治療的に有効な量のポリペプチドまたは化合物、および薬剤的に許容できるキャリアーまたは賦形剤を含んでなる。調剤は投与の形態に適合しなければならず、そして当該技術分野の熟練者の範囲内に十分に入る。本発明は、さらに、本発明の上記の組成物の1種またはそれ以上の成分を充填した1個またはそれ以上の容器を含んでなる薬剤包装物およびキットにも関する。

【0105】

本発明のポリペプチドおよびその他の化合物は、単独または他の化合物、例えば治療用化合物と一緒に使用してもよい。

【0106】

薬剤組成物の全身投与の好ましい形は、注射、典型的には静脈内注射を含む。他の注射経路、例えば皮下、筋肉内、または腹腔内が使用できる。全身投与の別の手段は、浸透剤、例えば胆汁酸塩またはフシジン酸またはその他の界面活性剤を用いる粘膜経由または経皮投与を含む。さらに、経口およびカプセル化調剤に適当に調剤された場合には、経口投与も可能であろう。

【0107】

所要の投与範囲は、ペプチドまたは化合物の選択、投与の経路、調剤の性質、患者の病状の性質、および担当医師の判断に依存する。適当な用量は、 $1 \sim 100 \mu\text{g} / \text{kg}$ (患者体重) の範囲内である。しかし、種々の使用化合物および投与の種々の経路の異なる効率を考慮して、所要用量の広範な変化も予想される。例えば、経口投与は、静脈内注射による投与よりも高い用量を必要とすると予想

される。これらの用量レベルの変化は、最適化のための標準的な経験慣行を用いて調整でき、これは当該技術分野では良く理解されている。

【0108】

治療に使用されるペプチドは、上記のようにしばしば「遺伝子治療」と呼ばれる治療モダリティにおいて、患者内に内在的に生成させることもできる。従って、例えば、患者からの細胞は、ポリヌクレオチド、例えばDNAまたはRNAを用いて生体外で、そして例えばレトロウイルスプラスミドベクターを用いてポリペプチドをコードするように操作してもよい。次いで細胞を患者内に導入する。

【0109】

以下の実施例は、本発明をさらに詳細に説明することのみを意図するものであり、従ってこれらの実施例は本発明をいかなる意味でも制限するとはみなされない。

【0110】

【実施例】

実施例1．新規のG - タンパク質共役型受容体をコードするcDNAのクローニング

実施例1a．新規のG - タンパク質共役型受容体(GPCR)をコードするゲノム断片の相同性PCRクローニング

PCRに基づく相同性クローニング戦略を、新規のG - タンパク質共役型受容体をコードする部分ゲノムDNA配列を単離するために使用した。前進(F22)および後退(R44およびR46)縮重PCRプライマーを、ニューロテンシン受容体遺伝子ファミリー(Vita N. et al. [1993] Febs Lett. 317, 139-142; Vita N. et al. [1998] Eur. J. Pharmacol. 360, 265-272)の保存領域内で、膜貫通ドメイン1(TM1)および3(TM3)内およびTM3と細胞内ループ2(I2)の間の境界において設計した。

F22(TM1) :

5' - CTCATCTTCGCGGTGGGC(AまたはG)C(A, C, GまたはT)G(CまたはT)(A, C, GまたはT)GG - 3'

(配列番号13)

R44(TM3/I2):

5' - GGCCAGGCAGCGCTCCGCGCT (Cまたはイノシン) A (AまたはG) (A, C, GまたはT) C (CまたはT) (A, C, GまたはT) GC (A, GまたはT) - 3' (配列番号14)

R46(TM3):

5' - GAA (AまたはG) TA (AまたはG) TAGCC (AまたはG) CG (AまたはG) CAGCC (AまたはT) - 3' (配列番号15)

ニューロテンシン受容体ファミリーの既知の成員の増幅を抑制するために、プライマーR44の3'最終ヌクレオチド位置を、NTR1およびMTR2 cDNA両方の相当する位置に相補的とならないように選択した。一次PCR反応は、体積60 μ l中で行い、そして100ngヒトゲノムDNA(Clontech)、6 μ lジーンアンプ™ (GeneAmp) 10xPCR緩衝液II (100mM Tris-HCl pH8.3; 500mM KCl、Perkin Elmer)、3.6 μ l 2.5mM MgCl₂、0.36 μ l dNTP類(それぞれのdNTPの25mM)、1.5単位AmpliAq-Gold™ポリメラーゼ(Perkin Elmer)、および縮重前進(F22)および後退プライマー(R44)それぞれ30ピコモルを含んでいた。反応管を95 $^{\circ}$ Cで10分間加熱し、次いで変性(95 $^{\circ}$ C、1分間)、アニーリング(55 $^{\circ}$ C、2分間)および伸展(72 $^{\circ}$ C、3分間)の35サイクルを行った。最後に反応管を10分間、72 $^{\circ}$ Cで加熱した。

【0111】

半-ネスト(semi-nested) PCR反応のために、一次PCR反応モノクロナールの1/50希釈物の1 μ lを、それぞれ縮重前進および後退プライマーF22およびR44を用いる鑄型として用いた。半-ネストPCR反応は、一次PCR反応と同じ条件下で行った。

【0112】

半-ネストPCR反応産物をアガロースゲル上でサイズ分別し、そして臭化エチジウムを用いて染色した。 \pm 220bpの断片が期待されたけれども、 \pm 120bpの断片だけが視認できた。この断片をQiaex-II™精製キット(Qia

gen)を用いてゲルから精製しそして供給者(pGEM-T キット、Promega)の推奨する方法に従ってpGEM-Tプラスミド中に連結した。このようにして作製した組換えプラスミドを適合する大腸菌(E. coli) SURE™2細菌(Stratagene)を形質転換するために使用した。形質転換した細胞を、アンピシリン(100 µg/ml)、IPTG(0.5 mM)およびX-gal(50 µg/ml)を含むLBアガープレート上にプレーティングした。プラスミドDNAを、Qiagen-tip 20 miniprep kit(Qiagen)を用いて個別コロニーのミニ-培養物から精製した。DNA配列決定反応は、ABI Prism™ BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction キット(PE-ABI)を用い、挿入-近接プライマーを用いて精製したプラスミドDNA上で行った。

【0113】

【表7】

表7: 使用したオリゴプライマーの概要

配列番号: 13	F22: 5'-CTCATCTTCGCGGTGGGC(AまたはG)C(A,C,GまたはT)G(CまたはT)(A,C,GまたはT)GG-3'
配列番号: 14	R44: 5'-GGCCAGGCAGCGCTCCGCGCT(Cまたはイソシ)A(AまたはG)(A,C,GまたはT)C(CまたはT)(A,C,GまたはT)GC(A,GまたはT)-3'
配列番号: 15	R46: 5'-GAA(AまたはG)TA(AまたはG)TAGCC(AまたはG)CG(AまたはG)CAGCC(AまたはT)-3'
配列番号: 16	AP1: 5'-CCATCCTAATACGACTCACTATAGGGC-3'
配列番号: 17	AP2: 5'-ACTCACTATAGGGCTCGAGCGGC-3'
配列番号: 18	IGS4R1: 5'GGATCCCAAATAAGAAAGGGTAGTTGC-3'
配列番号: 19	IGS4R2: 5'AAAGGGTAGTTGCGCCACATCTCATAGAC-3'
配列番号: 20	IGS4F5: 5'AGGTCTATGAGATGTGGCGCAACTACCCT-3'
配列番号: 21	IGS4F6: 5'ATGTGGCGCAACTACCCTTTCTTATTGGG-3'
配列番号: 22	R74: 5'-CGGAAGTTGGCGGACACG(AまたはG)(A,CまたはG)(AまたはG)TT(AまたはG)TA-3'
配列番号: 23	IGS4F7: 5'-GCTCAGCTTGAACAGAGCCTCGTACC-3'
配列番号: 24	IGS4F8: 5'-CCATGTGGATCTACAATTCATCATCC-3'
配列番号: 25	IGS4F9: 5'-AAGACAAATCTCTTGAGGCAGATGAAGGG-3'
配列番号: 26	IGS4F10: 5'-GATGCTGTTTGTCTTGGTCTTAGTGTTTGC-3'
配列番号: 27	IGS4R5: 5'-GGATGATGAAATTGTAGATCCACATGGGC-3'
配列番号: 28	IGS4R6: 5'-TGTGGAGAAGTCTCTCAAAGTGTGG-3'
配列番号: 29	IGS4R7: 5'-TAGTAGGAGTGACAGCCTGACTCGGAACG-3'
配列番号: 30	IGS4R8: 5'-AACGTAGATGACTCAGGACGAACCATTTC-3'
配列番号: 31	IGS4F11: 5'-TCGTACCAGGGGAGGCTCAGGC-3'

【0114】

配列決定反応の産物は、EtOH/NaOAc沈降を介して精製し、そしてABI 377自動配列決定装置を用いて分析した。

【0115】

クローンHNT1552の挿入物の配列分析は、これがGPCRファミリーの新規の成員の一部分を潜在的にコードすることを示した。我々はこの新規のGPCRをIGS4と呼ぶ。

実施例1b. 完全IGS4コーディング配列を含むcDNA断片のクローニング

IGS4 cDNAの完全コーディング配列は、RACE分析(cDNA末端の迅速増幅)およびRT-PCR増幅の両者を介して得た。5' - および3' RACE PCR反応は、ヒト脳または精巣からのMarathon-Ready™ cDNA (それぞれClontech番号7400-1および7414-1) に関して、Marathon™ cDNA増幅キット(Clontech K1802-1)と一緒に提供されたアダプタープライマー1および2(AP1:配列番号16、AP2:配列番号17)およびIGS4特異性プライマーを用いて行った。PCR RACE反応は、Clontechから提供されたMarathon-Ready™ cDNAユーザーマニュアルの指示に従って行った。RACE産物は、アガロースゲル上で分離し、臭化エチジウムを用いて可視化しそしてHybond N+膜上にプロットした。プロットを65℃、2時間、変性Church緩衝液(0.5Mリン酸塩、7%SDS、10mMEDTA)中でプレハイブリダイズし、次いで、一晩、65℃で、³²P-標識IGS4 cDNAプローブの2 × 10⁶ cpm/mlを含む同じ緩衝液内でハイブリダイズした。IGS4 cDNAプローブを[γ-³²P]dCTPのランダムプライム組込みを介して比放射能 > 10⁹ cpm/μgまで、Prime-It IIキット™(Stratagene)を用い、供給者により提供された指示に従って放射能標識した。ハイブリダイズしたプロットを高ストリンジェンシー(2 × 30分間、室温、2 × SSC / 0.1%SDS中、次いで40分間、65℃での0.1 × SSC、0.1%SDS中での洗浄2回)で洗浄し、次いで一晩オートラジオグラフィーを行った。ハイブリダイジング断片を調製ゲルから精製し、pGEM-Tベクター中にクローンしそして上記のようにして配列決定し

た。

【0116】

I G S 4 特異性プライマー I G S 4 R 1 (配列番号 1 8) および I G S 4 R 2 (配列番号 1 9) (クローン H N T 1 5 5 2 の D N A 配列に基づいて設計) を用いるヒト脳 c D N A に関する半 - ネスト 5 ' R A C E 分析の最初の 1 回は、クローン H N T 1 8 8 6 および H N T 1 8 8 7 を生成した (図 1) 。これらのクローンは、翻訳コドンの推定開始点までおよびこれを越える上流の I G S 4 c D N A 配列を延長する。同様に、I G S 4 特異性プライマー I G S 4 F 5 (配列番号 2 0) および I G S 4 F 6 (配列番号 2 1) を用いるヒト脳 c D N A に関する 3 ' R A C E 分析の最初の一回は、クローン H N T 1 8 7 4 - 1 8 7 8 および H N T 1 9 0 2 - 1 9 0 3 を生成した (図 1) 。これらのクローンは、既知の I G S 4 c D N A を 3 ' 末端で延長した。

【0117】

この時点で得られたすべての配列を、ヒトオーファン受容体 F M - 3 (Tan et al., Genomics 52, 223-229 [1998]、GeneBank 受入番号 AF044600 および AF044601) に最も類似する新規のタンパク質の一部をコードする長いオープンリーディングフレームを含む単一コンティグに構築した。I G S 4 の R N A 発現プロフィールを研究するために、種々のヒト組織からの R N A を含む M a s t e r B l o t TM 膜 (Clontech カタログ番号 770-1) を、供給者により推奨された条件下でクローン H M T 1 9 0 3 の ³²P - 標識挿入物にハイブリダイズした。最強のハイブリダイゼーションは、精巣 R N A で得られ、一方大幅に弱いシグナルは前立腺、胃、脊髄、海馬、延髄、甲状腺、胸腺、肺および気管内で得られた。

【0118】

コンティグ配列は完全 I G S 4 コーディング配列をまだ含んでいなかったもので、我々は、ニューロテンシン受容体 1 および 2、成長ホルモン分泌促進物質受容体 (Howard A.D. et al. [1996] Science 273, 974-977) およびオーファン G P C R F M - 3 および G P R 3 8 (McKee K.K. et al., [1997] Genomics 46, 426-434) から成る G P C R サブファミリーの保存領域 (T M 7 / C - 末端細胞内部分) 内で設計した I G S 4 特異性プライマー I G S 4 F 6 (配列番号 2 1) および

縮重プライマー (R74、配列番号22) を用いて、ヒト全脳RNA上のRT-PCR相同性クローニング実験を組み立てた。RT-PCR反応は、ヒト脳からの全RNA 500 ng上の体積50 µl内で、供給者の指示に従って、TitanTM One Tube RT-PCRシステム(Boehringer カタログ番号1,888,382)を用いて行った。要約すると、RT-PCR条件は下記であった: 45分間、55 °Cの逆転写、94 °Cで変性2分間、次いで20サイクル(94 °Cで30秒間変性、60 °Cで30秒間アニーリング[-0.25 °C/サイクル]および68 °Cで2分間伸展)のタッチダウン(touch-down)PCR反応、次いで追加のPCRサイクル30回(94 °Cで30秒間変性、55 °Cで30秒間アニーリングおよび68 °Cで3分間伸展[+5秒間/サイクル])を行った。最後に68 °Cで7分間の追加の伸展ステップを行った。クローンHMT 1903の放射能標識挿入物を用いるサザンブロットにより反応産物を分析した。プローブにハイブリダイズした±690 bpの断片をゲルから精製し(QiaexIITM、Qiagen)、そしてpGEM-Tベクター内にクローニングしてクローンHMT 2210-2212を得た。これらのクローンの配列分析は、3'方向に存在するIGS4 cDNAコンティグの延伸を可能とした。

【0119】

延伸したIGS4 cDNAコンティグは、翻訳停止コドンをもまだ含んでいなかったため、追加のIGS4特異性3' RACEプライマーを設計した(IGS4 F7-10、配列番号23~26)。ネストまたは半-ネストした3' RACE反応をヒト精巣からMarathon-ReadyTM cDNA(Clontech 7414-1)上で行った。IGS4特異性バンド(IGS4特異性プローブを用いるサザンブロットを用いて評価)をpGEM-T内にクローニングした。これはクローンHNT 2289-90(AP1/IGS4 F5->AP2/IGS4 F9)、HNT 2293-2295(AP1/IGS4 F6->AP2/IGS4 F9)、HNT 2296-2297(AP1/IGS4 F7->AP2/IGS4 F9)、HNT 2308-2310(AP1/IGS4 F8->AP2/IGS4 F10)、HNT 2253(AP1/IGS4 F7->AP2/IGS4 F5)。追加の5' RACE PCR反応は、精巣Marathon-ReadyTM cD

NA上で行い、クローンHNT2279-2281 (AP2/IGS4R6->AP2/IGS4R5)を得た(注:例えばAP1/IGS4F5->AP2/IGS4F9は、一次RACE PCR反応〔プライマー対AP1/IGS4F5を使用〕をプライマー対AP2/IGS4F9とネストした後に得られたIGS4特異性断片からクローンが作製されたことを示す)。

【0120】

これらのクローンの配列分析は、存在するIGS4 cDNAコンティグをさらに3'方向に延長することを可能とするが、IGS4コーディング配列の末端にはまだ到達していない。発現された配列タグ(EST)データベース(dbest)に対するIGS4コンティグDNA配列のコンピューター支援相同性サーチ(Blastn; Altschul S.F. et al., Nucleic Acids Res. (1997) 25:3389-3402)は、IGS4コンティグの3'末端と重複した(重複領域内ではほぼ100%一致)EST配列(受入番号N45474)の存在を示した。EST N45474は、3'末端で、翻訳終止コドン内および3'非翻訳領域(3'-UTR)内にIGS4 DNAコンティグをさらに延長した。さらにIGS4 mRNAの3'-UTRをすべてカバーしたその他のESTの組が同定された(図2)。追加のIGS4特異性プライマー(IGS4R7-8、配列番号29-30)をこれらのESTの3'-UTR内で設計した。IGS4F7(配列番号23)、IGS4F11(配列番号31)、およびIGS47-8(配列番号29-30)プライマーの種々の組み合わせを用いてヒト精巣からMarathon-Ready™ cDNA上で一次PCR反応を行った。PCR管を2分間、95℃に加熱し、次いで変性(95℃、30秒間)、アニーリング(65℃、30秒間)および伸展(72℃、1分30秒間)の35サイクルを行った。最後に、反応管を72℃で10分間加熱した。ネストしたPCR反応も同じ条件下で行った。±1630bpのDNA断片をゲルから精製しそしてpGEM-Tベクター中にクローニングした。下記のクローンが得られた: HNT2311、HNT2312およびHNT2317(IGS4F7/IGS4R7->IGS4F11/IGS4R8); HNT2313、HNT2324、HNT2326およびHNT2328(IGS4F11->IGS4R8); HNT2314、HNT2315およびHNT

2322 (IGS4F11 -> R7)。クローンHNT2363が、精製した1630bp PCR断片から得られ、これを下記のわずかに変更した条件下でIGS4F11/R7プライマー対を用いてヒト精巣Marathon-Ready™ cDNAから増幅した。94 での2分間の初回変性の後に、PCR管を変性〔15秒間、94 〕、アニーリング〔30秒間、65 〕および伸展〔2分間、72 〕の15サイクル、次いで変性〔15秒間、94 〕、アニーリング〔30秒間、65 〕および伸展〔2分間、72 ；+10秒/サイクル〕の別の20サイクルを行った。7分間、72 の最終伸展ステップを行った。これらのクローンの配列分析は、IGS4 cDNA共通配列の構築を可能とした(図1)。すべてのクローンを詳しく検査すると、これらは実際的に2種の配列タイプであり、これらは5個のヌクレオチド位置で異なっていたことが分かった。これらの変種配列は、ヒト母集団の多型に相当する。我々はこれらの種々のcDNAタイプをIGS4ADNA(配列番号1および配列番号3)およびIGS4BDNA(配列番号5および配列番号7)と名付けた。共通配列は、2個のインフレーム開始コドン(IGS4ADNAおよびIGS4BDNA中の位置55-57(配列番号1および配列番号5)および64-66(配列番号3および配列番号7))を含む長いオープンリーディングフレームを含み、これは415(配列番号2および配列番号6)または412(配列番号4および配列番号8)アミノ酸のいずれかのタンパク質を予言し、これはGPCRタンパク質と良い相関を示す。タンパク質のハイドロパシー分析(Kyte J. et al.[1982] J. Mol. Biol. 157:105-132; Klein P. et al.[1985] Biochem. Biophys. Acta 815:468-476)も、7個の膜貫通ドメインの存在を示す。最初のATGイニシエーターコドンが弱い”Kozak”翻訳開始コンテキスト内にありそして第二のものは強いKozakコンテキスト内にあるので、IGS4A/Bタンパク質が第二メチオニンで開始しそして412アミノ酸長であるらしい(Kozak M. [1999] Gene 234, 187-208)。しかし第一ATGにおけるいくらかの(あるいは独占的)開始は除外できない。5種の多型ヌクレオチドの中で、4種(IGS4A/BDNA中の位置947、999、1202および1216)はコードされたアミノ酸残基の切り替えをもたらし、一方、第5(IGS4A/BDNA中の位置1381)は3'-UT

