

(19) 日本国特許庁(JP)

**再公表特許(A1)**

(11) 国際公開番号

**WO2003/033727**

発行日 平成17年2月3日 (2005.2.3)

(43) 国際公開日 **平成15年4月24日 (2003.4.24)**(51) Int. Cl.<sup>7</sup>

**C 1 2 N 15/09**  
**A 6 1 K 45/00**  
**A 6 1 P 1/18**  
**A 6 1 P 9/00**  
**A 6 1 P 19/02**

F I

C 1 2 N 15/00 Z N A A  
 A 6 1 K 45/00  
 A 6 1 P 1/18  
 A 6 1 P 9/00  
 A 6 1 P 19/02

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 82 頁) 最終頁に続く

出願番号	特願2003-536450 (P2003-536450)	(71) 出願人	000006677 山之内製薬株式会社 東京都中央区日本橋本町2丁目3番11号
(21) 国際出願番号	PCT/JP2002/008128	(74) 代理人	100089200 弁理士 長井 省三
(22) 国際出願日	平成14年8月8日 (2002.8.8)	(74) 代理人	100109357 弁理士 矢野 恵美子
(31) 優先権主張番号	特願2001-315339 (P2001-315339)	(72) 発明者	佐野 頼方 茨城県つくば市御幸が丘2-1 山之内製薬株式会社内
(32) 優先日	平成13年10月12日 (2001.10.12)	(72) 発明者	稲村 耕平 茨城県つくば市御幸が丘2-1 山之内製薬株式会社内
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		
(31) 優先権主張番号	特願2002-211175 (P2002-211175)		
(32) 優先日	平成14年1月30日 (2002.1.30)		
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 細胞死抑制剤スクリーニング法

## (57) 【要約】

P A R P の活性化によって引き起こされる細胞死を抑制する物質、特に、慢性関節リウマチ、脳虚血時の神経細胞死、心筋梗塞再灌流後の心臓の細胞死、膵臓ランゲルハンス島ベーター細胞の自己免疫破壊、ショック後の細胞死、あるいは、免疫細胞死による炎症反応の治療剤及び/又は予防剤として有用な物質をスクリーニングする方法を提供する。また、新規タンパク質及びそれをコードする新規遺伝子を提供する。

前記スクリーニング方法は、L T R P C 2 タンパク質を発現している細胞に、L T R P C 2 タンパク質を活性化させることのできる条件下で、試験物質を接触させる工程と、L T R P C 2 タンパク質の活性化の阻害を分析する工程とを含む。前記の新規タンパク質はラット及びマウス L T R P C 2 タンパク質であり、前記の新規遺伝子はラット及びマウス L T R P C 2 遺伝子である。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

配列番号 2、配列番号 4 若しくは配列番号 1 4 で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド又はその機能的等価改変体を発現している細胞に、前記ポリペプチド又はその機能的等価改変体を活性化させることのできる条件下で、試験物質を接触させる工程、及び前記ポリペプチド又はその機能的等価改変体の活性化の阻害を分析する工程を含むことを特徴とする、細胞死抑制に有用な物質をスクリーニングする方法。

## 【請求項 2】

請求の範囲 1 に記載のスクリーニング方法を用いてスクリーニングする工程、及び前記スクリーニングにより得られた物質を用いて製剤化する工程を含むことを特徴とする、細胞死抑制用医薬組成物の製造方法。

10

## 【請求項 3】

(1) 配列番号 4 又は配列番号 1 4 で表されるアミノ酸配列を含み、しかも、L T R P C 2 タンパク質活性を示すポリペプチド、あるいは、(2) 配列番号 4 又は配列番号 1 4 で表されるアミノ酸配列において、1 又は数個のアミノ酸が置換、欠失、及び/又は挿入されたアミノ酸配列を含み、しかも、L T R P C 2 タンパク質活性を示すポリペプチド(但し、配列番号 2 で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドを除く)。

## 【請求項 4】

配列番号 4 又は配列番号 1 4 で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド。

## 【請求項 5】

請求の範囲 3 又は 4 に記載のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド。

20

## 【請求項 6】

請求の範囲 5 に記載のポリヌクレオチドを含むベクター。

## 【請求項 7】

請求の範囲 6 に記載のベクターを含む細胞。

## 【請求項 8】

請求の範囲 7 に記載の細胞を培養する工程を含むことを特徴とする、請求の範囲 3 又は 4 に記載のポリペプチドを製造する方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 技術分野

本発明は、細胞死抑制剤スクリーニング法に関する。また、本発明は、新規ラット L T R P C 2 及びマウス L T R P C 2 に関する。

30

## 背景技術

核内に存在するポリ・ADP リボース・ポリメラーゼ (PARP; poly-ADP-ribose polymerase) は、誘導型一酸化窒素 (NO)、活性酸素などによる DNA 分解によって活性化し、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NAD) から ADP リボース部分を核タンパク質、および DNA に付加する酵素である。すなわち、DNA 障害は PARP を活性化し、ATP を消費しながら大量の ADP リボースをヒストンや PARP 自身に付加する。その結果、細胞内の NAD 量及び ATP 量が減少し、細胞内エネルギー枯渇による細胞死を来すものと考えられている (Zhang, J. 及び Snyder, S. H., Science, 263, 687-689, 1995)。PARP タンパク質を構成する遺伝子は、これまでに 5 つ報告されており、これらの遺伝子が機能することで PARP 活性を示すことが推測されている。それらの遺伝子の中で、PARP-1 遺伝子が最も解析が進められている遺伝子であり、PARP タンパク質の活性化に伴う細胞死に最も貢献度が高い遺伝子であると推測されている。(Smith, S., Trends Biochem. Sci., 26174-179, 2001)

40

PARP 遺伝子を欠損させたミュータントマウスにおいて、脾臓ランゲルハンス島細胞で DNA 損傷による NAD 枯渇が生じないことが報告されている (Heller, B.ら, J. Biol. Chem., 270, 11176-11180, 1995)。また別文献によると、前記ミュータントマウスで脳皮質ニューロンでも同様に DNA 損傷による N

50

A D 枯渴が生じないことが明らかになっており、さらにこのマウスでは一過性脳虚血に伴う脳梗塞範囲が著明に減少することが報告されている (Eliasson, M. J. ら, *Nature Med.*, 3, 1089 - 1095, 1997)。このように PARP の活性化によって引き起こされた細胞死は、生体組織において重篤な疾患を引き起こすことが知られている。PARP の活性化によって引き起こされる細胞死が関与する疾患として、脳虚血時の神経細胞死、心筋梗塞再灌流後の心臓の細胞死、1型糖尿病における膵臓ランゲルハンス島ベーター細胞の自己免疫破壊、ショック後の細胞死、免疫細胞死による炎症反応、免疫機能に異常が起きることによって発病する自己免疫疾患である慢性関節リウマチ (Eliasson, M. J. ら, *Nature Med.*, 3, 1089 - 1095, 1997; Zingarelli, B., Salzman, A. L. 及び Szabo, C., *Circ. Res.*, 83, 85 - 94, 1998; Burkart, V. ら, *Nature Med.*, 5, 314 - 319, 1999; Pieper, A. A. ら, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 96, 3059 - 3064, 1997; Szabo, C., Cuzzocrea, S., Zingarelli, B., O'Connor, M. 及び Saltzman, A. L., *J. Clin. Invest.*, 100, 723 - 735, 1997; Oliver, F. J. ら, *EMBO J.*, 18, 4446 - 4454, 1999; Szabo, C. ら, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 95, 3867 - 72, 1998) も知られている。

10

一方、N - メチル - N' - ニトロ - N - ニトロソグアニジン (N - methyl - N' - nitro - N - nitrosoguanidine; MNNG) 又は H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> は、PARP を活性化することによって細胞死を引き起こすことが知られており (Halappanavar, S. S. ら, *J. Biol. Chem.*, 274, 37097 - 37104, 1999; Watson, A. J., Askew, J. N. 及び Benson, R. S., *Gastroenterology*, 109, 472 - 482, 1995)、3, 4 - ジヒドロ - 5 - [4 - (1 - ピペリジニル) ブトキシ] - 1 (2H) - イソキノリノン [3, 4 - dihydro - 5 - [4 - (1 - piperidinyl) butox] - 1 (2H) - isoquinolinone; DPQ]、3 - アミノベンズアミド、又はニコチンアミドは、PARP の活性化を阻害することによって、PARP による細胞死を抑制することが知られている (Takahashi, K. ら, *Brain Res.*, 829, 46 - 54, 1999; Watson, A. J., Askew, J. N. 及び Benson, R. S., *Gastroenterology*, 109, 472 - 482, 1995)。

20

30

しかしながら、PARP の下流に存在している因子の存在は明確にはされておらず、どのような機序で PARP の活性化が細胞死を引き起こすかについては現在のところ不明である。

一方、ヒト LTRPC2 (long transient receptor potential channel 2) 遺伝子は 1998 年に取得された (Genomics, 54, 1, 124 - 131, 1998)。マウス LTRPC2 遺伝子は取得したとの報告 (Japanese Journal of Pharmacology 80, Suppl. 1, 83, 2000; Molecular Cell 9, 163 - 173, 2002) はあるもののその具体的な塩基配列については開示されていない。また、ラット LTRPC2 に関する情報は開示されていない。ヒト LTRPC2 遺伝子は細胞内の ADP リボース又は NAD によって活性化し、カルシウム透過型非選択的陽イオンチャネルとして機能することが明らかになっている (Sano, Y. ら, *Science*, 293, 1327 - 1330, 2001)。ADPR による LTRPC2 の制御機構は細胞機能において大きな役割を持つかもしれないことが示唆されているもの (Nature, 411, 6837, 595 - 599, 2001)、どのような機序によって細胞内で LTRPC2 が機能して、その結果、細胞にどのような影響を示すかは不明である。

40

また、これまでに免疫細胞をクローン化した細胞での LTRPC2 遺伝子の発現は明らかになっているが、実際のヒトの血液、特に免疫細胞が含まれているリンパ球での発現は不

50

明である。

以上述べたように、PARPの活性化が細胞死を引き起こすこと自体は知られていたが、PARPの下流に存在している因子の存在は明確にはされておらず、その機序は不明であった。従って、PARPの活性化によって引き起こされる細胞死を抑制する物質、特に、PARPの活性化によって引き起こされる細胞死が関与する疾患（例えば、慢性関節リウマチ、脳虚血時の神経細胞死、心筋梗塞再灌流後の心臓の細胞死、膵臓ランゲルハンス島ベーター細胞の自己免疫破壊、ショック後の細胞死、あるいは、免疫細胞死による炎症反応）の治療剤及び/又は予防剤として有用な物質をスクリーニングする方法が待望されている。

発明の開示

本発明者らは、鋭意研究を重ねた結果、LTRPC2タンパク質の活性化がPARPの活性化によって制御されており、細胞死を引き起こす機能を有していることを、初めて見出した。さらに、LTRPC2遺伝子がヒトリンパ球で発現しており、さらに、慢性関節リウマチ疾患において発現量が増加していることを、初めて見出した。

より具体的には後述の実施例6に示すように、PARPを活性化することが知られている物質、すなわち、MNNG又はH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を、LTRPC2タンパク質を発現させた細胞に添加すると、LTRPC2タンパク質の活性化が観察された。更に、実施例7に示すように、PARPの活性化阻害剤であるDPQ、3-アミノベンズアミド、又はニコチンアミドを、PARP活性化剤（例えば、MNNG又はH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>）と共に添加すると、LTRPC2タンパク質の活性化は有意に阻害された。

さらに、実施例10に示すように、LTRPC2タンパク質を発現させた細胞で、PARP活性化剤であるH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>による細胞死が促進された。

また、実施例2に示すように、LTRPC2遺伝子は免疫の機能を担うリンパ球で多く発現しており、さらに、実施例12に示すように免疫疾患の1つである慢性関節リウマチのモデル動物において、LTRPC2遺伝子の発現量が増加していた。

加えて、実施例17に示すように、LTRPC2タンパク質は1型糖尿病モデルであるストレプトゾトシン刺激による細胞死を促進することを見出した。

従って、LTRPC2タンパク質の活性化を阻害する物質を選択することにより、PARPの活性化によって引き起こされる細胞死を抑制することができる物質を同定することができる。引いては、細胞死によって引き起こされる疾患治療薬、例えば、免疫疾患である慢性関節リウマチ、脳虚血後の神経細胞死、又は1型糖尿病における膵臓ランゲルハンス島ベーター細胞の自己免疫破壊の治療薬として有用な物質を見出すことができる。本発明は、このような知見に基づくスクリーニング系を提供するものである。

すなわち本発明は、

(1) 配列番号2、配列番号4若しくは配列番号14で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド又はその機能的等価改変体を発現している細胞に、前記ポリペプチド又はその機能的等価改変体を活性化させることのできる条件下で、試験物質を接触させる工程、及び

前記ポリペプチド又はその機能的等価改変体の活性化の阻害を分析する工程

を含むことを特徴とする、細胞死抑制に有用な物質をスクリーニングする方法、

(2) (1)に記載のスクリーニング方法を用いてスクリーニングする工程、及び

前記スクリーニングにより得られた物質を用いて製剤化する工程

を含むことを特徴とする、細胞死抑制用医薬組成物の製造方法、

(3) (i) 配列番号4又は配列番号14で表されるアミノ酸配列を含み、しかも、LTRPC2タンパク質活性を示すポリペプチド、あるいは、(ii) 配列番号4又は配列番号14で表されるアミノ酸配列において、1又は数個のアミノ酸が置換、欠失、及び/又は挿入されたアミノ酸配列を含み、しかも、LTRPC2タンパク質活性を示すポリペプチド（但し、配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドを除く）、

(4) 配列番号4又は配列番号14で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、

(5) (3)又は(4)に記載のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、

10

20

30

40

50

(6)(5)に記載のポリヌクレオチドを含むベクター、  
 (7)(6)に記載のベクターを含む細胞、  
 (8)(7)に記載の細胞を培養する工程を含むことを特徴とする、(3)又は(4)に記載のポリペプチドを製造する方法  
 に関する。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を詳細に説明する。

本明細書における「細胞死」には、アポトーシス及びネクローシスの両方が含まれる。アポトーシスはプログラムされた細胞死であり、生理的条件下で細胞自らが積極的に引き起こす細胞死である。一方、ネクローシスは生体の一部が死ぬことを示し、非生理的条件下で強制的に引き起こされる細胞死である。

[1]本発明のポリペプチド、ポリヌクレオチド

配列番号4及び配列番号14で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドは、それぞれラット、及びマウス由来の天然型LTRPC2タンパク質である。「配列番号4又は14で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド」又はその機能的等価改変体(但し、配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドを除く)は、それら自体、新規のポリペプチドであり、本発明のポリペプチドに包含される。

「配列番号4で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド」の機能的等価改変体としては、例えば、

(1)配列番号4で表されるアミノ酸配列を含み、しかも、LTRPC2タンパク質活性を示すポリペプチド；

(2)配列番号4で表されるアミノ酸配列の1又は数個、好ましくは1~5個、より好ましくは1~3個、更に好ましくは1個のアミノ酸が置換、欠失、及び/又は挿入されたアミノ酸配列を含み、しかも、LTRPC2タンパク質活性を示すポリペプチド；

(3)配列番号4で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドの部分断片であって、しかも、LTRPC2タンパク質活性を示す部分断片；又は

(4)配列番号4で表されるアミノ酸配列との相同性が84%以上(好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上、更に好ましくは98%以上、特に好ましくは99%以上)であるアミノ酸配列を含み、しかも、LTRPC2タンパク質活性を示すポリペプチドなどを挙げることができる。

また、「配列番号14で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド」の機能的等価改変体としては、例えば、

(1)配列番号14で表されるアミノ酸配列を含み、しかも、LTRPC2タンパク質活性を示すポリペプチド；

(2)配列番号14で表されるアミノ酸配列の1又は数個、好ましくは1~5個、より好ましくは1~3個、更に好ましくは1個のアミノ酸が置換、欠失、及び/又は挿入されたアミノ酸配列を含み、しかも、LTRPC2タンパク質活性を示すポリペプチド；

(3)配列番号14で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドの部分断片であって、しかも、LTRPC2タンパク質活性を示す部分断片；又は

(4)配列番号14で表されるアミノ酸配列との相同性が84%以上(好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上、更に好ましくは98%以上、特に好ましくは99%以上)であるアミノ酸配列を含み、しかも、LTRPC2タンパク質活性を示すポリペプチド

などを挙げることができる。

なお、本明細書における前記「相同性」とは、BLASTパッケージ[sgis32bit版,バージョン2.0.12;National Center for Biotechnology Information(NCBI)より入手]のbl2seqプログラム(Tatiana A. Tatusova, Thomas L. Madden, FEMS Microbiol. Lett., 174, 247-250, 1999)を用いて得られた値を意味する。なお、パラメーターでは、ペアワイズアラインメントパラメータ

ーとして、「プログラム名」として「blastp」を、「Gap挿入Cost値」を「0」で、「Gap伸長Cost値」を「0」で、「Matrix」として「BLOSUM62」をそれぞれ使用する。

本明細書において、或るポリペプチドが「LTRPC2タンパク質活性」を示すとは、配列番号2で表されるアミノ酸配列からなる公知のヒト由来の天然型LTRPC2タンパク質と同様の活性を示すことを意味し、具体的には、例えば、PARP共発現下で、PARP活性化剤を作用させることにより、膜に存在する前記ポリペプチドそれ自体がイオンの通り道を生じ、その結果、イオンの透過を生じさせる活性を意味する。

本明細書において、或るポリペプチドが「LTRPC2タンパク質活性」を示すか否かは、特に限定されるものではないが、例えば、以下の方法（好ましくは実施例6に記載の方法）により確認することができる。すなわち、LTRPC2タンパク質をコードするポリペプチドを含む発現ベクターで、PARPを発現している細胞をトランスフェクションする。得られた細胞に予め $^{86}\text{Rb}^+$ を取り込ませ、PARP活性化剤を添加する。その結果生じるLTRPC2タンパク質を介した細胞からの $^{86}\text{Rb}^+$ の放出を、細胞外液又は細胞内の $^{86}\text{Rb}^+$ の放射活性の変化を指標に確認することができる。

「配列番号4又は14で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド」の機能的等価改変体の1つである「配列番号4又は14で表されるアミノ酸配列を含み、しかも、LTRPC2タンパク質活性を示すポリペプチド」には、例えば、配列番号4又は14で表されるアミノ酸配列のN末端及び/又はC末端に、適当なマーカー配列等を付加したポリペプチド（但し、LTRPC2タンパク質活性を示すことが必要）を挙げることができる。前記マーカー配列としては、ペプチドの発現の確認、細胞内局在の確認、あるいは、精製等を容易に行なうための配列を用いることができ、例えば、FLAGエピトープ、ヘキサ-ヒスチジン・タグ、ヘマグルチニン・タグ、又はmycエピトープなどを挙げることができる。

「配列番号4又は14で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド」の機能的等価改変体の起源は、ヒト、ラット又はマウスに限定されない。例えば、前記機能的等価改変体には、例えば、配列番号4又は14で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドのヒト、ラット又はマウスにおける天然のアレル変異体（但し、LTRPC2タンパク質活性を示す）、あるいは、一塩基多型（Single Nucleotide Polymorphism; SNP）などのアミノ酸置換で生じたポリペプチド（但し、LTRPC2タンパク質活性を示す）が含まれるだけでなく、ヒト、ラット又はマウス以外の生物〔例えば、ヒト又はラット以外の哺乳動物（例えば、ハムスター、又はイヌ）〕由来の天然に存在する機能的等価改変体が含まれる。また、これらの天然のポリペプチド、特に、配列番号4又は14で表されるアミノ酸配列を基にして遺伝子工学的に人為的に改変したポリペプチドなどが含まれる。

本発明の新規ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、それら自体、新規物であり、本発明のポリヌクレオチドに包含される。本発明のポリヌクレオチドとしては、配列番号4若しくは配列番号14で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドが好ましく、配列番号3で表される塩基配列における第84番～第4610番の塩基からなる配列若しくは配列番号13で表される塩基配列における第36番～第4559番の塩基からなる配列からなるポリヌクレオチドがより好ましい。更に好ましくは、配列番号3で表される塩基配列における第84番～第4610番の塩基からなる配列である。なお、本明細書における用語「ポリヌクレオチド」には、DNA及びRNAの両方が含まれる。

本発明のポリペプチド、ポリヌクレオチドは、細胞死抑制用物質のスクリーニングツールとして使用することができる。

[2]スクリーニング用細胞、並びに、本発明の発現ベクター及び細胞配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドは、公知のヒト由来の天然型LTRPC2タンパク質である。配列番号2、配列番号4若しくは配列番号14で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドと、その機能的等価改変体とを総称して、「LTRP

10

20

30

40

50

C2タンパク質」と称する。

「配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド」の機能的等価改変体としては、例えば、

(1) 配列番号2で表されるアミノ酸配列を含み、しかも、LTRPC2タンパク質活性を示すポリペプチド；

(2) 配列番号2で表されるアミノ酸配列の1又は数個、好ましくは1～5個、より好ましくは1～3個、更に好ましくは1個のアミノ酸が置換、欠失、及び/又は挿入されたアミノ酸配列を含み、しかも、LTRPC2タンパク質活性を示すポリペプチド；

(3) 配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドの部分断片であって、しかも、LTRPC2タンパク質活性を示す部分断片；又は

(4) 配列番号2で表されるアミノ酸配列との相同性が84%以上（好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上、更に好ましくは98%以上、特に好ましくは99%以上）であるアミノ酸配列を含み、しかも、LTRPC2タンパク質活性を示すポリペプチドなどを挙げることができ、配列番号4又は14で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドの機能改変体と同様、その起源は限定されず、また、遺伝子工学的に人為的に改変したポリペプチドも含まれる。

本発明のスクリーニング方法で用いる細胞（スクリーニング用細胞と称する）は、上記のLTRPC2タンパク質を発現している細胞である限り特に限定されるものではなく、遺伝子組換え技術により製造した細胞及び天然に存在する細胞の何れを用いることも出来るが、遺伝子組換え技術により製造した細胞を用いることが好ましい。また、配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド又はその機能的等価改変体を発現している細胞が好ましく、配列番号2、配列番号4、若しくは配列番号14で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドを発現している細胞が更に好ましい。スクリーニング用細胞は、細胞死抑制用物質のスクリーニングツールとして使用することができる。

本発明のポリヌクレオチドを含むベクター、及びそのベクターを含む細胞は、それぞれ、新規であり、本発明のベクター及び本発明の細胞に包含される。本発明の細胞は上記スクリーニング用細胞に包含され、本発明のスクリーニングに用いることが出来る。

### [3] スクリーニング用細胞の製造方法

スクリーニング用細胞の製造方法は、特に限定されるものではないが、例えば、LTRPC2タンパク質をコードするポリヌクレオチドを、適当なベクターDNAに組み込み、宿主細胞（好ましくは真核生物、特に好ましくはCHO細胞）を形質転換させることにより取得することができる。また、これらのベクターに適当なプロモーター及び形質発現にかかわる配列を導入することにより、それぞれの宿主細胞においてポリヌクレオチドを発現させることが可能である。

スクリーニング用細胞の製造に用いることのできる、LTRPC2タンパク質をコードするポリヌクレオチド（本発明のポリヌクレオチドを含む）の製造方法は、特に限定されるものではないが、例えば、(1) PCRを用いた方法、(2) 常法の遺伝子工学的手法（すなわち、cDNAライブラリーで形質転換した形質転換株から、所望のcDNAを含む形質転換株を選択する方法）を用いる方法、又は(3) 化学合成法などを挙げることができる。以下、各製造方法について、順次、説明する。なお、以下の説明は、本発明のポリヌクレオチドを例にとって説明するが、本発明のポリヌクレオチド以外の、LTRPC2タンパク質をコードするポリヌクレオチドについても、同様にして製造することができる。

PCRを用いた方法では、例えば、以下の手順により、本発明のポリヌクレオチドを製造することができる。

すなわち、本発明のポリペプチドを産生する能力を有する細胞又は組織からmRNAを抽出する。次いで、本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの塩基配列に基づいて、本発明のポリペプチドに相当するmRNAの全長を挟むことのできる2個1組のプライマーセット、あるいは、その一部のmRNA領域を挟むことのできる2個1組のプライマーセットを作成する。逆転写酵素-ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）を行なう

ことにより、本発明のポリペプチドの全長 cDNA 又はその一部を得ることができる。より詳細には、まず、本発明のポリペプチドの産生能力を有する細胞又は組織から、本発明のポリペプチドをコードする mRNA を含む総 RNA を既知の方法により抽出する。抽出法としては、例えば、グアニジン・チオシアネート・ホット・フェノール法、グアニジン・チオシアネート・グアニジン・塩酸法、又はグアニジン・チオシアネート塩化セシウム法等を挙げることができるが、グアニジン・チオシアネート塩化セシウム法を用いることが好ましい。本発明のポリペプチドの産生能力を有する細胞又は組織は、例えば、本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド又はその一部を用いたノーザンブロットイング法、あるいは、本発明のポリペプチドに特異的な抗体を用いたウエスタンブロットイング法などにより特定することができる。

10

続いて、抽出した mRNA を精製する。mRNA の精製は常法に従えばよく、例えば、mRNA をオリゴ(dT)セルロースカラムに吸着後、溶出させることにより精製することができる。所望により、ショ糖密度勾配遠心法等により mRNA を更に分画することもできる。また、mRNA を抽出しなくても、市販されている抽出精製済みの mRNA を用いることもできる。

次に、精製された mRNA を、例えば、ランダムプライマー、オリゴ dT プライマー、及び/又はカスタム合成したプライマーの存在下で、逆転写酵素反応を行ない、第 1 鎖 cDNA を合成する。この合成は、常法によって行なうことができる。得られた第 1 鎖 cDNA を用い、目的ポリヌクレオチドの全長又は一部の領域を挟んだ 2 種類のプライマーを用いて PCR を実施し、目的とする cDNA を増幅することができる。得られた DNA をアガロースゲル電気泳動等により分画する。所望により、前記 DNA を制限酵素等で切断し、接続することによって目的とする DNA 断片を得ることもできる。また、ゲノム DNA から目的とする DNA 断片を得ることもできる。

20

常法の遺伝子工学的手法を用いる方法では、例えば、WO 01/34785 の「発明の実施の形態」1) 蛋白質遺伝子の製造方法 b) 第 2 製造法に記載された手順により、本発明のポリヌクレオチドを製造することができる。

化学合成法を用いた方法では、例えば、前記特許文献の「発明の実施の形態」1) 蛋白質遺伝子の製造方法 c) 第 3 製造法、d) 第 4 製造法に記載された方法によって、本発明のポリヌクレオチドを製造することができる。より具体的には、化学合成法によって製造したヌクレオチド断片を結合することによっても製造できる。また、各ポリヌクレオチド(オリゴヌクレオチド)は、DNA 合成機(例えば、Oligo 1000M DNA Synthesizer (Beckman 社)、あるいは、394 DNA/RNA Synthesizer (Applied Biosystems 社)など)を用いて合成することができる。

30

これまで述べた種々の方法により得られる DNA の配列決定は、例えば、マキサム・ギルバートの化学修飾法(Maxam, A. M. 及び Gilbert, W., "Methods in Enzymology", 65, 499-559, 1980) やジデオキシヌクレオチド鎖終結法(Messing, J. 及び Vieira, J., Gene, 19, 269-276, 1982) 等により行なうことができる。

単離された本発明のポリヌクレオチドを、適当なベクター DNA に再び組込むことにより、宿主細胞(好ましくは真核生物)を形質転換させることができる。また、これらのベクターに適当なプロモーター及び形質発現にかかわる配列を導入することにより、それぞれの宿主細胞においてポリヌクレオチドを発現させることが可能である。

40

スクリーニング用細胞の製造に用いることのできる、宿主細胞及び発現ベクターとしては、例えば、遺伝子工学において一般的に使用可能な公知の宿主細胞及び発現ベクターを用いることができる。

例えば、真核生物の宿主細胞には、脊椎動物、昆虫、及び酵母等の細胞が含まれ、脊椎動物細胞としては、例えば、サルの細胞である COS 細胞(Gluzman, Y., Cell, 23, 175-182, 1981)、チャイニーズ・ハムスター卵巣細胞(CHO) のジヒドロ葉酸レダクターゼ欠損株である CHO dhfr<sup>-</sup>細胞(Urlaub, G.

50

及び Chasin, L. A., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 4216-4220, 1980)、ヒト胎児腎臓由来 HEK 293 細胞、及び前記 HEK 293 細胞にエプスタイン・バーウイルスの EBNA-1 遺伝子を導入した 293-EBNA 細胞 (インビトロジェン社) 等を挙げることができる。

宿主細胞として CHO 細胞を用いる場合には、LTRPC2 タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターと共に、G418 耐性マーカーとして機能する neo 遺伝子を発現することのできるベクター、例えば、pRSVneo (Sambrook, J. ら, "Molecular Cloning - A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, NY, 1989) 又は pSV2-neo (Southern, P. J. 及び Berg, P., J. Mol. Appl. Genet., 1, 327-341, 1982) 等をコ・トランスフェクトし、G418 耐性のコロニーを選択することにより、LTRPC2 タンパク質を安定に産生する形質転換細胞を得ることができる。

脊椎動物細胞の発現ベクターとしては、通常発現しようとするポリヌクレオチドの上流に位置するプロモーター、RNA のスプライス部位、ポリアデニル化部位、及び転写終結配列等を有するものを使用することができ、更に必要により、複製起点を有していることができる。前記発現ベクターの例としては、例えば、SV40 の初期プロモーターを有する pSV2dhfr (Subramani, S. ら, Mol. Cell. Biol., 1, 854-864, 1981)、ヒトの延長因子プロモーターを有する pEF-BOS (Mizushima, S. 及び Nagata, S., Nucleic Acids Res., 18, 5322, 1990)、サイトメガロウイルスプロモーターを有する pCEP4 (インビトロジェン社) 又は pcDNA3.1 (+) (インビトロジェン社) 等を挙げることができる。

前記発現ベクターは、例えば、DEAE-デキストラン法 (Luthman, H. 及び Magnusson, G., Nucleic Acids Res., 11, 1295-1308, 1983)、リン酸カルシウム-DNA 共沈殿法 (Graham, F. L. 及び van der Ed, A. J., Virology, 52, 456-457, 1973)、市販のトランスフェクション試薬 (例えば、FuGENE™6 Transfection Reagent; Roche Diagnostics 社) を用いた方法、あるいは、電気パルス穿孔法 (Neumann, E. ら, EMBO J., 1, 841-845, 1982) 等により、細胞に取り込ませることができる。

LTRPC2 タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む細胞は、常法に従って培養することができ、前記培養により細胞表面に LTRPC2 タンパク質が生産される。前記培養に用いることのできる培地としては、採用した宿主細胞に応じて慣用される各種の培地を適宜選択することができる。例えば、CHO 細胞の場合には、例えば、ダルベッコ修正イーグル最小必須培地 (DMEM) 等の培地に、必要に応じて牛胎仔血清 (FBS) 等の血清成分を添加した培地を使用することができる。また、293 細胞の場合には、牛胎仔血清 (EBS) 等の血清成分を添加したダルベッコ修正イーグル最小必須培地 (DMEM) 等の培地に G418 を加えた培地を使用することができる。

#### [4] 細胞死抑制に有用な物質をスクリーニングする方法

本発明の細胞死抑制に有用な物質をスクリーニングする方法は、(1) LTRPC2 タンパク質を発現している細胞に、LTRPC2 タンパク質を活性化させることのできる条件下で、試験物質を接触させる工程と、(2) LTRPC2 タンパク質の活性化の阻害を分析する工程とを含む。

本発明のスクリーニング方法では、LTRPC2 タンパク質を活性化させることのできる条件下において、スクリーニング用細胞と試験物質とを接触させる。LTRPC2 タンパク質を活性化させることのできる条件下としては、例えば、LTRPC2 タンパク質活性化剤の存在下を挙げることができる。前記 LTRPC2 タンパク質活性化剤としては、例えば、ADP リボース若しくは NAD、又は PARP 活性化剤 (例えば、MNNG 又は H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) を挙げることができる。

10

20

30

40

50

本発明のスクリーニング方法では、特に限定されるものでないが、例えば、L T R P C 2タンパク質の活性化の後に、試験物質と接触させることもでき、あるいは、L T R P C 2タンパク質の活性化と同時に、試験物質と接触させることもできる。前者の場合には、試験物質がL T R P C 2タンパク質の活性化を阻害する物質であれば、L T R P C 2タンパク質の活性化が阻害され、逆に、試験物質がL T R P C 2タンパク質の活性化を阻害する物質でなければ、L T R P C 2タンパク質の活性化が維持される。一方、後者の場合には、試験物質がL T R P C 2タンパク質の活性化を阻害する物質であれば、L T R P C 2タンパク質の活性化が起こらないか、あるいは、減弱される。逆に、試験物質がL T R P C 2タンパク質の活性化を阻害する物質でなければ、L T R P C 2タンパク質の活性化が起こる。

10

本発明のスクリーニング方法を用いると、L T R P C 2タンパク質の活性化を阻害する物質（すなわち、アンタゴニスト）をスクリーニングすることができる。本発明者が今回初めて見出したように、L T R P C 2タンパク質の活性化は、P A R Pの活性化によって制御されている。また、P A R Pの活性化により細胞死が引き起こされることが、既に公知である。従って、P A R Pの活性化により、L T R P C 2タンパク質の活性化が引き起こされ、その結果、更に、細胞死が引き起こされることが、本発明者により今回初めて明らかになった。従って、L T R P C 2タンパク質の活性化を阻害する物質は、P A R Pの活性化によって引き起こされる細胞死を抑制することができ、P A R Pの活性化によって引き起こされる細胞死が関与する疾患の治療及び/又は予防剤の有効成分として有用である。

20

より具体的には、本発明のスクリーニング方法は、L T R P C 2タンパク質の活性化を分析するのに用いる方法の違いに基づいて、例えば、

- (a) パッチクランプ (patch-clamp) 法を利用したスクリーニング方法、
- (b) 放射性同位元素イオンの流入又は放出を利用したスクリーニング方法、
- (c)  $Rb^+$  イオンの放出を利用したスクリーニング方法、又は
- (d) 細胞内  $Ca^{2+}$  検出色素を利用したスクリーニング方法

などを挙げることができる。

前記 (a) のパッチクランプ法を利用して、細胞死抑制剤として有用な、L T R P C 2タンパク質の活性化を阻害する物質をスクリーニングする場合には、例えば、ホールセルパッチクランプ (whole-cell patch-clamp) 法 (Hille, B., "Ionic Channels of Excitable Membranes", 2nd Ed., 1992, Sinauer Associates Inc., MA) を用いて、スクリーニング用細胞における全細胞電流を測定することにより、L T R P C 2タンパク質の活性化が阻害されるか否かを分析することができる。すなわち、パッチクランプ法を利用する本発明のスクリーニング方法は、特に限定されるものではないが、例えば、スクリーニング用細胞をホールセルパッチクランプ法により膜電位固定し、L T R P C 2タンパク質を活性化させることのできる条件下で、前記スクリーニング用細胞と試験物質とを接触させる工程、及び前記スクリーニング用細胞における全細胞電流の変化を分析する工程を含む。

30

より具体的には、スクリーニング用細胞をホールセルパッチクランプ法により膜電位固定し、L T R P C 2タンパク質を活性化する化合物（例えば、ADPリボース、NAD、 $H_2O_2$ 、又はMNNG）を添加して、スクリーニング用細胞の全細胞電流を測定する。この場合、細胞外液としては、 $145\text{ mmol/L} - NaCl$ 、 $5\text{ mmol/L} - KCl$ 、 $2\text{ mmol/L} - CaCl_2$ 、 $2\text{ mmol/L} - MgCl_2$ 、及び $10\text{ mmol/L} - HEPES - Na$  (pH 7.4) を含む溶液を使用し、細胞内液としては、 $150\text{ mmol/L} - CsCl$ 、 $5\text{ mmol/L} - MgCl_2$ 、及び $10\text{ mmol/L} - HEPES - Cs$  (pH 7.2) を含む溶液などを用いることができる。続いて、細胞外液又は細胞内液に試験物質を添加した場合の電流変化を測定することで、L T R P C 2タンパク質の活性化を阻害する物質をスクリーニングすることができる。例えば、試験物質を添加した場合に、スクリーニング用細胞にL T R P C 2タンパク質の活性化刺激の際に生じる全細胞電

40

50

流の変化がなくなるか、あるいは、減弱されれば、前記試験物質は、LTPC2タンパク質の活性化を阻害する物質であると判定することができる。

前記(b)の放射性同位元素イオンの放出を利用して、細胞死抑制剤として有用な、LTPC2タンパク質の活性化を阻害する物質をスクリーニングする場合には、例えば、 $Ca^{2+}$ 、 $Na^+$ 、又は $K^+$ イオンの各放射性同位元素を指標としてそのチャンネル活性を測定することができる(Sidney P. Colowick及びNathan O. Kaplan, "Methods in ENZYMOLOGY", 88(1), 1982, Academic Press社, 346-347)。この分析方法は、LTPC2タンパク質が $Ca^{2+}$ 、 $Na^+$ 、又は $K^+$ イオンを透過させる(Sano, Y.ら, Science, 293, 1327-1330, 2001)との公知の知見に基づくものである。

10

放射性同位元素イオンの放出を利用する本発明のスクリーニング方法は、特に限定されるものではないが、例えば、スクリーニング用細胞に、放射性同位元素を取り込ませた後、LTPC2タンパク質を活性化させることのできる条件下で、前記スクリーニング用細胞と試験物質とを接触させる工程、及び前記スクリーニング用細胞の細胞外へ放出される放射活性、あるいは、細胞内に残存する放射活性の量を分析する工程を含む。

具体的には、各イオンの放射性同位元素である $^{45}Ca^{2+}$ 、 $^{22}Na^+$ 、又は $^{42}K^+$ を用いて測定することができる。 $K^+$ を用いる場合には、 $K^+$ を予め細胞に取り込ませた後、細胞外液に残った $K^+$ を取り除く。その後、LTPC2タンパク質活性化剤を用いてLTPC2タンパク質を活性化させると、放射性同位体元素 $K^+$ が透過することから、細胞外液中の放射活性(すなわち、細胞外へ放出された放射活性)、あるいは、細胞内に残存した放射活性をチャンネル活性の指標とすることができる。 $^{45}Ca^{2+}$ 又は $^{22}Na^+$ を用いる場合には、 $^{45}Ca^{2+}$ 又は $^{22}Na^+$ を反応液中に入れておいた状態で、

20

LTPC2タンパク質活性化剤を用いてLTPC2タンパク質を活性化させると、放射性同位体元素が透過することから、細胞外液中の放射活性(すなわち、細胞外液に残存した放射活性)、あるいは、細胞内に流入した放射性同位元素の放射活性をチャンネル活性の指標とすることができる(黒木登志夫、許南浩、及び千田和広編、実験医学別冊「分子生物学研究のための培養細胞実験法」、1995年、羊土社;以下、文献1と称する)。この際、LTPC2タンパク質活性化剤の存在下において、試験物質を添加して、細胞外液中の放射活性(すなわち、細胞外へ放出された放射活性)、あるいは、細胞内に残存した放射活性を測定することで、LTPC2タンパク質の活性化を阻害する物質をスクリーニングすることができる。より具体的には、次に説明する「(c)  $Rb^+$ イオンの放出を利用したスクリーニング方法」に準じて実施することができる。

30

一般的に、 $K^+$ イオンを透過するイオンチャンネルは、 $K^+$ イオンと同様に、 $Rb^+$ イオンを通すことができるので、放射性同位元素 $^{86}Rb^+$ の放出を指標としてそのチャンネル活性を測定することができる(Sidney P. Colowick及びNathan O. Kaplan, "Methods in ENZYMOLOGY", 88(1), 1982, Academic Press社, 346-347;以下、文献2と称する)。

前記(c)の $Rb^+$ イオンの放出を利用して、細胞死抑制剤として有用な、LTPC2タンパク質の活性化を阻害する物質をスクリーニングする本発明のスクリーニング方法は、特に限定されるものではないが、例えば、スクリーニング用細胞に放射性同位元素 $^{86}Rb^+$ を取り込ませた後、LTPC2タンパク質を活性化させることのできる条件下で、前記スクリーニング用細胞と試験物質とを接触させる工程、及び前記スクリーニング用細胞の細胞外へ放出される $^{86}Rb^+$ の放射活性、あるいは、細胞内に残存する $^{86}Rb^+$ の放射活性の量を分析する工程を含む。

40

$Rb^+$ イオンの放出を利用する本発明のスクリーニング方法では、スクリーニング用細胞を、 $^{86}RbCl$ とインキュベート(例えば、37℃にて24時間)することにより、 $^{86}Rb^+$ を前記細胞内に取り込ませることができる(文献1)。細胞を通常の生理食塩水で洗浄し、取り込まれなかった $^{86}Rb^+$ を取り除く。LTPC2タンパク質が活性化すると、細胞外への $^{86}Rb^+$ 放出量が増加するので、細胞外液中の $^{86}Rb^+$ の放射活

50

性、あるいは、細胞内に残存した $^{86}\text{Rb}^+$ の放射活性をチャンネル活性の指標とすることができる。

より具体的には、例えば、LTPC2タンパク質活性化剤の存在下で、試験物質を含有する溶液（例えば、生理食塩水）中で、予め $^{86}\text{Rb}^+$ を取り込ませたスクリーニング用細胞をインキュベート（例えば、37℃にて30分間）した後、細胞外液中の $^{86}\text{Rb}^+$ の放射活性、あるいは、細胞内に残存した $^{86}\text{Rb}^+$ の放射活性を測定する。この際、ネガティブコントロールとして、LTPC2タンパク質活性化剤の不在下で、試験物質不含溶液中で、同様の操作を実施し、ポジティブコントロールとして、LTPC2タンパク質活性化剤の存在下で、試験物質不含溶液中で、同様の操作を実施することが好ましい。前記ネガティブコントロールでは、LTPC2タンパク質が活性化されないため、 $^{86}\text{Rb}^+$ が細胞外へ放出されないのに対して、前記ポジティブコントロールでは、LTPC2タンパク質が活性化されるため、 $^{86}\text{Rb}^+$ が細胞外へ放出される。LTPC2タンパク質活性化剤の存在下において試験物質を添加した場合に、（1）前記ネガティブコントロールの場合と同様に、 $^{86}\text{Rb}^+$ の細胞外への放出が観察されないか、あるいは、（2）前記ポジティブコントロールに比べて、 $^{86}\text{Rb}^+$ の細胞外への放出量が減少すれば、前記試験物質は、LTPC2タンパク質の活性化を阻害する物質であると判定することができる。本発明による、 $\text{Rb}^+$ イオンの放出を利用したスクリーニング方法は、後述の実施例7に記載の条件で実施することが好ましい。

前記（d）の細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 検出色素を利用して、細胞死抑制剤として有用な、LTPC2タンパク質の活性化を阻害する物質をスクリーニングする場合には、細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 検出色素として、例えば、Fluo3-AMなどを用いることができる。細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 検出色素は、LTPC2タンパク質の開口に伴う細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度の変化を光学的に検出することが可能である（工藤佳久編、実験医学別冊「細胞内カルシウム実験プロトコール」、1996年、羊土社）。これらの色素を用いることによってLTPC2タンパク質の活性を測定することができ、LTPC2タンパク質活性化時の試験物質存在下と不在下とで変化量を比較することにより、LTPC2タンパク質の活性化を阻害する化合物をスクリーニングすることが可能である。細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 検出色素を利用する本発明のスクリーニング方法は、特に限定されるものではないが、例えば、スクリーニング用細胞に細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 検出色素を取り込ませた後、LTPC2タンパク質を活性化させることのできる条件下で、前記スクリーニング用細胞と試験物質とを接触させる工程、及び前記スクリーニング用細胞における細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 検出色素の量変化を光学的に分析する工程を含む。

より具体的には、LTPC2タンパク質活性化剤の存在下において、試験物質を添加した場合に、試験物質不在下の場合と比較して、細胞内に流入する $\text{Ca}^{2+}$ 量が減少するか、あるいは、なくなれば、前記試験物質は、LTPC2タンパク質の活性化を阻害する物質であると判定することができる。

本発明のスクリーニング方法によって選択対象とする試験物質としては、特に限定されるものではないが、例えば、ケミカルファイルに登録されている種々の公知化合物（ペプチドを含む）、コンビナトリアル・ケミストリー技術（Terrett, N. K.ら, Tetrahedron, 51, 8135-8137, 1995）によって得られた化合物群、あるいは、ファージ・ディスプレイ法（Felicci, F.ら, J. Mol. Biol., 222, 301-310, 1991）などを応用して作成されたランダム・ペプチド群を用いることができる。また、微生物、植物、海洋生物、又は動物由来の天然成分（例えば、培養上清又は組織抽出物）などもスクリーニングの試験物質として用いることができる。更には、本発明のスクリーニング方法により選択された化合物（ペプチドを含む）を、化学的又は生物学的に修飾した化合物（ペプチドを含む）を用いることができる。

#### [5] 細胞死抑制用医薬組成物の製造方法

本発明には、本発明のスクリーニング方法を用いてスクリーニングする工程、及び前記スクリーニングにより得られた物質を用いて製剤化する工程を含むことを特徴とする、細胞死抑制用医薬組成物の製造方法が包含される。

本発明のスクリーニング方法により得られる物質を有効成分とする製剤は、前記有効成分のタイプに応じて、それらの製剤化に通常用いられる担体、賦形剤、及び/又はその他の添加剤を用いて調製することができる。

投与としては、例えば、錠剤、丸剤、カプセル剤、顆粒剤、細粒剤、散剤、又は経口用液剤などによる経口投与、あるいは、静注、筋注、若しくは関節注などの注射剤、坐剤、経皮投与剤、又は経粘膜投与剤などによる非経口投与を挙げることができる。特に胃で消化されるペプチドにあっては、静注等の非経口投与が好ましい。

経口投与のための固体組成物においては、1又はそれ以上の活性物質と、少なくとも一つの不活性な希釈剤、例えば、乳糖、マンニトール、ブドウ糖、微結晶セルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、デンプン、ポリビニルピロリドン、又はメタケイ酸アルミン酸マグネシウムなどと混合することができる。前記組成物は、常法に従って、不活性な希釈剤以外の添加剤、例えば、滑沢剤、崩壊剤、安定化剤、又は溶解若しくは溶解補助剤などを含有することができる。錠剤又は丸剤は、必要により糖衣又は胃溶性若しくは腸溶性物質などのフィルムで被覆することができる。

10

経口のための液体組成物は、例えば、乳濁剤、溶液剤、懸濁剤、シロップ剤、又はエリキシル剤を含むことができ、一般的に用いられる不活性な希釈剤、例えば、精製水又はエタノールを含むことができる。前記組成物は、不活性な希釈剤以外の添加剤、例えば、湿潤剤、懸濁剤、甘味剤、芳香剤、又は防腐剤を含有することができる。

非経口のための注射剤としては、無菌の水溶性若しくは非水溶性の溶液剤、懸濁剤、又は乳濁剤を含むことができる。水溶性の溶液剤又は懸濁剤には、希釈剤として、例えば、注射用蒸留水又は生理用食塩水などを含むことができる。非水溶性の溶液剤又は懸濁剤の希釈剤としては、例えば、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、植物油（例えば、オリーブ油）、アルコール類（例えば、エタノール）、又はポリソルベート80等を含むことができる。前記組成物は、更に湿潤剤、乳化剤、分散剤、安定化剤、溶解若しくは溶解補助剤、又は防腐剤などを含むことができる。前記組成物は、例えば、バクテリア保留フィルターを通す濾過、殺菌剤の配合、又は照射によって無菌化することができる。また、無菌の固体組成物を製造し、使用の際に、無菌水又はその他の無菌用注射用媒体に溶解し、使用することもできる。

20

投与量は、有効成分、すなわち、LTRPC2タンパク質の活性化を阻害する物質、あるいは、本発明のスクリーニング方法により得られる物質の活性の強さ、症状、投与対象の年齢、又は性別等を考慮して、適宜決定することができる。

30

例えば、経口投与の場合、その投与量は、通常、成人（体重60kgとして）において、1日につき約0.1~100mg、好ましくは0.1~50mgである。非経口投与の場合、注射剤の形では、1日につき0.01~50mg、好ましくは0.01~10mgである。

#### 実施例

以下、実施例によって本発明を具体的に説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。なお、特に断らない限り、遺伝子工学的操作及びチャネル活性分析操作については、公知の方法（Maniatis, T.ら, "Molecular Cloning - A Laboratory Manual", 1982, Cold Spring Harbor Laboratory, NY; Hille, B., "Ionic Channels of Excitable Membranes", 2nd Ed., 1992, Sinauer Associates Inc., MA）に従って実施可能である。