R中にある。それぞれの予言されたタンパク質配列は、IGS4APROT（配列番号2および配列番号4）およびIGS4BPROT（配列番号6および配列番号8）と呼ばれる（注1：本文書内のIGS4APROTおよびIGS4BPROT配列は、最も長い可能な（415アミノ酸）配列として表されるが、しかし実際のタンパク質はアミノ末端においてアミノ酸3個分短いと考えられる；この理由で、表4および5中のIGS4APROTおよびIGS4BPROTの最初のアミノ酸3個は括弧に入れた）（注2：本文書中で、IGS4は、特定の対立遺伝子タイプに関係なく、一般的にIGS4配列を呼ぶ）。公開ドメインタンパク質データベースに対するIGS4タンパク質配列の相同性サーチは、ヒトオーファンGPCR FM-3（受入番号O43664、Tan C.P., et al. Genomics(1998) 52:223-229; IGS4アミノ酸残基26-342中で46%一致）への最善の相同性を示した。

【0121】

IGS4 cDNA配列に関するDNAデータベースの相同性サーチから、IGS4遺伝子座からも誘導されたエントリーの数を得られた（概要は図2）。

- ・10EST配列エントリー（受入番号W61169、A1432384、W61131、A1023570、F01358、F03770、Z38158、R40869、R37725、H11333）、2STS（配列タグ部位）（受入番号G20615およびG05725）および1個のゲノム配列（受入番号AQ078563）が発見され、これらはすべてIGS4 cDNAの3'-UTRから誘導された。

- ・EST受入番号N45474は、IGS4コーディング配列3'末端および3'UTRの一部をコードした（上記参照）。

- ・任意の順序で構築された42個の非整列コンティグから成る「ワーキングドラフト(working draft)」高収量ゲノム配列（受入番号AC008571、バージョンAC008571.1、1999年8月3日寄託）が発見され、この中で我々は4個の分離した領域中に全IGS4 cDNA配列を検出した。これらの領域は、これらに基準プライドナーおよび受容体配列が近接しているため、種々のIGS4エクソンに相当する可能性が非常に高い。この分析に基づいて、I

IGS4ADNA (またはIGS4BDNA) 配列中の種々のエキソンの位置は、下記のように定義できる: エキソン1 (1 - 780)、エキソン2 (781 - 865)、エキソン3 (866 - 991) およびエキソン4 (992 - 1658)。AC008571ゲノム配列は、IGS4A対立遺伝子タイプである。

・構築されたDNA配列がその3'末端でIGS4エキソン2およびエキソン3の最初と重複する6個の重複ESTエントリー (受入番号H11359、R13890、R13353、F07531、F05108、F05107) が発見された。しかし、エキソン2の上流のDNA配列は、IGS4エキソン1とは完全に異なっていた。多分、これらの6個のESTは、別のプロモーターに由来する転写物から誘導されたのであろう。

・最後に、エキソン2をコードする2個のゲノム配列エントリー (受入番号AQ019411およびAQ015065) が発見された。

【0122】

上記の種々の実験で我々が単離した多数のIGS4 cDNAの中から、我々は64bp欠失 (IGS4ADNA中の位置866 - 929) を含む多数のクローンも発見した (スプライスされた (または部分的にスプライスされた) 転写物から誘導された多数のクローンの他に)。これまで我々は多型タイプAの末端切除転写物のみを発見した。我々はこのスプライス変種cDNA配列をIGS4A-64DNA (配列番号9および配列番号11) と呼ぶ。この欠失は正確にエキソン2 / エキソン3境界で起きるので、そして欠失した断片の最後の2個のヌクレオチドが "AG" であるので、この欠失は、エキソン3中の "AG" がスプライス受容体 (splice acceptor) として役立つ別のスプライシングイベントを表すと考えられる。スプライス変種によりコードされたIGS4Aリーディングフレームは、欠失点を越えてフレームシフトされている。296アミノ酸のコード化 (末端切除) タンパク質は、IGS4A-64PROT (配列番号10および配列番号12) と呼ばれる。IGS4A-64PROT配列のヒドロパシー分析は、このタンパク質が5個の膜貫通ドメインのみを含むことを示す (IGS4APROTのTMドメイン1 - 5に相当)。この末端切除受容体は、生理学的関連性を有するであろう。

【0123】

プラスミドHNT2322 (IGS4ADNA挿入物を含む)を内包する細菌株を100 µg アンピシリン/mlを含むLBアガプレート上に再プレーティングした後再クローンしそして両者をインノゲネティクス(Innogenetics)N.V.株表(ICCG4320)および"Centraalbureau voor Schimmelcultures(CBS)" (Baarn, The Netherlands、受入番号CBS102221)の両方に寄託した。プラスミドDNAを再クローンした単離物から作製しそして送入物を再配列決定しそしてIGS4ADNA配列と同一であることを見いだした。

【0124】

プラスミドHNT2363 (IGS4BDNA挿入物を含む)を内包する細胞株を、100 µg アンピシリン/MLを含むLBアガプレート上に再プレーティングした後再クローンしそして両者をインノゲネティクスN.V.株表(ICCG4340)および"Centraalbureau voor Schimmelcultures(CBS)" (Baarn, The Netherlands、受入番号CBS102222)の両方に寄託した。プラスミドDNAを再クローンした単離物から作製しそして送入物を再配列決定しそしてIGS4BDNA配列と同一であることを見いだした。

実施例2. ニューロメジンUによりCHOG 16-IGS4細胞中に誘導された細胞内カルシウム濃度における特異性変化

実施例2a. 実験手順: 方法および材料

A. IGS-4をトランスフェクションしたCHOG 16-細胞のための方法および材料

下記の材料を実験に使用した: IGS4-DNA配列を含むベクター (IGS4-pcDNA3.1); スーパーフェクト(SuperFect) トランスフェクション試薬(Qiagen); 10% FCSを含むナット-ミックス(Nut-Mix) F12 (Gibco); 0.028 mg/ml ゲンタマイシン(Gibco); 0.22 mg/ml ハイグロマイシン(Gibco)。

【0125】

クローン選択に使用した材料: 10% FCSを含むナット-ミックスF12; 0.028 mg/ml ゲンタマイシン; 0.22 mg/ml ハイグロマイシンお

よび 0.55 mg/ml ジェネティシン (Geneticin, Gibco)。

【0126】

下記の方法を適用した：スーパーフェクトトランスフェクション試薬を用いるトランスフェクションを製造者(Qiagen)の記載に従って行った。細胞を24-ウエルプレート上に50%集密までプレーティングした。ウエルあたりに $1 \mu\text{l}$ スーパーフェクトトランスフェクション試薬を含むプラスミドDNA $0.6 \mu\text{g} / \mu\text{l}$ を加えた。24時間後に媒体を交換しそしてトランスフェクションされた細胞クローンをジェネティシン含有選択培地により選択した。IGS4発現細胞クローンがRT-PCRおよびノーザンブロットにより特性決定された。

B.FLIPRアッセイのための方法および材料

細胞調製

細胞調製のために、下記の材料を使用した：プレート：透明、平底、黒色ウエルの96ウエルプレート1(Costar)；培地：培養培地：10%ウシ胎児血清(Gibco)を補足したグルタマックス(Glutamax, Gibco)を含むナット-ミックスF-12(HAM)；培養装置：5%CO₂、37 (Nuair)。

【0127】

方法は下記のように行った：実験の24時間または48時間前に細胞を黒色壁マイクロプレート内に接種した。細胞密度は、48時間インキュベーションには 0.8×10^4 細胞/ウエルそして24時間インキュベーションには 2.2×10^4 細胞/ウエルであった。すべてのステップを滅菌条件下で行った。

染料負荷

細胞内カルシウムレベルの変化を観察するために、カルシウム感受性蛍光染料を用いて細胞を「負荷(loading)」しなければならない。FLUO-4 (Molecular Probes)と呼ばれるこの染料は、488nmで励起され、そしてカルシウムとの錯体が形成された時のみ500-560nm範囲内の光を放射する。染料は最終濃度 $4 \mu\text{M}$ で使用した。染料の溶解度および細胞内への染料の取り込みを増加させるためにプルロン酸を加えた。アニオン交換タンパク質阻害剤であるプロベニシッド(Probenicid)を染料培地に加えて細胞内の染料滞留を上昇させた。

【0128】

下記の材料を使用した：

- ・ 2 mM染料原液：443 μ l 低 - 水分DMSO (Sigma) 中に可溶化した1 mg Fluor-4 (Molecular Probes)。材料は -20 で保管。
- ・ 20%プルロン酸溶液：37 で2 ml 低 - 水分DMSO (Sigma) 中に可溶化した400 mg プルロン酸 (Sigma) 。室温保管。
- ・ 染料/プルロン酸混合物：使用直前に、等体積の染料原液と20%プルロン酸とを混合した。染料およびプルロン酸はそれぞれ最終濃度1 mMおよび10%を有していた。
- ・ プロベニシッド、250 mM原液：5 ml 1 N NaOH中に可溶化しそしてフェノールレッドを含まず20 mM HEPESを補足したハंक (Hank's) BSS溶液 (Gibco) 5 ml と混合した710 mg プロベニシッド (Sigma) 。
- ・ 負荷 - 緩衝液：フェノールレッドを含まず20 mM HEPES、105 μ l プロベニシッド、210 μ l 1 M HEPESを補足したハंक (Hank's) BSS溶液 (Gibco) 10.5 ml。
- ・ 洗浄 - 緩衝液：フェノールレッドを含まず20 mM HEPES (Gibco) および2.5 mM プロベニシッドを補足したハंक (Hank's) BSS溶液 (Gibco) 。

【0129】

本方法は下記のように操作した：染料の2 mM原液を等量の20% (w/v) プルロン酸と、負荷 - 緩衝液への添加の直前に混合した。集密細胞層を乱さないようにして培地をウエルから吸い出した。マルチドロップ (Multidrop, Labsystems) を用いて100 μ l 負荷媒体をそれぞれのウエル中に分配した。細胞を5% CO₂、37 インキュベーター中で30分間インキュベーションした。背景蛍光を算出するために、一部のウエルに染料を負荷しなかった。これらのウエル中の背景蛍光は、細胞の自発蛍光からもたらされた。染料負荷の後、細胞を3回、洗浄緩衝液を用いて洗浄 (自動化されたデンリー (Denley) 細胞洗浄装置) して基底蛍光を背景上20,000 ~ 25,000 カウントに低下させた。100 l 緩衝液を加えそして細胞を37 で実験開始までインキュベーションした。

C. 複合プレートの作製

最初のスクリーニングのためにペプチドを3 μ M (最終濃度の3倍) で調製し

た。濃度応答曲線のために、ペプチド溶液を30 μ Mから100 nMまでの濃度範囲で調製した。すべてのペプチドを0.1% BSA (Sigma) を含む緩衝液中で希釈した。

【0130】

下記の材料を使用した：ペプチド：ブタニューロメジンU25、ラットニューロメジンU-23、ブタニューロメジンU-8 (Bachem)；希釈緩衝液：フェノールレッド(Gibco) を含まず20 mM HEPES (Gibco) および0.1% BSA (Sigma) を補足したハンク(Hank's) BSS溶液；プレート：透明、平底、96ウェルプレート(Costar)。

D. アッセイ

FLIPR設定パラメーターを0.4秒の暴露長さ、フィルター1.50 μ l液体添加、ピペッター高さ125 μ l、分配スピード40 μ l/秒、攪拌なしに設定した。

実施例2b. 結果

オーファンGタンパク質共役型受容体(GPCR)IGS4のための内在性リガンドを同定するために、IGS4(IGS4AおよびIGS4Bの両方の形)をチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞内に安定にトランスフェクションした。IGS4のG-タンパク質共役機構は未知であるので、特異性CHO-細胞株を使用した。これらのCHO-細胞はG-タンパク質G-16(CHOG16, Molecular Devices)を安定に発現し、これはGPCRのための「汎用アダプター」として知られるものである(Milligan G., Marshall F. and Rees S. (1996), G16 as a universal G protein adapter: implications for agonist screening strategies. TIPS 17: 235-237)。

【0131】

得られたCHOG16-IGS4細胞を蛍光測定イメージングプレートリーダー(Fluorometric Imaging Plate Reader, FLIPR)を用いて機能的にスクリーニングして、推定ペプチドリガンドにตอบสนองする細胞内カルシウムの可動度を測定した。10 nMの濃度で、ニューロメジンU-23は大きく、一時的そして強いカルシウム応答を誘発した。反対に、CHOG16細胞および他の非関連オーファ

ンGPCRを発現するCHO G16細胞は、ニューロメジンU-23に应答しなかった。IGS4Bを用いたこれらの実験の結果を図4に示す。

【0132】

さらに、ブタおよびラットニューロメジンUアイソフォームによるIGS4活性化の濃度依存性を研究した(IGS4AおよびIGS4Bの両方の形について)。 $10^{-6} \sim 10^{-12}$ Mの範囲内で、ブタニューロメジンU-25、ラットニューロメジンU-23、ブタニューロメジンU-8は、FLIPRアッセイにおいて特異性IGS4-媒介カルシウム可動化を誘導した。試験したすべての3種類のニューロメジンUアイソフォームは、IGS4Bの同じ最高活性化、すなわち -10.09 ± 0.08 (ニューロメジンU-8、 $n=4$; 80 pM)、 -10.61 ± 0.08 (ニューロメジンU-23、 $n=10$; 50 pM) および -9.14 ± 0.09 (ニューロメジンU-25、 $n=3$; 1.2 nM)のLogEC₅₀値を誘導した。従って、3種すべてのペプチドは、特にIGS4の強力な活性化を起こし、ニューロメジンUがこの受容体に対する天然のアゴニストであることを示唆する。IGS4Bを用いたこれらの実験の結果を図3a(ニューロメジンU-8)、図3b(ニューロメジンU-23)および図3c(ニューロメジンU-25)に示した。

【0133】

IGS4A受容体に関しては、いくらか低いアフィニティーが見いだされたが、しかしニューロメジンUペプチドは一般にIGS4受容体に対して良好なりガンドであることが示された。IGS4Aについて見いだされたLogEC₅₀値は、下記であった;ニューロメジンU-8に対して:LogEC₅₀ = -9.3 ± 0.09 ($n=1$; 485 pM);ニューロメジンU-23に対して:LogEC₅₀ = -7.27 ± 0.16 ($n=6$; 53 nM);そしてニューロメジンU-25に対して:LogEC₅₀ = -6.18 ± 0.14 ($n=3$; 658 nM)。

【0134】

ニューロメジンUによるIGS4の活性化に続いて見られるカルシウム可動化応答は、この受容体がGq/11サブファミリーのGタンパク質に共役することを示唆する。さらに細胞内cAMPの基底レベルは、CHO G16-IGS4細

胞内のブタニューロメジンU - 8 (1 および 1 0 μ M) により調節されず、この受容体がGサブファミリー類のGタンパク質に共役しないことを示唆する(データは記載しない)。

実施例3 . ヒト多重組織発現アレイ (M T E TM) 上の I G S 4 ハイブリダイゼーション

ヒト I G S 4 DNA (p G E M T - h I G S 4 A から の \pm 7 3 0 b p B a m H I / H i n d I I I 挿入物 [I C C G # 4 3 2 0]) を、プライムイット (P r i m e - I t) I I キット TM (S t r a t a g e n e) を用いて比放射能 $> 1 0^9$ c p m / μ g に [^s _x - ³² P] - d C T P のランダムプライム組込みを介して放射能標識した。標識したプローブをセファデックス (S e p h a d e x) G - 5 0 クロマトグラフィーを用いて無標識物から精製し、5分間、95°Cでの変性そしてエクスプレスハイブ (E x p r e s s H y b) ハイブリダイゼーション溶液に最終濃度 $1 \sim 1.5 \times 10^6$ c p m / m l まで加えた。それぞれ供給者の推奨に従って、ヒト多重組織発現 (M T E TM) アレイ (C l o n t e c h # 7 7 7 5 - 1) をプレハイブリダイズしそしてエクスプレスハイブ溶液中、65°Cで30分間および一晩ハイブリダイズした。

【 0 1 3 5 】

ハイブリダイズした M T E TM アレイを、20分間、 $2 \times S S C$ 、1% S D S 中、60°Cで5回、次いで20分間55°Cで $0.1 \times S S C$ 、0.5% S D S 中で2回洗浄した。洗浄の後、ホスホリメーキング (p h o s p h o r i m a g i n g , C y c l o n e S t o r a g e P h o s p h o r S y s t e m , P a c k a r d) を用いてオートラジオグラフィーした (図 5) 。 M T E TM アレイのハイブリダイゼーションデータをオプティクワント (O p t i Q u a n t) イメージ分析ソフトウェア (P a c k a r d) を用いて定量的に分析した。R N A を含む種々のスポット位置のシグナル強度を、空位置から得られた平均背景シグナルにより補正した。大腸菌 D N A を含むスポットから得られたシグナル強度が、I G S 4 発現を示さない試料を表すと考えた。大腸菌のものよりも低いシグナル強度を有する試料を陰性と考えた。

【 0 1 3 6 】

R N A アレイ上の種々の組織のハイブリダイゼーションシグナルは、それぞれの値から大腸菌 D N A で観察されたハイブリダイゼーションシグナル (これを背

景シグナルと考える)を差し引いて再計算した。より低いハイブリダイゼーションシグナルを示すすべての組織を背景以下でありそしてIGS4陰性と考えた。精巢で見いだされた発現レベル(100%)と比較した発現レベルをプロットしそして図7を作製した。

実施例4. ノーザンプロット分析によるIGS4の組織分布

ヒトIGS4A DNA (pGEMT-hIGS4Aからの ± 730 bp BamHI/HindIII挿入物[ICCG#4320])を、プライムイットIIキット™(Stratagene)を用いて比放射能 $> 10^9$ cpm/ μ gに[32 P]-dCTPのランダムプライム組込みを介して放射能標識した。標識したプローブをセファデックスG-50クロマトグラフィーを用いて無標識物から精製し、5分間、95°Cでの変性そしてエクスプレスハイブリダイゼーション溶液に最終濃度 $1 \sim 1.5 \times 10^6$ cpm/mlまで加えた。ヒトノーザンプロット(Clontech #7760-1、#7759-1、#7767-1、#7755-1 および#7769-1)をそれぞれ供給者の推奨に従ってプレハイブリダイズしそしてエクスプレスハイブ溶液中、65°Cで30分間および一晩ハイブリダイズした。

【0137】

ハイブリダイゼーションの後、ノーザンプロットを、10分間、室温で $2 \times$ SSC、0.05%SDS中で4回、次いで40分間、50°Cで $0.1 \times$ SSC、0.5%SDS中で2回洗浄した。洗浄の後、リン貯蔵プレート(phosphor storage plate, Cyclone Storage Phosphor Systems, Packard) およびX線フィルムを用いてノーザンプロットをオートラジオグラフィーした。ノーザンプロットの結果を図6に示す。

【0138】

ノーザンプロット分析の結果は、アレイハイブリダイゼーション(図3)からの結果と大部分は同一であるように見える。これまで最強のシグナル(2.4kb転写物)は精巢に見いだされた。弱い2.4kbバンドが胸腺、脊髄、骨髄、甲状腺、視床、黒質に、そして非常に弱いバンドが脳梁、尾状核および胃に見いだされた。一部の組織で2.4kbバンドはノーザンプロットで見ることができず、一方強くないし中程度のハイブリダイゼーションシグナルがMTEアレイで観

察された(例えば全脳、大脳皮質、肺、側頭葉および前頭葉、扁桃、小脳、腎臓および海馬)。

実施例5 . 定量的RT - PCR分析

種々のヒト組織中のIGS4発現レベルも、ライトサイクラー™(Light Cycle r)装置(Roche Diagnostics) およびIGS4特異性タクマン™(TaqMan)プローブを用いてリアルタイム定量RT - PCR(Q - PCR)を介して測定した。

実施例5 a . 実験操作

A . cDNA合成

逆転写の前に、ヒト全RNAパネルI ~ V(Clontech #K4000-1 ~ K4004-1)からの3 µg全RNAを3U DNAアーゼ(Life Technologies #18068-015)を用い、30 µl 反応体積(20mM Tris pH8.3、50mM KCl、2mM KCl)中、15分間、室温で、含まれている可能性があるゲノムDNAを破壊するために処理した。3 µl 25 mM EDTAを加えそして10分間、65 °Cに加熱して反応を停止した。DNAアーゼ処置RNA 2.6 µgを1.3 µgオリゴ(dT)(Life Technologies #18418-012)を用いてアニールしそしてオムニプラスト(Omniplast)逆転写酵素(Qiagen カタログ番号205111)を用い、1時間、37 °Cで52 µl 反応体積中、酵素の供給者の推奨に従って逆転写させた。オムニプラスト逆転写酵素を93 °Cに5分間加熱して不活性化した。

B . Q - PCR

1Xタクマン™汎用PCRマスターミックス(Universal PCR Mastermix, PE Applied Biosystems カタログ番号#4304437)、0.12 mg BSA/ml、IGS4特異性前進および後退プライマー(IP14,963 およびIP14,964) 900 nM、IGS4特異性タクマン™プローブ(IP14,962) 250 nMおよび鋳型としてcDNA合成反応物の1.6 µl (IGS4)または0.16 µl (GAPDH: グリセルアルデヒド - 三リン酸脱水素酵素)のいずれかを含む20 µl 反応混合物中で定量的PCR反応を行った。IGS4標準曲線を設定するために、IGS4プラスミドICCG4320の一連の希釈系列(10⁷ ~ 10¹ コピー/反応)を使用し、一方GAPDH標準曲線のためにはヒト脳cDNA合成反応物の一連の希釈系列(0.16 µl、0.016 および0.0016 µl)を鋳型とし

て使用した。1 X タクマン™汎用PCRマスターミックスは、アンプリタクゴールド™(AmpliTaq Gold) DNAポリメラーゼ、アンペラーゼ™(AmpErase)UNG (ウラシル - N - グリコシラーゼ)、dUTPを含むdNTP、受動対照標準(passive reference) および最適化緩衝液成分を含んでいた。IGS4特異性プライマーおよびタクマンプローブは、プライマーエクスプレス™(Primer Express)ソフトウェア(PE Applied Biosystems) を用いて設計した。ヒトGAPDHのための定量的PCR反応は、IGS4のための記載と同様の条件で行ったが、ただし、GAPDH特異性プライマーおよびタクマン™プローブをタクマン™GAPDH調節試薬キット(PE Applied Biosystems、カタログ番号#402869;配列情報はPE Applied Biosystems から得られなかった) から使用した。

【0139】

PCR反応は、ライトサイクラー™装置内のガラス毛管キュベット内で行った。50℃、2分間のアンペラーゼ™UNG反応を進行させる最初のインキュベーションおよびアンプリタクゴールドDNAポリメラーゼの活性化(95℃、10分間)の後、反応混合物を、変性(15秒間、95℃)およびアニーリング/伸展(1分間、60℃〔GAPDH〕または68℃〔IGS4〕のいずれか)の40サイクルを行った。実験試料の定量分析は、ライトサイクラーソフトウェアバージョン3.0を用いて行った。IGS4プラスミドの量とレポーター染料の放出との間に、 10^{-1} ~ 10^7 IGS4プラスミドコピーの範囲内で良好な線型関係が得られた。我々はまた連続的に希釈した脳cDNAを用いてGAPDHタクマン™プローブと線型標準曲線を得た。相対GAPDH発現レベルは、骨格筋内で観察されたものの0.4 ~ 10.2%の範囲内であり、試験したすべての組織のものは、最高のGAPDH発現レベルを有していた。相対GAPDH発現レベルは、試験したすべての組織中で最高のIGS4発現レベルを発現した脊髄中で検出されたレベルとの割合で表した(図8)。我々は、相対GAPDH発現レベルもGAPDHハウスキーピング遺伝子の発現に関して正規化した後にプロットした(図8)。

実施例5b. 結果

IGS4特異性タクマンプローブを用いたQ-PCRは、最高発現レベル(G

A P D Hに関する正規化せず)が脊髄中で見いだされることを示した。脊髄中の I G S 4 発現レベルは、11,467コピーmRNA/ng pA RNAに達した(cDNA合成反応の100%効率を仮定そしてpA RNAが全RNAの2%を構成すると仮定した)。高いI G S 4 発現レベルは、脳(脊髄レベルの41%)、骨格筋(37%)、小脳(31%)、精巣(19%)および肺臓(12%)および心臓(11%)で見いだされた。低い発現レベルは、胎児脳(5%)、気管(4%)、前立腺(2%)および甲状腺(1.4%)に見いだされた。G A P D H発現に関して正規化後、相対I G S 4 発現パターンは、相対発現が脊髄中のものの2%に低下した骨格筋を除いて大きくは変化しなかった。G A P D Hに関する正規化が正しい手順であるかどうかは明らかでないので(G A P D H発現レベルは種々の細胞/組織タイプ内で多少とも変化すると予想できる)、我々は非-正規化正規化合物相対発現レベルに焦点を当てることを選んだ。

【0140】

これらのQ-PCRデータは、RNAアレイ(実施例3)およびノーザンブロット(実施例4)ハイブリダイゼーション実験からの発現データと、精巣、脊髄および脳がなかでも最も著しい発現部位であるという意味で調和すると考えられる。しかし、Q-PCR分析は、多数の他の組織、例えば骨格筋、小脳、肺臓および心臓内での重要な発現も別に示す。

【0141】

リガンドのニューロメジンUは、特定の受容体の知識はないが神経ペプチドまたは神経モジュレーターとして提示された(Domin J., Ghatei M.A., Chohan P. and Bloom S.R. (1987), Peptides 8: 779-784)。我々の研究は、I G S 4がニューロメジンU-受容体ファミリーの新規の一員であり、DNAおよびPNS領域、胃腸系、免疫学的系、尿生殖器系および心臓血管系、骨格筋、甲状腺および肺臓内で発現されることを示す。

【0142】

【表8】

表8:IGS4 Q-PCR反応に使用したPCRオリゴヌクレオチドプライマーおよびタクマンプローブの概要

配列番号:32	IP 14,963	5'-CCTCTTCAGCCTGGCGGTCTCTG-3'
配列番号:33	IP 14,964	5'- GGAGGCGAAGCACACGGTCTCA-3'
配列番号:34	IP 14,962	5'(FAM)-AGATGTGGCGCAACTACCCTTTCTTGTTCTCGGGCC-(TAMRA)3'

【0143】

本明細書内に引用されたすべての出版物は、特許および特許申請も含み、これらに限定されることなく、それぞれの個別の出版物が、完全に記載の通りに本明細書中に引用されて組み込まれると特定および個別に指定されるように、引用することにより本明細書中に編入される。

【0144】

【表9】

Original (for SUBMISSION) - printed on 25.09.2000 12:53:10 PM

0-1	Form - PCT/RO/134 (EASY) Indications Relating to Deposited Microorganism(s) or Other Biological Material (PCT Rule 13bis)	
0-1-1	Prepared using	PCT-EASY Version 2.90 (updated 15.12.1999)
0-2	International Application No.	PCT/EP 00 / 09584
0-3	Applicant's or agent's file reference	SPW99.06
1	The indications made below relate to the deposited microorganism(s) or other biological material referred to in the description on:	
1-1	page	44
1-2	line	25>
1-3	Identification of Deposit	
1-3-1	Name of depositary institution	Centraalbureau voor Schimmelcultures
1-3-2	Address of depositary institution	Oosterstraat 1, Postbus 273, NL-3740 AG Baarn, Netherlands
1-3-3	Date of deposit	24 September 1999 (24.09.1999)
1-3-4	Accession Number	CBS 102221
1-4	Additional Indications	none
1-5	Designated States for Which Indications are Made	all designated States
1-6	Separate Furnishing of Indications These indications will be submitted to the International Bureau later	none
2	The indications made below relate to the deposited microorganism(s) or other biological material referred to in the description on:	
2-1	page	44
2-2	line	30>
2-3	Identification of Deposit	
2-3-1	Name of depositary institution	Centraalbureau voor Schimmelcultures
2-3-2	Address of depositary institution	Oosterstraat 1, Postbus 273, NL-3740 AG Baarn, Netherlands
2-3-3	Date of deposit	24 September 1999 (24.09.1999)
2-3-4	Accession Number	CBS 102222
2-4	Additional Indications	none
2-5	Designated States for Which Indications are Made	all designated States
2-6	Separate Furnishing of Indications These indications will be submitted to the International Bureau later	none
FOR RECEIVING OFFICE USE ONLY		
0-4	This form was received with the international application: (yes or no)	27.09.2000

【 0 1 4 5 】

【表10】

Original (for **SUBMISSION**) - printed on 25.09.2000 12:53:10 PM

0-4-1	Authorized officer	 Rocky van Amstel
-------	--------------------	---

FOR INTERNATIONAL BUREAU USE ONLY

0-5	This form was received by the international Bureau on:	
0-5-1	Authorized officer	

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> SOLVAY PHARMACEUTICALS B.V.

<120> Novel human G-protein coupled Receptor

<130> SPW99.06/HA 00.19

<140>

<141>

<160> 34

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1658

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (55)..(1299)

<223> IGS4A long version

<400> 1

```

ggctcagctt gaaacagagc ctcgtaccag gggaggctca ggccttggat ttta atg 57
                                                    Met
                                                    1

tca ggg atg gaa aaa ctt cag aat gct tcc tgg atc tac cag cag aaa 105
Ser Gly Met Glu Lys Leu Gln Asn Ala Ser Trp Ile Tyr Gln Gln Lys
           5                10                15

cta gaa gat cca ttc cag aaa cac ctg aac agc acc gag gag tat ctg 153
Leu Glu Asp Pro Phe Gln Lys His Leu Asn Ser Thr Glu Glu Tyr Leu
           20                25                30

gcc ttc ctc tgc gga cct cgg cgc agc cac ttc ttc ctc ccc gtg tct 201
Ala Phe Leu Cys Gly Pro Arg Arg Ser His Phe Phe Leu Pro Val Ser
           35                40                45

gtg gtg tat gtg cca att ttt gtg gtg ggg gtc att ggc aat gtc ctg 249
Val Val Tyr Val Pro Ile Phe Val Val Gly Val Ile Gly Asn Val Leu
           50                55                60                65

gtg tgc ctg gtg att ctg cag cac cag gct atg aag acg ccc acc aac 297
Val Cys Leu Val Ile Leu Gln His Gln Ala Met Lys Thr Pro Thr Asn
           70                75                80

tac tac ctc ttc agc ctg gcg gtc tct gac ctc ctg gtc ctg ctc ctt 345
Tyr Tyr Leu Phe Ser Leu Ala Val Ser Asp Leu Leu Val Leu Leu Leu
           85                90                95

gga atg ccc ctg gag gtc tat gag atg tgg cgc aac tac cct ttc ttg 393
Gly Met Pro Leu Glu Val Tyr Glu Met Trp Arg Asn Tyr Pro Phe Leu

```

100	105	110	
ttc ggg ccc gtg ggc tgc tac	ttc aag acg gcc ctc	ttt gag acc gtg	441
Phe Gly Pro Val Gly Cys Tyr	Phe Lys Thr Ala Leu	Phe Glu Thr Val	
115	120	125	
tgc ttc gcc tcc atc ctc agc	atc acc acc gtc agc	gtg gag cgc tac	489
Cys Phe Ala Ser Ile Leu Ser	Ile Thr Thr Val Ser	Val Glu Arg Tyr	
130	135	140 145	
gtg gcc atc cta cac ccg ttc	cgc gcc aaa ctg cag	agc acc cgg cgc	537
Val Ala Ile Leu His Pro Phe	Arg Ala Lys Leu Gln	Ser Thr Arg Arg	
150	155	160	
cgg gcc ctc agg atc ctc ggc	atc gtc tgg ggc ttc	tcc gtg ctc ttc	585
Arg Ala Leu Arg Ile Leu Gly	Ile Val Trp Gly Phe	Ser Val Leu Phe	
165	170	175	
tcc ctg ccc aac acc agc atc	cat ggc atc aag ttc	cac tac ttc ccc	633
Ser Leu Pro Asn Thr Ser Ile	His Gly Ile Lys Phe	His Tyr Phe Pro	
180	185	190	
aat ggg tcc ctg gtc cca ggt	tcg gcc acc tgt acg	gtc atc aag ccc	681
Asn Gly Ser Leu Val Pro Gly	Ser Ala Thr Cys Thr	Val Ile Lys Pro	
195	200	205	
atg tgg atc tac aat ttc atc	atc cag gtc acc tcc	ttc cta ttc tac	729
Met Trp Ile Tyr Asn Phe Ile	Ile Gln Val Thr Ser	Phe Leu Phe Tyr	
210	215	220 225	
ctc ctc ccc atg act gtc atc	agt gtc ctc tac tac	ctc atg gca ctc	777
Leu Leu Pro Met Thr Val Ile	Ser Val Leu Tyr Tyr	Leu Met Ala Leu	
230	235	240	
aga cta aag aaa gac aaa tct	ctt gag gca gat gaa	ggg aat gca aat	825
Arg Leu Lys Lys Asp Lys Ser	Leu Glu Ala Asp Glu	Gly Asn Ala Asn	
245	250	255	
att caa aga ccc tgc aga aaa	tca gtc aac aag atg	ctg ttt gtc ttg	873
Ile Gln Arg Pro Cys Arg Lys	Ser Val Asn Lys Met	Leu Phe Val Leu	
260	265	270	
gtc tta gtg ttt gct atc tgt	tgg gcc ccg ttc cac	att gac cga ctc	921
Val Leu Val Phe Ala Ile Cys	Trp Ala Pro Phe His	Ile Asp Arg Leu	
275	280	285	
ttc ttc agc ttt gtg gag gag	tgg agt gaa tcc ctg	gct gct gtg ttc	969
Phe Phe Ser Phe Val Glu Glu	Trp Ser Glu Ser Leu	Ala Ala Val Phe	
290	295	300 305	
aac ctc gtc cat gtg gtg tca	ggt gtc ttc ttc tac	ctg agc tca gct	1017
Asn Leu Val His Val Val Ser	Gly Val Phe Phe Tyr	Leu Ser Ser Ala	
310	315	320	
gtc aac ccc att atc tat aac	cta ctg tct cgc cgc	ttc cag gca gca	1065
Val Asn Pro Ile Ile Tyr Asn	Leu Leu Ser Arg Arg	Phe Gln Ala Ala	

Asn Tyr Tyr Leu Phe Ser Leu Ala Val Ser Asp Leu Leu Val Leu Leu
 85 90 95
 Leu Gly Met Pro Leu Glu Val Tyr Glu Met Trp Arg Asn Tyr Pro Phe
 100 105 110
 Leu Phe Gly Pro Val Gly Cys Tyr Phe Lys Thr Ala Leu Phe Glu Thr
 115 120 125
 Val Cys Phe Ala Ser Ile Leu Ser Ile Thr Thr Val Ser Val Glu Arg
 130 135 140
 Tyr Val Ala Ile Leu His Pro Phe Arg Ala Lys Leu Gln Ser Thr Arg
 145 150 155 160
 Arg Arg Ala Leu Arg Ile Leu Gly Ile Val Trp Gly Phe Ser Val Leu
 165 170 175
 Phe Ser Leu Pro Asn Thr Ser Ile His Gly Ile Lys Phe His Tyr Phe
 180 185 190
 Pro Asn Gly Ser Leu Val Pro Gly Ser Ala Thr Cys Thr Val Ile Lys
 195 200 205
 Pro Met Trp Ile Tyr Asn Phe Ile Ile Gln Val Thr Ser Phe Leu Phe
 210 215 220
 Tyr Leu Leu Pro Met Thr Val Ile Ser Val Leu Tyr Tyr Leu Met Ala
 225 230 235 240
 Leu Arg Leu Lys Lys Asp Lys Ser Leu Glu Ala Asp Glu Gly Asn Ala
 245 250 255
 Asn Ile Gln Arg Pro Cys Arg Lys Ser Val Asn Lys Met Leu Phe Val
 260 265 270
 Leu Val Leu Val Phe Ala Ile Cys Trp Ala Pro Phe His Ile Asp Arg
 275 280 285
 Leu Phe Phe Ser Phe Val Glu Glu Trp Ser Glu Ser Leu Ala Ala Val
 290 295 300
 Phe Asn Leu Val His Val Val Ser Gly Val Phe Phe Tyr Leu Ser Ser
 305 310 315 320
 Ala Val Asn Pro Ile Ile Tyr Asn Leu Leu Ser Arg Arg Phe Gln Ala
 325 330 335
 Ala Phe Gln Asn Val Ile Ser Ser Phe His Lys Gln Trp His Ser Gln
 340 345 350
 His Asp Pro Gln Leu Pro Pro Ala Gln Arg Asn Ile Phe Leu Thr Glu
 355 360 365
 Cys His Phe Val Glu Leu Thr Glu Asp Ile Gly Pro Gln Phe Pro Cys
 370 375 380

Gln Ser Ser Met His Asn Ser His Leu Pro Thr Ala Leu Ser Ser Glu
385 390 395 400

Gln Met Ser Arg Thr Asn Tyr Gln Ser Phe His Phe Asn Lys Thr
405 410 415

<210> 3

<211> 1658

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (64)..(1299)

<223> IGS4A short version

<400> 3

ggctcagctt gaaacagagc ctcgtagcag gggaggctca ggccttggat tttaatgtca 60

ggg atg gaa aaa ctt cag aat gct tcc tgg atc tac cag cag aaa cta 108
Met Glu Lys Leu Gln Asn Ala Ser Trp Ile Tyr Gln Gln Lys Leu
1 5 10 15

gaa gat cca ttc cag aaa cac ctg aac agc acc gag gag tat ctg gcc 156
Glu Asp Pro Phe Gln Lys His Leu Asn Ser Thr Glu Glu Tyr Leu Ala
20 25 30

ttc ctc tgc gga cct cgg cgc agc cac ttc ttc ctc ccc gtg tct gtg 204
Phe Leu Cys Gly Pro Arg Arg Ser His Phe Phe Leu Pro Val Ser Val
35 40 45

gtg tat gtg cca att ttt gtg gtg ggg gtc att ggc aat gtc ctg gtg 252
Val Tyr Val Pro Ile Phe Val Val Gly Val Ile Gly Asn Val Leu Val
50 55 60

tgc ctg gtg att ctg cag cac cag gct atg aag acg ccc acc aac tac 300
Cys Leu Val Ile Leu Gln His Gln Ala Met Lys Thr Pro Thr Asn Tyr
65 70 75

tac ctc ttc agc ctg gcg gtc tct gac ctc ctg gtc ctg ctc ctt gga 348
Tyr Leu Phe Ser Leu Ala Val Ser Asp Leu Leu Val Leu Leu Leu Gly
80 85 90 95

atg ccc ctg gag gtc tat gag atg tgg cgc aac tac cct ttc ttg ttc 396
Met Pro Leu Glu Val Tyr Glu Met Trp Arg Asn Tyr Pro Phe Leu Phe
100 105 110

ggg ccc gtg ggc tgc tac ttc aag acg gcc ctc ttt gag acc gtg tgc 444
Gly Pro Val Gly Cys Tyr Phe Lys Thr Ala Leu Phe Glu Thr Val Cys
115 120 125

ttc gcc tcc atc ctc agc atc acc acc gtc agc gtg gag cgc tac gtg 492
Phe Ala Ser Ile Leu Ser Ile Thr Thr Val Ser Val Glu Arg Tyr Val