40

本実施例のクローニングにおいては、逆転写反作用キットはインビトロジェン社のSUPERSCRIPT First-Strand Synthesis System for RT-PCRを、クローニングキットはインビトロジェン社のTOPO XL PCR Cloning Kitを用いた。

#### 【実施例1】

《ヒトLTRPC2タンパク質をコードする遺伝子の単離及び発現ベクターの構築》

50

配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるヒトLTRPC2タンパク質(以下の各実施例において、単に「ヒトLTRPC2タンパク質」と称する)をコードする全長cDNAは、ヒト白血球由来のmRNAを鋳型とする逆転写-ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)により取得した。まず、ヒト白血球mRNA(10ng)を、逆転写反作用キットを用いて逆転写させ、第一鎖cDNAを合成した。この第一鎖cDNAを鋳型とし、Taq DNAポリメラーゼ(LA Taq DNA polymerase; 宝酒造)を用いて、ホットスタート法によるPCRを行なった。前記PCRは、センスプライマーとして配列番号5で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドを、そして、アンチセンスプライマーとして配列番号6で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドを用いて実施し、最初に98(1分間)で熱変性を行なった後、98(15秒間)/65(30秒間)/72(6分間)からなるサイクルを35回繰り返した。その結果、約4.7kbのDNA断片が増幅された。

このDNA断片を、クローニングキットを用いて、pCR-TOPOベクターにクローニングを行なった。得られたプラスミドDNAを制限酵素EcoRIで消化して、LTRPC2-cDNAのみを単離した後、pcDNA3.1(+ )プラスミド(インビトロジェン社)を用いてクローニングした。pcDNA3.1(+ )プラスミドは、サイトメガロウイルス由来のプロモーター配列を持っており、動物細胞でLTRPC2タンパク質を発現させるために使用することができる。得られたクローンpcDNA3.1-LTRPC2の塩基配列を、ジデオキシターミネーター(dideoxy terminator)法により、DNAシーケンサー(ABI3700 DNA Sequencer; アプライドバイオシステムズ社)を用いて解析したところ、配列番号1で表される配列が得られた。

#### 【実施例2】

##### 《ヒトLTRPC2遺伝子の発現分布》

ヒト組織及びヒト血液におけるヒトLTRPC2遺伝子の発現分布をRT-PCR法により解析した。ヒト組織については、ヒトの各組織由来のmRNA(クロンテック社)5ngをDNアーゼ処理を行なった後、逆転写反作用キット(Advantage RT-for-PCR Kit; クロンテック社)を用いて逆転写させ、第一鎖cDNAを得た。この第一鎖cDNAを鋳型として、Taq DNAポリメラーゼ(LA Taq DNA polymerase; 宝酒造社)を用いて、ホットスタート法によるPCRを行なった。

ヒト血液は、1名の匿名社内ボランティア(健常人)より、血液凝固を防ぐためにヘパリン・ナトリウムを添加したシリンジを用いて、100ml採取した。その血液をFicoll-Paque試薬(アマシャムファルマシア社)を用いて、好酸球、好中球、リンパ球、血小板に分画した後、それぞれからISOGEN試薬(ニッポンジーン社)を用いて、総RNAを抽出した。なお、実際の操作は、Ficoll-Paque試薬、及びISOGEN試薬に添付のプロトコールに従って行った。それぞれの総RNA20ngをDNアーゼ処理を行なった後、逆転写反作用キットを用いて逆転写させ、第一鎖cDNAを得た。この第一鎖cDNAを鋳型として、Taq DNAポリメラーゼ(LA Taq DNA polymerase; 宝酒造)を用いて、ホットスタート法によるPCRを行なった。

前記PCRは、センスプライマーとして配列番号7で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドを、そして、アンチセンスプライマーとして配列番号8で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドを用いて実施し、最初に98(1分間)で熱変性を行なった後、98(15秒間)/70(1分間)からなるサイクルを30回繰り返した。それぞれのプライマーは、配列番号1で表される塩基配列における第22番目~第4533番目の塩基からなる配列からなるヒトLTRPC2遺伝子に特異的な配列である。

ヒトの各組織(扁桃核、尾状核、海馬、脳梁、黒質、視床、小脳、前頭葉、視床下部、脊髄、下垂体、全脳、心臓、胎盤、肺、気管、肝臓、骨格筋、腎臓、小腸、胃、脾臓、骨髄、胸腺、甲状腺、唾液腺、副腎、乳腺、及び前立腺)についてRT-PCR解析を行なっ

10

20

30

40

50

たところ、約660bpのDNA断片が、脳、脊髄、心臓、胎盤、肺、気管、小腸、胃、脾臓、骨髄、胸腺、及び白血球にて増幅された。このことから、ヒトLTRPC2のmRNAが、PARP活性化に伴う細胞死が原因となる疾患が報告されている組織で発現していることが明らかになった。

また、ヒト血液についてのRT-PCR解析を行ったところ、約660bpのDNA断片が主にリンパ球にて増幅された。このことから、ヒトLTRPC2は、ヒト血液において主にリンパ球にて発現していることが明らかになった。リンパ球は免疫機能を担っていることが明らかになっていることから、LTRPC2遺伝子が免疫機能において重要な役割を担っている事が示唆された。

### 【実施例3】

#### 《ラットLTRPC2タンパク質をコードする遺伝子の単離》

配列番号4で表されるアミノ酸配列からなるラットLTRPC2タンパク質（以下の各実施例において、単に「ラットLTRPC2タンパク質」と称する）をコードする全長cDNAは、ラット脳由来のmRNA（クロンテック社）10ngを鋳型とするRT-PCRにより実施例1と同様の手法で取得した。PCRは、センスプライマーとして配列番号9で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドを、そして、アンチセンスプライマーとして配列番号10で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドを用いて実施し、最初に98（1分間）で熱変性を行なった後、98（15秒間）/60（30秒間）/72（5分間）からなるサイクルを35回繰り返した。その結果、約4.7kbpのDNA断片が増幅された。このDNA断片を、PCR-TOPOベクターにクローニングして得られたクローンPCR-TOPO-ratLTRPC2の塩基配列を解析したところ、配列番号3で表される配列が得られた。配列番号3で表される塩基配列は、4527塩基対からなるオープンリーディングフレーム（配列番号3で表される塩基配列における第84番～第4610番の塩基からなる配列）を有する。前記オープンリーディングフレームから予測されるアミノ酸配列は、1508アミノ酸残基からなる配列番号4で表されるアミノ酸配列であった。

配列番号4で表されるアミノ酸配列は、配列番号2で表されるアミノ酸配列（ヒトLTRPC2タンパク質）と84%のホモロジーを有する。なお、前記ホモロジーの数値は、前記BLAST検索により得られた値である。

### 【実施例4】

#### 《ラットLTRPC2遺伝子の発現分布》

ラット組織におけるラットLTRPC2遺伝子の発現分布をRT-PCR法により解析した。ラットの各組織由来のmRNA（クロンテック社）5ngをDNアーゼ処理を行なった後、逆転写反応キットを用いて逆転写させ、第一鎖cDNAを得た。この第一鎖cDNAを鋳型として、Taq DNAポリメラーゼ（Platinum Taq DNA polymerase；インビトロジェン社）を用いて、ホットスタート法によるPCRを行なった。前記PCRは、センスプライマーとして配列番号11で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドを、そして、アンチセンスプライマーとして配列番号12で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドを用いて実施し、最初に95（1分間）で熱変性を行なった後、95（15秒間）/62（30秒間）/72（1分間）からなるサイクルを35回繰り返した。それぞれのプライマーは、配列番号3で表される塩基配列における第84番目～第4610番目の塩基からなる配列からなるラットLTRPC2遺伝子に特異的な配列である。

ラットの各組織（脳、心臓、腎臓、肝臓、肺、膵臓、網膜、骨格筋、脾臓、及び精巣）についてRT-PCR解析を行なったところ、約380bpのDNA断片が全ての組織にて増幅され、ラットLTRPC2のmRNAは、前記の各組織で発現していることが明らかになった。また、この結果から、PARP活性化に伴う細胞死が原因となる疾患が報告されている組織で、ラットLTRPC2のmRNAが発現していることが明らかになった。

### 【実施例5】

#### 《ヒトLTRPC2タンパク質の動物細胞での発現》

10

20

30

40

50

ヒトLTRPC2タンパク質のチャネル活性を検出するために、動物細胞に前記タンパク質の発現を誘導した。実施例1で得られた発現ベクターpcDNA3.1-LTRPC2と、形質転換用試薬(LIPOFECTAMINE2000;インビトロジェン社)を用いて、チャイニーズ・ハムスター卵巣由来のCHO dhfr<sup>-</sup>細胞の形質転換を行ない、ヒトLTRPC2タンパク質の発現を誘導した。なお、前記操作は、前記形質転換用試薬に添付のプロトコール、及び公知の方法(文献1)に従って実施した。

#### 【実施例6】

##### 《PARP活性化剤によるヒトLTRPC2タンパク質の活性化検出》

以下で具体的に記載した操作以外は、公知の方法(文献1、文献2)に従って実施した。実施例5で得られた形質転換細胞( $1.6 \times 10^5$ 細胞)を、 $^{86}\text{RbCl}$  ( $1 \mu\text{Ci}/\text{mL}$ )存在下、37℃で24時間インキュベートすることにより、 $^{86}\text{Rb}^+$ を細胞内に取り込ませた後、生理食塩水で洗浄して、細胞に取り込まれなかった $^{86}\text{Rb}^+$ を取り除いた。得られた細胞を、PARP活性化剤であるMNNG(最終濃度 =  $1 \text{mmol}/\text{L}$ )又は $\text{H}_2\text{O}_2$ (最終濃度 =  $0.06\%$ )を添加した生理食塩水中にて、室温で30分間インキュベートした。なお、コントロールとして、通常の生理食塩水(すなわち、MNNG又は $\text{H}_2\text{O}_2$ のいずれも添加しない生理食塩水)中にて、同様の操作を実施した。各細胞を生理食塩水で洗浄した後、細胞に残った $^{86}\text{Rb}^+$ の放射活性を測定した。その結果、 $^{86}\text{Rb}^+$ の残存活性は、コントロールの細胞(MNNG又は $\text{H}_2\text{O}_2$ を添加していない細胞)と比較して、MNNGを添加した細胞では35.6%に、 $\text{H}_2\text{O}_2$ を添加した細胞では8.9%に、それぞれ減少していた。これは、MNNG又は $\text{H}_2\text{O}_2$ によりヒトLTRPC2タンパク質が活性化し、細胞内の $^{86}\text{Rb}^+$ が細胞外へ排出されたことを示している。この結果から、ヒトLTRPC2タンパク質は、PARP活性化剤であるMNNG又は $\text{H}_2\text{O}_2$ で活性化することが明らかになった。

#### 【実施例7】

##### 《PARP活性阻害剤によるヒトLTRPC2タンパク質の活性化阻害》

以下で具体的に記載した操作以外は、公知の方法(文献1、文献2)に従って実施した。実施例5で得られた形質転換細胞( $1.6 \times 10^5$ 細胞)を、 $^{86}\text{RbCl}$  ( $1 \mu\text{Ci}/\text{mL}$ )存在下、37℃で24時間インキュベートすることにより、 $^{86}\text{Rb}^+$ を細胞内に取り込ませた後、生理食塩水で洗浄して、細胞に取り込まれなかった $^{86}\text{Rb}^+$ を取り除いた。得られた細胞に対して、MNNG(最終濃度 =  $1 \text{mmol}/\text{L}$ )又は $\text{H}_2\text{O}_2$ (最終濃度 =  $0.06\%$ )存在下で、PARP活性化阻害剤であるDPQ(最終濃度 =  $100 \mu\text{mol}/\text{L}$ )、3-アミノベンズアミド(最終濃度 =  $1 \text{mmol}/\text{L}$ )、又はニコチンアミド(最終濃度 =  $1 \text{mmol}/\text{L}$ )をそれぞれ添加した生理食塩水中にて、室温で30分間インキュベートした。なお、コントロールとして、MNNG及び $\text{H}_2\text{O}_2$ 不在下で、生理食塩水(すなわち、DPQ、3-アミノベンズアミド、又はニコチンアミドのいずれも添加しない生理食塩水)中にて、同様の操作を実施した。各細胞を生理食塩水で洗浄した後、細胞に残った $^{86}\text{Rb}^+$ の放射活性を測定した。その結果、PARP活性化阻害剤を添加した各細胞における $^{86}\text{Rb}^+$ の残存活性は、コントロールの細胞(MNNG又は $\text{H}_2\text{O}_2$ を添加していない細胞)、すなわち、ヒトLTRPC2タンパク質の活性を誘導していない細胞と同等であった。より具体的には、DPQを添加した細胞では、コントロール細胞に対して、93.4%( $\text{H}_2\text{O}_2$ 存在下の場合)又は95.5%(MNNG存在下の場合)の $^{86}\text{Rb}^+$ 残存活性を示した。同様に、3-アミノベンズアミドを添加した細胞では、91.9%( $\text{H}_2\text{O}_2$ 存在下の場合)又は96.2%(MNNG存在下の場合)の $^{86}\text{Rb}^+$ 残存活性を示し、ニコチンアミドを添加した細胞では、57.8%( $\text{H}_2\text{O}_2$ 存在下の場合)又は95.9%(MNNG存在下の場合)の $^{86}\text{Rb}^+$ 残存活性を示した。

これは、DPQ、3-アミノベンズアミド、又はニコチンアミドによってヒトLTRPC2タンパク質の活性化が阻害され、細胞内の $^{86}\text{Rb}^+$ が細胞外へ排出されなかったか、あるいは、排出が減少したことを示している。この結果から、MNNG又は $\text{H}_2\text{O}_2$ によるヒトLTRPC2タンパク質の活性化は、PARP活性化阻害剤であるDPQ、3-ア

10

20

30

40

50

ミノベンズアミド、又はニコチンアミドによって阻害されることが明らかになった。

#### 【実施例 8】

《PARP 活性化阻害剤によるヒト LTRPC 2 タンパク質の活性化阻害と PARP 活性化阻害との比較》

実施例 7 で示した PARP 阻害剤によるヒト LTRPC 2 タンパク質の活性化阻害が PARP を介していることを確認するために、ヒト LTRPC 2 タンパク質の活性化阻害の IC50 値と PARP 活性化阻害の IC50 値を比較、検討した。

前述の PARP 活性化阻害剤である DPQ、3 - アミノベンズアミド、ニコチンアミドの LTRPC 2 の活性化阻害の IC50 値を各濃度の阻害剤を添加することにより実施例 7 の方法で検討した。その結果、DPQ、3 - アミノベンズアミド、ニコチンアミドのヒト LTRPC 2 タンパク質の活性化阻害の IC50 値はそれぞれ、0.20 μM、117 μM、541 μM であった。

PARP 活性化阻害の IC50 値は次の方法で検討した。実施例 5 で得られた形質転換細胞を、PARP 活性化剤である MNNG (最終濃度 = 1 mmol/L) 又は H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (最終濃度 = 0.06%)、及び前述で用いた各濃度の PARP 阻害剤をそれぞれ添加した生理食塩水中にて、室温で 30 分間インキュベートした。なお、コントロールとして、通常の生理食塩水 (すなわち、MNNG 又は H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> のいずれも添加しない生理食塩水) 中に、同様の操作を実施した。その後、活性剤、及び阻害剤を添加した生理食塩水を除いた細胞に <sup>3</sup>H - NAD を最終濃度 0.2 nCi/μL になるように加え、37 度で 40 分間インキュベートした。その後、この細胞に TCA を最終濃度 10% になるように加えて 4 度で 30 分間インキュベートすることで反応を停止させた。その後、細胞を 5% TCA で 2 回洗浄することで、取り込まれなかった <sup>3</sup>H - NAD を除いた。洗浄した細胞を、2% SDS、0.1 M - NaOH を含む溶液で溶解した後、細胞に含まれる <sup>3</sup>H の放射活性を測定した。その結果、DPQ、3 - アミノベンズアミド、ニコチンアミドの PARP 活性化阻害の IC50 値は、それぞれ 0.26 μM、71.7 μM、335 μM であった。それぞれの IC50 値は、LTRPC 2 活性化阻害、及び PARP 活性化阻害で近似していることから、LTRPC 2 活性化阻害は PARP 活性化阻害によるものであることが確認された。

#### 【実施例 9】

《ヒト LTRPC 2 タンパク質の動物細胞での発現》

ヒト LTRPC 2 タンパク質の細胞での機能を明らかにするために、動物細胞に前記タンパク質の発現を誘導した。実施例 1 で得られた発現ベクター pcDNA3.1-LTRPC2 と、形質転換用試薬 (LIPOFECTAMINE 2000; インビトロジェン社) とを用いて、ヒト胎児腎臓由来の HEK293 細胞の形質転換を行ない、ヒト LTRPC 2 タンパク質の発現を誘導した。なお、前記操作は、前記形質転換用試薬に添付のプロトコール、及び公知の方法 (文献 1) に従って、実施した。

#### 【実施例 10】

《ヒト LTRPC 2 タンパク質による細胞死誘導》

実施例 8 で得られた形質転換細胞を 96 穴プレート (旭テクノグラス社) に 4 × 10<sup>4</sup> 細胞/ウェルになるように蒔き一晚培養した後、最終濃度 0.001% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を含む細胞培地で室温、2 時間インキュベートした。生理食塩水で洗浄した後、細胞培地を添加し 4 時間培養した。培地を除いた後、細胞の生死を判定するためにアラマブルーアッセイ (AlaMaBlue Assay; バイオサイエンス社) を行った。本操作は、細胞における酸化還元反応によって蛍光を発する試薬を加え、その結果生じる蛍光強度を測定することによって、細胞の生死を判断することができる。なお、実験操作は、前記アラマブルーアッセイ用試薬に添付のプロトコールに従って実施した。刺激を加えた細胞にアラマブルーアッセイ用試薬を加え、さらに 1 時間インキュベーションした後、蛍光強度を測定した。なお、コントロールとして、LTRPC 2 を含まない pcDNA3.1 ベクターのみを形質転換した細胞を用いて、同様の操作を実施した。その結果、LTRPC 2 を発現させた細胞はベクターのみを発現させた細胞と比較して、有意に蛍光強度が減少していた (

47.5%の減少)。これは、 $H_2O_2$ 刺激によってLTRPC2を介して細胞死が起き、その結果、生きていた細胞が減少したことを示している。この結果から、ヒトLTRPC2タンパク質は、 $H_2O_2$ 刺激による細胞死を促進することが確認できた。また、前記の結果よりLTRPC2は $H_2O_2$ 刺激によって活性化することが明らかになっているので、本実施例の結果からもLTRPC2タンパク質は細胞死を引き起こす機能を有していることが明らかである。

#### 【実施例11】

##### 《マウスLTRPC2タンパク質をコードする遺伝子の単離》

配列番号14で表されるアミノ酸配列からなるマウスLTRPC2タンパク質（以下の各実施例において、単に「マウスLTRPC2タンパク質」と称する）をコードする全長cDNAは、マウス脳由来のmRNA（クロンテック社）10ngを鋳型とするRT-PCRにより実施例1及び実施例2と同様の手法で取得した。PCRは、センスプライマーとして配列番号15で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドを、そして、アンチセンスプライマーとして配列番号16で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドを用いて実施し、PCRサイクルは実施例2と同様の条件で行った。その結果、約4.7kbのDNA断片が増幅された。このDNA断片をPCR-TOPOベクターにクローニングして得られたクローンPCR-TOPO-mouseLTRPC2の塩基配列を解析したところ、配列番号13で表される配列が得られた。配列番号13で表される塩基配列は、4524塩基対からなるオープンリーディングフレーム（配列番号13で表される塩基配列における第36番～第4559番の塩基からなる配列）を有する。前記オープンリーディングフレームから予測されるアミノ酸配列は、1507アミノ酸残基からなる配列番号14で表されるアミノ酸配列であった。配列番号14で表されるアミノ酸配列は、配列番号2で表されるアミノ酸配列（ヒトLTRPC2タンパク質）、及び配列番号4で表されるアミノ酸配列（ラットLTRPC2タンパク質）とそれぞれ84%、94%のホモロジーを有する。なお、前記ホモロジーの数値は、前記BLAST検索により得られた値である。

#### 【実施例12】

##### 《マウスLTRPC2遺伝子の慢性関節リウマチモデル動物における発現解析》

慢性関節リウマチにおけるLTRPC2遺伝子の発現解析を行うために、慢性関節リウマチのモデルであるマウスコラーゲン誘発関節炎モデルを作製し、このマウスでのマウスLTRPC2遺伝子の発現変動を解析した。

マウスコラーゲン誘発関節炎モデルの作製は以下の方法で行った。マウス関節部分に150 $\mu$ gのタイプ2コラーゲンを注射し3週間飼育した後、再度同量のコラーゲンの注射を行った。その後、5週間飼育を行った後、解剖して関節部分を取り出した。この時、取り出したマウス関節は慢性関節リウマチ患者と同様の損傷（軟骨、骨破壊）がおきていることを確認した。このマウス関節を凍結粉碎後、ISOGEN試薬（ニッポンジーン社）を用いて、mRNAを抽出した。なお、コントロールとして、処理を行っていない正常マウスの関節からも同様にmRNAを抽出した。

得られたマウスコラーゲン誘発関節炎モデルの関節におけるマウスLTRPC2遺伝子の発現変動を解析するために、PRISM7900（アプライドバイオシステムズ社）を用いたリアルタイムPCRを行った。リアルタイムPCRを行うことで、mRNA中に含まれるマウスLTRPC2遺伝子を定量化して測定することができる。

得られたmRNAをDNアーゼ処理を行なった後、逆転写反作用キットを用いて逆転写させ、第一鎖cDNAを得た。この第一鎖cDNAを鋳型として、蛍光試薬SYBR Green PCR Core Reagents Kit（アプライドバイオシステムズ社）を用いて、PCRを行なった。前記PCRは、センスプライマーとして配列番号17で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドを、そして、アンチセンスプライマーとして配列番号18で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドを用いて実施し、最初に95（10分間）で熱変性を行なった後、95（15秒間）/59（1分間）からなるサイクルを45回繰り返した。それぞれのプライマーは、配列番号13で表される塩

基配列における第3763番目～第3780番目、及び第3813番目～第3830番目の塩基配列からなるマウスLTRPC2遺伝子に特異的な配列である。

その結果、マウスLTRPC2遺伝子はコラーゲン誘発関節炎モデルマウスにおいて、処理を行っていない正常マウスと比較して、発現量が約15倍増加していた。このことから、マウスLTRPC2遺伝子は、慢性関節リウマチにおいて重要な働きを担っていることが明らかになった。

#### 【実施例13】

##### 《マウスLTRPC2遺伝子の発現分布》

マウス組織におけるマウスLTRPC2遺伝子の発現分布を、実施例12と同様の方法で、PRISM7900(アプライドバイオシステムズ)を用いたリアルタイムPCRにより解析した。マウスの各組織(脳、心臓、腎臓、肝臓、肺、膵臓、骨格筋、平滑筋、脾臓、及び精巣)由来のmRNA(クロンテック社)5ngをDNアーゼ処理を行なった後、逆転写反作用キットを用いて逆転写させ、第一鎖cDNAを得た。この第一鎖cDNAを鋳型として、PCRを行なった。その結果、脳、脾臓を中心に全ての組織にて増幅が検出された。このことから、マウスLTRPC2のmRNAは、前記の各組織で発現していることが明らかになった。また、この結果から、PARP活性化に伴う細胞死が原因となる疾患が報告されている組織で、マウスLTRPC2のmRNAが発現していることが明らかになった。

#### 【実施例14】

##### 《PARP-1ドミナントネガティブ変異体をコードする遺伝子の単離及び発現ベクターの構築》

ヒトPARP-1全長アミノ酸配列(Genebankアクセッション番号:XP\_037273)の第1番目～第374番目はDNA結合部位であり、このDNA結合部分のみを野生型PARP-1と共発現すると、DNAへの結合を競合することが知られている。その結果、野生型PARP-1のDNAへの結合の割合が減少することで、活性化したPARP-1のDNAへのポリADPリボース化の阻害、および細胞死の誘導が阻害されることが知られている(ドミナントネガティブ効果)。従って、PARP-1のDNA結合部位のみは、PARP-1に対してドミナントネガティブ効果を示すドミナントネガティブ変異体タンパク質として機能することが明らかになっている。(Kupper, J. H., de Murcia, G. 及びBurkle, A., J. Biol. Chem., 265, 18721-18724, 1990)。

上記部位、すなわち、配列番号20で表されるアミノ酸配列からなるヒトPARP-1ドミナントネガティブ変異体タンパク質(以下の各実施例において、単に「PARP-1ドミナントネガティブ変異体」と称する)をコードする全長cDNAは、ヒト脾臓由来のmRNAを鋳型とするRT-PCRにより取得した。まず、ヒト脾臓mRNA(10ng)を、逆転写反作用キットを用いて逆転写させ、第一鎖cDNAを合成した。この第一鎖cDNAを鋳型とし、Taq DNAポリメラーゼ(LA Taq DNA polymerase; 宝酒造)を用いて、ホットスタート法によるPCRを行なった。前記PCRは、センスプライマーとして配列番号21で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドを、そして、アンチセンスプライマーとして配列番号22で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドを用いて実施し、最初に98(1分間)で熱変性を行なった後、98(15秒間)/65(30秒間)/72(6分間)からなるサイクルを35回繰り返した。その結果、約1.2kbpのDNA断片が増幅された。このDNA断片を、クローニングキットを用いて、pCR-TOPOベクターにクローニングを行なった。得られたプラスミドDNAを制限酵素EcoRIで消化して、インサート(PARP-1ドミナントネガティブ変異体をコードするcDNA)のみを単離した後、pcDNA3.1(+ )プラスミド(インビトロジェン社)を用いてクローニングした。得られたクローンpcDNA3.1-PARPtの塩基配列を、ジデオキシターミネーター法により、DNAシーケンサー(ABI3700 DNA Sequencer; アプライドバイオシステムズ社)を用いて解析したところ、配列番号19で表される配列が得られた。配列番号1

10

20

30

40

50

9で表される塩基配列は、PARP-1ドミナントネガティブ変異体をコードしていた。

【実施例15】

《PARP-1ドミナントネガティブ変異体によるヒトLTRPC2タンパク質の活性化阻害》

ヒトLTRPC2タンパク質のチャネル活性へのPARP-1ドミナントネガティブ変異体の影響を検討するために、動物細胞に前記タンパク質の発現を誘導した。実施例1、及び実施例14で得られた発現ベクターpcDNA3.1-LTRPC2及びpcDNA3.1-PARPtと、形質転換用試薬(LIPOFECTAMINE2000;インビトロジェン社)とを用いて、チャイニーズ・ハムスター卵巣由来のCHO dhfr<sup>-</sup>細胞の形質転換を行ない、ヒトLTRPC2タンパク質及びPARP-1ドミナントネガティブ変異体の発現を誘導した。なお、前記操作は、前記形質転換用試薬に添付のプロトコール、及び公知の方法(文献1)に従って、実施した。

得られた形質転換細胞( $1.6 \times 10^5$ 細胞)におけるLTRPC2活性化を、Rb<sup>+</sup>イオンの放出を測定する方法を利用して測定した。方法は実施例6と同様に行った。ただし、PARP活性化剤としてはH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(最終濃度=0.06%)を用い、コントロールとして、実施例5で得られたLTRPC2タンパク質のみを発現させた細胞を用いた。

測定の結果、PARP-1ドミナントネガティブ変異体を発現させた細胞における<sup>86</sup>Rb<sup>+</sup>の残存活性は、コントロールの細胞(PARP-1ドミナントネガティブ変異体を発現させていない細胞)と比較して有意に上昇していた。

これは、PARP-1ドミナントネガティブ変異体によってPARP活性が阻害されて、その結果、ヒトLTRPC2タンパク質の活性化が阻害され、細胞内の<sup>86</sup>Rb<sup>+</sup>の細胞外への排出が減少したことを示している。

また、この時のPARPの活性化を実施例8の手法を用いて検討した。ただし、PARP活性化剤としてはH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(最終濃度=0.06%)を用い、コントロールとして、実施例5で得られたLTRPC2タンパク質のみを発現させた細胞を用いた。測定の結果、PARP-1ドミナントネガティブ変異体を発現させた細胞における<sup>3</sup>Hの放射活性は、コントロールの細胞と比較して、67%に減少していた。

これらの結果から、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>によるヒトLTRPC2タンパク質の活性化は、PARP-1ドミナントネガティブ変異体によって阻害されることが明らかになった。PARP阻害化合物を用いた結果(実施例7)に加え、PARP-1ドミナントネガティブ変異体を用いた結果(本実施例)からも、PARP活性が減少することによりLTRPC2活性化が阻害され、LTRPC2はPARPによって活性が制御されていることが確認された。

【実施例16】

《ヒトLTRPC2タンパク質活性阻害剤のスクリーニング》

ヒトLTRPC2タンパク質のイオンチャネル活性を阻害する化合物のスクリーニングを行なった。

実施例5で得られた形質転換細胞を( $1.6 \times 10^5$ 細胞)を、<sup>86</sup>RbCl( $1 \mu\text{Ci}/\text{mL}$ )存在下、37℃で24時間インキュベートすることにより、<sup>86</sup>Rb<sup>+</sup>を細胞内に取り込ませた後、生理食塩水で洗浄して、細胞に取り込まれなかった<sup>86</sup>Rb<sup>+</sup>を取り除いた。得られた細胞に対して、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(最終濃度=0.06%)存在下で、さまざまな化合物(最終濃度=10 $\mu\text{mol}/\text{L}$ )をそれぞれ添加した生理食塩水中にて、室温で30分間インキュベートした。なお、コントロールとして、化合物を添加しないH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>存在下で、同様の操作を実施した。

各細胞を生理食塩水で洗浄した後、細胞に残った<sup>86</sup>Rb<sup>+</sup>の放射活性を測定した。得られた放射活性がコントロールの細胞(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>のみを添加した細胞)の放射活性と比較して、有意に高い残存活性を示す化合物がヒトLTRPC2タンパク質のチャネル活性を阻害する化合物である。これは、添加した化合物によってヒトLTRPC2タンパク質の活性化が阻害され、細胞内の<sup>86</sup>Rb<sup>+</sup>が細胞外へ排出されなかったか、あるいは、排出が減少したことを示している。

上記で見出された化合物は、ヒトLTRPC2タンパク質の活性化に伴う<sup>86</sup>Rb<sup>+</sup>の細

胞外への排出を指標にしたものであり、直接のヒトLTPC2タンパク質の阻害活性を検出していない。より具体的には、細胞内に含まれるPARPの阻害活性を示す化合物もヒトLTPC2タンパク質の活性化を阻害し、その結果<sup>86</sup>Rb<sup>+</sup>の細胞外への排出を阻害する。そのため、上記工程で得られた化合物について、更にPARP阻害活性の検討を行なった。

実施例5で得られた形質転換細胞に対して、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>（最終濃度 = 0.06%）存在下で、さまざまな化合物（最終濃度 = 10 μmol/L）をそれぞれ添加した生理食塩水中にて、室温で30分間インキュベートした。なお、コントロールとして、化合物を添加しないH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>存在下で、同様の操作を実施した。その後、反応液を除去した細胞に<sup>3</sup>H-NADを最終濃度0.2 nCi/microLになるように加え、37度で40分間インキュベートとした。その後、この細胞にTCAを最終濃度10%になるように加えて4度で30分間インキュベートすることで反応を停止させた。その後、細胞を5%TCAで2回洗浄することで、取り込まれなかった<sup>3</sup>H-NADを除いた。洗浄した細胞を、2%SDS、0.1%NaOHを含む溶液で溶解した後、細胞に含まれる<sup>3</sup>Hの放射活性を測定した。

10

その結果、コントロールの細胞（H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>のみを添加した細胞）の残存放射活性と同程度の残存活性を示す化合物を選択した。これは、添加した化合物が、PARP活性を阻害していないことを示している。

これらの検討の結果、ヒトLTPC2タンパク質の活性化に伴う<sup>86</sup>Rb<sup>+</sup>の細胞外への排出を阻害し、同時に細胞内のPARP活性を阻害しない化合物を選択した。この化合物はヒトLTPC2タンパク質の活性化を直接阻害していることが考えられる。

20

次に、見出された化合物がヒトLTPC2タンパク質を直接阻害していることを確認するために、電気生理の手法を用いて、ヒトLTPC2タンパク質のイオンチャネル活性への影響を検討した。具体的には、前記実施例5で得られた形質転換細胞を、ホールセル膜電位固定（whole-cell voltage-clamp）法により膜電位固定し、ADP-ribose（最終濃度500 μM）を細胞内へ投与したときに生じる全細胞電流を測定した。細胞外液として、145 mmol/L-NaCl、5 mmol/L-KCl、2 mmol/L-CaCl<sub>2</sub>、2 mmol/L-MgCl<sub>2</sub>、及び10 mmol/L-HEPES-Na（pH = 7.4）を含む溶液を使用し、細胞内液として、150 mmol/L-CsCl、5 mmol/L-MgCl<sub>2</sub>、及び10 mmol/L-HEPES-Cs（pH = 7.2）を含む溶液を用いた。

30

この時、上記工程で見出された化合物をADP-ribose投与と同時に、あるいは前処理時から加え、ADP-riboseによって惹起される全電流変化を測定した。この時、全電流変化がADP-ribose単独を加えた時と比較して、減少、あるいは完全に惹起されなくなる化合物を選択する。これは、添加した化合物が直接ヒトLTPC2タンパク質のチャネル活性を阻害したことを示している。

これらの検討を行なうことで、ヒトLTPC2タンパク質を直接阻害する化合物を見出すことが可能である。

#### 【実施例17】

《ヒトLTPC2タンパク質のすい臓細胞での発現とヒトLTPC2タンパク質による1型糖尿病の細胞死の促進》

40

ヒトLTPC2タンパク質のすい臓での機能、及び1型糖尿病モデルにおける細胞死へのヒトLTPC2タンパク質の関与を検討した。すい臓細胞の1型糖尿病の細胞死は、ストレプトゾトシン刺激による細胞死をモデルとすることができる。さらに、この細胞死の過程には、PARPが関与していることも明らかになっている（Pieper, A. A.ら, Proc. Natl. Acad. Sci., 96, 3059-3064, 1999）。

実施例1で得られた発現ベクターpcDNA3.1-LTPC2と、形質転換用試薬（LIPOFECTAMINE 2000；インビトロジェン社）とを用いて、マウスすい臓ランゲルハンス島ベータ細胞由来のMIN6B細胞の形質転換を行ない、ヒトLTPC

50

2タンパク質の発現を誘導した。なお、前記操作は、前記形質転換用試薬に添付のプロトコール、及び公知の方法（文献1）に従って、実施した。

得られた形質転換細胞を96穴プレート（旭テクノグラス社）に $4 \times 10^4$ 細胞/ウェルになるように蒔き一晚培養した後、最終濃度1mMストレプトゾトシン（シグマ・アルドリッチ社）を含む細胞培地で室温、越夜でインキュベートした。細胞培地を除いた後、細胞の生死を判定するためにMTTアッセイを行った。本操作は、細胞内のミトコンドリアの呼吸酵素系によってMTTがホルマザンに還元されて青色を呈する反応を利用することによって、細胞の生死を判断することができる。刺激を加えた細胞にMTT試薬（和光純薬）を加え2時間培養した後、培養上清を抜き取った細胞にDMSOを加えてホルマザンを溶解した後、吸光度計で吸光度を測定した。なお、コントロールとして、LTRPC2を含まないpcDNA3.1ベクターのみを形質転換した細胞を用いて、同様の操作を実施した。その結果、LTRPC2を発現させた細胞はベクターのみを発現させた細胞と比較して、有意に吸光度が減少していた（93%に減少）。これは、ストレプトゾトシン刺激によってLTRPC2を介して細胞死が起き、その結果、生きている細胞が減少したことを示している。この結果から、ヒトLTRPC2タンパク質は、ストレプトゾトシン刺激による細胞死を促進することが確認できた。さらに、ストレプトゾトシン刺激による細胞死は1型糖尿病のモデルであることから、ヒトLTRPC2は1型糖尿病による細胞死を誘導する機能を有していることが明らかになった。

10

#### 産業上の利用可能性

本発明のスクリーニング方法によれば、PARPの活性化によって引き起こされる細胞死を抑制する物質、特に、PARPの活性化によって引き起こされる細胞死が関与する疾患（例えば、慢性関節リウマチ、脳虚血時の神経細胞死、心筋梗塞再灌流後の心臓の細胞死、1型糖尿病における膵臓ランゲルハンス島ベータ細胞の自己免疫破壊、ショック後の細胞死、あるいは、免疫細胞死による炎症反応）の治療剤及び/又は予防剤として有用な物質をスクリーニングすることができる。本発明のLTRPC2、本発明の細胞を用いて、本発明のスクリーニング系を構築することができる。

20

以上、本発明を特定の態様に沿って説明したが、当業者に自明の変形や改良は本発明の範囲に含まれる。

#### 【配列表】

## SEQUENCE LISTING

<110> Yamanouchi Pharmaceutical Co., Ltd.

<120> Method for screening agents for suppressing cell death

<130> Y0228-PCT

<150> JP 2001-315339

<151> 2001-10-12

<150> JP 2002-021175

<151> 2002-01-30

<160> 18

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 4738

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (22)..(4533)

<400> 1

```

agctggcgtg ggggtotcag a atg gag ccc tca gcc ctg agg aaa gct ggc 51
                Met Glu Pro Ser Ala Leu Arg Lys Ala Gly
                    1             5             10

tgc gag cag gag gag ggc ttt gag ggg ctg ccc aga agg gtc act gac 99
Ser Glu Gln Glu Glu Gly Phe Glu Gly Leu Pro Arg Arg Val Thr Asp
                15             20             25

ctg ggg atg gtc tcc aat ctc cgg cgc agc aac agc agc ctc ttc aag 147

```

Leu Gly Met Val Ser Asn Leu Arg Arg Ser Asn Ser Ser Leu Phe Lys  
                   30                                  35                                  40

agc tgg agg cta cag tgc ccc ttc ggc aac aat gac aag caa gaa agc 195  
 Ser Trp Arg Leu Gln Cys Pro Phe Gly Asn Asn Asp Lys Gln Glu Ser  
           45                                  50                                  55

ctc agt tog tgg att cct gaa aac atc aag aag aaa gaa tgc gtg tat 243  
 Leu Ser Ser Trp Ile Pro Glu Asn Ile Lys Lys Lys Glu Cys Val Tyr  
           60                                  65                                  70

ttt gtg gaa agt tcc aaa ctg tct gat gct ggg aag gtg gtg tgt cag 291  
 Phe Val Glu Ser Ser Lys Leu Ser Asp Ala Gly Lys Val Val Cys Gln  
           75                                  80                                  85                                  90

tgt ggc tac acg cat gag cag cac ttg gag gag gct acc aag ccc cac 339  
 Cys Gly Tyr Thr His Glu Gln His Leu Glu Glu Ala Thr Lys Pro His  
                                   95                                  100                                  105

acc ttc cag ggc aca cag tgg gac cca aag aaa cat gtc cag gag atg 387  
 Thr Phe Gln Gly Thr Gln Trp Asp Pro Lys Lys His Val Gln Glu Met  
                                   110                                  115                                  120

cca acc gat gcc ttt ggc gac atc gtc ttc acg ggc ctg agc cag aag 435  
 Pro Thr Asp Ala Phe Gly Asp Ile Val Phe Thr Gly Leu Ser Gln Lys  
                                   125                                  130                                  135

gtg aaa aag tac gtc cga gtc tcc cag gac acg ccc tcc agc gtg atc 483  
 Val Lys Lys Tyr Val Arg Val Ser Gln Asp Thr Pro Ser Ser Val Ile  
           140                                  145                                  150

tac cac ctc atg acc cag cac tgg ggg ctg gac gtc ccc aat ctc ttg 531  
 Tyr His Leu Met Thr Gln His Trp Gly Leu Asp Val Pro Asn Leu Leu  
           155                                  160                                  165                                  170

atc tog gtg acc ggg ggg gcc aag aac ttc aac atg aag ccc cgg ctg 579

Ile Ser Val Thr Gly Gly Ala Lys Asn Phe Asn Met Lys Pro Arg Leu	
175	180
aag agc att ttc cgc aga ggc ctg gtc aag gtg gct cag acc aca ggg	627
Lys Ser Ile Phe Arg Arg Gly Leu Val Lys Val Ala Gln Thr Thr Gly	
190	195
200	
gcc tgg atc atc aca ggg ggg tcc cac acc ggc gtc atg aag cag gta	675
Ala Trp Ile Ile Thr Gly Gly Ser His Thr Gly Val Met Lys Gln Val	
205	210
215	
ggc gag gcg gtg cgg gac ttc agc ctg agc agc agc tac aag gaa ggc	723
Gly Glu Ala Val Arg Asp Phe Ser Leu Ser Ser Ser Tyr Lys Glu Gly	
220	225
230	
gag ctc atc acc atc gga gtc gcc acc tgg ggc act gtc cac cgc cgc	771
Glu Leu Ile Thr Ile Gly Val Ala Thr Trp Gly Thr Val His Arg Arg	
235	240
245	250
gag ggc ctg atc cat ccc acg ggc agc ttc ccc gcc gag tac ata ctg	819
Glu Gly Leu Ile His Pro Thr Gly Ser Phe Pro Ala Glu Tyr Ile Leu	
255	260
265	
gat gag gat ggc caa ggg aac ctg acc tgc cta gac agc aac cac tct	867
Asp Glu Asp Gly Gln Gly Asn Leu Thr Cys Leu Asp Ser Asn His Ser	
270	275
280	
cac ttc atc ctc gtg gac gac ggg acc cac ggc cag tac ggg gtg gag	915
His Phe Ile Leu Val Asp Asp Gly Thr His Gly Gln Tyr Gly Val Glu	
285	290
295	
att oct ctg agg acc agg ctg gag aag ttc ata tog gag cag acc aag	963
Ile Pro Leu Arg Thr Arg Leu Glu Lys Phe Ile Ser Glu Gln Thr Lys	
300	305
310	
gaa aga gga ggt gtg gcc atc aag atc ccc atc gtg tgc gtg gtg ctg	1011

Glu Arg Gly Gly Val Ala Ile Lys Ile Pro Ile Val Cys Val Val Leu  
 315 320 325 330

gag ggc ggc ccg ggc acg ttg cac acc atc gac aac gcc acc acc aac 1059  
 Glu Gly Gly Pro Gly Thr Leu His Thr Ile Asp Asn Ala Thr Thr Asn  
 335 340 345

ggc acc ccc tgt gtg gtt gtg gag ggc tcg ggc cgc gtg gcc gac gtc 1107  
 Gly Thr Pro Cys Val Val Val Glu Gly Ser Gly Arg Val Ala Asp Val  
 350 355 360

att gcc cag gtg gcc aac ctg cct gtc tcg gac atc act atc tcc ctg 1155  
 Ile Ala Gln Val Ala Asn Leu Pro Val Ser Asp Ile Thr Ile Ser Leu  
 365 370 375

atc cag cag aaa ctg agc gtg ttc ttc cag gag atg ttt gag acc ttc 1203  
 Ile Gln Gln Lys Leu Ser Val Phe Phe Gln Glu Met Phe Glu Thr Phe  
 380 385 390

acg gaa agc agg att gtc gag tgg acc aaa aag atc caa gat att gtc 1251  
 Thr Glu Ser Arg Ile Val Glu Trp Thr Lys Lys Ile Gln Asp Ile Val  
 395 400 405 410

cgg agg cgg cag ctg ctg act gtc ttc cgg gaa ggc aag gat ggt cag 1299  
 Arg Arg Arg Gln Leu Leu Thr Val Phe Arg Glu Gly Lys Asp Gly Gln  
 415 420 425

cag gac gtg gat gtg gcc atc ttg cag gcc ttg ctg aaa gcc tca cgg 1347  
 Gln Asp Val Asp Val Ala Ile Leu Gln Ala Leu Leu Lys Ala Ser Arg  
 430 435 440

agc caa gac cac ttt ggc cac gag aac tgg gac cac cag ctg aaa ctg 1395  
 Ser Gln Asp His Phe Gly His Glu Asn Trp Asp His Gln Leu Lys Leu  
 445 450 455

gca gtg gca tgg aat cgc gtg gac att gcc cgc agt gag atc ttc atg 1443

Ala Val Ala Trp Asn Arg Val Asp Ile Ala Arg Ser Glu Ile Phe Met  
 460 465 470

gat gag tgg cag tgg aag cct tca gat ctg cac ccc acg atg aca gct 1491  
 Asp Glu Trp Gln Trp Lys Pro Ser Asp Leu His Pro Thr Met Thr Ala  
 475 480 485 490

gca ctc atc tcc aac aag cct gag ttt gtg aag ctc ttc ctg gaa aac 1539  
 Ala Leu Ile Ser Asn Lys Pro Glu Phe Val Lys Leu Phe Leu Glu Asn  
 495 500 505

ggg gtg cag ctg aag gag ttt gtc acc tgg gac acc ttg ctc tac ctg 1587  
 Gly Val Gln Leu Lys Glu Phe Val Thr Trp Asp Thr Leu Leu Tyr Leu  
 510 515 520

tac gag aac ctg gac ccc tcc tgc ctg ttc cac agc aag ctg caa aag 1635  
 Tyr Glu Asn Leu Asp Pro Ser Cys Leu Phe His Ser Lys Leu Gln Lys  
 525 530 535

gtg ctg gtg gag gat ccc gag cgc ccg gct tgc gcg ccc gcg gcg ccc 1683  
 Val Leu Val Glu Asp Pro Glu Arg Pro Ala Cys Ala Pro Ala Ala Pro  
 540 545 550

cgc ctg cag atg cac cac gtg gcc cag gtg ctg cgg gag ctg ctg ggg 1731  
 Arg Leu Gln Met His His Val Ala Gln Val Leu Arg Glu Leu Leu Gly  
 555 560 565 570

gac ttc acg cag ccg ctt tat ccc cgg ccc cgg cac aac gac cgg ctg 1779  
 Asp Phe Thr Gln Pro Leu Tyr Pro Arg Pro Arg His Asn Asp Arg Leu  
 575 580 585

cgg ctc ctg ctg ccc gtt ccc cac gtc aag ctc aac gtg cag gga gtg 1827  
 Arg Leu Leu Leu Pro Val Pro His Val Lys Leu Asn Val Gln Gly Val  
 590 595 600

agc ctc cgg tcc ctc tac aag cgt tcc tca ggc cat gtg acc ttc acc 1875

Ser	Leu	Arg	Ser	Leu	Tyr	Lys	Arg	Ser	Ser	Gly	His	Val	Thr	Phe	Thr		
		605					610					615					
atg	gac	ccc	atc	cgt	gac	ctt	ctc	att	tgg	gcc	att	gtc	cag	aac	cgt		1923
Met	Asp	Pro	Ile	Arg	Asp	Leu	Leu	Ile	Trp	Ala	Ile	Val	Gln	Asn	Arg		
		620				625				630							
cgg	gag	ctg	gca	gga	atc	atc	tgg	gct	cag	agc	cag	gac	tgc	atc	gca		1971
Arg	Glu	Leu	Ala	Gly	Ile	Ile	Trp	Ala	Gln	Ser	Gln	Asp	Cys	Ile	Ala		
635				640					645					650			
gcg	gcc	ttg	gcc	tgc	agc	aag	atc	ctg	aag	gaa	ctg	tcc	aag	gag	gag		2019
Ala	Ala	Leu	Ala	Cys	Ser	Lys	Ile	Leu	Lys	Glu	Leu	Ser	Lys	Glu	Glu		
			655					660					665				
gag	gac	acg	gac	agc	tcg	gag	gag	atg	ctg	gcg	ctg	gcg	gag	gag	tat		2067
Glu	Asp	Thr	Asp	Ser	Ser	Glu	Glu	Met	Leu	Ala	Leu	Ala	Glu	Glu	Tyr		
			670					675					680				
gag	cac	aga	gcc	atc	ggg	gtc	ttc	acc	gag	tgc	tac	cgg	aag	gac	gaa		2115
Glu	His	Arg	Ala	Ile	Gly	Val	Phe	Thr	Glu	Cys	Tyr	Arg	Lys	Asp	Glu		
		685				690						695					
gag	aga	gcc	cag	aaa	ctg	ctc	acc	cgc	gtg	tcc	gag	gcc	tgg	ggg	aag		2163
Glu	Arg	Ala	Gln	Lys	Leu	Leu	Thr	Arg	Val	Ser	Glu	Ala	Trp	Gly	Lys		
	700				705						710						
acc	acc	tgc	ctg	cag	ctc	gcc	ctg	gag	gcc	aag	gac	atg	aag	ttt	gtg		2211
Thr	Thr	Cys	Leu	Gln	Leu	Ala	Leu	Glu	Ala	Lys	Asp	Met	Lys	Phe	Val		
715				720						725				730			
tct	cac	ggg	ggc	atc	cag	gcc	ttc	ctg	acc	aag	gtg	tgg	tgg	ggc	cag		2259
Ser	His	Gly	Gly	Ile	Gln	Ala	Phe	Leu	Thr	Lys	Val	Trp	Trp	Gly	Gln		
			735					740						745			
ctc	tcc	gtg	gac	aat	ggg	ctg	tgg	cgt	gtg	acc	ctg	tgc	atg	ctg	gcc		2307