130	135	140	
gcc atc cta cac ccg ttc cgc gcc aaa ctg cag agc acc cgg cgc cgg			540
Ala Ile Leu His Pro Phe Arg Ala Lys Leu Gln Ser Thr Arg Arg Arg			
145	150	155	
gcc ctc agg atc ctc ggc atc gtc tgg ggc ttc tcc gtg ctc ttc tcc			588
Ala Leu Arg Ile Leu Gly Ile Val Trp Gly Phe Ser Val Leu Phe Ser			
160	165	170	175
ctg ccc aac acc agc atc cat ggc atc aag ttc cac tac ttc ccc aat			636
Leu Pro Asn Thr Ser Ile His Gly Ile Lys Phe His Tyr Phe Pro Asn			
180	185	190	
ggg tcc ctg gtc cca ggt tgg gcc acc tgt acg gtc atc aag ccc atg			684
Gly Ser Leu Val Pro Gly Ser Ala Thr Cys Thr Val Ile Lys Pro Met			
195	200	205	
tgg atc tac aat ttc atc atc cag gtc acc tcc ttc cta ttc tac ctc			732
Trp Ile Tyr Asn Phe Ile Ile Gln Val Thr Ser Phe Leu Phe Tyr Leu			
210	215	220	
ctc ccc atg act gtc atc agt gtc ctc tac tac ctc atg gca ctc aga			780
Leu Pro Met Thr Val Ile Ser Val Leu Tyr Tyr Leu Met Ala Leu Arg			
225	230	235	
cta aag aaa gac aaa tct ctt gag gca gat gaa ggg aat gca aat att			828
Leu Lys Lys Asp Lys Ser Leu Glu Ala Asp Glu Gly Asn Ala Asn Ile			
240	245	250	255
caa aga ccc tgc aga aaa tca gtc aac aag atg ctg ttt gtc ttg gtc			876
Gln Arg Pro Cys Arg Lys Ser Val Asn Lys Met Leu Phe Val Leu Val			
260	265	270	
tta gtg ttt gct atc tgt tgg gcc ccg ttc cac att gac cga ctc ttc			924
Leu Val Phe Ala Ile Cys Trp Ala Pro Phe His Ile Asp Arg Leu Phe			
275	280	285	
ttc agc ttt gtg gag gag tgg agt gaa tcc ctg gct gct gtg ttc aac			972
Phe Ser Phe Val Glu Glu Trp Ser Glu Ser Leu Ala Ala Val Phe Asn			
290	295	300	
ctc gtc cat gtg gtg tca ggt gtc ttc ttc tac ctg agc tca gct gtc			1020
Leu Val His Val Val Ser Gly Val Phe Phe Tyr Leu Ser Ser Ala Val			
305	310	315	
aac ccc att atc tat aac cta ctg tct cgc cgc ttc cag gca gca ttc			1068
Asn Pro Ile Ile Tyr Asn Leu Leu Ser Arg Arg Phe Gln Ala Ala Phe			
320	325	330	335
cag aat gtg atc tct tct ttc cac aaa cag tgg cac tcc cag cat gac			1116
Gln Asn Val Ile Ser Ser Phe His Lys Gln Trp His Ser Gln His Asp			
340	345	350	
cca cag ttg cca cct gcc cag cgg aac atc ttc ctg aca gaa tgc cac			1164
Pro Gln Leu Pro Pro Ala Gln Arg Asn Ile Phe Leu Thr Glu Cys His			

```

          355                360                365
ttt gtg gag ctg acc gaa gat ata ggt ccc caa ttc cca tgt cag tca 1212
Phe Val Glu Leu Thr Glu Asp Ile Gly Pro Gln Phe Pro Cys Gln Ser
          370                375                380

tcc atg cac aac tct cac ctc cca aca gcc ctc tct agt gaa cag atg 1260
Ser Met His Asn Ser His Leu Pro Thr Ala Leu Ser Ser Glu Gln Met
          385                390                395

tca aga aca aac tat caa agc ttc cac ttt aac aaa acc tgaattcttt 1309
Ser Arg Thr Asn Tyr Gln Ser Phe His Phe Asn Lys Thr
400                405                410

cagagctgac tctcctctat gcctcaaac ttcagagagg aacatcccat aatgtatgcc 1369

ttctcatatg atattagaga ggtagaatgg ctcttacaac tcatgtaccc attgctagtt 1429

tttttttttt aataaacgtg aaaactgaga gttagatctg gtttcaaac ccaagactgc 1489

ctgattttta gttatctttc cactatccta actgcctcat gcccttcac tagttcatgc 1549

caagaacgtg actggaaagg catggcacct ataccttgat taatttccat taatggaaat 1609

ggttcgtcct gagtcatcta cgttccgagt caggctgtca ctctacta 1658

<210> 4
<211> 412
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 4
Met Glu Lys Leu Gln Asn Ala Ser Trp Ile Tyr Gln Gln Lys Leu Glu
  1                5                10                15

Asp Pro Phe Gln Lys His Leu Asn Ser Thr Glu Glu Tyr Leu Ala Phe
          20                25                30

Leu Cys Gly Pro Arg Arg Ser His Phe Phe Leu Pro Val Ser Val Val
          35                40                45

Tyr Val Pro Ile Phe Val Val Gly Val Ile Gly Asn Val Leu Val Cys
          50                55                60

Leu Val Ile Leu Gln His Gln Ala Met Lys Thr Pro Thr Asn Tyr Tyr
          65                70                75                80

Leu Phe Ser Leu Ala Val Ser Asp Leu Leu Val Leu Leu Leu Gly Met
          85                90                95

Pro Leu Glu Val Tyr Glu Met Trp Arg Asn Tyr Pro Phe Leu Phe Gly
          100                105                110

Pro Val Gly Cys Tyr Phe Lys Thr Ala Leu Phe Glu Thr Val Cys Phe
          115                120                125

```

Ala Ser Ile Leu Ser Ile Thr Thr Val Ser Val Glu Arg Tyr Val Ala
 130 135 140
 Ile Leu His Pro Phe Arg Ala Lys Leu Gln Ser Thr Arg Arg Arg Ala
 145 150 155 160
 Leu Arg Ile Leu Gly Ile Val Trp Gly Phe Ser Val Leu Phe Ser Leu
 165 170 175
 Pro Asn Thr Ser Ile His Gly Ile Lys Phe His Tyr Phe Pro Asn Gly
 180 185 190
 Ser Leu Val Pro Gly Ser Ala Thr Cys Thr Val Ile Lys Pro Met Trp
 195 200 205
 Ile Tyr Asn Phe Ile Ile Gln Val Thr Ser Phe Leu Phe Tyr Leu Leu
 210 215 220
 Pro Met Thr Val Ile Ser Val Leu Tyr Tyr Leu Met Ala Leu Arg Leu
 225 230 235 240
 Lys Lys Asp Lys Ser Leu Glu Ala Asp Glu Gly Asn Ala Asn Ile Gln
 245 250 255
 Arg Pro Cys Arg Lys Ser Val Asn Lys Met Leu Phe Val Leu Val Leu
 260 265 270
 Val Phe Ala Ile Cys Trp Ala Pro Phe His Ile Asp Arg Leu Phe Phe
 275 280 285
 Ser Phe Val Glu Glu Trp Ser Glu Ser Leu Ala Ala Val Phe Asn Leu
 290 295 300
 Val His Val Val Ser Gly Val Phe Phe Tyr Leu Ser Ser Ala Val Asn
 305 310 315 320
 Pro Ile Ile Tyr Asn Leu Leu Ser Arg Arg Phe Gln Ala Ala Phe Gln
 325 330 335
 Asn Val Ile Ser Ser Phe His Lys Gln Trp His Ser Gln His Asp Pro
 340 345 350
 Gln Leu Pro Pro Ala Gln Arg Asn Ile Phe Leu Thr Glu Cys His Phe
 355 360 365
 Val Glu Leu Thr Glu Asp Ile Gly Pro Gln Phe Pro Cys Gln Ser Ser
 370 375 380
 Met His Asn Ser His Leu Pro Thr Ala Leu Ser Ser Glu Gln Met Ser
 385 390 395 400
 Arg Thr Asn Tyr Gln Ser Phe His Phe Asn Lys Thr
 405 410

```

<210> 5
<211> 1658
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (55)..(1299)
<223> IGS4B long version

<400> 5
ggctcagctt gaaacagagc ctcgtaccag gggaggctca ggccttggat ttta atg 57
Met
1

tca ggg atg gaa aaa ctt cag aat gct tcc tgg atc tac cag cag aaa 105
Ser Gly Met Glu Lys Leu Gln Asn Ala Ser Trp Ile Tyr Gln Gln Lys
5 10 15

cta gaa gat cca ttc cag aaa cac ctg aac agc acc gag gag tat ctg 153
Leu Glu Asp Pro Phe Gln Lys His Leu Asn Ser Thr Glu Glu Tyr Leu
20 25 30

gcc ttc ctc tgc gga cct cgg cgc agc cac ttc ttc ctc ccc gtg tct 201
Ala Phe Leu Cys Gly Pro Arg Arg Ser His Phe Phe Leu Pro Val Ser
35 40 45

gtg gtg tat gtg cca att ttt gtg gtg ggg gtc att ggc aat gtc ctg 249
Val Val Tyr Val Pro Ile Phe Val Val Gly Val Ile Gly Asn Val Leu
50 55 60 65

gtg tgc ctg gtg att ctg cag cac cag gct atg aag acg ccc acc aac 297
Val Cys Leu Val Ile Leu Gln His Gln Ala Met Lys Thr Pro Thr Asn
70 75 80

tac tac ctc ttc agc ctg gcg gtc tct gac ctc ctg gtc ctg ctc ctt 345
Tyr Tyr Leu Phe Ser Leu Ala Val Ser Asp Leu Leu Val Leu Leu Leu
85 90 95

gga atg ccc ctg gag gtc tat gag atg tgg cgc aac tac cct ttc ttg 393
Gly Met Pro Leu Glu Val Tyr Glu Met Trp Arg Asn Tyr Pro Phe Leu
100 105 110

ttc ggg ccc gtg ggc tgc tac ttc aag acg gcc ctc ttt gag acc gtg 441
Phe Gly Pro Val Gly Cys Tyr Phe Lys Thr Ala Leu Phe Glu Thr Val
115 120 125

tgc ttc gcc tcc atc ctc agc atc acc acc gtc agc gtg gag cgc tac 489
Cys Phe Ala Ser Ile Leu Ser Ile Thr Thr Val Ser Val Glu Arg Tyr
130 135 140 145

gtg gcc atc cta cac ccg ttc cgc gcc aaa ctg cag agc acc cgg cgc 537
Val Ala Ile Leu His Pro Phe Arg Ala Lys Leu Gln Ser Thr Arg Arg
150 155 160

```

cgg gcc ctc agg atc ctc ggc atc gtc tgg ggc ttc tcc gtg ctc ttc	585
Arg Ala Leu Arg Ile Leu Gly Ile Val Trp Gly Phe Ser Val Leu Phe	
165 170 175	
tcc ctg ccc aac acc agc atc cat ggc atc aag ttc cac tac ttc ccc	633
Ser Leu Pro Asn Thr Ser Ile His Gly Ile Lys Phe His Tyr Phe Pro	
180 185 190	
aat ggg tcc ctg gtc cca ggt tgg gcc acc tgt acg gtc atc aag ccc	681
Asn Gly Ser Leu Val Pro Gly Ser Ala Thr Cys Thr Val Ile Lys Pro	
195 200 205	
atg tgg atc tac aat ttc atc atc cag gtc acc tcc ttc cta ttc tac	729
Met Trp Ile Tyr Asn Phe Ile Ile Gln Val Thr Ser Phe Leu Phe Tyr	
210 215 220 225	
ctc ctc ccc atg act gtc atc agt gtc ctc tac tac ctc atg gca ctc	777
Leu Leu Pro Met Thr Val Ile Ser Val Leu Tyr Tyr Leu Met Ala Leu	
230 235 240	
aga cta aag aaa gac aaa tct ctt gag gca gat gaa ggg aat gca aat	825
Arg Leu Lys Lys Asp Lys Ser Leu Glu Ala Asp Glu Gly Asn Ala Asn	
245 250 255	
att caa aga ccc tgc aga aaa tca gtc aac aag atg ctg ttt gtc ttg	873
Ile Gln Arg Pro Cys Arg Lys Ser Val Asn Lys Met Leu Phe Val Leu	
260 265 270	
gtc tta gtg ttt gct atc tgt tgg gcc cgg ttc cac att gac cga ctc	921
Val Leu Val Phe Ala Ile Cys Trp Ala Pro Phe His Ile Asp Arg Leu	
275 280 285	
ttc ttc agc ttt gtg gag gag tgg act gaa tcc ctg gct gct gtg ttc	969
Phe Phe Ser Phe Val Glu Glu Trp Thr Glu Ser Leu Ala Ala Val Phe	
290 295 300 305	
aac ctc gtc cat gtg gtg tca ggt gtc tta ttc tac ctg agc tca gct	1017
Asn Leu Val His Val Val Ser Gly Val Leu Phe Tyr Leu Ser Ser Ala	
310 315 320	
gtc aac ccc att atc tat aac cta ctg tct cgc cgc ttc cag gca gca	1065
Val Asn Pro Ile Ile Tyr Asn Leu Leu Ser Arg Arg Phe Gln Ala Ala	
325 330 335	
ttc cag aat gtg atc tct tct ttc cac aaa cag tgg cac tcc cag cat	1113
Phe Gln Asn Val Ile Ser Ser Phe His Lys Gln Trp His Ser Gln His	
340 345 350	
gac cca cag ttg cca cct gcc cag cgg aac atc ttc ctg aca gaa tgc	1161
Asp Pro Gln Leu Pro Pro Ala Gln Arg Asn Ile Phe Leu Thr Glu Cys	
355 360 365	
cac ttt gtg gag ctg acc gaa gat ata ggt ccc caa ttc cta tgt cag	1209
His Phe Val Glu Leu Thr Glu Asp Ile Gly Pro Gln Phe Leu Cys Gln	
370 375 380 385	

tca tcc gtg cac aac tct cac ctc cca aca gcc ctc tct agt gaa cag 1257
 Ser Ser Val His Asn Ser His Leu Pro Thr Ala Leu Ser Ser Glu Gln
 390 395 400

atg tca aga aca aac tat caa agc ttc cac ttt aac aaa acc 1299
 Met Ser Arg Thr Asn Tyr Gln Ser Phe His Phe Asn Lys Thr
 405 410 415

tgaattcttt cagagctgac tctcctctat gctcaaaac ttcagagagg aacatcccat 1359

aatgtatgcc ttctcatatg aaattagaga ggtagaatgg ctcttacaac tcatgtaccc 1419

attgctagtt tttttttttt aataaacgtg aaaactgaga gttagatctg gtttcaaac 1479

ccaagactgc ctgattttta gttatctttc cactatccta actgectcat gcccttcac 1539

tagttcatgc caagaacgtg actggaaagg catggcacct ataccttgat taatttccat 1599

taatggaaat ggttcgtcct gagtcaccta cgttccgagt caggctgtca ctctacta 1658

<210> 6

<211> 415

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Met Ser Gly Met Glu Lys Leu Gln Asn Ala Ser Trp Ile Tyr Gln Gln
 1 5 10 15

Lys Leu Glu Asp Pro Phe Gln Lys His Leu Asn Ser Thr Glu Glu Tyr
 20 25 30

Leu Ala Phe Leu Cys Gly Pro Arg Arg Ser His Phe Phe Leu Pro Val
 35 40 45

Ser Val Val Tyr Val Pro Ile Phe Val Val Gly Val Ile Gly Asn Val
 50 55 60

Leu Val Cys Leu Val Ile Leu Gln His Gln Ala Met Lys Thr Pro Thr
 65 70 75 80

Asn Tyr Tyr Leu Phe Ser Leu Ala Val Ser Asp Leu Leu Val Leu Leu
 85 90 95

Leu Gly Met Pro Leu Glu Val Tyr Glu Met Trp Arg Asn Tyr Pro Phe
 100 105 110

Leu Phe Gly Pro Val Gly Cys Tyr Phe Lys Thr Ala Leu Phe Glu Thr
 115 120 125

Val Cys Phe Ala Ser Ile Leu Ser Ile Thr Thr Val Ser Val Glu Arg
 130 135 140

Tyr Val Ala Ile Leu His Pro Phe Arg Ala Lys Leu Gln Ser Thr Arg
 145 150 155 160

Arg Arg Ala Leu Arg Ile Leu Gly Ile Val Trp Gly Phe Ser Val Leu
 165 170 175
 Phe Ser Leu Pro Asn Thr Ser Ile His Gly Ile Lys Phe His Tyr Phe
 180 185 190
 Pro Asn Gly Ser Leu Val Pro Gly Ser Ala Thr Cys Thr Val Ile Lys
 195 200 205
 Pro Met Trp Ile Tyr Asn Phe Ile Ile Gln Val Thr Ser Phe Leu Phe
 210 215 220
 Tyr Leu Leu Pro Met Thr Val Ile Ser Val Leu Tyr Tyr Leu Met Ala
 225 230 235 240
 Leu Arg Leu Lys Lys Asp Lys Ser Leu Glu Ala Asp Glu Gly Asn Ala
 245 250 255
 Asn Ile Gln Arg Pro Cys Arg Lys Ser Val Asn Lys Met Leu Phe Val
 260 265 270
 Leu Val Leu Val Phe Ala Ile Cys Trp Ala Pro Phe His Ile Asp Arg
 275 280 285
 Leu Phe Phe Ser Phe Val Glu Glu Trp Thr Glu Ser Leu Ala Ala Val
 290 295 300
 Phe Asn Leu Val His Val Val Ser Gly Val Leu Phe Tyr Leu Ser Ser
 305 310 315 320
 Ala Val Asn Pro Ile Ile Tyr Asn Leu Leu Ser Arg Arg Phe Gln Ala
 325 330 335
 Ala Phe Gln Asn Val Ile Ser Ser Phe His Lys Gln Trp His Ser Gln
 340 345 350
 His Asp Pro Gln Leu Pro Pro Ala Gln Arg Asn Ile Phe Leu Thr Glu
 355 360 365
 Cys His Phe Val Glu Leu Thr Glu Asp Ile Gly Pro Gln Phe Leu Cys
 370 375 380
 Gln Ser Ser Val His Asn Ser His Leu Pro Thr Ala Leu Ser Ser Glu
 385 390 395 400
 Gln Met Ser Arg Thr Asn Tyr Gln Ser Phe His Phe Asn Lys Thr
 405 410 415

<210> 7

<211> 1658

<212> DNA

<213> Homo sapiens

```

<220>
<221> CDS
<222> (64)..(1299)
<223> IGS4B short version

<400> 7
ggctcagctt gaaacagagc ctcgtaccag gggaggctca ggccttgat ttaaatgtca 60

ggg atg gaa aaa ctt cag aat gct tcc tgg atc tac cag cag aaa cta 108
Met Glu Lys Leu Gln Asn Ala Ser Trp Ile Tyr Gln Gln Lys Leu
1 5 10 15

gaa gat cca ttc cag aaa cac ctg aac agc acc gag gag tat ctg gcc 156
Glu Asp Pro Phe Gln Lys His Leu Asn Ser Thr Glu Glu Tyr Leu Ala
20 25 30

ttc ctc tgc gga cct cgg cgc agc cac ttc ttc ctc ccc gtg tot gtg 204
Phe Leu Cys Gly Pro Arg Arg Ser His Phe Phe Leu Pro Val Ser Val
35 40 45

gtg tat gtg cca att ttt gtg gtg ggg gtc att ggc aat gtc ctg gtg 252
Val Tyr Val Pro Ile Phe Val Val Gly Val Ile Gly Asn Val Leu Val
50 55 60

tgc ctg gtg att ctg cag cac cag gct atg aag acg ccc acc aac tac 300
Cys Leu Val Ile Leu Gln His Gln Ala Met Lys Thr Pro Thr Asn Tyr
65 70 75

tac ctc ttc agc ctg gcg gtc tct gac ctc ctg gtc ctg ctc ctt gga 348
Tyr Leu Phe Ser Leu Ala Val Ser Asp Leu Leu Val Leu Leu Leu Gly
80 85 90 95

atg ccc ctg gag gtc tat gag atg tgg cgc aac tac cct ttc ttg ttc 396
Met Pro Leu Glu Val Tyr Glu Met Trp Arg Asn Tyr Pro Phe Leu Phe
100 105 110

ggg ccc gtg ggc tgc tac ttc aag acg gcc ctc ttt gag acc gtg tgc 444
Gly Pro Val Gly Cys Tyr Phe Lys Thr Ala Leu Phe Glu Thr Val Cys
115 120 125

ttc gcc tcc atc ctc agc atc acc acc gtc agc gtg gag cgc tac gtg 492
Phe Ala Ser Ile Leu Ser Ile Thr Thr Val Ser Val Glu Arg Tyr Val
130 135 140

gcc atc cta cac ccg ttc cgc gcc aaa ctg cag agc acc cgg cgc cgg 540
Ala Ile Leu His Pro Phe Arg Ala Lys Leu Gln Ser Thr Arg Arg Arg
145 150 155

gcc ctc agg atc ctc ggc atc gtc tgg ggc ttc tcc gtg ctc ttc tcc 588
Ala Leu Arg Ile Leu Gly Ile Val Trp Gly Phe Ser Val Leu Phe Ser
160 165 170 175

ctg ccc aac acc agc atc cat ggc atc aag ttc cac tac ttc ccc aat 636
Leu Pro Asn Thr Ser Ile His Gly Ile Lys Phe His Tyr Phe Pro Asn
180 185 190