Leu Ser Val Asp Asn Gly Leu Trp Arg Val Thr Leu Cys Met Leu Ala	
750	755
760	
ttc ccg ctg ctc ctc acc ggc ctc atc tcc ttc agg gag aag agg ctg	2355
Phe Pro Leu Leu Leu Thr Gly Leu Ile Ser Phe Arg Glu Lys Arg Leu	
765	770
775	
cag gat gtg ggc acc ccc gcg gcc cgc gcc cgt gcc ttc ttc acc gca	2403
Gln Asp Val Gly Thr Pro Ala Ala Arg Ala Arg Ala Phe Phe Thr Ala	
780	785
790	
ccc gtg gtg gtc ttc cac ctg aac atc ctc tcc tac ttc gcc ttc ctc	2451
Pro Val Val Val Phe His Leu Asn Ile Leu Ser Tyr Phe Ala Phe Leu	
795	800
805	810
tgc ctg ttc gcc tac gtg ctc atg gtg gac ttc cag cct gtg ccc tcc	2499
Cys Leu Phe Ala Tyr Val Leu Met Val Asp Phe Gln Pro Val Pro Ser	
815	820
825	
tgg tgc gag tgt gcc atc tac ctc tgg ctc ttc tcc ttg gtg tgc gag	2547
Trp Cys Glu Cys Ala Ile Tyr Leu Trp Leu Phe Ser Leu Val Cys Glu	
830	835
840	
gag atg cgg cag ctc ttc tat gac cct gac gag tgc ggg ctg atg aag	2595
Glu Met Arg Gln Leu Phe Tyr Asp Pro Asp Glu Cys Gly Leu Met Lys	
845	850
855	
aag gca gcc ttg tac ttc agt gac ttc tgg aat aag ctg gac gtc ggc	2643
Lys Ala Ala Leu Tyr Phe Ser Asp Phe Trp Asn Lys Leu Asp Val Gly	
860	865
870	
gca atc ttg ctc ttc gtg gca ggg ctg acc tgc agg ctc atc ccg gcg	2691
Ala Ile Leu Leu Phe Val Ala Gly Leu Thr Cys Arg Leu Ile Pro Ala	
875	880
885	890
acg ctg tac ccc ggg cgc gtc atc ctc tct ctg gac ttc atc ctg ttc	2739

Thr Leu Tyr Pro Gly Arg Val Ile Leu Ser Leu Asp Phe Ile Leu Phe  
 895 900 905  
 tgc ctc cgg ctc atg cac att ttt acc atc agt aag acg ctg ggg ccc 2787  
 Cys Leu Arg Leu Met His Ile Phe Thr Ile Ser Lys Thr Leu Gly Pro  
 910 915 920  
 aag atc atc att gtg aag cgg atg atg aag gac gtc ttc ttc ttc ctc 2835  
 Lys Ile Ile Ile Val Lys Arg Met Met Lys Asp Val Phe Phe Phe Leu  
 925 930 935  
 ttc ctg ctg gct gtg tgg gtg gtg tcc ttc ggg gtg gcc aag cag gcc 2883  
 Phe Leu Leu Ala Val Trp Val Val Ser Phe Gly Val Ala Lys Gln Ala  
 940 945 950  
 atc ctc atc cac aac gag cgc cgg gtg gac tgg ctg ttc cga ggg gcc 2931  
 Ile Leu Ile His Asn Glu Arg Arg Val Asp Trp Leu Phe Arg Gly Ala  
 955 960 965 970  
 gtc tac cac tcc tac ctc acc atc ttc ggg cag atc ccg ggc tac atc 2979  
 Val Tyr His Ser Tyr Leu Thr Ile Phe Gly Gln Ile Pro Gly Tyr Ile  
 975 980 985  
 gac ggt gtg aac ttc aac ccg gag cac tgc agc ccc aat ggc acc gac 3027  
 Asp Gly Val Asn Phe Asn Pro Glu His Cys Ser Pro Asn Gly Thr Asp  
 990 995 1000  
 ccc tac aag cct aag tgc ccc gag agc gac gcg acg cag cag agg ccg 3075  
 Pro Tyr Lys Pro Lys Cys Pro Glu Ser Asp Ala Thr Gln Gln Arg Pro  
 1005 1010 1015  
 gcc ttc cct gag tgg ctg acg gtc ctc cta ctc tgc ctc tac ctg ctc 3123  
 Ala Phe Pro Glu Trp Leu Thr Val Leu Leu Leu Cys Leu Tyr Leu Leu  
 1020 1025 1030  
 ttc acc aac atc ctg ctg ctc aac ctc ctc atc gcc atg ttc aac tac 3171

Phe Thr Asn Ile Leu Leu Leu Asn Leu Leu Ile Ala Met Phe Asn Tyr  
 1035 1040 1045 1050

acc ttc cag cag gtg cag gag cac acg gac cag att tgg aag ttc cag 3219  
 Thr Phe Gln Gln Val Gln Glu His Thr Asp Gln Ile Trp Lys Phe Gln  
 1055 1060 1065

cgc cat gac ctg atc gag gag tac cac ggc cgc ccc gcc gcg cgg ccc 3267  
 Arg His Asp Leu Ile Glu Glu Tyr His Gly Arg Pro Ala Ala Pro Pro  
 1070 1075 1080

ccc ttc atc ctc ctc agc cac ctg cag ctc ttc atc aag agg gtg gtc 3315  
 Pro Phe Ile Leu Leu Ser His Leu Gln Leu Phe Ile Lys Arg Val Val  
 1085 1090 1095

ctg aag act cgg gcc aag agg cac aag cag ctc aag aac aag ctg gag 3363  
 Leu Lys Thr Pro Ala Lys Arg His Lys Gln Leu Lys Asn Lys Leu Glu  
 1100 1105 1110

aag aac gag gag gcg gcc ctg cta tcc tgg gag atc tac ctg aag gag 3411  
 Lys Asn Glu Glu Ala Ala Leu Leu Ser Trp Glu Ile Tyr Leu Lys Glu  
 1115 1120 1125 1130

aac tac ctc cag aac cga cag ttc cag caa aag cag cgg ccc gag cag 3459  
 Asn Tyr Leu Gln Asn Arg Gln Phe Gln Gln Lys Gln Arg Pro Glu Gln  
 1135 1140 1145

aag atc gag gac atc agc aat aag gtt gac gcc atg gtg gac ctg ctg 3507  
 Lys Ile Glu Asp Ile Ser Asn Lys Val Asp Ala Met Val Asp Leu Leu  
 1150 1155 1160

gac ctg gac cca ctg aag agg tcg ggc tcc atg gag cag agg ttg gcc 3555  
 Asp Leu Asp Pro Leu Lys Arg Ser Gly Ser Met Glu Gln Arg Leu Ala  
 1165 1170 1175

tcc ctg gag gag cag gtg gcc cag aca gcc cga gcc ctg cac tgg atc 3603

Ser	Leu	Glu	Glu	Gln	Val	Ala	Gln	Thr	Ala	Arg	Ala	Leu	His	Trp	Ile		
1180						1185					1190						
gtg	agg	acg	ctg	cgg	gcc	agc	ggc	ttc	agc	tcg	gag	gcg	gac	gtc	ccc	3651	
Val	Arg	Thr	Leu	Arg	Ala	Ser	Gly	Phe	Ser	Ser	Glu	Ala	Asp	Val	Pro		
1195				1200					1205					1210			
act	ctg	gcc	tcc	cag	aag	gcc	gcg	gag	gag	cgg	gat	gct	gag	cgg	gga	3699	
Thr	Leu	Ala	Ser	Gln	Lys	Ala	Ala	Glu	Glu	Pro	Asp	Ala	Glu	Pro	Gly		
				1215				1220					1225				
ggc	agg	aag	aag	acg	gag	gag	cgg	ggc	gac	agc	tac	cac	gtg	aat	gcc	3747	
Gly	Arg	Lys	Lys	Thr	Glu	Glu	Pro	Gly	Asp	Ser	Tyr	His	Val	Asn	Ala		
		1230					1235					1240					
cgg	cac	ctc	ctc	tac	ccc	aac	tgc	cct	gtc	acg	cgc	ttc	ccc	gtg	ccc	3795	
Arg	His	Leu	Leu	Tyr	Pro	Asn	Cys	Pro	Val	Thr	Arg	Phe	Pro	Val	Pro		
	1245					1250						1255					
aac	gag	aag	gtg	ccc	tgg	gag	acg	gag	ttc	ctg	atc	tat	gac	cca	ccc	3843	
Asn	Glu	Lys	Val	Pro	Trp	Glu	Thr	Glu	Phe	Leu	Ile	Tyr	Asp	Pro	Pro		
	1260				1265				1270								
ttt	tac	acg	gca	gag	agg	aag	gac	gcg	gcc	gcc	atg	gac	ccc	atg	gga	3891	
Phe	Tyr	Thr	Ala	Glu	Arg	Lys	Asp	Ala	Ala	Ala	Met	Asp	Pro	Met	Gly		
1275				1280				1285					1290				
gac	acc	ctg	gag	cca	ctg	tcc	acg	atc	cag	tac	aac	gtg	gtg	gat	ggc	3939	
Asp	Thr	Leu	Glu	Pro	Leu	Ser	Thr	Ile	Gln	Tyr	Asn	Val	Val	Asp	Gly		
			1295					1300					1305				
ctg	agg	gac	cgc	cgg	agc	ttc	cac	ggg	cgg	tac	aca	gtg	cag	gcc	ggg	3987	
Leu	Arg	Asp	Arg	Arg	Ser	Phe	His	Gly	Pro	Tyr	Thr	Val	Gln	Ala	Gly		
		1310						1315					1320				
ttg	ccc	ctg	aac	ccc	atg	ggc	cgc	aca	gga	ctg	cgt	ggg	cgc	ggg	agc	4035	

Leu Pro Leu Asn Pro Met Gly Arg Thr Gly Leu Arg Gly Arg Gly Ser  
 1325 1330 1335  
 etc agc tgc ttc gga ccc aac cac acg ctg tac ccc atg gtc acg cgg 4083  
 Leu Ser Cys Phe Gly Pro Asn His Thr Leu Tyr Pro Met Val Thr Arg  
 1340 1345 1350  
 tgg agg cgg aac gag gat gga gcc atc tgc agg aag agc ata aag aag 4131  
 Trp Arg Arg Asn Glu Asp Gly Ala Ile Cys Arg Lys Ser Ile Lys Lys  
 1355 1360 1365 1370  
 atg ctg gaa gtg ctg gtg gtg aag ctc cct ctc tcc gag cac tgg gcc 4179  
 Met Leu Glu Val Leu Val Val Lys Leu Pro Leu Ser Glu His Trp Ala  
 1375 1380 1385  
 ctg cct ggg ggc tcc cgg gag cca ggg gag atg cta cct cgg aag ctg 4227  
 Leu Pro Gly Gly Ser Arg Glu Pro Gly Glu Met Leu Pro Arg Lys Leu  
 1390 1395 1400  
 aag cgg atc ctc cgg cag gag cac tgg cgg tct ttt gaa aac ttg ctg 4275  
 Lys Arg Ile Leu Arg Gln Glu His Trp Pro Ser Phe Glu Asn Leu Leu  
 1405 1410 1415  
 aag tgc ggc atg gag gtg tac aaa ggc tac atg gat gac cgg agg aac 4323  
 Lys Cys Gly Met Glu Val Tyr Lys Gly Tyr Met Asp Asp Pro Arg Asn  
 1420 1425 1430  
 acg gac aat gcc tgg atc gag acg gtg gcc gtc agc gtc cac ttc cag 4371  
 Thr Asp Asn Ala Trp Ile Glu Thr Val Ala Val Ser Val His Phe Gln  
 1435 1440 1445 1450  
 gac cag aat gac gtg gag ctg aac agg ctg aac tct aac ctg cac gcc 4419  
 Asp Gln Asn Asp Val Glu Leu Asn Arg Leu Asn Ser Asn Leu His Ala  
 1455 1460 1465  
 tgc gac tcg ggg gcc tcc atc cga tgg cag gtg gtg gac agg cgc atc 4467

Cys Asp Ser Gly Ala Ser Ile Arg Trp Gln Val Val Asp Arg Arg Ile  
 1470 1475 1480

cca ctc tat gcg aac cac aag acc ctc ctc cag aag gca gcc gct gag 4515  
 Pro Leu Tyr Ala Asn His Lys Thr Leu Leu Gln Lys Ala Ala Ala Glu  
 1485 1490 1495

ttc ggg gct cac tac tga ctgtgccctc aggctgggcg gctccagtcc 4563  
 Phe Gly Ala His Tyr  
 1500

atagacgttc cccccagaaa ccagggttc tctctcctga gcttgccag gactcaggct 4623

gttcctgggc cctgcacatg atggggtttg gtggaccag tgccctcac ggctgccga 4683

agtctgctgc agatgacctc atgaactgga aggggtcaag gtgaccggg aggag 4738

<210> 2

<211> 1503

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Glu Pro Ser Ala Leu Arg Lys Ala Gly Ser Glu Gln Glu Glu Gly  
 1 5 10 15  
 Phe Glu Gly Leu Pro Arg Arg Val Thr Asp Leu Gly Met Val Ser Asn  
 20 25 30  
 Leu Arg Arg Ser Asn Ser Ser Leu Phe Lys Ser Trp Arg Leu Gln Cys  
 35 40 45  
 Pro Phe Gly Asn Asn Asp Lys Gln Glu Ser Leu Ser Ser Trp Ile Pro  
 50 55 60  
 Glu Asn Ile Lys Lys Lys Glu Cys Val Tyr Phe Val Glu Ser Ser Lys  
 65 70 75 80  
 Leu Ser Asp Ala Gly Lys Val Val Cys Gln Cys Gly Tyr Thr His Glu  
 85 90 95

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

Val Phe Phe Gln Glu Met Phe Glu Thr Phe Thr Glu Ser Arg Ile Val  
 385 390 395 400  
 Glu Trp Thr Lys Lys Ile Gln Asp Ile Val Arg Arg Arg Gln Leu Leu  
 405 410 415  
 Thr Val Phe Arg Glu Gly Lys Asp Gly Gln Gln Asp Val Asp Val Ala  
 420 425 430  
 Ile Leu Gln Ala Leu Leu Lys Ala Ser Arg Ser Gln Asp His Phe Gly  
 435 440 445  
 His Glu Asn Trp Asp His Gln Leu Lys Leu Ala Val Ala Trp Asn Arg  
 450 455 460  
 Val Asp Ile Ala Arg Ser Glu Ile Phe Met Asp Glu Trp Gln Trp Lys  
 465 470 475 480  
 Pro Ser Asp Leu His Pro Thr Met Thr Ala Ala Leu Ile Ser Asn Lys  
 485 490 495  
 Pro Glu Phe Val Lys Leu Phe Leu Glu Asn Gly Val Gln Leu Lys Glu  
 500 505 510  
 Phe Val Thr Trp Asp Thr Leu Leu Tyr Leu Tyr Glu Asn Leu Asp Pro  
 515 520 525  
 Ser Cys Leu Phe His Ser Lys Leu Gln Lys Val Leu Val Glu Asp Pro  
 530 535 540  
 Glu Arg Pro Ala Cys Ala Pro Ala Ala Pro Arg Leu Gln Met His His  
 545 550 555 560  
 Val Ala Gln Val Leu Arg Glu Leu Leu Gly Asp Phe Thr Gln Pro Leu  
 565 570 575  
 Tyr Pro Arg Pro Arg His Asn Asp Arg Leu Arg Leu Leu Leu Pro Val  
 580 585 590  
 Pro His Val Lys Leu Asn Val Gln Gly Val Ser Leu Arg Ser Leu Tyr  
 595 600 605  
 Lys Arg Ser Ser Gly His Val Thr Phe Thr Met Asp Pro Ile Arg Asp  
 610 615 620  
 Leu Leu Ile Trp Ala Ile Val Gln Asn Arg Arg Glu Leu Ala Gly Ile  
 625 630 635 640  
 Ile Trp Ala Gln Ser Gln Asp Cys Ile Ala Ala Ala Leu Ala Cys Ser  
 645 650 655  
 Lys Ile Leu Lys Glu Leu Ser Lys Glu Glu Glu Asp Thr Asp Ser Ser  
 660 665 670

Glu Glu Met Leu Ala Leu Ala Glu Glu Tyr Glu His Arg Ala Ile Gly  
           675                                  680                                  685  
 Val Phe Thr Glu Cys Tyr Arg Lys Asp Glu Glu Arg Ala Gln Lys Leu  
           690                                  695                                  700  
 Leu Thr Arg Val Ser Glu Ala Trp Gly Lys Thr Thr Cys Leu Gln Leu  
   705                                  710                                  715                                  720  
 Ala Leu Glu Ala Lys Asp Met Lys Phe Val Ser His Gly Gly Ile Gln  
                                   725                                  730                                  735  
 Ala Phe Leu Thr Lys Val Trp Trp Gly Gln Leu Ser Val Asp Asn Gly  
                                   740                                  745                                  750  
 Leu Trp Arg Val Thr Leu Cys Met Leu Ala Phe Pro Leu Leu Leu Thr  
           755                                  760                                  765  
 Gly Leu Ile Ser Phe Arg Glu Lys Arg Leu Gln Asp Val Gly Thr Pro  
   770                                  775                                  780  
 Ala Ala Arg Ala Arg Ala Phe Phe Thr Ala Pro Val Val Val Phe His  
   785                                  790                                  795                                  800  
 Leu Asn Ile Leu Ser Tyr Phe Ala Phe Leu Cys Leu Phe Ala Tyr Val  
                                   805                                  810                                  815  
 Leu Met Val Asp Phe Gln Pro Val Pro Ser Trp Cys Glu Cys Ala Ile  
                                   820                                  825                                  830  
 Tyr Leu Trp Leu Phe Ser Leu Val Cys Glu Glu Met Arg Gln Leu Phe  
           835                                  840                                  845  
 Tyr Asp Pro Asp Glu Cys Gly Leu Met Lys Lys Ala Ala Leu Tyr Phe  
   850                                  855                                  860  
 Ser Asp Phe Trp Asn Lys Leu Asp Val Gly Ala Ile Leu Leu Phe Val  
   865                                  870                                  875                                  880  
 Ala Gly Leu Thr Cys Arg Leu Ile Pro Ala Thr Leu Tyr Pro Gly Arg  
                                   885                                  890                                  895  
 Val Ile Leu Ser Leu Asp Phe Ile Leu Phe Cys Leu Arg Leu Met His  
           900                                  905                                  910  
 Ile Phe Thr Ile Ser Lys Thr Leu Gly Pro Lys Ile Ile Ile Val Lys  
           915                                  920                                  925  
 Arg Met Met Lys Asp Val Phe Phe Phe Leu Phe Leu Leu Ala Val Trp  
   930                                  935                                  940  
 Val Val Ser Phe Gly Val Ala Lys Gln Ala Ile Leu Ile His Asn Glu  
   945                                  950                                  955                                  960



Asn Cys Pro Val Thr Arg Phe Pro Val Pro Asn Glu Lys Val Pro Trp  
 1250 1255 1260  
 Glu Thr Glu Phe Leu Ile Tyr Asp Pro Pro Phe Tyr Thr Ala Glu Arg  
 1265 1270 1275 1280  
 Lys Asp Ala Ala Ala Met Asp Pro Met Gly Asp Thr Leu Glu Pro Leu  
 1285 1290 1295  
 Ser Thr Ile Gln Tyr Asn Val Val Asp Gly Leu Arg Asp Arg Arg Ser  
 1300 1305 1310  
 Phe His Gly Pro Tyr Thr Val Gln Ala Gly Leu Pro Leu Asn Pro Met  
 1315 1320 1325  
 Gly Arg Thr Gly Leu Arg Gly Arg Gly Ser Leu Ser Cys Phe Gly Pro  
 1330 1335 1340  
 Asn His Thr Leu Tyr Pro Met Val Thr Arg Trp Arg Arg Asn Glu Asp  
 1345 1350 1355 1360  
 Gly Ala Ile Cys Arg Lys Ser Ile Lys Lys Met Leu Glu Val Leu Val  
 1365 1370 1375  
 Val Lys Leu Pro Leu Ser Glu His Trp Ala Leu Pro Gly Gly Ser Arg  
 1380 1385 1390  
 Glu Pro Gly Glu Met Leu Pro Arg Lys Leu Lys Arg Ile Leu Arg Gln  
 1395 1400 1405  
 Glu His Trp Pro Ser Phe Glu Asn Leu Leu Lys Cys Gly Met Glu Val  
 1410 1415 1420  
 Tyr Lys Gly Tyr Met Asp Asp Pro Arg Asn Thr Asp Asn Ala Trp Ile  
 1425 1430 1435 1440  
 Glu Thr Val Ala Val Ser Val His Phe Gln Asp Gln Asn Asp Val Glu  
 1445 1450 1455  
 Leu Asn Arg Leu Asn Ser Asn Leu His Ala Cys Asp Ser Gly Ala Ser  
 1460 1465 1470  
 Ile Arg Trp Gln Val Val Asp Arg Arg Ile Pro Leu Tyr Ala Asn His  
 1475 1480 1485  
 Lys Thr Leu Leu Gln Lys Ala Ala Ala Glu Phe Gly Ala His Tyr  
 1490 1495 1500

<211> 4738

<212> DNA

<213> Rattus sp.

<220>

<221> CDS

<222> (84).. (4610)

<400> 3

cccccaacct cacaaatgag aagagacatc cctgaaaggc atotagagat ctctctctctc 60

tggtggatct ggagccgtgg agg atg gag occ ttg gac cag aga aga act gac 113

Met Glu Pro Leu Asp Gln Arg Arg Thr Asp

1 5 10

tct gat caa gag gag ggc ttt ggg gtg cag tcc cgg agg gcc act gat 161

Ser Asp Gln Glu Glu Gly Phe Gly Val Gln Ser Arg Arg Ala Thr Asp

15 20 25

ctg ggc atg gtc ccc aat ctc cga cga agc aat agc agt ctt tgc aag 209

Leu Gly Met Val Pro Asn Leu Arg Arg Ser Asn Ser Ser Leu Cys Lys

30 35 40

agc agg agg ctt ctg tgc tcc ttc agc agt gag aag caa gaa aac ctt 257

Ser Arg Arg Leu Leu Cys Ser Phe Ser Ser Glu Lys Gln Glu Asn Leu

45 50 55

agc tca tgg att ccc gag aac atc aag aag aag gaa tgt gtg tat ttc 305

Ser Ser Trp Ile Pro Glu Asn Ile Lys Lys Lys Glu Cys Val Tyr Phe

60 65 70

gtg gaa agt tcc aag ctc tcg gat gca ggg aag gta gtg tgt gag tgt 353

Val Glu Ser Ser Lys Leu Ser Asp Ala Gly Lys Val Val Cys Glu Cys

75 80 85 90

ggt tac acc cac gag cag cac att gaa gtg gcc atc aag cct cac acc 401

Gly Tyr Thr His Glu Gln His Ile Glu Val Ala Ile Lys Pro His Thr	
95	100
105	
ttc cag ggc aag gag tgg gac cca aag aaa cac gtc cat gag atg oct	449
Phe Gln Gly Lys Glu Trp Asp Pro Lys Lys His Val His Glu Met Pro	
110	115
120	
aca gat gcc ttt ggt gac att gtc ttc acc ggc ctg agc cag aaa gtg	497
Thr Asp Ala Phe Gly Asp Ile Val Phe Thr Gly Leu Ser Gln Lys Val	
125	130
135	
ggg aag tat gtc cga ctc tcc cag gac acg tcg tcc att gtc atc tac	545
Gly Lys Tyr Val Arg Leu Ser Gln Asp Thr Ser Ser Ile Val Ile Tyr	
140	145
150	
cag ctt atg aca cag cac tgg ggc ctg gat gtc ccc agc ctc ctc atc	593
Gln Leu Met Thr Gln His Trp Gly Leu Asp Val Pro Ser Leu Leu Ile	
155	160
165	170
tct gtg acc ggt ggg gcc aag aac ttc aac atg aag ctg agg ttg aag	641
Ser Val Thr Gly Gly Ala Lys Asn Phe Asn Met Lys Leu Arg Leu Lys	
175	180
185	
agc atc ttc cgg aga ggc ctg gtt aag gtg gcc caa acc acg ggg gcc	689
Ser Ile Phe Arg Arg Gly Leu Val Lys Val Ala Gln Thr Thr Gly Ala	
190	195
200	
tgg atc atc act ggg ggt tcc cac acc ggt gtg atg aag cag gtg ggc	737
Trp Ile Ile Thr Gly Gly Ser His Thr Gly Val Met Lys Gln Val Gly	
205	210
215	
gag gcg gta cgg gac ttc agc cta agc agc agc tgc aaa gaa ggc gac	785
Glu Ala Val Arg Asp Phe Ser Leu Ser Ser Ser Cys Lys Glu Gly Asp	
220	225
230	
gtc atc acc atc ggc ata gcc acg tgg ggc acc atc cac aac cgt gag	833

Val	Ile	Thr	Ile	Gly	Ile	Ala	Thr	Trp	Gly	Thr	Ile	His	Asn	Arg	Glu	
235					240					245					250	
gca ctg atc cat ccc atg gga ggc ttc ccc gct gag tac atg ctg gat 881																
Ala	Leu	Ile	His	Pro	Met	Gly	Gly	Phe	Pro	Ala	Glu	Tyr	Met	Leu	Asp	
				255					260					265		
gag gaa ggc caa ggg aac ctg acc tgc ctg gac agc aac cac tcc cac 929																
Glu	Glu	Gly	Gln	Gly	Asn	Leu	Thr	Cys	Leu	Asp	Ser	Asn	His	Ser	His	
			270					275					280			
ttc atc ctg gtg gat gat ggg acc cac ggg cag tat ggt gtg gag att 977																
Phe	Ile	Leu	Val	Asp	Asp	Gly	Thr	His	Gly	Gln	Tyr	Gly	Val	Glu	Ile	
		285					290					295				
ccg ctg agg act aag ctg gag aag ttc ata tog gag caa acg aag gaa 1025																
Pro	Leu	Arg	Thr	Lys	Leu	Glu	Lys	Phe	Ile	Ser	Glu	Gln	Thr	Lys	Glu	
	300					305					310					
aga ggg ggt gtg gcc att aag atc ccc att gtc tgc gtg gtg ttg gag 1073																
Arg	Gly	Gly	Val	Ala	Ile	Lys	Ile	Pro	Ile	Val	Cys	Val	Val	Leu	Glu	
315					320					325				330		
ggt ggc cct ggc act ctg cat acc atc tac aac gcc atc acc aat ggc 1121																
Gly	Gly	Pro	Gly	Thr	Leu	His	Thr	Ile	Tyr	Asn	Ala	Ile	Thr	Asn	Gly	
				335					340					345		
aca ccc tgc gtg ata gtg gag ggc tcc ggc cga gtg gct gac gtc atc 1169																
Thr	Pro	Cys	Val	Ile	Val	Glu	Gly	Ser	Gly	Arg	Val	Ala	Asp	Val	Ile	
			350						355				360			
gct cag gtg gcc gct ctg ccc gtc tct gag atc acc atc tcc ctg atc 1217																
Ala	Gln	Val	Ala	Ala	Leu	Pro	Val	Ser	Glu	Ile	Thr	Ile	Ser	Leu	Ile	
		365						370					375			
cag cag aag ctc agc gtc ttc ttc cag gag atg ttt gag act ttc acc 1265																

Gln	Gln	Lys	Leu	Ser	Val	Phe	Phe	Gln	Glu	Met	Phe	Glu	Thr	Phe	Thr		
380						385				390							
gaa aac cag att gtg gaa tgg acc aaa aag atc caa gat att gtc agg 1313																	
Glu	Asn	Gln	Ile	Val	Glu	Trp	Thr	Lys	Lys	Ile	Gln	Asp	Ile	Val	Arg		
395				400					405					410			
agg cgg cag ctg ctg acg gtc ttc cgg gaa ggc aag gat ggt cag cag 1361																	
Arg	Arg	Gln	Leu	Leu	Thr	Val	Phe	Arg	Glu	Gly	Lys	Asp	Gly	Gln	Gln		
			415					420					425				
gat gtg gat gtt gcc att ctg caa gct tta ctg aaa gcc tct cga agc 1409																	
Asp	Val	Asp	Val	Ala	Ile	Leu	Gln	Ala	Leu	Leu	Lys	Ala	Ser	Arg	Ser		
			430				435					440					
caa gat cac ttc ggc cac gag aac tgg gac cat cag ctg aag ctg gcc 1457																	
Gln	Asp	His	Phe	Gly	His	Glu	Asn	Trp	Asp	His	Gln	Leu	Lys	Leu	Ala		
		445					450				455						
gtg gcc tgg aac cgt gtg gac atc gcc cgc agt gag atc ttc act gat 1505																	
Val	Ala	Trp	Asn	Arg	Val	Asp	Ile	Ala	Arg	Ser	Glu	Ile	Phe	Thr	Asp		
	460					465					470						
gag tgg cag tgg aag cct tca gac ctg cat ccc atg atg aca gct gcc 1553																	
Glu	Trp	Gln	Trp	Lys	Pro	Ser	Asp	Leu	His	Pro	Met	Met	Thr	Ala	Ala		
475				480					485					490			
ctc atc tcc aac aag cct gag ttt gtg agg ctc ttt ctg gag aac ggg 1601																	
Leu	Ile	Ser	Asn	Lys	Pro	Glu	Phe	Val	Arg	Leu	Phe	Leu	Glu	Asn	Gly		
				495					500					505			
gtg cgg ctg aag gag ttt gtc acc tgg gat act ctt ctc tgc ctc tac 1649																	
Val	Arg	Leu	Lys	Glu	Phe	Val	Thr	Trp	Asp	Thr	Leu	Leu	Cys	Leu	Tyr		
			510					515					520				
gag aac ctg gag cca tcc tgc ctt ttc cac agc aag ctg cag aag gtg 1697																	

Glu Asn Leu Glu Pro Ser Cys Leu Phe His Ser Lys Leu Gln Lys Val	
525	530
ctg gca gaa gag cat gaa cgc tta gcc tat gca tot gag aca ccc cgg	1745
Leu Ala Glu Glu His Glu Arg Leu Ala Tyr Ala Ser Glu Thr Pro Arg	
540	550
ctg caa atg cac cac gtg gcc cag gtg ctg cgt gag ctc ctc gga gac	1793
Leu Gln Met His His Val Ala Gln Val Leu Arg Glu Leu Leu Gly Asp	
555	565
tcc aca cag ctg ctg tat ccc cgg ccc cgg tac act gac cgg cca cgg	1841
Ser Thr Gln Leu Leu Tyr Pro Arg Pro Arg Tyr Thr Asp Arg Pro Arg	
575	580
ctc tcg ctg ccc atg cca cac atc aaa ctc aac gtg caa gga gtg agc	1889
Leu Ser Leu Pro Met Pro His Ile Lys Leu Asn Val Gln Gly Val Ser	
590	595
ctc cgg tct ctc tat aag cga tca aca ggc cac gtt acc ttc acc att	1937
Leu Arg Ser Leu Tyr Lys Arg Ser Thr Gly His Val Thr Phe Thr Ile	
605	610
gac cca gtc cgc gat ctt ctc att tgg gcc atc atc cag aac cac agg	1985
Asp Pro Val Arg Asp Leu Leu Ile Trp Ala Ile Ile Gln Asn His Arg	
620	625
gag ctg gcg ggc atc atc tgg gct cag agc cag gac tgc aca gca gcc	2033
Glu Leu Ala Gly Ile Ile Trp Ala Gln Ser Gln Asp Cys Thr Ala Ala	
635	640
gca ctg gcc tgc agc aag atc ctg aag gag ctg tcc aag gag gag gaa	2081
Ala Leu Ala Cys Ser Lys Ile Leu Lys Glu Leu Ser Lys Glu Glu Glu	
655	660
gat aca gac agc tct gag gag atg ctg gca ctc gcg gat gag ttt gag	2129

Asp Thr Asp Ser Ser Glu Glu Met Leu Ala Leu Ala Asp Glu Phe Glu	
670	675
680	
cat aga gct atc ggt gtc ttc acc gag tgc tac aga aag gat gag gaa	2177
His Arg Ala Ile Gly Val Phe Thr Glu Cys Tyr Arg Lys Asp Glu Glu	
685	690
695	
aga gcc cag aag ctg ctt gtc cgt gtg tct gag gcc tgg ggg aag acc	2225
Arg Ala Gln Lys Leu Leu Val Arg Val Ser Glu Ala Trp Gly Lys Thr	
700	705
710	
acc tgc ctg cag ctg gcc ctc gag gcc aag gac atg aaa ttc gtg tct	2273
Thr Cys Leu Gln Leu Ala Leu Glu Ala Lys Asp Met Lys Phe Val Ser	
715	720
725	730
cac gga ggg atc cag gct ttc cta acg aag gtg tgg tgg ggt cag ctc	2321
His Gly Gly Ile Gln Ala Phe Leu Thr Lys Val Trp Trp Gly Gln Leu	
735	740
745	
tgc gtg gac aat ggc ctg tgg agg atc atc ctg tgc atg ctg gcc ttc	2369
Cys Val Asp Asn Gly Leu Trp Arg Ile Ile Leu Cys Met Leu Ala Phe	
750	755
760	
cct ctg ctc ttc acc ggc ttc atc tcc ttc agg gaa aag agg ctg cag	2417
Pro Leu Leu Phe Thr Gly Phe Ile Ser Phe Arg Glu Lys Arg Leu Gln	
765	770
775	
gca ctg tgc cgc ccg gcc cgc gtc cgc gcc ttc ttc aac gcg ccg gtg	2465
Ala Leu Cys Arg Pro Ala Arg Val Arg Ala Phe Phe Asn Ala Pro Val	
780	785
790	
gtc atc ttc tac ctc aat att ctc tcc tac ttt gcc ttc ctc tgc ctg	2513
Val Ile Phe Tyr Leu Asn Ile Leu Ser Tyr Phe Ala Phe Leu Cys Leu	
795	800
805	810
815	
ttt gcc tac gtg ctc atg gtg gac ttc cag ccc tea cca tcc tgg tgc	2561

Phe Ala Tyr Val Leu Met Val Asp Phe Gln Pro Ser Pro Ser Trp Cys  
                   815                                  820                                  825

gag tac ctc atc tac ctg tgg ctc ttc tcc ctg gtg tgc gag gag aca 2609  
 Glu Tyr Leu Ile Tyr Leu Trp Leu Phe Ser Leu Val Cys Glu Glu Thr  
                   830                                  835                                  840

cgg cag cta ttc tac gat ccc gat ggc tgc ggg ctc atg aag atg gcg 2657  
 Arg Gln Leu Phe Tyr Asp Pro Asp Gly Cys Gly Leu Met Lys Met Ala  
                   845                                  850                                  855

tcc ctg tac ttc agt gac ttc tgg aac aaa ctg gac gtt ggg gcc att 2705  
 Ser Leu Tyr Phe Ser Asp Phe Trp Asn Lys Leu Asp Val Gly Ala Ile  
                   860                                  865                                  870

ctg ctc ttt ata gca gga ctg acc tgc cga ctc atc cca gcg acg ctg 2753  
 Leu Leu Phe Ile Ala Gly Leu Thr Cys Arg Leu Ile Pro Ala Thr Leu  
 875                                  880                                  885                                  890

tac cct ggg cgc atc atc ctg tct ttg gac ttc att atg ttc tgc ctc 2801  
 Tyr Pro Gly Arg Ile Ile Leu Ser Leu Asp Phe Ile Met Phe Cys Leu  
                                   895                                  900                                  905

cgc ctc atg cac atc ttc acc att agc aag aca ctg ggg ccc aag ata 2849  
 Arg Leu Met His Ile Phe Thr Ile Ser Lys Thr Leu Gly Pro Lys Ile  
                                   910                                  915                                  920

atc atc gtg aag cgg' atg atg aag gac gtc ttc ttc ttc ctc ttt ctc 2897  
 Ile Ile Val Lys Arg Met Met Lys Asp Val Phe Phe Phe Leu Phe Leu  
                   925                                  930                                  935

ctg gcg gtg tgg gtg gtg tcc ttc gga gtg gcc aag cag gcc atc ctc 2945  
 Leu Ala Val Trp Val Val Ser Phe Gly Val Ala Lys Gln Ala Ile Leu  
                   940                                  945                                  950

atc cac aat gag agc cgc gtg gac tgg atc ttc cgc gga gtt atc tat 2993

Ile His Asn Glu Ser Arg Val Asp Trp Ile Phe Arg Gly Val Ile Tyr	
955	960 965 970
cac tct tac ctt acc atc ttc ggg cag atc ccg acc tac att gac ggc	3041
His Ser Tyr Leu Thr Ile Phe Gly Gln Ile Pro Thr Tyr Ile Asp Gly	
	975 980 985
gtg aat ttc agc atg gac cag tgc agc ccc aat ggt aca gac ccc tac	3089
Val Asn Phe Ser Met Asp Gln Cys Ser Pro Asn Gly Thr Asp Pro Tyr	
	990 995 1000
aag ccc aag tgt cct gag agt gac tgg aca ggg cag gca ccc gcc ttc	3137
Lys Pro Lys Cys Pro Glu Ser Asp Trp Thr Gly Gln Ala Pro Ala Phe	
	1005 1010 1015
ccc gag tgg ctg aca gtc acc ctt ctc tgc ctc tac ctg ctc ttc gcc	3185
Pro Glu Trp Leu Thr Val Thr Leu Leu Cys Leu Tyr Leu Leu Phe Ala	
	1020 1025 1030
aac atc ctg ctg ctt aat ttg ctc atc gcc atg ttc aac tac acc ttc	3233
Asn Ile Leu Leu Leu Asn Leu Leu Ile Ala Met Phe Asn Tyr Thr Phe	
	1035 1040 1045 1050
cag gag gtg cag gag cac aca gac cag atc tgg aag ttc cag cgc cac	3281
Gln Glu Val Gln Glu His Thr Asp Gln Ile Trp Lys Phe Gln Arg His	
	1055 1060 1065
gac ctg att gag gag tac cac ggc cgg ccc ccg gcc cct ccc cca ctc	3329
Asp Leu Ile Glu Glu Tyr His Gly Arg Pro Pro Ala Pro Pro Pro Leu	
	1070 1075 1080
atc ctc ctc agc cac ctg cag ctc ctg atc aag agg att gtc ctg aag	3377
Ile Leu Leu Ser His Leu Gln Leu Leu Ile Lys Arg Ile Val Leu Lys	
	1085 1090 1095
atc ccc gcc aag agg cac aag cag ctc aag aac aag ctg gag aag aat	3425

Ile Pro Ala Lys Arg His Lys Gln Leu Lys Asn Lys Leu Glu Lys Asn	
1100	1105 1110
gag gag gca gcc ctc ctg tcc tgg gag ctc tac ctg aag gag aat tac	3473
Glu Glu Ala Ala Leu Leu Ser Trp Glu Leu Tyr Leu Lys Glu Asn Tyr	
1115	1120 1125 1130
ctg cag aac caa cag tac cag cac aaa cag cgg cca gag cag aag atc	3521
Leu Gln Asn Gln Gln Tyr Gln His Lys Gln Arg Pro Glu Gln Lys Ile	
	1135 1140 1145
cag gac atc agt gag aaa gtg gac acc atg gtg gat ctg ttg gac atg	3569
Gln Asp Ile Ser Glu Lys Val Asp Thr Met Val Asp Leu Leu Asp Met	
	1150 1155 1160
gac cgt gtg aag aga tca ggc tcc aca gag cag agg ctg gcc tcc ctt	3617
Asp Arg Val Lys Arg Ser Gly Ser Thr Glu Gln Arg Leu Ala Ser Leu	
	1165 1170 1175
gag gaa cag gtg act cag atg ggc aga tct ttg cac tgg atc gtg acg	3665
Glu Glu Gln Val Thr Gln Met Gly Arg Ser Leu His Trp Ile Val Thr	
	1180 1185 1190
acc ctg aag gac agt ggc ttt ggc tca ggg gcc ggt gca ctg acc ctg	3713
Thr Leu Lys Asp Ser Gly Phe Gly Ser Gly Ala Gly Ala Leu Thr Leu	
	1195 1200 1205 1210
gca gcc caa agg gcc ttc gac gag cca gat gct gag ctg agt atc agg	3761
Ala Ala Gln Arg Ala Phe Asp Glu Pro Asp Ala Glu Leu Ser Ile Arg	
	1215 1220 1225
aag aaa gga gag gag gga gga gat ggc tat cat gtg agc gcc cgg cac	3809
Lys Lys Gly Glu Glu Gly Gly Asp Gly Tyr His Val Ser Ala Arg His	
	1230 1235 1240
ctc ctc tac cct gat gcc cgc atc atg cgc ttc ccc gtg cct aat gag	3857

Leu Leu Tyr Pro Asp Ala Arg Ile Met Arg Phe Pro Val Pro Asn Glu  
 1245 1250 1255

aag gtg cct tgg gag gca gag ttt ctg atc tac gac cct ccg ttt tac 3905  
 Lys Val Pro Trp Glu Ala Glu Phe Leu Ile Tyr Asp Pro Pro Phe Tyr  
 1260 1265 1270

aca gct gag aag aag gat gcg act ctc aca gac cct gtg gga gac act 3953  
 Thr Ala Glu Lys Lys Asp Ala Thr Leu Thr Asp Pro Val Gly Asp Thr  
 1275 1280 1285 1290

gca gaa cct ctg tct aag atc aat tac aac gtc gtg gac gga ctg atg 4001  
 Ala Glu Pro Leu Ser Lys Ile Asn Tyr Asn Val Val Asp Gly Leu Met  
 1295 1300 1305

gac cgt tgc agc ttc cat ggg acc tat gtg gtc caa tat gga ttc cct 4049  
 Asp Arg Cys Ser Phe His Gly Thr Tyr Val Val Gln Tyr Gly Phe Pro  
 1310 1315 1320

ttg aac ccc atg ggc cgc acc ggg ttg cgt ggt cgt ggg agc ctc agc 4097  
 Leu Asn Pro Met Gly Arg Thr Gly Leu Arg Gly Arg Gly Ser Leu Ser  
 1325 1330 1335

tgg ttt ggt ccc aac cac act ctg cag cca gtt gtt acc cgg tgg aag 4145  
 Trp Phe Gly Pro Asn His Thr Leu Gln Pro Val Val Thr Arg Trp Lys  
 1340 1345 1350

agg aac cag ggt gga ggc atc tgc cgg aag agt gtc agg aag atg ttg 4193  
 Arg Asn Gln Gly Gly Gly Ile Cys Arg Lys Ser Val Arg Lys Met Leu  
 1355 1360 1365 1370

gag gtg ctg gtc atg aag ttg cct caa tcc gag cac tgg gcc ttg cct 4241  
 Glu Val Leu Val Met Lys Leu Pro Gln Ser Glu His Trp Ala Leu Pro  
 1375 1380 1385

ggg ggc tct cgg gag cca ggg aag atg cta cca cgg aag ctg aaa cag 4289

Gly Gly Ser Arg Glu Pro Gly Lys Met Leu Pro Arg Lys Leu Lys Gln	
1390	1395
1400	
gtc ctc cag cag gag tac tgg gtg acc ttt gag acc ttg cta agg caa	4337
Val Leu Gln Gln Glu Tyr Trp Val Thr Phe Glu Thr Leu Leu Arg Gln	
1405	1410
1415	
ggt aca gag gtg tac aaa gga tac gtg gat gac cca agg aac acg gac	4385
Gly Thr Glu Val Tyr Lys Gly Tyr Val Asp Asp Pro Arg Asn Thr Asp	
1420	1425
1430	
aat gcc tgg atc gag acg gtg gct gtc agc atc cat ttc cag gac cag	4433
Asn Ala Trp Ile Glu Thr Val Ala Val Ser Ile His Phe Gln Asp Gln	
1435	1440
1445	1450
aat gat gtg gag ctg aag agg ctg gaa gag aac ctg caa act cat gat	4481
Asn Asp Val Glu Leu Lys Arg Leu Glu Glu Asn Leu Gln Thr His Asp	
1455	1460
1465	
cca aag gag tog gcc cgt ggc ttg gag atg tet act gaa tgg cag gtt	4529
Pro Lys Glu Ser Ala Arg Gly Leu Glu Met Ser Thr Glu Trp Gln Val	
1470	1475
1480	
gta gac cgg cgg atc cct ctg tat gtg aac cac aag aag atc ctc caa	4577
Val Asp Arg Arg Ile Pro Leu Tyr Val Asn His Lys Lys Ile Leu Gln	
1485	1490
1495	
aag gtg gcc tog ctg ttt ggc gct cac ttc tga ccgtgggttc ttgtggaagc	4630
Lys Val Ala Ser Leu Phe Gly Ala His Phe	
1500	1505
tccaggggaa ggggtgatca tccatcaatg acccccctcc aagacttgga ctgggtggca	4690
ggttggggta ctgggttggg gtggtaggtt gttgggctgg gttgggtg	4738

<210> 4  
 <211> 1508  
 <212> PRT  
 <213> Rattus sp.