```

ggg tcc ctg gtc cca ggt tcg gcc acc tgt acg gtc atc aag ccc atg	684
Gly Ser Leu Val Pro Gly Ser Ala Thr Cys Thr Val Ile Lys Pro Met	
195 200 205	
tgg atc tac aat ttc atc atc cag gtc acc tcc ttc cta ttc tac ctc	732
Trp Ile Tyr Asn Phe Ile Ile Gln Val Thr Ser Phe Leu Phe Tyr Leu	
210 215 220	
ctc ccc atg act gtc atc agt gtc ctc tac tac ctc atg gca ctc aga	780
Leu Pro Met Thr Val Ile Ser Val Leu Tyr Tyr Leu Met Ala Leu Arg	
225 230 235	
cta aag aaa gac aaa tct ctt gag gca gat gaa ggg aat gca aat att	828
Leu Lys Lys Asp Lys Ser Leu Glu Ala Asp Glu Gly Asn Ala Asn Ile	
240 245 250 255	
caa aga ccc tgc aga aaa tca gtc aac aag atg ctg ttt gtc ttg gtc	876
Gln Arg Pro Cys Arg Lys Ser Val Asn Lys Met Leu Phe Val Leu Val	
260 265 270	
tta gtg ttt gct atc tgt tgg gcc cag ttc cac att gac cga ctc ttc	924
Leu Val Phe Ala Ile Cys Trp Ala Pro Phe His Ile Asp Arg Leu Phe	
275 280 285	
ttc agc ttt gtg gag gag tgg act gaa tcc ctg gct gct gtg ttc aac	972
Phe Ser Phe Val Glu Glu Trp Thr Glu Ser Leu Ala Ala Val Phe Asn	
290 295 300	
ctc gtc cat gtg gtg tca ggt gtc tta ttc tac ctg agc tca gct gtc	1020
Leu Val His Val Val Ser Gly Val Leu Phe Tyr Leu Ser Ser Ala Val	
305 310 315	
aac ccc att atc tat aac cta ctg tct cgc cgc ttc cag gca gca ttc	1068
Asn Pro Ile Ile Tyr Asn Leu Leu Ser Arg Arg Phe Gln Ala Ala Phe	
320 325 330 335	
cag aat gtg atc tct tct ttc cac aaa cag tgg cac tcc cag cat gac	1116
Gln Asn Val Ile Ser Ser Phe His Lys Gln Trp His Ser Gln His Asp	
340 345 350	
cca cag ttg cca cct gcc cag cgg aac atc ttc ctg aca gaa tgc cac	1164
Pro Gln Leu Pro Pro Ala Gln Arg Asn Ile Phe Leu Thr Glu Cys His	
355 360 365	
ttt gtg gag ctg acc gaa gat ata ggt ccc caa ttc cta tgt cag tca	1212
Phe Val Glu Leu Thr Glu Asp Ile Gly Pro Gln Phe Leu Cys Gln Ser	
370 375 380	
tcc gtg cac aac tct cac ctc cca aca gcc ctc tct agt gaa cag atg	1260
Ser Val His Asn Ser His Leu Pro Thr Ala Leu Ser Ser Glu Gln Met	
385 390 395	
tca aga aca aac tat caa agc ttc cac ttt aac aaa acc tgaattcttt	1309
Ser Arg Thr Asn Tyr Gln Ser Phe His Phe Asn Lys Thr	
400 405 410	

cagagctgac tctcctctat gcctcaaaac ttcagagagg aacatcccat aatgtatgcc 1369
 ttctcatatg aaattagaga ggtagaatgg ctcttacaac tcatgtaccc attgctagtt 1429
 tttttttttt aataaacgtg aaaactgaga gttagatctg gtttcaaaac ccaagactgc 1489
 ctgattttta gttatctttc cactataccta actgcctcat gccctttcac tagttcatgc 1549
 caagaacgtg actggaaaagg catggcacct ataccttgat taatttccat taatggaaat 1609
 ggttcgtcct gagtcatcta cgttccgagt caggctgtca ctctacta 1658

<210> 8

<211> 412

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Met Glu Lys Leu Gln Asn Ala Ser Trp Ile Tyr Gln Gln Lys Leu Glu
 1 5 10 15
 Asp Pro Phe Gln Lys His Leu Asn Ser Thr Glu Glu Tyr Leu Ala Phe
 20 25 30
 Leu Cys Gly Pro Arg Arg Ser His Phe Phe Leu Pro Val Ser Val Val
 35 40 45
 Tyr Val Pro Ile Phe Val Val Gly Val Ile Gly Asn Val Leu Val Cys
 50 55 60
 Leu Val Ile Leu Gln His Gln Ala Met Lys Thr Pro Thr Asn Tyr Tyr
 65 70 75 80
 Leu Phe Ser Leu Ala Val Ser Asp Leu Leu Val Leu Leu Leu Gly Met
 85 90 95
 Pro Leu Glu Val Tyr Glu Met Trp Arg Asn Tyr Pro Phe Leu Phe Gly
 100 105 110
 Pro Val Gly Cys Tyr Phe Lys Thr Ala Leu Phe Glu Thr Val Cys Phe
 115 120 125
 Ala Ser Ile Leu Ser Ile Thr Thr Val Ser Val Glu Arg Tyr Val Ala
 130 135 140
 Ile Leu His Pro Phe Arg Ala Lys Leu Gln Ser Thr Arg Arg Arg Ala
 145 150 155 160
 Leu Arg Ile Leu Gly Ile Val Trp Gly Phe Ser Val Leu Phe Ser Leu
 165 170 175
 Pro Asn Thr Ser Ile His Gly Ile Lys Phe His Tyr Phe Pro Asn Gly
 180 185 190
 Ser Leu Val Pro Gly Ser Ala Thr Cys Thr Val Ile Lys Pro Met Trp

Leu Ala Phe Leu Cys Gly Pro Arg Arg Ser His Phe Phe Leu Pro Val
 35 40 45
 Ser Val Val Tyr Val Pro Ile Phe Val Val Gly Val Ile Gly Asn Val
 50 55 60
 Leu Val Cys Leu Val Ile Leu Gln His Gln Ala Met Lys Thr Pro Thr
 65 70 75 80
 Asn Tyr Tyr Leu Phe Ser Leu Ala Val Ser Asp Leu Leu Val Leu Leu
 85 90 95
 Leu Gly Met Pro Leu Glu Val Tyr Glu Met Trp Arg Asn Tyr Pro Phe
 100 105 110
 Leu Phe Gly Pro Val Gly Cys Tyr Phe Lys Thr Ala Leu Phe Glu Thr
 115 120 125
 Val Cys Phe Ala Ser Ile Leu Ser Ile Thr Thr Val Ser Val Glu Arg
 130 135 140
 Tyr Val Ala Ile Leu His Pro Phe Arg Ala Lys Leu Gln Ser Thr Arg
 145 150 155 160
 Arg Arg Ala Leu Arg Ile Leu Gly Ile Val Trp Gly Phe Ser Val Leu
 165 170 175
 Phe Ser Leu Pro Asn Thr Ser Ile His Gly Ile Lys Phe His Tyr Phe
 180 185 190
 Pro Asn Gly Ser Leu Val Pro Gly Ser Ala Thr Cys Thr Val Ile Lys
 195 200 205
 Pro Met Trp Ile Tyr Asn Phe Ile Ile Gln Val Thr Ser Phe Leu Phe
 210 215 220
 Tyr Leu Leu Pro Met Thr Val Ile Ser Val Leu Tyr Tyr Leu Met Ala
 225 230 235 240
 Leu Arg Leu Lys Lys Asp Lys Ser Leu Glu Ala Asp Glu Gly Asn Ala
 245 250 255
 Asn Ile Gln Arg Pro Cys Arg Lys Ser Val Asn Lys Met Leu Ser Leu
 260 265 270
 Trp Arg Ser Gly Val Asn Pro Trp Leu Leu Cys Ser Thr Ser Ser Met
 275 280 285
 Trp Cys Gln Val Ser Ser Ser Thr
 290 295

<210> 11

<211> 1594

```

<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (64)..(942)
<223> IGS4A truncated DNA short version

<400> 11
ggctcagctt gaaacagagc ctctgaccag gggaggctca ggccttggat tttaatgtca 60

ggg atg gaa aaa ctt cag aat gct tcc tgg atc tac cag cag aaa cta 108
Met Glu Lys Leu Gln Asn Ala Ser Trp Ile Tyr Gln Gln Lys Leu
1 5 10 15

gaa gat cca ttc cag aaa cac ctg aac agc acc gag gag tat ctg gcc 156
Glu Asp Pro Phe Gln Lys His Leu Asn Ser Thr Glu Glu Tyr Leu Ala
20 25 30

ttc ctc tgc gga cct cgg cgc agc cac ttc ttc ctc ccc gtg tct gtg 204
Phe Leu Cys Gly Pro Arg Arg Ser His Phe Phe Leu Pro Val Ser Val
35 40 45

gtg tat gtg cca att ttt gtg gtg ggg gtc att ggc aat gtc ctg gtg 252
Val Tyr Val Pro Ile Phe Val Val Gly Val Ile Gly Asn Val Leu Val
50 55 60

tgc ctg gtg att ctg cag cac cag gct atg aag acg ccc acc aac tac 300
Cys Leu Val Ile Leu Gln His Gln Ala Met Lys Thr Pro Thr Asn Tyr
65 70 75

tac ctc ttc agc ctg gcg gtc tct gac ctc ctg gtc ctg ctc ctt gga 348
Tyr Leu Phe Ser Leu Ala Val Ser Asp Leu Leu Val Leu Leu Leu Gly
80 85 90 95

atg ccc ctg gag gtc tat gag atg tgg cgc aac tac cct ttc ttg ttc 396
Met Pro Leu Glu Val Tyr Glu Met Trp Arg Asn Tyr Pro Phe Leu Phe
100 105 110

ggg ccc gtg ggc tgc tac ttc aag acg gcc ctc ttt gag acc gtg tgc 444
Gly Pro Val Gly Cys Tyr Phe Lys Thr Ala Leu Phe Glu Thr Val Cys
115 120 125

ttc gcc tcc atc ctc agc atc acc acc gtc agc gtg gag cgc tac gtg 492
Phe Ala Ser Ile Leu Ser Ile Thr Thr Val Ser Val Glu Arg Tyr Val
130 135 140

gcc atc cta cac ccg ttc cgc gcc aaa ctg cag agc acc cgg cgc cgg 540
Ala Ile Leu His Pro Phe Arg Ala Lys Leu Gln Ser Thr Arg Arg Arg
145 150 155

gcc ctc agg atc ctc ggc atc gtc tgg ggc ttc tcc gtg ctc ttc tcc 588
Ala Leu Arg Ile Leu Gly Ile Val Trp Gly Phe Ser Val Leu Phe Ser
160 165 170 175

ctg ccc aac acc agc atc cat ggc atc aag ttc cac tac ttc ccc aat 636

```

Leu Pro Asn Thr Ser Ile His Gly Ile Lys Phe His Tyr Phe Pro Asn
 180 185 190
 ggg tcc ctg gtc cca ggt tcg gcc acc tgt acg gtc atc aag ccc atg 684
 Gly Ser Leu Val Pro Gly Ser Ala Thr Cys Thr Val Ile Lys Pro Met
 195 200 205
 tgg atc tac aat ttc atc atc cag gtc acc tcc ttc cta ttc tac ctc 732
 Trp Ile Tyr Asn Phe Ile Ile Gln Val Thr Ser Phe Leu Phe Tyr Leu
 210 215 220
 ctc ccc atg act gtc atc agt gtc ctc tac tac ctc atg gca ctc aga 780
 Leu Pro Met Thr Val Ile Ser Val Leu Tyr Tyr Leu Met Ala Leu Arg
 225 230 235
 cta aag aaa gac aaa tct ctt gag gca gat gaa ggg aat gca aat att 828
 Leu Lys Lys Asp Lys Ser Leu Glu Ala Asp Glu Gly Asn Ala Asn Ile
 240 245 250 255
 caa aga ccc tgc aga aaa tca gtc aac aag atg ctg tct ttg tgg agg 876
 Gln Arg Pro Cys Arg Lys Ser Val Asn Lys Met Leu Ser Leu Trp Arg
 260 265 270
 agt gga gtg aat ccc tgg ctg ctg tgt tca acc tcg tcc atg tgg tgt 924
 Ser Gly Val Asn Pro Trp Leu Leu Cys Ser Thr Ser Ser Met Trp Cys
 275 280 285
 cag gtg tct tct tct acc tgagctcagc tgtcaacccc attatctata 972
 Gln Val Ser Ser Ser Thr
 290
 acctactgtc tcgcccgttc caggcagcat tccagaatgt gatctcttct ttccacaaac 1032
 agtggcactc ccagcatgac ccacagtgc cacctgcccga gcggaacatc ttccctgacag 1092
 aatgccactt tgtggagctg accgaagata taggtcccca attcccatgt cagtcaccca 1152
 tgcacaactc tcacctccca acagccctct ctagtgaaca gatgtcaaga acaaaactatc 1212
 aaagcttcca cttaacaaa acctgaattc tttcagagct gactctcctc tatgcctcaa 1272
 aacttcagag aggaacatcc cataatgtat gccttctcat atgatattag agaggtagaa 1332
 tggctcttac aactcatgta ccattgcta gttttttttt ttaataaac gtgaaaactg 1392
 agagttagat ctggtttcaa aaccaagac tgccctgattt ttagttatct ttccactatc 1452
 ctaactgcct catgcccctt cactagtcca tgccaagaac gtgactggaa aggcattgca 1512
 cctatacctt gattaatttc cattaatgga aatggttcgt cctgagtcac ctaegtccg 1572
 agtcaggctg tcactoctac ta 1594

<210> 12
 <211> 293

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

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

275	280	285
-----	-----	-----

Val Ser Ser Ser Thr
290

<210> 13
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Degenerated primers

<220>
<221> variation
<222> (21)
<223> A,C,G or T

<220>
<221> variation
<222> (24)
<223> A, C, G or T

<400> 13
ctcatcttcg cggtagggcrc ngyngg 26

<210> 14
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Degenerated primers

<220>
<221> variation
<222> (22)
<223> C or Inosine

<220>
<221> variation
<222> (25)
<223> A, C, G or T

<220>
<221> variation
<222> (28)
<223> A, C, G or T

<400> 14
ggccaggcag cgctccgcgc tnarncyngc d 31

<210> 15
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Degenerated primers

<400> 15
gaartartag ccrcgrcagc cw 22

<210> 16
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 16
ccatccta atcgcactcact atagggc 27

<210> 17
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 17
actcactata gggctcgagc ggc 23

<210> 18
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 18
ggatcccaaa taagaaagg tagttgc 27

<210> 19
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Primer

 <400> 19
 aaagggtagt tgcgccacat ctcatagac 29

 <210> 20
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Primer

 <400> 20
 aggtctatga gatgtggcgc aactaccct 29

 <210> 21
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Primer

 <400> 21
 atgtggcgca actacccttt cttatttggg 30

 <210> 22
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Degenerated
 primers

 <400> 22
 cggaagttgg cggacacgrv rtrrta 26

 <210> 23
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Primer

 <400> 23
 gctcagcttg aaacagagcc tcgtacc 27

<210> 24
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 24
ccatgtggat ctacaatttc atcatcc 27

<210> 25
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 25
aagacaaatc tcttgaggca gatgaaggg 29

<210> 26
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 26
gatgctgttt gtcttggtct tagtgtttgc 30

<210> 27
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 27
ggatgatgaa attgtagatc cacatgggc 29

<210> 28
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 28
 tgtggagaag tctctcaaag tgtgg 25

<210> 29
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 29
 tagtaggagt gacagcctga ctcggaacg 29

<210> 30
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 30
 aacgtagatg actcaggacg aaccatttcc 30

<210> 31
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 31
 tcgtaccagg ggaggctcag gc 22

<210> 32
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 32
 cctcttcagc ctggcggctc ctg 23

<210> 33
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

```

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 33
ggaggcgaag cacacgtct ca                                22

<210> 34
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<220>
<221> misc_binding
<222> {1}
<223> Labeled with 6-carboxyfluorescein

<220>
<221> misc_binding
<222> {34}
<223> Labeled with
        N,N,N',N'-tetramethyl-6-carboxyrhodamin

<400> 34
agatgtggcg caactacct ttctgttcg ggcc                    34

```

【図面の簡単な説明】

【図1】

共通IGS4 cDNA配列を生成するように単離された種々のcDNAクローンの相対位置の図示。使用された5'および3'RACEプライマー(それぞれIGS4R#およびIGS4F#)ならびにEST受入番号N45474の位置も示した。プライマーIGS4R6はイントロン1内に位置する。一部のクローン(例えばHNT2311、HNT2312およびHNT2313)は、部分的にのみ配列決定された(配列決定された部分のみを示す)。CONSENSUS AおよびCONSENSUS Bは、それぞれIGS4対立遺伝子タイプAおよびBの共通配列を表す。4個の多型位置のそれぞれで同定されたヌクレオチドは、それぞれのクローンについて示した(影付き四角形)。「S」は、クローンHNT2211およびHNT2212中の配列未確定を示し、そして「C」または「T」のいずれかを意味する。IGS4AおよびIGS4B共通配列のコード領域は、「**」で示す。共通配列の5'末端に幾らかの配列不確定が残ってい

るので、IGS4ADNAおよびIGS4BDNA配列は位置86から末端までのみを取り上げた。

【図2】

IGS4 cDNA配列と比較した種々のDNAデータベースエントリーの相対位置の図示。IGS4 cDNA配列は、四角形で示す(IGS4コーディング配列の位置は黒四角形で示す)。IGS4エキソン1~4の相対位置は、IGS4 cDNA配列の上に示す(「=」)。エキソン1~4をコードするゲノム配列AC008571の部分は、それぞれAC008571a~dで示す。AC008571配列内のこれらの断片の位置は下記である: AC008571a (AC008571の逆補体の13129 - 13908)、AC008571b (AC008571の51676 - 51760)、AC008571c (AC008571の逆補体の79978 - 80103)およびAC008571d (AC008571の逆補体の83060 - 83728)。G05725およびG20615はSTS(配列タグ配列)エントリーであり、一方F05107、F05108、F07531、R13353、R13890、H11359、N45474、W61169、AI432384、W61131、AI023570、F01358、F03770、Z38158、R40869、R37725、H11333はESTエントリーである。IGS4エキソン2を含むゲノムクローンAQ019411およびAQ015065の部分は「:」で示す。IGS4 cDNA配列とは全く異なるEST配列F05107、F05108、F07531、R13353、R13890およびH11359の5'部分は、「*」で示す。AQ078563はゲノムクローンである。

【図3a】

種々のニューロメジンUアイソフォームによるIGS4受容体活性化。CHO G16-IGS4B細胞を96-ウエルプレート内で一晚培養しそしてFluo-4AMを負荷した。受容体媒介Ca²⁺は、FLIPR(Molecular Devices)を用いて測定した。CCDカメラで検出した蛍光変化の極大を1に正規化しそしてカウントで表した。ニューロメジンU-8の結果。

【図3b】

種々のニューロメジンUアイソフォームによるIGS4受容体活性化。CHO G 16 - IGS4 B細胞を96 - ウエルプレート内で一晚培養しそしてFluo - 4 AMを負荷した。受容体媒介Ca²⁺は、FLIPR (Molecular Devices) を用いて測定した。CCDカメラで検出した蛍光変化の極大を1に正規化しそしてカウントで表した。ニューロメジンU - 23の結果。

【図3c】

種々のニューロメジンUアイソフォームによるIGS4受容体活性化。CHO G 16 - IGS4 B細胞を96 - ウエルプレート内で一晚培養しそしてFluo - 4 AMを負荷した。受容体媒介Ca²⁺は、FLIPR (Molecular Devices) を用いて測定した。CCDカメラで検出した蛍光変化の極大を1に正規化しそしてカウントで表した。ニューロメジンU - 25の結果。