<400> 4

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



Cys Leu Phe His Ser Lys Leu Gln Lys Val Leu Ala Glu Glu His Glu  
 530 535 540  
 Arg Leu Ala Tyr Ala Ser Glu Thr Pro Arg Leu Gln Met His His Val  
 545 550 555 560  
 Ala Gln Val Leu Arg Glu Leu Leu Gly Asp Ser Thr Gln Leu Leu Tyr  
 565 570 575  
 Pro Arg Pro Arg Tyr Thr Asp Arg Pro Arg Leu Ser Leu Pro Met Pro  
 580 585 590  
 His Ile Lys Leu Asn Val Gln Gly Val Ser Leu Arg Ser Leu Tyr Lys  
 595 600 605  
 Arg Ser Thr Gly His Val Thr Phe Thr Ile Asp Pro Val Arg Asp Leu  
 610 615 620  
 Leu Ile Trp Ala Ile Ile Gln Asn His Arg Glu Leu Ala Gly Ile Ile  
 625 630 635 640  
 Trp Ala Gln Ser Gln Asp Cys Thr Ala Ala Ala Leu Ala Cys Ser Lys  
 645 650 655  
 Ile Leu Lys Glu Leu Ser Lys Glu Glu Glu Asp Thr Asp Ser Ser Glu  
 660 665 670  
 Glu Met Leu Ala Leu Ala Asp Glu Phe Glu His Arg Ala Ile Gly Val  
 675 680 685  
 Phe Thr Glu Cys Tyr Arg Lys Asp Glu Glu Arg Ala Gln Lys Leu Leu  
 690 695 700  
 Val Arg Val Ser Glu Ala Trp Gly Lys Thr Thr Cys Leu Gln Leu Ala  
 705 710 715 720  
 Leu Glu Ala Lys Asp Met Lys Phe Val Ser His Gly Gly Ile Gln Ala  
 725 730 735  
 Phe Leu Thr Lys Val Trp Trp Gly Gln Leu Cys Val Asp Asn Gly Leu  
 740 745 750  
 Trp Arg Ile Ile Leu Cys Met Leu Ala Phe Pro Leu Leu Phe Thr Gly  
 755 760 765  
 Phe Ile Ser Phe Arg Glu Lys Arg Leu Gln Ala Leu Cys Arg Pro Ala  
 770 775 780  
 Arg Val Arg Ala Phe Phe Asn Ala Pro Val Val Ile Phe Tyr Leu Asn  
 785 790 795 800  
 Ile Leu Ser Tyr Phe Ala Phe Leu Cys Leu Phe Ala Tyr Val Leu Met  
 805 810 815

Val Asp Phe Gln Pro Ser Pro Ser Trp Cys Glu Tyr Leu Ile Tyr Leu  
                   820                                  825                                  830  
 Trp Leu Phe Ser Leu Val Cys Glu Glu Thr Arg Gln Leu Phe Tyr Asp  
                   835                                  840                                  845  
 Pro Asp Gly Cys Gly Leu Met Lys Met Ala Ser Leu Tyr Phe Ser Asp  
                   850                                  855                                  860  
 Phe Trp Asn Lys Leu Asp Val Gly Ala Ile Leu Leu Phe Ile Ala Gly  
 865                                  870                                  875                                  880  
 Leu Thr Cys Arg Leu Ile Pro Ala Thr Leu Tyr Pro Gly Arg Ile Ile  
                                   885                                  890                                  895  
 Leu Ser Leu Asp Phe Ile Met Phe Cys Leu Arg Leu Met His Ile Phe  
                                   900                                  905                                  910  
 Thr Ile Ser Lys Thr Leu Gly Pro Lys Ile Ile Ile Val Lys Arg Met  
                   915                                  920                                  925  
 Met Lys Asp Val Phe Phe Phe Leu Phe Leu Leu Ala Val Trp Val Val  
                   930                                  935                                  940  
 Ser Phe Gly Val Ala Lys Gln Ala Ile Leu Ile His Asn Glu Ser Arg  
 945                                  950                                  955                                  960  
 Val Asp Trp Ile Phe Arg Gly Val Ile Tyr His Ser Tyr Leu Thr Ile  
                                   965                                  970                                  975  
 Phe Gly Gln Ile Pro Thr Tyr Ile Asp Gly Val Asn Phe Ser Met Asp  
                                   980                                  985                                  990  
 Gln Cys Ser Pro Asn Gly Thr Asp Pro Tyr Lys Pro Lys Cys Pro Glu  
                   995                                  1000                                  1005  
 Ser Asp Trp Thr Gly Gln Ala Pro Ala Phe Pro Glu Trp Leu Thr Val  
                   1010                                  1015                                  1020  
 Thr Leu Leu Cys Leu Tyr Leu Leu Phe Ala Asn Ile Leu Leu Leu Asn  
 1025                                  1030                                  1035                                  1040  
 Leu Leu Ile Ala Met Phe Asn Tyr Thr Phe Gln Glu Val Gln Glu His  
                                   1045                                  1050                                  1055  
 Thr Asp Gln Ile Trp Lys Phe Gln Arg His Asp Leu Ile Glu Glu Tyr  
                   1060                                  1065                                  1070  
 His Gly Arg Pro Pro Ala Pro Pro Pro Leu Ile Leu Leu Ser His Leu  
                   1075                                  1080                                  1085  
 Gln Leu Leu Ile Lys Arg Ile Val Leu Lys Ile Pro Ala Lys Arg His  
                   1090                                  1095                                  1100

Lys Gln Leu Lys Asn Lys Leu Glu Lys Asn Glu Glu Ala Ala Leu Leu  
 1105                    1110                    1115                    1120  
 Ser Trp Glu Leu Tyr Leu Lys Glu Asn Tyr Leu Gln Asn Gln Gln Tyr  
                          1125                    1130                    1135  
 Gln His Lys Gln Arg Pro Glu Gln Lys Ile Gln Asp Ile Ser Glu Lys  
                          1140                    1145                    1150  
 Val Asp Thr Met Val Asp Leu Leu Asp Met Asp Arg Val Lys Arg Ser  
                          1155                    1160                    1165  
 Gly Ser Thr Glu Gln Arg Leu Ala Ser Leu Glu Glu Gln Val Thr Gln  
                          1170                    1175                    1180  
 Met Gly Arg Ser Leu His Trp Ile Val Thr Thr Leu Lys Asp Ser Gly  
 1185                    1190                    1195                    1200  
 Phe Gly Ser Gly Ala Gly Ala Leu Thr Leu Ala Ala Gln Arg Ala Phe  
                          1205                    1210                    1215  
 Asp Glu Pro Asp Ala Glu Leu Ser Ile Arg Lys Lys Gly Glu Glu Gly  
                          1220                    1225                    1230  
 Gly Asp Gly Tyr His Val Ser Ala Arg His Leu Leu Tyr Pro Asp Ala  
                          1235                    1240                    1245  
 Arg Ile Met Arg Phe Pro Val Pro Asn Glu Lys Val Pro Trp Glu Ala  
                          1250                    1255                    1260  
 Glu Phe Leu Ile Tyr Asp Pro Pro Phe Tyr Thr Ala Glu Lys Lys Asp  
 1265                    1270                    1275                    1280  
 Ala Thr Leu Thr Asp Pro Val Gly Asp Thr Ala Glu Pro Leu Ser Lys  
                          1285                    1290                    1295  
 Ile Asn Tyr Asn Val Val Asp Gly Leu Met Asp Arg Cys Ser Phe His  
                          1300                    1305                    1310  
 Gly Thr Tyr Val Val Gln Tyr Gly Phe Pro Leu Asn Pro Met Gly Arg  
                          1315                    1320                    1325  
 Thr Gly Leu Arg Gly Arg Gly Ser Leu Ser Trp Phe Gly Pro Asn His  
                          1330                    1335                    1340  
 Thr Leu Gln Pro Val Val Thr Arg Trp Lys Arg Asn Gln Gly Gly Gly  
 1345                    1350                    1355                    1360  
 Ile Cys Arg Lys Ser Val Arg Lys Met Leu Glu Val Leu Val Met Lys  
                          1365                    1370                    1375  
 Leu Pro Gln Ser Glu His Trp Ala Leu Pro Gly Gly Ser Arg Glu Pro  
                          1380                    1385                    1390

Gly Lys Met Leu Pro Arg Lys Leu Lys Gln Val Leu Gln Gln Glu Tyr  
 1395 1400 1405  
 Trp Val Thr Phe Glu Thr Leu Leu Arg Gln Gly Thr Glu Val Tyr Lys  
 1410 1415 1420  
 Gly Tyr Val Asp Asp Pro Arg Asn Thr Asp Asn Ala Trp Ile Glu Thr  
 1425 1430 1435 1440  
 Val Ala Val Ser Ile His Phe Gln Asp Gln Asn Asp Val Glu Leu Lys  
 1445 1450 1455  
 Arg Leu Glu Glu Asn Leu Gln Thr His Asp Pro Lys Glu Ser Ala Arg  
 1460 1465 1470  
 Gly Leu Glu Met Ser Thr Glu Trp Gln Val Val Asp Arg Arg Ile Pro  
 1475 1480 1485  
 Leu Tyr Val Asn His Lys Lys Ile Leu Gln Lys Val Ala Ser Leu Phe  
 1490 1495 1500  
 Gly Ala His Phe  
 1505

<210> 5

<211> 18

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 5

agctggcgtg ggggtctc

18

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 6

ctctcccgg gtcaccttga

20

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 7

tctccggcgc agcaacagca

20

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 8

ccctcgcggc ggtggacagt

20

<210> 9

<211> 18

<212> DNA

<213> Rattus sp.

<400> 9

cccccaacct cacaaatg

18

<210> 10

<211> 19

<212> DNA

<213> Rattus sp.

<400> 10

cacccaaccc agccaaca

19

<210> 11  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Rattus sp.

<400> 11  
 gggccatcat ccagaaccac 20

<210> 12  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Rattus sp.

<400> 12  
 aggccattgt ccacgcagag 20

<210> 13  
 <211> 4808  
 <212> DNA  
 <213> Mus musculus

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (36)..(4559)

<400> 13  
 gtctctgtcc tcgggtgaat ctggagccgt ggagg atg gag tcc ttg gac cgg 53  
 Met Glu Ser Leu Asp Arg  
 1 5

aga aga act ggc tct gag cag gag gag ggc ttt ggg gtg cag tca agg 101  
 Arg Arg Thr Gly Ser Glu Gln Glu Glu Gly Phe Gly Val Gln Ser Arg  
 10 15 20

agg gcc act gac ctg ggc atg gtc ccc aat ctc cga cga agc aat agc	149
Arg Ala Thr Asp Leu Gly Met Val Pro Asn Leu Arg Arg Ser Asn Ser	
25 30 35	
agc ctt tgc aag agc agg aga ttt ctg tgc tct ttc agc agt gag aag	197
Ser Leu Cys Lys Ser Arg Arg Phe Leu Cys Ser Phe Ser Ser Glu Lys	
40 45 50	
caa gaa aac ctt agc tca tgg att ccc gag aat atc aag aag aag gag	245
Gln Glu Asn Leu Ser Ser Trp Ile Pro Glu Asn Ile Lys Lys Lys Glu	
55 60 65 70	
tgt gtg tac ttc gtg gaa agt tcc aaa ctc tog gac gca ggg aag gta	293
Cys Val Tyr Phe Val Glu Ser Ser Lys Leu Ser Asp Ala Gly Lys Val	
75 80 85	
gtg tgt gog tgt ggt tat acc cac gag caa cac ttg gag gtg gcc atc	341
Val Cys Ala Cys Gly Tyr Thr His Glu Gln His Leu Glu Val Ala Ile	
90 95 100	
aag cca cac acc ttc cag ggc aag gag tgg gat cca aag aaa cac gtc	389
Lys Pro His Thr Phe Gln Gly Lys Glu Trp Asp Pro Lys Lys His Val	
105 110 115	
caa gag atg ccc aca gat gcc ttt ggt gac atc gtt ttc aca gac ctg	437
Gln Glu Met Pro Thr Asp Ala Phe Gly Asp Ile Val Phe Thr Asp Leu	
120 125 130	
agc cag aaa gtg ggg aag tat gtc cgg gtc tcc cag gac acg ccc tcc	485
Ser Gln Lys Val Gly Lys Tyr Val Arg Val Ser Gln Asp Thr Pro Ser	
135 140 145 150	
agt gtc atc tac cag ctc atg acc cag cac tgg ggc cta gat gtc ccc	533
Ser Val Ile Tyr Gln Leu Met Thr Gln His Trp Gly Leu Asp Val Pro	
155 160 165	

aac ctc ctc atc tcc gtg acc ggt ggg gcc aag aac ttc aac atg aag	581
Asn Leu Leu Ile Ser Val Thr Gly Gly Ala Lys Asn Phe Asn Met Lys	
170	175
ctg agg ctg aag agc atc ttc cgg aga ggc ttg gtc aag gtg gct caa	629
Leu Arg Leu Lys Ser Ile Phe Arg Arg Gly Leu Val Lys Val Ala Gln	
185	190
acc acg ggg gcc tgg atc atc act gga gga tcc cac aca ggc gtg atg	677
Thr Thr Gly Ala Trp Ile Ile Thr Gly Gly Ser His Thr Gly Val Met	
200	205
aag cag gtg ggc gaa gcg gta cgg gac ttc agt ctg agc agc agc tgc	725
Lys Gln Val Gly Glu Ala Val Arg Asp Phe Ser Leu Ser Ser Ser Cys	
215	220
aaa gaa ggt gaa gtc atc act att ggc gta gcc acg tgg ggc acc atc	773
Lys Glu Gly Glu Val Ile Thr Ile Gly Val Ala Thr Trp Gly Thr Ile	
235	240
cac aac cgc gag gga ctg atc cat ccc atg gga ggc ttc ccc gcc gag	821
His Asn Arg Glu Gly Leu Ile His Pro Met Gly Gly Phe Pro Ala Glu	
250	255
tac atg ctg gat gag gaa ggc caa ggg aac ctg acc tgc ttg gac agc	869
Tyr Met Leu Asp Glu Glu Gly Gln Gly Asn Leu Thr Cys Leu Asp Ser	
265	270
aac cat tcc cac ttc atc ttg gtg gat gat ggg acc cac ggg caa tat	917
Asn His Ser His Phe Ile Leu Val Asp Asp Gly Thr His Gly Gln Tyr	
280	285
ggt gtg gag att ccg ctg agg act aag ctg gaa aag ttc atc tca gag	965
Gly Val Glu Ile Pro Leu Arg Thr Lys Leu Glu Lys Phe Ile Ser Glu	
295	300

caa acg aag gaa agg gga ggt gtg gcc atc aag atc ccc att gtc tgc 1013  
 Gln Thr Lys Glu Arg Gly Gly Val Ala Ile Lys Ile Pro Ile Val Cys  
                   315                                  320                                  325

gtg gtg ttg gag ggt ggc cct ggc act ctg cat aca atc tac aat gcc 1061  
 Val Val Leu Glu Gly Gly Pro Gly Thr Leu His Thr Ile Tyr Asn Ala  
                   330                                  335                                  340

atc aac aat ggc aca ccc tgc gtg ata gtg gag ggc tct ggc cga gtg 1109  
 Ile Asn Asn Gly Thr Pro Cys Val Ile Val Glu Gly Ser Gly Arg Val  
                   345                                  350                                  355

gct gac gtc atc gct cag gta gct act ctg cct gtc tct gag atc acc 1157  
 Ala Asp Val Ile Ala Gln Val Ala Thr Leu Pro Val Ser Glu Ile Thr  
                   360                                  365                                  370

atc tcc ttg atc cag cag aag ctc agc ata ttc ttc cag gag atg ttt 1205  
 Ile Ser Leu Ile Gln Gln Lys Leu Ser Ile Phe Phe Gln Glu Met Phe  
 375                                  380                                  385                                  390

gag act ttc acc gaa aac cag att gtg gaa tgg acc aaa aag atc caa 1253  
 Glu Thr Phe Thr Glu Asn Gln Ile Val Glu Trp Thr Lys Lys Ile Gln  
                   395                                  400                                  405

gac att gtc cgg agg cgg cag ctg ctg acg atc ttc cgg gaa ggc aag 1301  
 Asp Ile Val Arg Arg Arg Gln Leu Leu Thr Ile Phe Arg Glu Gly Lys  
                   410                                  415                                  420

gat ggt cag cag gat gtg gat gtg gcc att ctg cag gcg tta ctg aaa 1349  
 Asp Gly Gln Gln Asp Val Asp Val Ala Ile Leu Gln Ala Leu Leu Lys  
                   425                                  430                                  435

gcc tct cga agc caa gac cac ttt ggc cac gag aac tgg gac cac caa 1397  
 Ala Ser Arg Ser Gln Asp His Phe Gly His Glu Asn Trp Asp His Gln  
                   440                                  445                                  450

ctg aag ttg got gtg gcc tgg aac cgc gtg gac atc gct cgc agt gag	1445
Leu Lys Leu Ala Val Ala Trp Asn Arg Val Asp Ile Ala Arg Ser Glu	
455	460
465	470
atc ttc acc gat gaa tgg cag tgg aag cct gca gat ctg cat ccc atg	1493
Ile Phe Thr Asp Glu Trp Gln Trp Lys Pro Ala Asp Leu His Pro Met	
475	480
485	
atg acg gcc gct ctc atc tcc aac aag cct gag ttc gtg agg ctc ttt	1541
Met Thr Ala Ala Leu Ile Ser Asn Lys Pro Glu Phe Val Arg Leu Phe	
490	495
500	
ctg gag aat ggg gtg cgg ctc aag gag ttt gtc act tgg gat act ctt	1589
Leu Glu Asn Gly Val Arg Leu Lys Glu Phe Val Thr Trp Asp Thr Leu	
505	510
515	
ctc tgc ctg tac gag aac ctg gag ccg tcc tgt ctc ttc cac agc aag	1637
Leu Cys Leu Tyr Glu Asn Leu Glu Pro Ser Cys Leu Phe His Ser Lys	
520	525
530	
cta cag aag gtg ctg gcc gaa gaa cag cgc tta gcc tat gca tct gca	1685
Leu Gln Lys Val Leu Ala Glu Glu Gln Arg Leu Ala Tyr Ala Ser Ala	
535	540
545	550
aca ccc cgc ctg cac atg cac cat gtg gcc cag gtg ctt cgt gaa ctc	1733
Thr Pro Arg Leu His Met His His Val Ala Gln Val Leu Arg Glu Leu	
555	560
565	
ctg ggg gac tcc acg cag ctg ctg tac ccc cgg ccc cgg tac act gac	1781
Leu Gly Asp Ser Thr Gln Leu Leu Tyr Pro Arg Pro Arg Tyr Thr Asp	
570	575
580	
agg cca cgg ctc tcg atg acc gtg cca cac atc aag ctg aac gtg cag	1829
Arg Pro Arg Leu Ser Met Thr Val Pro His Ile Lys Leu Asn Val Gln	
585	590
595	

gga gtg agc ctc cgg tcc ctc tat aag cga tca aca ggc cac gtt acc 1877  
 Gly Val Ser Leu Arg Ser Leu Tyr Lys Arg Ser Thr Gly His Val Thr  
 600 605 610

ttc acc att gac cca gtc cgt gac ctt ctc att tgg gcc gtt atc cag 1925  
 Phe Thr Ile Asp Pro Val Arg Asp Leu Leu Ile Trp Ala Val Ile Gln  
 615 620 625 630

aac cac agg gag ctg gca ggc atc atc tgg gct cag agt cag gac tgt 1973  
 Asn His Arg Glu Leu Ala Gly Ile Ile Trp Ala Gln Ser Gln Asp Cys  
 635 640 645

act gcc gca gca ctg gcc tgt agc aag atc ctg aag gag ctg tcc aag 2021  
 Thr Ala Ala Ala Leu Ala Cys Ser Lys Ile Leu Lys Glu Leu Ser Lys  
 650 655 660

gag gag gaa gat aca gac agc tct gag gag atg ctg gca ctg gca gac 2069  
 Glu Glu Glu Asp Thr Asp Ser Ser Glu Glu Met Leu Ala Leu Ala Asp  
 665 670 675

gag ttt gag cac aga gct ata ggc gtc ttc act gag tgc tac agg aag 2117  
 Glu Phe Glu His Arg Ala Ile Gly Val Phe Thr Glu Cys Tyr Arg Lys  
 680 685 690

gat gag gaa aga gcc cag aag ctg ctt gtc cgt gtg tct gag gcc tgg 2165  
 Asp Glu Glu Arg Ala Gln Lys Leu Leu Val Arg Val Ser Glu Ala Trp  
 695 700 705 710

ggg aag acc acc tgc ctg cag ctg gcc cta gag gcc aag gac atg aaa 2213  
 Gly Lys Thr Thr Cys Leu Gln Leu Ala Leu Glu Ala Lys Asp Met Lys  
 715 720 725

ttc gtg tct cat gga ggc atc cag gct ttc cta acc aag gtg tgg tgg 2261  
 Phe Val Ser His Gly Gly Ile Gln Ala Phe Leu Thr Lys Val Trp Trp  
 730 735 740



gcg acg ctg tac cct ggg cgc atc atc ctg tct ttg gac ttc atc atg 2741  
 Ala Thr Leu Tyr Pro Gly Arg Ile Ile Leu Ser Leu Asp Phe Ile Met  
                   890                                  895                                  900

ttc tgt ctc cgt ctc atg cac atc ttc act att agc aag aca ctg ggg 2789  
 Phe Cys Leu Arg Leu Met His Ile Phe Thr Ile Ser Lys Thr Leu Gly  
                   905                                  910                                  915

ccc aag ata atc atc gtg aag cgg atg atg aag gac gtc ttc ttc ttc 2837  
 Pro Lys Ile Ile Ile Val Lys Arg Met Met Lys Asp Val Phe Phe Phe  
                   920                                  925                                  930

ctc ttt ctc ctg gcg gtg tgg gtg gtg tcc ttc ggc gta gct aag cag 2885  
 Leu Phe Leu Leu Ala Val Trp Val Val Ser Phe Gly Val Ala Lys Gln  
 935                                  940                                  945                                  950

gcc att ctc ata cat aac gag agc cgc gtg gac tgg atc ttc cgt ggg 2933  
 Ala Ile Leu Ile His Asn Glu Ser Arg Val Asp Trp Ile Phe Arg Gly  
                                   955                                  960                                  965

gtt gtc tat cac tct tac ctg acc atc ttt ggc cag atc cca acc tac 2981  
 Val Val Tyr His Ser Tyr Leu Thr Ile Phe Gly Gln Ile Pro Thr Tyr  
                                   970                                  975                                  980

att gac ggt gtg aat ttc agc atg gac cag tgc agc ccc aat ggc acg 3029  
 Ile Asp Gly Val Asn Phe Ser Met Asp Gln Cys Ser Pro Asn Gly Thr  
                   985                                  990                                  995

gac ccc tac aag cct aag tgt cct gag agc gac tgg acg gga cag gca 3077  
 Asp Pro Tyr Lys Pro Lys Cys Pro Glu Ser Asp Trp Thr Gly Gln Ala  
                   1000                                  1005                                  1010

cct gcc ttc ccc gag tgg ctg act gtc acc ctg ctc tgc ctc tac ctg 3125  
 Pro Ala Phe Pro Glu Trp Leu Thr Val Thr Leu Leu Cys Leu Tyr Leu  
 1015                                  1020                                  1025                                  1030

ctc ttt gcc aac atc ctg ctg ctt aac ctg ctc atc gcc atg ttc aac	3173
Leu Phe Ala Asn Ile Leu Leu Leu Asn Leu Leu Ile Ala Met Phe Asn	
1035 1040 1045	
tac acc ttc cag gag gtg cag gaa cac aca gac cag atc tgg aaa ttc	3221
Tyr Thr Phe Gln Glu Val Gln Glu His Thr Asp Gln Ile Trp Lys Phe	
1050 1055 1060	
cag cgc cac gac ctg atc gag gag tac cat ggc cgt ccc ccg gca cct	3269
Gln Arg His Asp Leu Ile Glu Glu Tyr His Gly Arg Pro Pro Ala Pro	
1065 1070 1075	
ccc cca ctc atc ctc ctc agc cac ctg cag ctc ctg atc aag agg att	3317
Pro Pro Leu Ile Leu Leu Ser His Leu Gln Leu Leu Ile Lys Arg Ile	
1080 1085 1090	
gtc ctg aag atc cct gcc aag agg cat aag cag ctc aag aac aag ctg	3365
Val Leu Lys Ile Pro Ala Lys Arg His Lys Gln Leu Lys Asn Lys Leu	
1095 1100 1105 1110	
gag aag aac gag gag aca gcg ctc ctg tct tgg gaa ctg tac ctg aag	3413
Glu Lys Asn Glu Glu Thr Ala Leu Leu Ser Trp Glu Leu Tyr Leu Lys	
1115 1120 1125	
gag aac tac ctg cag aac cag cag tac cag cag aaa cag cgt cca gag	3461
Glu Asn Tyr Leu Gln Asn Gln Gln Tyr Gln Gln Lys Gln Arg Pro Glu	
1130 1135 1140	
cag aaa atc caa gac atc agt gag aaa gtg gac acc atg gtg gat ctg	3509
Gln Lys Ile Gln Asp Ile Ser Glu Lys Val Asp Thr Met Val Asp Leu	
1145 1150 1155	
ctg gac atg gac cag gtg aag agg tca ggc tcc aca gag cag aga ctg	3557
Leu Asp Met Asp Gln Val Lys Arg Ser Gly Ser Thr Glu Gln Arg Leu	
1160 1165 1170	



ttc ccg tgt gaa ccc cat ggg ccg cga cag ggt tgc tgt ggt cgt ggg	4037
Phe Pro Cys Glu Pro His Gly Pro Arg Gln Gly Cys Cys Gly Arg Gly	
1320 1325 1330	
agc ctc agc tgg ttt ggt ccc aac cac act ctg cag cca gtt gtc acc	4085
Ser Leu Ser Trp Phe Gly Pro Asn His Thr Leu Gln Pro Val Val Thr	
1335 1340 1345 1350	
cgg tgg aag agg aac cag ggt gga gcc atc tgc cgg aag agt gtc agg	4133
Arg Trp Lys Arg Asn Gln Gly Gly Ala Ile Cys Arg Lys Ser Val Arg	
1355 1360 1365	
aag atg ctg gag gtg cta gtg atg aag ctg cct cgc tct gag cac tgg	4181
Lys Met Leu Glu Val Leu Val Met Lys Leu Pro Arg Ser Glu His Trp	
1370 1375 1380	
gcc ttg cct ggg ggc tct agg gag cca ggg gag atg cta cca cgg aag	4229
Ala Leu Pro Gly Gly Ser Arg Glu Pro Gly Glu Met Leu Pro Arg Lys	
1385 1390 1395	
ctg aaa cgg gtc ctc cgg cag gag ttc tgg gtg gcc ttt gag acc ttg	4277
Leu Lys Arg Val Leu Arg Gln Glu Phe Trp Val Ala Phe Glu Thr Leu	
1400 1405 1410	
ctg atg caa ggt aca gag gta tac aaa ggg tac gtg gat gac cca agg	4325
Leu Met Gln Gly Thr Glu Val Tyr Lys Gly Tyr Val Asp Asp Pro Arg	
1415 1420 1425 1430	
aac aca gac aat gcc tgg atc gag aca gtg gct gtc agc atc cat ttt	4373
Asn Thr Asp Asn Ala Trp Ile Glu Thr Val Ala Val Ser Ile His Phe	
1435 1440 1445	
cag gac cag aat gat atg gag ctg aag agg ctg gaa gag aac ctg cac	4421
Gln Asp Gln Asn Asp Met Glu Leu Lys Arg Leu Glu Glu Asn Leu His	
1450 1455 1460	

act cat gat cca aag gag ttg acc cgt gac ctg aag ctg tct act gaa 4469  
 Thr His Asp Pro Lys Glu Leu Thr Arg Asp Leu Lys Leu Ser Thr Glu  
 1465 1470 1475

tgg cag gtg gta gac cgg cgg atc cct ctg tat gcg aac cac aag acc 4517  
 Trp Gln Val Val Asp Arg Arg Ile Pro Leu Tyr Ala Asn His Lys Thr  
 1480 1485 1490

atc ctc cag aag gtg gcc tca ctg ttt gga gct cac ttc tga 4559  
 Ile Leu Gln Lys Val Ala Ser Leu Phe Gly Ala His Phe  
 1495 1500 1505

ctgtggcttc tgggccacaa tggcccccca agacttggac tgctgtcttg ggctggatgg 4619

ctggttgggg tactgggttg gggtggttg taggtttag ggctgggttg ggtgaccaca 4679

gggatcttaa taagtcccca gaggtgatgt cctgaaagcc acttctgcca caacaggaag 4739

gtcacaagca taaggacaga agtgtattca gtggtcctg ctacctatgt cctcaagtgc 4799

catgctttg 4808

<210> 14

<211> 1507

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 14

Met Glu Ser Leu Asp Arg Arg Arg Thr Gly Ser Glu Gln Glu Glu Gly  
 1 5 10 15  
 Phe Gly Val Gln Ser Arg Arg Ala Thr Asp Leu Gly Met Val Pro Asn  
 20 25 30  
 Leu Arg Arg Ser Asn Ser Ser Leu Cys Lys Ser Arg Arg Phe Leu Cys  
 35 40 45