【図4】

IGS4 Bを発現するCHO G 16 - 細胞中のニューロメジンU - 23誘導細胞内Ca²⁺可動化。細胞株CHO G 16 - AI、CHO G 16および他のオーファンGPCRを用いてトランスフェクションされたCHO Gへの10 nMニューロメジンU - 23の適用。細胞は96ウエルプレート中で一晚培養しそしてFluo - 4 AMを負荷した。受容体媒介細胞内Ca²⁺変化は、FLIPR (Molecular Devices) を用いて測定し、CCDカメラで検出したカウントで表した。

【図5】

ヒトIGS4プローブを用いたヒト多重組織発現アレイ。

【図6】

IGS4プローブを用いたノーザンプロット分析。

【図7】

IGS4発現分析 (MTEプロット)。

【図8】

脊髄中で観察された発現と比較したIGS4 mRNAの相対発現レベル。非 - 正規化およびGAPDH正規化発現レベルの両方を示す。

【図3a】

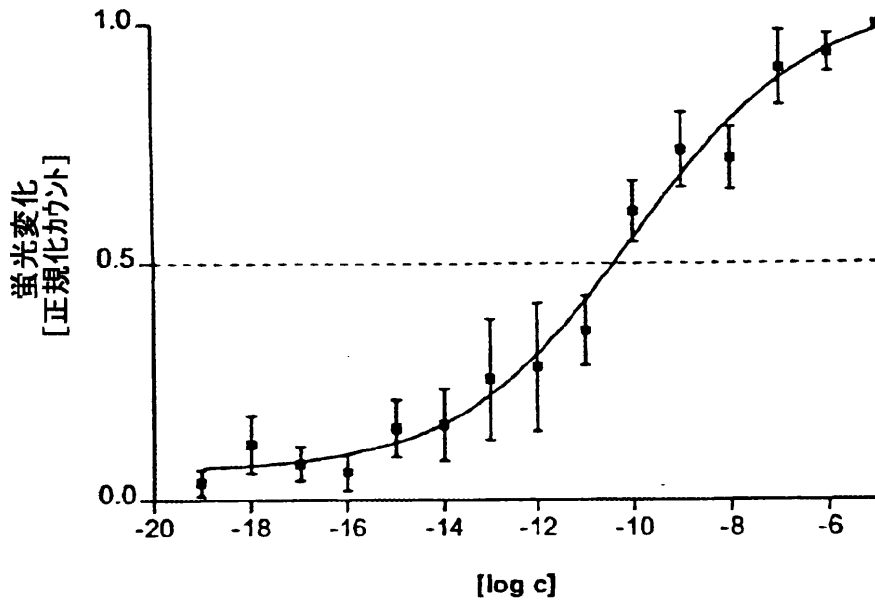


Fig. 3a

【図3b】

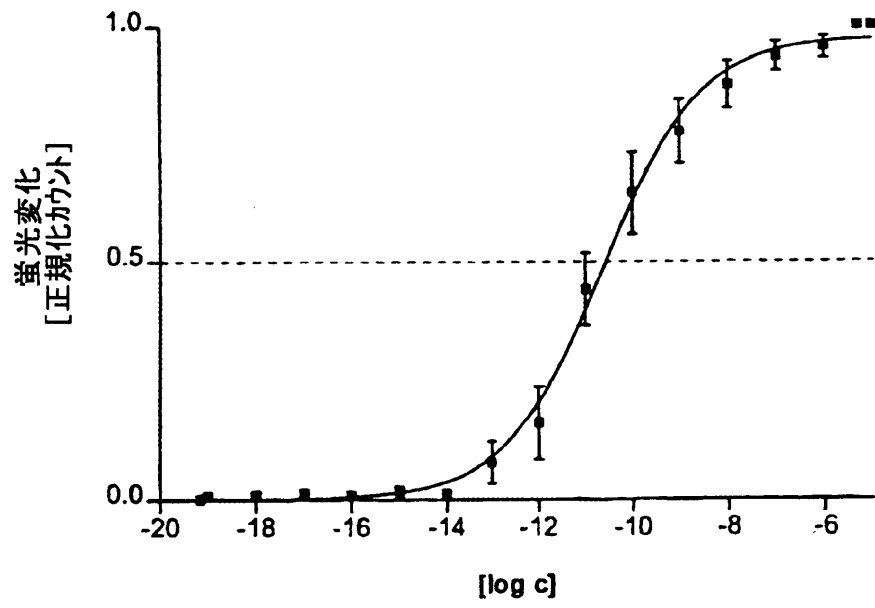


Fig. 3b

【図3c】

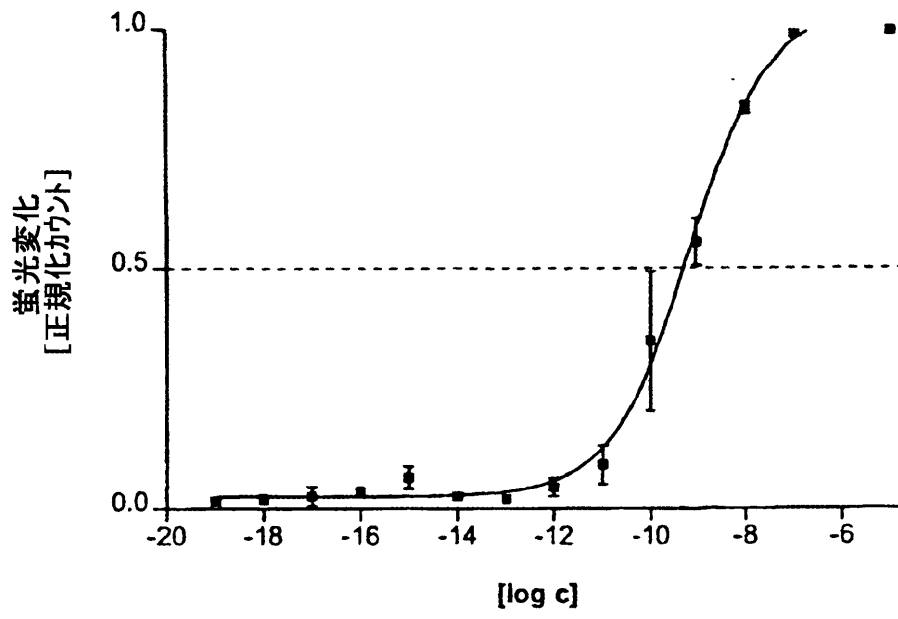
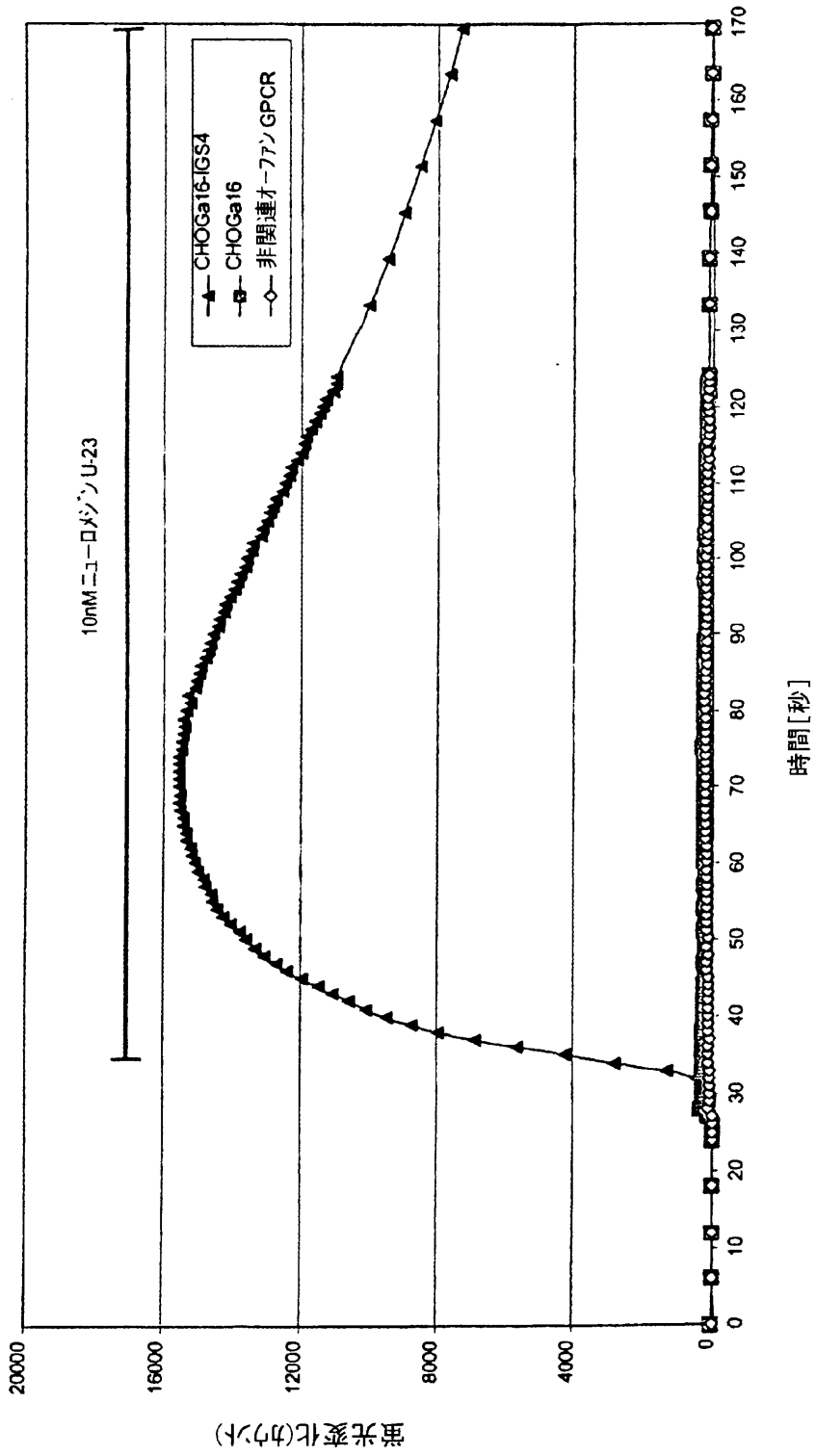


Fig. 3c

【図4】

Fig. 4

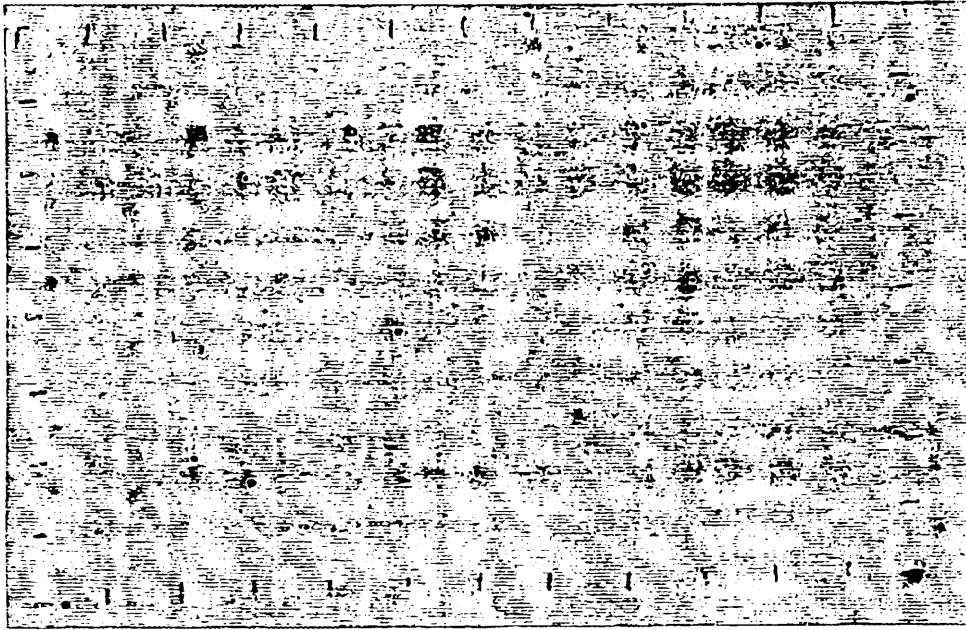


【図5】

Fig. 5

1. A1

A12



2. H1

H12

HIGS47ローブを用いたヒト多重組織発現アレイ

【図6】

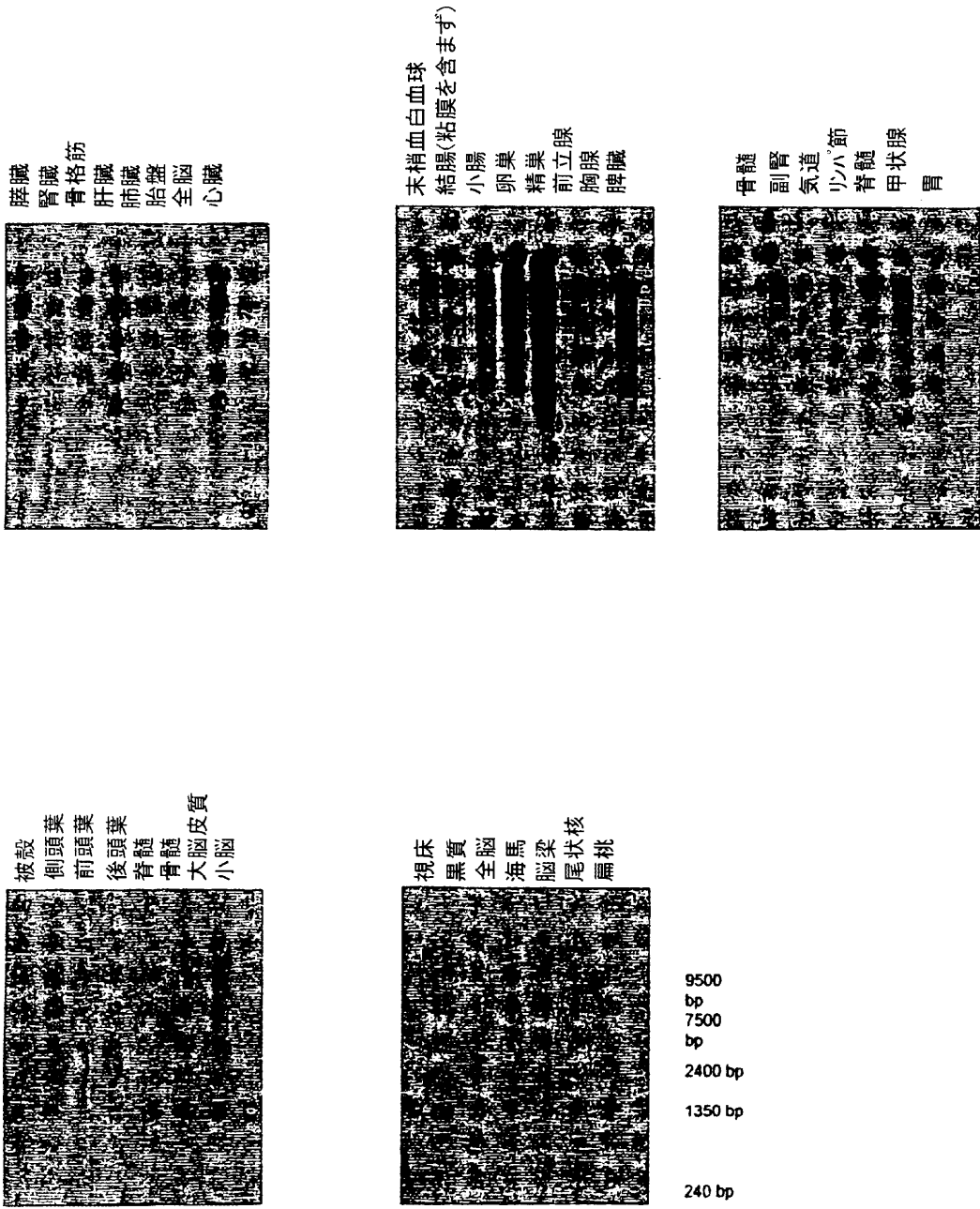
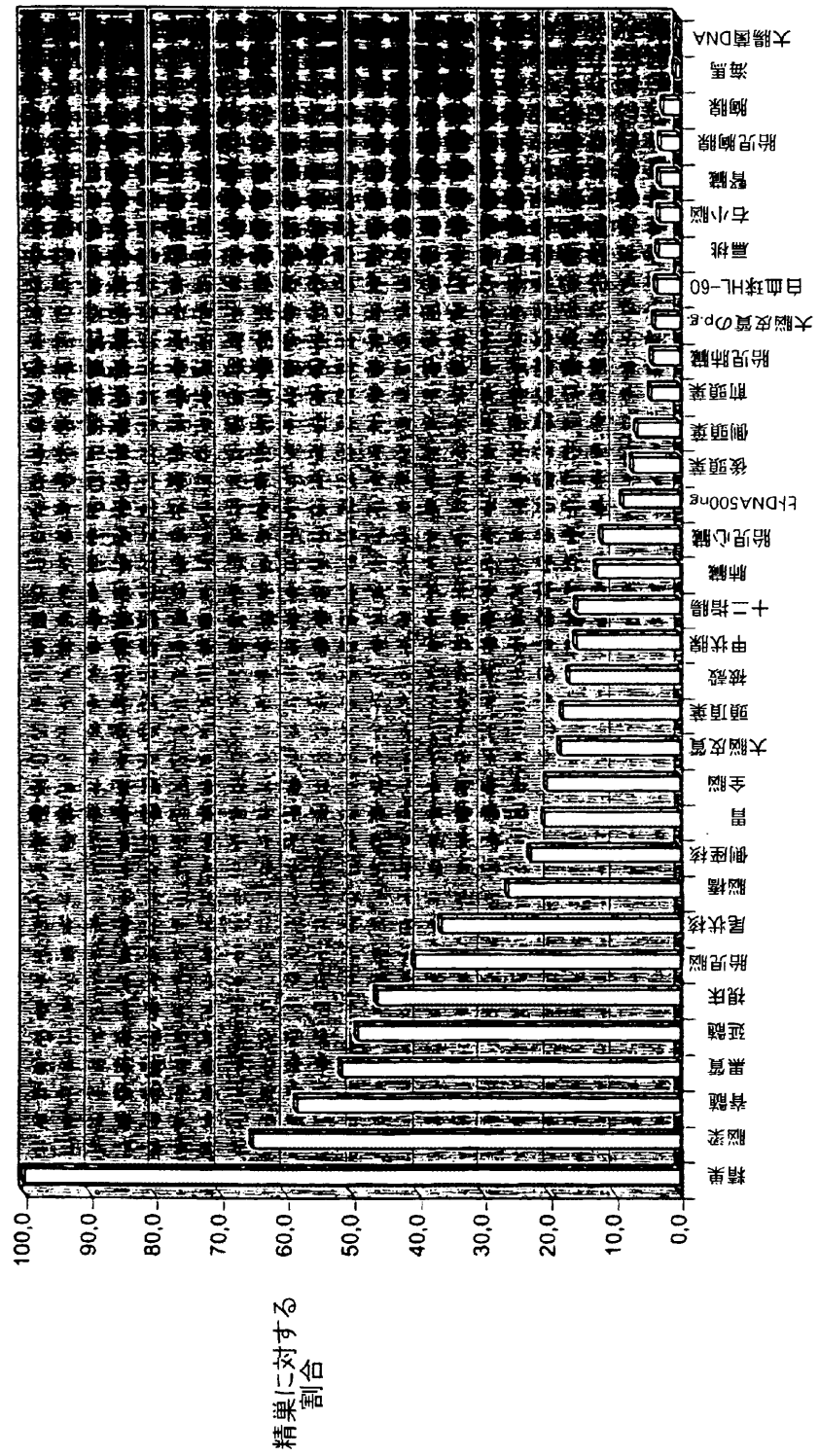


Fig. 6

【図7】

Fig. 7

hu-IGS4 発現分析(MTE プロット)



【**手続補正書**】特許協力条約第34条補正の翻訳文提出書

【**提出日**】平成13年10月1日(2001.10.1)

【**手続補正1**】

【**補正対象書類名**】明細書

【**補正対象項目名**】特許請求の範囲

【**補正方法**】変更

【**補正の内容**】

【**特許請求の範囲**】

【**請求項1**】 a) 配列番号2、配列番号4、配列番号6または配列番号8記載のIGS4ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列；

b) Centraalbureau voor Schimmelcultures (Baarn、オランダ国)における寄託番号CBS102221号または寄託番号CBS102222号内に含まれるDNA挿入物によりコードされるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、特に配列番号1、配列番号3、配列番号5または配列番号7に相当するヌクレオチド配列；

c) (a)または(b)のヌクレオチド配列に対してその全長にわたって少なくとも80% (好ましくは少なくとも90%)の配列同一性を有するヌクレオチド配列；

d) (a)または(b)または(c)のヌクレオチド配列に相補的であるヌクレオチド配列

からなる群より選ばれたヌクレオチド配列を含んでなる、単離されたポリヌクレオチド。

【**請求項2**】 ポリヌクレオチドが、配列番号2のIGS4ポリペプチドをコードする配列番号1内に含まれるヌクレオチド配列または配列番号4のIGS4ポリペプチドをコードする配列番号3内に含まれるヌクレオチド配列または配列番号6のIGS4ポリペプチドをコードする配列番号5内に含まれるヌクレオチド配列または配列番号8のIGS4ポリペプチドをコードする配列番号7内に含まれるヌクレオチド配列を含んでなる、請求項1記載のポリヌクレオチド。

【**請求項3**】 ポリヌクレオチドが、配列番号1、配列番号3、配列番号5

または配列番号7のものに対して、またはCentraalbureau voor Schimmelcultures (Baarn、オランダ国)における寄託番号CBS102221号または寄託番号CBS102222号内に含まれるDNA挿入物の配列に対して、その全長にわたって少なくとも80%が同一であるヌクレオチド配列を含んでなる、請求項1記載のポリヌクレオチド。

【請求項4】 配列番号1、配列番号3、配列番号5または配列番号7のポリヌクレオチドまたはCentraalbureau voor Schimmelcultures (Baarn、オランダ国)における寄託番号CBS102221号または寄託番号CBS102222号内に含まれるDNA挿入物である、請求項3記載のポリヌクレオチド。

【請求項5】 DNAまたRNAである、請求項1から4までに記載のポリヌクレオチド。

【請求項6】 配列番号2、配列番号4、配列番号6または配列番号8記載のアミノ酸配列を含んでなるIGS4ニューロメジン受容体タンパク質、好ましくは哺乳類ニューロメジン受容体タンパク質をコードし、該タンパク質がニューロメジンUに対し、好ましくはニューロメジンU-8に対し、ニューロメジンU-23に対しおよび/またはニューロメジンU-25に対し高いアフィニティ結合を示す単離されたヌクレオチド配列。

【請求項7】 配列番号2、配列番号4、配列番号6または配列番号8記載のアミノ酸配列を含んでなるIGS4ニューロメジン受容体タンパク質をコードし、該タンパク質が脳、骨格筋、小脳、精巣、脳梁、脊髄、黒質、骨髄、視床、尾状核、脳橋、側坐核、胎児脳、胃、心臓、甲状腺、肺、胸腺、前立腺および/または気管内の発現を示す、請求項6の単離されたヌクレオチド配列。

【請求項8】 配列番号2、配列番号4、配列番号6または配列番号8記載のアミノ酸配列を含んでなるIGS4ニューロメジン受容体タンパク質、好ましくは哺乳類ニューロメジン受容体タンパク質をコードし、該タンパク質がニューロメジンUに対し、好ましくはニューロメジンU-8に対し、ニューロメジンU-23に対しおよび/またはニューロメジンU-25に対し高いアフィニティ結合を示し、該タンパク質が脳、骨格筋、小脳、精巣、脳梁、脊髄、黒質、骨髄、視床、尾状核、脳橋、側坐核、胎児脳、胃、心臓、甲状腺、肺、胸腺、前立腺お

よび/または気管内の発現を示し、そして該ヌクレオチド配列が請求項1から5までに定義されたヌクレオチド配列の群より選択されている、単離されたヌクレオチド配列。

【請求項9】 発現ベクターが適合する宿主細胞内に存在する場合に、該発現ベクターが、配列番号2、配列番号4、配列番号6または配列番号8のポリペプチドとまたはCentraalbureau voor Schimmelcultures (Baarn、オランダ国)における寄託番号CBS102221号または寄託番号CBS102222号内に含まれるDNA挿入物によりコードされるポリペプチドと少なくとも80%の同一性を有するアミノ酸配列を含んでなるIGS4ポリペプチドの産生が可能である、該発現ベクターを含んでなるDNAまたはRNA分子。

【請求項10】 発現ベクターが、配列番号2、配列番号4、配列番号6または配列番号8記載のアミノ酸配列を含んでなるIGS4ニューロメジン受容体タンパク質、好ましくは哺乳類ニューロメジン受容体タンパク質を産生することが可能であり、該タンパク質がニューロメジンUに対し、好ましくはニューロメジンU-8に対し、ニューロメジンU-23に対しおよび/またはニューロメジンU-25に対し高いアフィニティ結合を示し、そして脳、骨格筋、小脳、精巣、脳梁、脊髄、黒質、骨髄、視床、尾状核、脳橋、側坐核、胎児脳、胃、心臓、甲状腺、肺、胸腺、前立腺および/または気管内の発現を示す、該発現ベクターを含んでなる単離されたDNAまたはRNA分子。

【請求項11】 請求項9または10の発現系を含んでなる宿主細胞。

【請求項12】 酵母細胞である、請求項11記載の宿主細胞。

【請求項13】 動物細胞である、請求項11記載の宿主細胞。

【請求項14】 請求項11から13までに記載の細胞から誘導されたIGS4受容体膜調製物。

【請求項15】 ポリペプチドの産生のために十分な条件下で請求項11から13までの宿主を培養しそして培養物からポリペプチドを回収することを含んでなる、IGS4ポリペプチドを製造するための方法。

【請求項16】 適当な培養条件下で、宿主細胞がIGS4ポリペプチドを産生するように、請求項9または10の発現系を用いて宿主細胞を形質転換また

はトランスフェクションすることを含んでなる、IGS4ポリペプチドを産生する細胞を製造するための方法。

【請求項17】 配列番号2、配列番号4、配列番号6または配列番号8記載のアミノ酸配列に対してまたはCentraalbureau voor Schimmelcultures (Baarn、オランダ国)における寄託番号CBS102221号または寄託番号CBS102222号内に含まれるDNA挿入物によりコードされるポリペプチドに対してその全長にわたって少なくとも80%が同一であるアミノ酸配列を含んでなる、IGS4ポリペプチド。

【請求項18】 配列番号2、配列番号4、配列番号6または配列番号8記載のアミノ酸配列またはCentraalbureau voor Schimmelcultures (Baarn、オランダ国)における寄託番号CBS102221号または寄託番号CBS102222号内に含まれるDNA挿入物によりコードされるアミノ酸配列を含んでなる、請求項17記載のポリペプチド。

【請求項19】 配列番号2、配列番号4、配列番号6または配列番号8記載のアミノ酸配列、好ましくは哺乳類ニューロメジン受容体タンパク質のアミノ酸配列を含んでなり、該タンパク質がニューロメジンUに対し、好ましくはニューロメジンU-8に対し、ニューロメジンU-23に対しおよび/またはニューロメジンU-25に対し高いアフィニティ結合を示す、単離されたIGS4ニューロメジン受容体タンパク質。

【請求項20】 配列番号2、配列番号4、配列番号6または配列番号8記載のアミノ酸配列を含んでなり、該タンパク質が脳、骨格筋、小脳、精巣、脳梁、脊髄、黒質、骨髄、視床、尾状核、脳橋、側坐核、胎児脳、胃、心臓、甲状腺、肺、胸腺、前立腺および/または気管内の発現を示す、請求項19記載の単離されたIGS4ニューロメジン受容体タンパク質。

【請求項21】 配列番号2、配列番号4、配列番号6または配列番号8記載のアミノ酸配列、好ましくは哺乳類ニューロメジン受容体タンパク質を含んでなり、該タンパク質がニューロメジンUに対し、好ましくはニューロメジンU-8に対し、ニューロメジンU-23に対しおよび/またはニューロメジンU-25に対し高いアフィニティ結合を示し、該タンパク質が脳、骨格筋、小脳、精巣

、脳梁、脊髄、黒質、骨髄、視床、尾状核、脳橋、側坐核、胎児脳、胃、心臓、甲状腺、肺、胸腺、前立腺および/または気管内の発現を示し、そして該アミノ酸配列が請求項17から18までに定義されたアミノ酸配列の群より選択されている、単離されたIGS4ニューロメジン受容体タンパク質。

【請求項22】 請求項17から21までの配列番号2、配列番号4、配列番号6または配列番号8記載のアミノ酸配列を含んでなるIGS4ポリペプチドに対して免疫特異性の抗体。

【請求項23】 (a) 請求項17から21までの配列番号2、配列番号4、配列番号6または配列番号8記載のアミノ酸配列を含んでなるIGS4ニューロメジン受容体ポリペプチドに対するアゴニストの治療的な有効量、および/または、

(b) 配列番号2、配列番号4、配列番号6または配列番号8記載のIGS4ポリペプチドまたはCentraalbureau voor Schimmelcultures (Baarn、オランダ国)における寄託番号CBS102221号または寄託番号CBS102222号内に含まれるDNA挿入物によりコードされるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列に対してその全長にわたって少なくとも80%の同一性を有するヌクレオチド配列、またはインビボで該受容体活性の産生を行うような形で該ヌクレオチド配列の一つに対して相補的なヌクレオチド配列を含んでなる、単離されたポリヌクレオチド、および/または

(c) 配列番号2、配列番号4、配列番号6または配列番号8記載のアミノ酸配列を含んでなるIGS4ニューロメジン受容体タンパク質、好ましくは哺乳類IGS4ニューロメジン受容体タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含んでなり、該タンパク質がニューロメジンUに対し、好ましくはニューロメジンU-8に対し、ニューロメジンU-23に対しおよび/またはニューロメジンU-25に対し高いアフィニティ結合を示す、単離されたポリヌクレオチドの、IGS4ニューロメジン受容体ポリペプチドの発現または活性に関連する疾患に罹患し、請求項17から21までの配列番号2、配列番号4、配列番号6または配列番号8記載のアミノ酸配列を含んでなるIGS4ポリペプチドの増強された活性または発現を必要とする患者の治療のための薬剤調製のための使用。

【請求項24】 (a) 請求項17から21までの配列番号2、配列番号4、配列番号6または配列番号8記載のアミノ酸配列を含んでなるIGS4ニューロメジン受容体ポリペプチドに対するアンタゴニストの治療的な有効量、および/または

(b) 請求項17から21までの配列番号2、配列番号4、配列番号6または配列番号8記載のアミノ酸配列を含んでなるIGS4ニューロメジン受容体ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列の発現を阻害する核酸分子、および/または

(c) リガンドに関して請求項17から21までの配列番号2、配列番号4、配列番号6または配列番号8記載のアミノ酸配列を含んでなるIGS4ニューロメジン受容体ポリペプチドと競合するポリペプチドの治療的な有効量の、IGS4ニューロメジン受容体ポリペプチドの発現または活性に関連する疾患に罹患し、配列番号2、配列番号4、配列番号6または配列番号8記載のアミノ酸配列を含んでなるIGS4ポリペプチドの活性または発現を阻害する必要性を有する患者の治療のための薬剤調製のための使用。

【請求項25】 (a) 患者から誘導された試料内の該患者のゲノム内の該IGS4ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列内の突然変異の存在または不在を決定し、および/または

(b) 該患者から誘導された試料内の該IGS4ポリペプチド発現の存在または量を分析することを含んでなる、該患者内の請求項17から21までの配列番号2、配列番号4、配列番号6または配列番号8記載のアミノ酸配列を含んでなるIGS4ニューロメジン受容体ポリペプチドの発現または活性に関連する患者内の疾患または疾患に対する罹患性の診断のための方法。

【請求項26】 (a) 該IGS4ポリペプチドを産生する細胞を試験化合物と接触させ、そして

(b) 試験化合物がIGS4ポリペプチドの活性化により発生されるシグナルに影響するかどうかを決定する

ことを含んでなる、請求項17から21までの配列番号2、配列番号4、配列番

号6または配列番号8記載のアミノ酸配列を含んでなるIGS4ポリペプチドに対するアゴニストを同定するための方法。

【請求項27】 請求項26の方法により同定されるアゴニスト。

【請求項28】 配列番号2、配列番号4、配列番号6または配列番号8記載のアミノ酸配列を含んでなるIGS4ニューロメジン受容体タンパク質、好ましくは哺乳類IGS4ニューロメジン受容体タンパク質に対するアゴニストを同定するための方法であって、該タンパク質がニューロメジンUに対し、好ましくはニューロメジンU-8に対し、ニューロメジンU-23に対しおよび/またはニューロメジンU-25に対し高いアフィニティ結合を示し、

(a) IGS4ニューロメジン受容体タンパク質を産生する細胞を試験化合物と接触させ、そして

(b) 試験化合物がIGS4ニューロメジン受容体タンパク質の活性化により発生されるシグナルに影響するかどうかを決定する

ことを含んでなる方法。

【請求項29】 該アゴニストが、中枢神経系(CNS)および末梢神経系(PNS)を含む神経系の障害、胃腸系および/または心臓血管系および/または骨格筋および/または甲状腺の障害、および/または肺疾患、免疫学的疾患および尿生殖系の障害に関して有効である、請求項28記載の配列番号2、配列番号4、配列番号6または配列番号8記載のアミノ酸配列を含んでなるIGS4ニューロメジン受容体タンパク質に対するアゴニストを同定するための方法。

【請求項30】 好ましくはアゴニストが、中枢神経系(CNS)および末梢神経系(PNS)を含む神経系の障害、胃腸系および/または心臓血管系および/または骨格筋および/または甲状腺の障害、および/または肺疾患、免疫学的疾患および尿生殖系の障害に関して有効である、請求項28または29の方法により同定されるアゴニスト。

【請求項31】 (a) 該IGS4ポリペプチドを産生する細胞をアゴニストと接触させ、そして

(b) 該アゴニストにより発生されるシグナルが候補化合物の存在下において減少されるかどうかを決定する

ことを含んでなる、請求項17から21までの配列番号2、配列番号4、配列番号6または配列番号8記載のアミノ酸配列を含んでなるIGS4ポリペプチドに対するアンタゴニストを同定するための方法。

【請求項32】 請求項31の方法により同定されるアンタゴニスト。

【請求項33】 配列番号2、配列番号4、配列番号6または配列番号8記載のアミノ酸配列を含んでなるIGS4ニューロメジン受容体タンパク質、好ましくは哺乳類IGS4ニューロメジン受容体タンパク質に対するアンタゴニストを同定するための方法であって、該タンパク質がニューロメジンUに対し、好ましくはニューロメジンU-8に対し、ニューロメジンU-23に対しおよび/またはニューロメジンU-25に対し高いアフィニティ結合を示し、

(a) 該IGS4ニューロメジン受容体タンパク質を産生する細胞をアゴニストと接触させ、そして

(b) 該アゴニストにより発生したシグナルが候補化合物の存在下で減少するかどうかを決定する

ことを含んでなる方法。

【請求項34】 該アンタゴニストが、中枢神経系(CNS)および末梢神経系(PNS)を含む神経系の障害、胃腸系および/または心臓血管系および/または骨格筋および/または甲状腺の障害、および/または肺疾患、免疫学的疾患および尿生殖系の障害に関して有効である、請求項33記載の配列番号2、配列番号4、配列番号6または配列番号8記載のアミノ酸配列を含んでなるIGS4ニューロメジン受容体タンパク質に対するアンタゴニストを同定するための方法。

【請求項35】 好ましくはアンタゴニストが、中枢神経系(CNS)および末梢神経系(PNS)を含む神経系の障害、胃腸系および/または心臓血管系および/または骨格筋および/または甲状腺の障害、および/または肺疾患、免疫学的疾患および尿生殖系の障害に関して有効である、請求項33または34の方法により同定されるアンタゴニスト。

【請求項36】 請求項16記載の方法により製造される組換え宿主細胞またはIGS4ポリペプチドを発現するその膜。

【請求項37】 a) アミノ酸配列の配列番号2、配列番号4、配列番号6または配列番号8またはCentraalbureau voor Schimmelcultures (Baarn、オランダ国)における寄託番号CBS102221号または寄託番号CBS102222号内に含まれるDNA挿入物によりコードされるアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする核酸配列から本質的になる核酸分子のコーディング部分を、高レベル遺伝子発現または遺伝子が該動物内で通常は発現されない細胞タイプ内での発現を駆動することができる調節配列と連結させ、または

b) アミノ酸配列 配列番号2、配列番号4、配列番号6または配列番号8またはCentraalbureau voor Schimmelcultures (Baarn、オランダ国)における寄託番号CBS102221号または寄託番号CBS102222号内に含まれるDNA挿入物によりコードされるアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする核酸配列から本質的になる核酸分子のコーディング部分を単離および操作し、そして、アミノ酸配列 配列番号2、配列番号4、配列番号6または配列番号8またはCentraalbureau voor Schimmelcultures (Baarn、オランダ国)における寄託番号CBS102221号または寄託番号CBS102222号内に含まれるDNA挿入物によりコードされるアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする内在性遺伝子対立遺伝子を完全にまたは部分的に不活性化させるような方法で該動物のゲノム内に該配列を再導入する

工程を含んでなる、IGS4ニューロメジン受容体関連疾患のための遺伝子的に操作したヒト以外の動物を創成する方法。

【請求項38】 (a) 請求項17から21までの1項または配列番号2、配列番号4、配列番号6および配列番号8の1個の受容体を発現する細胞、または請求項17から21までの1項または配列番号2、配列番号4、配列番号6および配列番号8の1個の該受容体の一つを含んでなる受容体膜調製物を、標識ニューロメジンUと物質の存在および不在において接触させ、そして

(b) IGS4へのニューロメジンUの結合を測定する

ことを含んでなる、物質が配列番号2、配列番号4、配列番号6または配列番号8記載のアミノ酸配列を含んでなるIGS4受容体の潜在的なリガンドであるかどうかを決定する方法。

【請求項39】 該ポリペプチドが、ニューロメジンU、好ましくはニューロメジンU - 8、ニューロメジンU - 23および/またはニューロメジンU - 25を結合して少なくとも約 $\log EC_{50} = -6$ のアフィニティーを示すことをさらに特徴とする、請求項17から21までのいずれか記載のポリペプチド。

【請求項40】 該ポリペプチドが、ニューロメジンU、好ましくはニューロメジンU - 8、ニューロメジンU - 23および/またはニューロメジンU - 25を結合して少なくとも約 $\log EC_{50} = -9$ のアフィニティーを示すことをさらに特徴とする、請求項17から21までのいずれか記載のポリペプチド。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		International Application No. PCT/EP 00/09584
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C07K14/705 C12N15/12 C07K16/28 C12Q1/68 A61K38/17 A01K67/027		
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 C12N A61K		
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) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, STRAND, BIOSIS		
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 NUCLEOTIDE AND PROTEIN SEQUENCES, 4 August 1999 (1999-08-04), XP002131651 HINXTON, GB cited in the application AC = AC008571. HGT, Homo sapiens chromosome 5 clone CIT-HSPC_550M4, WORKING DRAFT SEQUENCE, 42 unordered pieces. From nt 204886-205679. abstract --- -/--	1-5,9, 17,18
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input checked="" 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. *Z* document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 20 March 2001		Date of mailing of the international search report 09/04/2001
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Mateo Rosell, A.M.