Ser Phe Ser Ser Glu Lys Gln Glu Asn Leu Ser Ser Trp Ile Pro Glu  
 50 55 60  
 Asn Ile Lys Lys Lys Glu Cys Val Tyr Phe Val Glu Ser Ser Lys Leu  
 65 70 75 80  
 Ser Asp Ala Gly Lys Val Val Cys Ala Cys Gly Tyr Thr His Glu Gln  
 85 90 95  
 His Leu Glu Val Ala Ile Lys Pro His Thr Phe Gln Gly Lys Glu Trp  
 100 105 110  
 Asp Pro Lys Lys His Val Gln Glu Met Pro Thr Asp Ala Phe Gly Asp  
 115 120 125  
 Ile Val Phe Thr Asp Leu Ser Gln Lys Val Gly Lys Tyr Val Arg Val  
 130 135 140  
 Ser Gln Asp Thr Pro Ser Ser Val Ile Tyr Gln Leu Met Thr Gln His  
 145 150 155 160  
 Trp Gly Leu Asp Val Pro Asn Leu Leu Ile Ser Val Thr Gly Gly Ala  
 165 170 175  
 Lys Asn Phe Asn Met Lys Leu Arg Leu Lys Ser Ile Phe Arg Arg Gly  
 180 185 190  
 Leu Val Lys Val Ala Gln Thr Thr Gly Ala Trp Ile Ile Thr Gly Gly  
 195 200 205  
 Ser His Thr Gly Val Met Lys Gln Val Gly Glu Ala Val Arg Asp Phe  
 210 215 220  
 Ser Leu Ser Ser Ser Cys Lys Glu Gly Glu Val Ile Thr Ile Gly Val  
 225 230 235 240  
 Ala Thr Trp Gly Thr Ile His Asn Arg Glu Gly Leu Ile His Pro Met  
 245 250 255  
 Gly Gly Phe Pro Ala Glu Tyr Met Leu Asp Glu Glu Gly Gln Gly Asn  
 260 265 270  
 Leu Thr Cys Leu Asp Ser Asn His Ser His Phe Ile Leu Val Asp Asp  
 275 280 285  
 Gly Thr His Gly Gln Tyr Gly Val Glu Ile Pro Leu Arg Thr Lys Leu  
 290 295 300  
 Glu Lys Phe Ile Ser Glu Gln Thr Lys Glu Arg Gly Gly Val Ala Ile  
 305 310 315 320  
 Lys Ile Pro Ile Val Cys Val Val Leu Glu Gly Gly Pro Gly Thr Leu  
 325 330 335

His Thr Ile Tyr Asn Ala Ile Asn Asn Gly Thr Pro Cys Val Ile Val  
 340 345 350  
 Glu Gly Ser Gly Arg Val Ala Asp Val Ile Ala Gln Val Ala Thr Leu  
 355 360 365  
 Pro Val Ser Glu Ile Thr Ile Ser Leu Ile Gln Gln Lys Leu Ser Ile  
 370 375 380  
 Phe Phe Gln Glu Met Phe Glu Thr Phe Thr Glu Asn Gln Ile Val Glu  
 385 390 395 400  
 Trp Thr Lys Lys Ile Gln Asp Ile Val Arg Arg Arg Gln Leu Leu Thr  
 405 410 415  
 Ile Phe Arg Glu Gly Lys Asp Gly Gln Gln Asp Val Asp Val Ala Ile  
 420 425 430  
 Leu Gln Ala Leu Leu Lys Ala Ser Arg Ser Gln Asp His Phe Gly His  
 435 440 445  
 Glu Asn Trp Asp His Gln Leu Lys Leu Ala Val Ala Trp Asn Arg Val  
 450 455 460  
 Asp Ile Ala Arg Ser Glu Ile Phe Thr Asp Glu Trp Gln Trp Lys Pro  
 465 470 475 480  
 Ala Asp Leu His Pro Met Met Thr Ala Ala Leu Ile Ser Asn Lys Pro  
 485 490 495  
 Glu Phe Val Arg Leu Phe Leu Glu Asn Gly Val Arg Leu Lys Glu Phe  
 500 505 510  
 Val Thr Trp Asp Thr Leu Leu Cys Leu Tyr Glu Asn Leu Glu Pro Ser  
 515 520 525  
 Cys Leu Phe His Ser Lys Leu Gln Lys Val Leu Ala Glu Glu Gln Arg  
 530 535 540  
 Leu Ala Tyr Ala Ser Ala Thr Pro Arg Leu His Met His His Val Ala  
 545 550 555 560  
 Gln Val Leu Arg Glu Leu Leu Gly Asp Ser Thr Gln Leu Leu Tyr Pro  
 565 570 575  
 Arg Pro Arg Tyr Thr Asp Arg Pro Arg Leu Ser Met Thr Val Pro His  
 580 585 590  
 Ile Lys Leu Asn Val Gln Gly Val Ser Leu Arg Ser Leu Tyr Lys Arg  
 595 600 605  
 Ser Thr Gly His Val Thr Phe Thr Ile Asp Pro Val Arg Asp Leu Leu  
 610 615 620

Ile Trp Ala Val Ile Gln Asn His Arg Glu Leu Ala Gly Ile Ile Trp  
 625 630 635 640  
 Ala Gln Ser Gln Asp Cys Thr Ala Ala Ala Leu Ala Cys Ser Lys Ile  
 645 650 655  
 Leu Lys Glu Leu Ser Lys Glu Glu Glu Asp Thr Asp Ser Ser Glu Glu  
 660 665 670  
 Met Leu Ala Leu Ala Asp Glu Phe Glu His Arg Ala Ile Gly Val Phe  
 675 680 685  
 Thr Glu Cys Tyr Arg Lys Asp Glu Glu Arg Ala Gln Lys Leu Leu Val  
 690 695 700  
 Arg Val Ser Glu Ala Trp Gly Lys Thr Thr Cys Leu Gln Leu Ala Leu  
 705 710 715 720  
 Glu Ala Lys Asp Met Lys Phe Val Ser His Gly Gly Ile Gln Ala Phe  
 725 730 735  
 Leu Thr Lys Val Trp Trp Gly Gln Leu Cys Val Asp Asn Gly Leu Trp  
 740 745 750  
 Arg Ile Ile Leu Cys Met Leu Ala Phe Pro Leu Leu Phe Thr Gly Phe  
 755 760 765  
 Ile Ser Phe Arg Glu Lys Arg Leu Gln Ala Leu Cys Arg Pro Ala Arg  
 770 775 780  
 Val Arg Ala Phe Phe Asn Ala Pro Val Val Ile Phe His Met Asn Ile  
 785 790 795 800  
 Leu Ser Tyr Phe Ala Phe Leu Cys Leu Phe Ala Tyr Val Leu Met Val  
 805 810 815  
 Asp Phe Gln Pro Ser Pro Ser Trp Cys Glu Tyr Leu Ile Tyr Leu Trp  
 820 825 830  
 Leu Phe Ser Leu Val Cys Glu Glu Thr Arg Gln Leu Phe Tyr Asp Pro  
 835 840 845  
 Asp Gly Cys Gly Leu Met Lys Met Ala Ser Leu Tyr Phe Ser Asp Phe  
 850 855 860  
 Trp Asn Lys Leu Asp Val Gly Ala Ile Leu Leu Phe Ile Val Gly Leu  
 865 870 875 880  
 Thr Cys Arg Leu Ile Pro Ala Thr Leu Tyr Pro Gly Arg Ile Ile Leu  
 885 890 895  
 Ser Leu Asp Phe Ile Met Phe Cys Leu Arg Leu Met His Ile Phe Thr  
 900 905 910

Ile Ser Lys Thr Leu Gly Pro Lys Ile Ile Ile Val Lys Arg Met Met  
 915 920 925  
 Lys Asp Val Phe Phe Phe Leu Phe Leu Leu Ala Val Trp Val Val Ser  
 930 935 940  
 Phe Gly Val Ala Lys Gln Ala Ile Leu Ile His Asn Glu Ser Arg Val  
 945 950 955 960  
 Asp Trp Ile Phe Arg Gly Val Val Tyr His Ser Tyr Leu Thr Ile Phe  
 965 970 975  
 Gly Gln Ile Pro Thr Tyr Ile Asp Gly Val Asn Phe Ser Met Asp Gln  
 980 985 990  
 Cys Ser Pro Asn Gly Thr Asp Pro Tyr Lys Pro Lys Cys Pro Glu Ser  
 995 1000 1005  
 Asp Trp Thr Gly Gln Ala Pro Ala Phe Pro Glu Trp Leu Thr Val Thr  
 1010 1015 1020  
 Leu Leu Cys Leu Tyr Leu Leu Phe Ala Asn Ile Leu Leu Leu Asn Leu  
 1025 1030 1035 1040  
 Leu Ile Ala Met Phe Asn Tyr Thr Phe Gln Glu Val Gln Glu His Thr  
 1045 1050 1055  
 Asp Gln Ile Trp Lys Phe Gln Arg His Asp Leu Ile Glu Glu Tyr His  
 1060 1065 1070  
 Gly Arg Pro Pro Ala Pro Pro Pro Leu Ile Leu Leu Ser His Leu Gln  
 1075 1080 1085  
 Leu Leu Ile Lys Arg Ile Val Leu Lys Ile Pro Ala Lys Arg His Lys  
 1090 1095 1100  
 Gln Leu Lys Asn Lys Leu Glu Lys Asn Glu Glu Thr Ala Leu Leu Ser  
 1105 1110 1115 1120  
 Trp Glu Leu Tyr Leu Lys Glu Asn Tyr Leu Gln Asn Gln Gln Tyr Gln  
 1125 1130 1135  
 Gln Lys Gln Arg Pro Glu Gln Lys Ile Gln Asp Ile Ser Glu Lys Val  
 1140 1145 1150  
 Asp Thr Met Val Asp Leu Leu Asp Met Asp Gln Val Lys Arg Ser Gly  
 1155 1160 1165  
 Ser Thr Glu Gln Arg Leu Ala Ser Leu Glu Glu Gln Val Thr Gln Val  
 1170 1175 1180  
 Thr Arg Ala Leu His Trp Ile Val Thr Thr Leu Lys Asp Ser Gly Phe  
 1185 1190 1195 1200

Gly Ser Gly Ala Gly Ala Leu Thr Leu Ala Pro Gln Arg Ala Phe Asp  
 1205 1210 1215  
 Glu Pro Asp Ala Glu Leu Ser Ile Arg Arg Lys Val Glu Glu Pro Gly  
 1220 1225 1230  
 Asp Gly Tyr His Val Ser Ala Arg His Leu Leu Tyr Pro Asn Ala Arg  
 1235 1240 1245  
 Ile Met Arg Phe Pro Val Pro Asn Glu Lys Val Pro Trp Ala Ala Glu  
 1250 1255 1260  
 Phe Leu Ile Tyr Asp Pro Pro Phe Tyr Thr Ala Glu Lys Asp Val Ala  
 1265 1270 1275 1280  
 Leu Thr Asp Pro Val Gly Asp Thr Ala Glu Pro Leu Ser Lys Ile Ser  
 1285 1290 1295  
 Tyr Asn Val Val Asp Gly Pro Thr Asp Arg Arg Ser Phe His Gly Val  
 1300 1305 1310  
 Tyr Val Val Glu Tyr Gly Phe Pro Cys Glu Pro His Gly Pro Arg Gln  
 1315 1320 1325  
 Gly Cys Cys Gly Arg Gly Ser Leu Ser Trp Phe Gly Pro Asn His Thr  
 1330 1335 1340  
 Leu Gln Pro Val Val Thr Arg Trp Lys Arg Asn Gln Gly Gly Ala Ile  
 1345 1350 1355 1360  
 Cys Arg Lys Ser Val Arg Lys Met Leu Glu Val Leu Val Met Lys Leu  
 1365 1370 1375  
 Pro Arg Ser Glu His Trp Ala Leu Pro Gly Gly Ser Arg Glu Pro Gly  
 1380 1385 1390  
 Glu Met Leu Pro Arg Lys Leu Lys Arg Val Leu Arg Gln Glu Phe Trp  
 1395 1400 1405  
 Val Ala Phe Glu Thr Leu Leu Met Gln Gly Thr Glu Val Tyr Lys Gly  
 1410 1415 1420  
 Tyr Val Asp Asp Pro Arg Asn Thr Asp Asn Ala Trp Ile Glu Thr Val  
 1425 1430 1435 1440  
 Ala Val Ser Ile His Phe Gln Asp Gln Asn Asp Met Glu Leu Lys Arg  
 1445 1450 1455  
 Leu Glu Glu Asn Leu His Thr His Asp Pro Lys Glu Leu Thr Arg Asp  
 1460 1465 1470  
 Leu Lys Leu Ser Thr Glu Trp Gln Val Val Asp Arg Arg Ile Pro Leu  
 1475 1480 1485

Tyr Ala Asn His Lys Thr Ile Leu Gln Lys Val Ala Ser Leu Phe Gly

1490

1495

1500

Ala His Phe

1505

<210> 15

<211> 20

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 15

gtctctgtcc tcgggtgaat

20

<210> 16

<211> 20

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 16

caaagcatgg cacttgagga

20

<210> 17

<211> 18

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 17

tctatcccaa tgcccgca

18

<210> 18

<211> 18

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 18

aaactctgcc gcccaagg

18

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP02/08128
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int.Cl. <sup>7</sup> C12Q1/02, C12N15/12, C07K14/47, C12N5/10, C12P21/02, A61K38/17		
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) Int.Cl. <sup>7</sup> C12Q1/02, C12N15/12, C07K14/47, C12N5/10, C12P21/02, A61K38/17		
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 practicable, search terms used) SwissProt/PIR/GeneSeq, WPI(DIALOG), BIOSIS(DIALOG), JICST FILE(JOIS), MEDLINE(STN)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	WO 00/29571 A1 (Eiken Chemical Co., Ltd.), 25 May, 2000 (25.05.00), & EP 1048727 A1	3-8 1
X Y	WO 00/40614 A2 (Beth Israel Deaconess Medical Center, Inc.), 13 July, 2000 (13.07.00), & EP 1141017 A2	3-8 1
X Y	NAGAMINE, K. et al., Molecular Cloning of a Novel Putative Ca <sup>2+</sup> Channel Protein (TRPC7) Highly Expressed in Brain. Genomics, Vol.54, pages 124 to 131(1998)	3-8 1
Y	SANO, Y. et al., Immuncyte Ca <sup>2+</sup> influx system mediated by LTRPC2. Science, 17 August, 2001 (17.08.01), Vol.293, NO.5533, pages 1327 to 1330	1
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family 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 "I" document which may throw doubts on priority claims 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 05 September, 2002 (05.09.02)		Date of mailing of the international search report 01 October, 2002 (01.10.02)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP02/08128
<b>Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)</b>		
This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:		
1.	<input type="checkbox"/> Claims Nos.:	because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2.	<input checked="" type="checkbox"/> Claims Nos.: 2	because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically: The "substance" as set forth in claim 2 is specified by "the screening method as set forth in claim 1" and thus involves any substances obtained by the method. However, no specific substance obtained by the method is given in the description. Accordingly, (continued to extra sheet)
3.	<input type="checkbox"/> Claims Nos.:	because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).
<b>Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)</b>		
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:		
1.	<input type="checkbox"/>	As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.	<input type="checkbox"/>	As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.	<input type="checkbox"/>	As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.	<input type="checkbox"/>	No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
<b>Remark on Protest</b>	<input type="checkbox"/>	The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
	<input type="checkbox"/>	No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/JP02/08128

Continuation of Box No. I-2 of continuation of first sheet (1)

claim 2 is neither supported by the description nor disclosed therein.  
Moreover, claim 2 is described in an extremely unclear manner.

国際調査報告		国際出願番号 PCI/JP02/08128	
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl <sup>8</sup> C12Q1/02, C12N15/12, C07K14/47, C12N5/10, C12P21/02, A61K38/17			
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl <sup>8</sup> C12Q1/02, C12N15/12, C07K14/47, C12N5/10, C12P21/02, A61K38/17			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの			
国際調査で利用した電子データベース (データベースの名称、調査に利用した用語) SwissProt/PIR/Geneseq, WPI(DIALOG), BIOSIS(DIALOG), JICSTファイル(JOIS), MEDLINE(STN)			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号	
X Y	WO 00/29571 A1 (栄研化学株式会社) 2000.05.25 & EP 1048727 A1	3-8 1	
X Y	WO 00/40614 A2 (Beth Israel deaconess Medical Center, Inc.) 2000.07.13 & EP 1141017 A2	3-8 1	
X Y	Nagamine, K. et al., Molecular Cloning of a Novel Putative Ca <sup>2+</sup> Channel Protein (TRPC7) Highly Expressed in Brain. Genomics, Vol. 54, pp.124-131 (1998)	3-8 1	
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。		<input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。	
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「I」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ従先権の主張の基礎となる出願 の日に後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献			
国際調査を完了した日 05.09.02		国際調査報告の発送日 01.10.02	
国際調査機関の名称及び先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 田村 明 照 (三印)	4B 8412
		電話番号 03-3581-1101	内線 3448

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP02/08128
C (続き) 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	Sano, Y. et al., Immunocyte Ca <sup>2+</sup> influx system mediated by LTRPC2. Science, 2001 Aug 17, Vol. 293, No. 5533, pp. 1327-1330	1

国際調査報告	国際出願番号 PCT/JP02/08128
<p><b>第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)</b>            法第8条第3項 (PCT17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。</p>	
<p>1. <input type="checkbox"/> 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。つまり、</p>	
<p>2. <input checked="" type="checkbox"/> 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、            請求の範囲2に記載の「物質」は、「請求の範囲1に記載のスクリーニング方法」によって特定されており、当該方法で得られるあらゆる物質を包含するものであるが、明細書中には、当該方法で得られた物質が具体的に記載されていないから、請求の範囲2は明細書による裏付けを欠き、開示も欠き、かつ請求の範囲2の記載は著しく不明瞭である。</p>	
<p>3. <input type="checkbox"/> 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。</p>	
<p><b>第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)</b>            次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるこの国際調査機関は認めた。</p>	
<p>1. <input type="checkbox"/> 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期限内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。</p>	
<p>2. <input type="checkbox"/> 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。</p>	
<p>3. <input type="checkbox"/> 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期限内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。</p>	
<p>4. <input type="checkbox"/> 出願人が必要な追加調査手数料を期限内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。</p>	
<p>追加調査手数料の異議の申立てに関する注意  <input type="checkbox"/> 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。  <input type="checkbox"/> 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。</p>	
<p>様式PCT/ISA/210 (第1ページの続葉(1)) (1998年7月)</p>	

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	F I
A 6 1 P 25/00	A 6 1 P 25/00
A 6 1 P 29/00	A 6 1 P 29/00
A 6 1 P 37/06	A 6 1 P 29/00 1 0 1
A 6 1 P 43/00	A 6 1 P 37/06
C 0 7 K 14/47	A 6 1 P 43/00 1 0 5
C 1 2 N 1/15	A 6 1 P 43/00 1 0 7
C 1 2 N 1/19	C 0 7 K 14/47
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 1/15
C 1 2 N 5/10	C 1 2 N 1/19
C 1 2 P 21/02	C 1 2 N 1/21
C 1 2 Q 1/02	C 1 2 P 21/02 C
G 0 1 N 33/15	C 1 2 Q 1/02
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/15 Z
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/50 Z
G 0 1 N 33/566	G 0 1 N 33/53 D
	G 0 1 N 33/53 M
	G 0 1 N 33/566
	C 1 2 N 5/00 A

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW, ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES, FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,N Z,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 三宅 哲  
茨城県つくば市御幸が丘 2 1 山之内製薬株式会社内  
(72)発明者 横井 宏理  
茨城県つくば市御幸が丘 2 1 山之内製薬株式会社内  
(72)発明者 野沢 桂  
茨城県つくば市御幸が丘 2 1 山之内製薬株式会社内  
(72)発明者 望月 忍  
茨城県つくば市御幸が丘 2 1 山之内製薬株式会社内

(注) この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。

专利名称(译)	细胞死亡抑制剂筛选方法		
公开(公告)号	<a href="#">JPWO2003033727A1</a>	公开(公告)日	2005-02-03
申请号	JP2003536450	申请日	2002-08-08
申请(专利权)人(译)	山之内制药有限公司		
[标]发明人	佐野頼方 稻村耕平 三宅哲 横井宏理 野沢桂 望月忍		
发明人	佐野 頼方 稻村 耕平 三宅 哲 横井 宏理 野沢 桂 望月 忍		
IPC分类号	C12N15/09 A61K45/00 A61P1/18 A61P9/00 A61P19/02 A61P25/00 A61P29/00 A61P37/06 A61P43/00 C07K14/47 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/12 C12P21/02 C12Q1/02 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/566		
CPC分类号	A61P1/18 A61P19/02 A61P25/00 A61P29/00 G01N33/5008 G01N33/507 G01N33/566 G01N2500/10 G01N2510/00		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K45/00 A61P1/18 A61P9/00 A61P19/02 A61P25/00 A61P29/00 A61P29/00.101 A61P37/06 A61P43/00.105 A61P43/00.107 C07K14/47 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02.C C12Q1/02 G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566 C12N5/00.A		
代理人(译)	矢野惠美子		
优先权	2001315339 2001-10-12 JP 2002021175 2002-01-30 JP		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

抑制由PARP激活引起的细胞死亡的物质，尤其是类风湿性关节炎，脑缺血期间的神经元细胞死亡，心肌梗死再灌注后的心脏细胞死亡，胰腺Langerhans beta细胞自身免疫破坏 还提供了一种筛选物质的方法，所述物质可用作由于休克或免疫细胞死亡后的细胞死亡而引起的炎症反应的治疗剂和/或预防剂。 它还提供了一种新型蛋白质和一种编码该蛋白质的新型基因。 筛选方法包括在能够激活LTRPC2蛋白的条件下使表达LTRPC2蛋白的细胞与测试物质接触的步骤，并分析对LTRPC2蛋白激活的抑制作用。 。 新蛋白是大鼠和小鼠的LTRPC2蛋白，新基因是大鼠和小鼠的LTRPC2基因。