2

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/EP 00/09584

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>DATABASE EMBL NUCLEOTIDE AND PROTEIN SEQUENCES, 17 February 1996 (1996-02-17), XP002131652 HINXTON, GB cited in the application AC = N45474. EST, yy59b04.r1 Homo sapiens cDNA clone 277807 5'. abstract</p>	1-5,9, 17,18
X	<p>DATABASE EMBL NUCLEOTIDE AND PROTEIN SEQUENCES, 9 June 1996 (1996-06-09), XP002131653 HINXTON, GB cited in the application AC = W61169. EST, zd31a03.r1 Soares fetal heart NbHH19W Homo sapiens cDNA clone 342220 5'. abstract</p>	1-5,9, 17,18
X	<p>DATABASE EMBL NUCLEOTIDE AND PROTEIN SEQUENCES, 3 July 1995 (1995-07-03), XP002131654 HINXTON, GB cited in the application AC= H11359. EST, ym13d04.r1 Homo sapiens cDNA clone 47842 5' similar to contains L1 repetitive element abstract</p>	1-5,9, 17,18
A	<p>WO 90 01330 A (BENNETT TERENCE ;GARDINER SHEILA MARGARET (GB)) 22 February 1990 (1990-02-22) cited in the application abstract page 1, line 1 -page 5, line 3</p>	6-8,19, 21, 28-30, 33-35, 38-40
Y	<p>TAN C.P. ET AL.,: "Cloning and characterization of a human and murine T-cell orphan G-protein-coupled receptor similar to the growth hormone secretagogue and neurotensin receptors" GENOMICS, vol. 52(2), 1998, page 223-229 XP000879493 cited in the application Fig. 1 the whole document</p>	1-5, 11-18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/EP 00/09584

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	MCKEE K.K. ET AL.,: "Cloning and characterization of two human G protein-coupled receptor genes (GPR38 and GPR39) related to the growth hormone secretagogue and neurotensin receptors" GENOMICS, vol. 46(3), 1997, page 426-434 XP000889897 cited in the application Fig 1 the whole document	1-5, 11-18
A	VITA N ET AL: "CLONING AND EXPRESSION OF A COMPLEMENTARY DNA ENCODING A HIGH AFFINITY HUMAN NEUROTENSIN RECEPTOR" FEBS LETTERS,NL,ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS,AMSTERDAM, vol. 317, no. 1/02, 1 February 1993 (1993-02-01), page 139-142 XP002048144 ISSN: 0014-5793 cited in the application the whole document	1-5, 11-18
A	DATABASE WPI Section Ch, Week 199632 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B04, AN 1996-318958 XP002131656 & JP 08 143597 A (TAKEDA CHEM IND LTD), 4 June 1996 (1996-06-04) abstract	1-5, 11-18, 26-32
A	VITA N ET AL.,: "Neurotensin is an antagonist of the human neurotensin NT2 receptor expressed in Chinese hamster ovary cells" EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACOLOGY, vol. 360, no. 2/3, 6 November 1998 (1998-11-06), pages 265-272, XP000879367 cited in the application the whole document	26-32
A	US 5 482 835 A (KING KLIM ET AL) 9 January 1996 (1996-01-09) cited in the application abstract; examples 3-5	26-32
P,X	WD 99 55732 A (AHMAD SULTAN ;CAO JACK (CA); DONNELL DAJAN O (CA); WALKER PHILIPPE) 4 November 1999 (1999-11-04) abstract page 2, line 1 -page 5, line 17; figure 2 SEQ.ID.N.1	1-5,9, 11-18, 23-26

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/EP 00/09584

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	WO 00 22131 A (ARENA PHARMACEUTICALS INC ;GORE MARTIN (US); LIAW CHEN W (US); LIN) 20 April 2000 (2000-04-20) abstract SEQ.ID.N.12 page 3, line 5-14; example 1 ---	1-5,9, 11-18, 23-26
P,X	HOWARD ANDREW D ET AL: "Identification of receptors for neuromedin U and its role in feeding." NATURE (LONDON), vol. 406, no. 6791, 2000, pages 70-74, XP000926239 ISSN: 0028-0836 the whole document ---	1-40
P,X	HOSOYA MASAKI ET AL: "Identification and functional characterization of a novel subtype of neuromedin U receptor." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 275, no. 38, 22 September 2000 (2000-09-22), pages 29528-29532, XP002163224 ISSN: 0021-9258 the whole document ---	1-40
P,X	SZEKERES PHILIP G ET AL: "Neuromedin U is a potent agonist at the orphan G protein-coupled receptor FM3." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 275, no. 27, 7 July 2000 (2000-07-07), pages 20247-20250, XP002163225 ISSN: 0021-9258 the whole document ---	6-8,19, 21, 28-30, 33-35, 38-40
P,X	FUJII RYO ET AL: "Identification of neuromedin U as the cognate ligand of the orphan G protein-coupled receptor FM-3." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 275, no. 28, 14 July 2000 (2000-07-14), pages 21068-21074, XP002163226 ISSN: 0021-9258 the whole document ---	6-8,19, 21, 28-30, 33-35, 38-40

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 00/09584

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
T	<p>RADDATZ RITA ET AL: "Identification and characterization of two neuromedin U receptors differentially expressed in peripheral tissues and the central nervous system." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 275, no. 42, 20 October 2000 (2000-10-20), pages 32452-32459, XP002163227 ISSN: 0021-9258 the whole document</p>	1-40
T	<p>SHAN LIXIN ET AL: "Identification of a novel neuromedin U receptor subtype expressed in the central nervous system." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 275, no. 50, 15 December 2000 (2000-12-15), pages 39482-39486, XP002163228 ISSN: 0021-9258 the whole document</p>	1-40

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No. PCT/EP 00 09584

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.1

Although claims 23,24 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

Although claim 25 is directed to a diagnostic method practised on the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 27,30,32

Claims 27,30 and 32, refer to an agonist and antagonist of polypeptide of claim 1 without giving a true technical characterization. Moreover, no such compounds are defined in the application and in consequence, the scope of said claims is ambiguous and vague, and their subject-matter is not sufficiently disclosed and supported according to Art. 5 and 6 PCT.

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.
PCT/EP 00/09584

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9001330 A	22-02-1990	NONE	
JP 8143597 A	04-06-1996	NONE	
US 5482835 A	09-01-1996	US 5739029 A AU 652576 B AU 8511591 A CA 2092717 A EP 1029915 A EP 0548165 A IE 913242 A JP 6500693 T WO 9205244 A	14-04-1998 01-09-1994 15-04-1992 14-03-1992 23-08-2000 30-06-1993 25-02-1992 27-01-1994 02-04-1992
WO 9955732 A	04-11-1999	AU 4298099 A EP 1071714 A	16-11-1999 31-01-2001
WO 0022131 A	20-04-2000	AU 6299199 A AU 6430799 A WO 0021987 A WO 0022129 A AU 3790400 A WO 0031258 A	01-05-2000 01-05-2000 20-04-2000 20-04-2000 13-06-2000 02-06-2000

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)
A 6 1 K 45/00		A 6 1 P 1/00	4 C 0 8 4
48/00		1/04	4 C 0 8 5
A 6 1 P 1/00		1/08	4 C 0 8 6
1/04		1/12	4 H 0 4 5
1/08		3/14	
1/12		5/14	
3/14		7/02	
5/14		9/00	
7/02		9/04	
9/00		9/06	
9/04		9/10	
9/06			1 0 1
9/10		9/12	
	1 0 1	11/00	
9/12		11/06	
11/00		13/00	
11/06		13/02	
13/00		13/08	
13/02		13/12	
13/08		15/00	
13/12		19/02	
15/00		19/10	
19/02		21/00	
19/10		25/00	
21/00		25/02	
25/00		25/06	
25/02		25/08	
25/06		25/14	
25/08		25/16	
25/14		25/18	
25/16		25/20	
25/18		25/22	
25/20		25/24	
25/22		25/28	
25/24		25/30	
25/28		29/00	
25/30		31/00	
29/00		31/04	
31/00		31/10	
31/04		31/12	
31/10		31/14	
31/12		31/18	
31/14		35/00	
31/18		37/00	
35/00		37/08	
37/00		43/00	1 1 1

37/08		C 0 7 K	14/705	
43/00	1 1 1		16/28	
C 0 7 K	14/705	C 1 2 N	1/19	
	16/28	C 1 2 P	21/02	C
C 1 2 N	1/19	C 1 2 Q	1/02	
	5/10		1/68	A
C 1 2 P	21/02	G 0 1 N	33/15	Z
C 1 2 Q	1/02		33/50	Z
	1/68		33/53	D
G 0 1 N	33/15		33/566	
	33/50	C 1 2 N	15/00	Z N A A
	33/53		5/00	B
	33/566	A 6 1 K	37/02	

- (31)優先権主張番号 0 0 2 0 2 6 8 3 . 9
- (32)優先日 平成12年7月28日(2000 . 7 . 28)
- (33)優先権主張国 欧州特許庁 (E P)
- (31)優先権主張番号 6 0 / 2 2 2 , 0 4 7
- (32)優先日 平成12年7月31日(2000 . 7 . 31)
- (33)優先権主張国 米国 (U S)
- (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 , M Z , 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 R , C U , C Z , D E , D K , D M , 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 A , 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 , T Z , U A , U G , U S , U Z , V N , Y U , Z A , Z W
- (72)発明者 レケン, クリステイアネ
オランダ・エヌエル - 1381シーピー ウエ
ースプ・シーエイバンハウテンラーン36
- (72)発明者 ニス, ガイ
オランダ・エヌエル - 1381シーピー ウエ
ースプ・シーエイバンハウテンラーン36
- (72)発明者 ベネマ, ヤコブ
オランダ・エヌエル - 1381シーピー ウエ
ースプ・シーエイバンハウテンラーン36

Fターム(参考) 2G045 AA40 DA36 FB03
 4B024 AA01 AA11 BA63 CA04 CA09
 CA11 DA02 DA12 HA01 HA14
 HA17
 4B063 QA18 QA19 QQ03 QQ08 QQ43
 QR55 QS34
 4B064 AG20 CA06 CA10 CA19 CC24
 DA01 DA05 DA13
 4B065 AA72 AA90 AB01 BA02 CA24
 CA44 CA46
 4C084 AA01 AA02 AA07 BA01 BA02
 BA08 BA22 DC50 MA02 MA37
 MA52 MA56 MA63 MA66 NA14
 ZA02 ZA05 ZA06 ZA08 ZA11
 ZA12 ZA15 ZA16 ZA18 ZA20
 ZA36 ZA42 ZA43 ZA45 ZA59
 ZA66 ZA68 ZA70 ZA71 ZA73
 ZA81 ZA96 ZA97 ZC06 ZC35
 4C085 AA03 BB11 EE01 GG02 GG03
 GG04 GG05
 4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA02
 MA37 MA52 MA56 MA63 MA66
 NA14 ZA02 ZA05 ZA06 ZA08
 ZA11 ZA12 ZA15 ZA16 ZA18
 ZA20 ZA36 ZA42 ZA43 ZA45
 ZA59 ZA66 ZA68 ZA70 ZA71
 ZA73 ZA81 ZA96 ZA97 ZC06
 ZC35
 4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 CA40
 DA50 DA75 EA21 EA22 EA23
 EA25 EA26 EA27 EA28

【要約の続き】

症、真性糖尿病の合併症、および婦人科障害の治療、およびこのような状態に対する治療アッセイにおけるIGS4ポリペプチドおよびポリヌクレオチドおよび該IGS4受容体ファミリーに対するアゴニストおよびアンタゴニストの使用に関する。本発明の好ましい使用は、中枢神経系(CNS)および末梢神経系(PNS)を含む神経系の障害、胃腸系および/または心臓血管系および/または骨格筋および/または甲状腺の障害および/または肺疾患、免疫学的疾患および尿生殖系障害に関する。本発明は、本発明のIGS4ポリペプチドのコグネイトリガンドの同定にも関する。該IGS4ポリペプチドへの高いアフィニティー結合は、ニューロメジンUとして知られる神経ペプチドとして見いだされる。

专利名称(译)	新型人G蛋白偶联受体		
公开(公告)号	JP2003521894A	公开(公告)日	2003-07-22
申请号	JP2001528209	申请日	2000-09-25
[标]申请(专利权)人(译)	索尔瓦药物有限公司		
申请(专利权)人(译)	苏威杉机俞蒂卡尔的裴浮标		
[标]发明人	デレールスニーダーウイリ ベルガークラウドディア レケンクリステリアネ ニスガイ ベネマヤコブ		
发明人	デレールスニーダー,ウイリ ベルガー,クラウドディア レケン,クリステリアネ ニス,ガイ ベネマ,ヤコブ		
IPC分类号	A01K67/027 A61K31/7088 A61K38/00 A61K38/17 A61K39/00 A61K45/00 A61K48/00 A61P1/00 A61P1/04 A61P1/08 A61P1/12 A61P3/14 A61P5/14 A61P7/02 A61P9/00 A61P9/04 A61P9/06 A61P9/10 A61P9/12 A61P11/00 A61P11/06 A61P13/00 A61P13/02 A61P13/08 A61P13/12 A61P15/00 A61P19/02 A61P19/10 A61P21/00 A61P25/00 A61P25/02 A61P25/06 A61P25/08 A61P25/14 A61P25/16 A61P25/18 A61P25/20 A61P25/22 A61P25/24 A61P25/28 A61P25/30 A61P29/00 A61P31/00 A61P31/04 A61P31/10 A61P31/12 A61P31/14 A61P31/18 A61P35/00 A61P37/00 A61P37/08 A61P43/00 C07K14/705 C07K16/28 C12N1/19 C12N5/10 C12N15/09 C12N15/12 C12P21/02 C12Q1/02 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/566		
CPC分类号	A01K2217/05 A61P1/00 A61P1/04 A61P1/08 A61P1/12 A61P3/14 A61P11/00 A61P11/06 A61P13/00 A61P13/02 A61P13/08 A61P13/12 A61P15/00 A61P19/02 A61P19/10 A61P21/00 A61P25/00 A61P25/02 A61P25/06 A61P25/08 A61P25/14 A61P25/16 A61P25/18 A61P25/20 A61P25/22 A61P25/24 A61P25/28 A61P25/30 A61P29/00 A61P31/00 A61P31/04 A61P31/10 A61P31/12 A61P31/14 A61P31/18 A61P35/00 C07K14/705 Y02P20/582		
FI分类号	A01K67/027 A61K31/7088 A61K39/00.H A61K45/00 A61K48/00 A61P1/00 A61P1/04 A61P1/08 A61P1/12 A61P3/14 A61P5/14 A61P7/02 A61P9/00 A61P9/04 A61P9/06 A61P9/10 A61P9/10.101 A61P9/12 A61P11/00 A61P11/06 A61P13/00 A61P13/02 A61P13/08 A61P13/12 A61P15/00 A61P19/02 A61P19/10 A61P21/00 A61P25/00 A61P25/02 A61P25/06 A61P25/08 A61P25/14 A61P25/16 A61P25/18 A61P25/20 A61P25/22 A61P25/24 A61P25/28 A61P25/30 A61P29/00 A61P31/00 A61P31/04 A61P31/10 A61P31/12 A61P31/14 A61P31/18 A61P35/00 A61P37/00 A61P37/08 A61P43/00.111 C07K14/705 C07K16/28 C12N1/19 C12P21/02.C C12Q1/02 C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/566 C12N15/00.ZNA.A C12N5/00.B A61K37/02		
F-TERM分类号	2G045/AA40 2G045/DA36 2G045/FB03 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA63 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/CA11 4B024/DA02 4B024/DA12 4B024/HA01 4B024/HA14 4B024/HA17 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QQ08 4B063/QQ43 4B063/QR55 4B063/QS34 4B064/AG20 4B064/CA06 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA05 4B064/DA13 4B065/AA72 4B065/AA90 4B065/AB01 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA01 4C084/AA02 4C084/AA07 4C084/BA01 4C084/BA02 4C084/BA08 4C084/BA22 4C084/DC50 4C084/MA02 4C084/MA37 4C084/MA52 4C084/MA56 4C084/MA63 4C084/MA66 4C084/NA14 4C084/ZA02 4C084/ZA05 4C084/ZA06 4C084/ZA08 4C084/ZA11 4C084/ZA12 4C084/ZA15 4C084/ZA16 4C084/ZA18 4C084/ZA20 4C084/ZA36 4C084/ZA42 4C084/ZA43 4C084/ZA45 4C084/ZA59 4C084/ZA66 4C084/ZA68 4C084/ZA70 4C084/ZA71 4C084/ZA73 4C084/ZA81 4C084/ZA96 4C084/ZA97 4C084/ZC06		

4C084/ZC35 4C085/AA03 4C085/BB11 4C085/EE01 4C085/GG02 4C085/GG03 4C085/GG04 4C085/GG05 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA02 4C086/MA37 4C086/MA52 4C086/MA56 4C086/MA63 4C086/MA66 4C086/NA14 4C086/ZA02 4C086/ZA05 4C086/ZA06 4C086/ZA08 4C086/ZA11 4C086/ZA12 4C086/ZA15 4C086/ZA16 4C086/ZA18 4C086/ZA20 4C086/ZA36 4C086/ZA42 4C086/ZA43 4C086/ZA45 4C086/ZA59 4C086/ZA66 4C086/ZA68 4C086/ZA70 4C086/ZA71 4C086/ZA73 4C086/ZA81 4C086/ZA96 4C086/ZA97 4C086/ZC06 4C086/ZC35 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/CA40 4H045/DA50 4H045/DA75 4H045/EA21 4H045/EA22 4H045/EA23 4H045/EA25 4H045/EA26 4H045/EA27 4H045/EA28

优先权	1999203140 1999-09-24 EP 1013140 1999-09-24 NL 2000202683 2000-07-28 EP 60/222047 2000-07-31 US
-----	--

其他公开文献	JP2003521894A5
--------	----------------

外部链接	Espacenet
------	---------------------------

摘要(译)

本发明涉及新鉴定的多核苷酸，由其编码的多肽以及这些多核苷酸和多肽的用途及其生产。更具体地，本发明的多核苷酸和多肽涉及称为IGS4-家族的G蛋白偶联受体家族。本发明可以抑制或激活这些多核苷酸和多肽，含有该多肽核苷酸的载体，含有该载体的宿主细胞和IGS4-基因过表达，不表达，表达不足或抑制的作用。它还涉及转基因动物（敲除动物）。本发明进一步提供了用于筛选能够充当G蛋白偶联受体家族IGS4的激动剂或拮抗剂的化合物的方法，尤其是精神分裂症，间歇性发作性焦虑症（EPA）疾病例如强迫症（OCD），创伤后应激障碍（PTSD），恐惧症和恐慌症，严重抑郁症，双相情感障碍，帕金森氏病，一般性焦虑症，自闭症，del妄，多发性硬化症，阿尔茨海默氏病/痴呆等PNS包括神经退行性疾病，严重智力低下，运动障碍，亨廷顿舞蹈病，图雷特综合症，抽动，震颤，肌张力障碍，抽搐，厌食症，贪食症，中风，成瘾/依赖性/渴望，睡眠障碍，tencan，偏头痛，精神病和中枢神经系统疾病，分心/多动障碍（ADHD），心力衰竭，心绞痛，心律不齐，心肌梗塞，心脏肥大，低血压，高血压-例如原发性高血压，肾性高血压或肺动脉高压，血栓形成，动脉硬化，脑血管痉挛，蛛网膜下腔出血，脑缺血，脑梗塞，周围血管疾病，包括雷诺氏病在内的心血管疾病，肾脏疾病肾功能不全，血脂异常，肥胖，呕吐，肠易激综合症（IBS），炎症性肠病（IBD），胃肠道反射病（GERD），运动障碍和胃肠道症状延迟，例如术后或糖尿病性胃病轻瘫和糖尿病，溃疡-胃肠道疾病（包括胃溃疡），腹泻，其他疾病（包括骨质疏松症），炎症，细菌，真菌，原生动物和病毒等感染，尤其是HIV-1或HIV-2感染，困扰，癌症，化学诱发的疾病，肿瘤浸润，免疫疾病，残留尿液，哮喘，过敏，关节炎，良性前列腺增生，内毒素休克，败血症，糖尿病并发症和妇科疾病这个，这个尤娜的使用激动剂和拮抗剂对IGS4多肽和多核苷酸和IGS4受体家族治疗法的状态。本发明的优选用途包括神经系统的疾病，包括中枢神经系统（CNS）和周围神经系统（PNS），胃肠系统和/或心血管系统和/或骨骼肌和/或甲状腺和/或肺的疾病。疾病，免疫系统疾病和泌尿生殖系统疾病。本发明还涉及本发明IGS4多肽的同源配体的鉴定。在称为Neuromedin U的神经肽中发现了与IGS4多肽的高亲和力结合。