

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A) (11)特許出願公表番号

特表2003 - 502039

(P2003 - 502039A)

(43)公表日 平成15年1月21日(2003.1.21)

(51) Int.Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マコード (参考)
C 1 2 N 15/09	ZNA	A 6 1 K 39/00	H 4 B 0 2 4
A 6 1 K 38/00		48/00	4 B 0 6 3
39/00		A 6 1 P 7/02	4 B 0 6 5
48/00		23/00	4 C 0 8 4
A 6 1 P 7/02		29/00 101	4 C 0 8 5

審査請求 未請求 予備審査請求 (全 85数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001 - 503642(P2001 - 503642)

(86)(22)出願日 平成12年6月6日(2000.6.6)

(85)翻訳文提出日 平成13年12月7日(2001.12.7)

(86)国際出願番号 PCT/BE00/00061

(87)国際公開番号 W000/077198

(87)国際公開日 平成12年12月21日(2000.12.21)

(31)優先権主張番号 9913425.6

(32)優先日 平成11年6月9日(1999.6.9)

(33)優先権主張国 イギリス(GB)

(71)出願人 エノジャン エス.エー.
ベルギー, ベ - 6041 ゴセリエ, リュ
ド プロフ. ジェーネル エ ブラシユ
12

(72)発明者 ゴドフルワ, エドモン
ベルギー, ベ - 1020 ブリュッセル, ア
ヴニユ ド ラロカリア 13

(72)発明者 ボラン, アレックス
ベルギー, ベ - 1701 イッテルバーク,
ガースベークストラート 65

(74)代理人 弁理士 安達 光雄 (外 2名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ダニ唾液腺で発現するタンパク質の同定および分子的特徴付け

(57)【要約】

本発明は、ダニ（より詳細には、節足動物門のイクソデス・リシヌス (*Ixodes ricinus*) ダニ)の唾液腺において発現するタンパク質をコードするDNA配列の分子的特徴付けに関する。吸血の遅い摂食期のときにイクソデス・リシヌスの唾液腺において誘導される遺伝子が特徴付けされた。これらの遺伝子のクローニングは誘導cDNA（遅い摂食期の終わりに唾液腺において発現するmRNAから合成されたもの）から非誘導cDNA（非摂食ダニの唾液腺において発現するmRNAから合成されたもの）を除くことによってサブストラクティブcDNAライブラリーを設立することによって行われた。全長型cDNAライブラリーは興味があると認められる不完全な配列であってサブストラクティブcDNAライブラリーにおいて同定された不完全な配列から出発することによって設立された。本発明には新しく同定されたポリヌクレオチド及び派生ポリヌクレオチドの様々な用途も含まれる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ダニの摂食期のときにダニの唾液腺において誘導されるcDNAライブラリーを作製するための方法であって、

a) ダニの摂食期のときに誘導されるmRNAを選択的にクローニングして対応するcDNAライブラリーを得ること；

b) 工程a) で得られたライブラリーにおいて同定された少なくとも1つの不完全なcDNA配列に対応する全長型cDNAをクローニングすることを含む方法。

【請求項2】 前記ダニがイクソデス・リシヌス(*Ixodes ricinus*)である、請求項1に記載の方法。

【請求項3】 前記誘導された遺伝子は吸血の遅い摂食期のときに誘導される、請求項2に記載の方法。

【請求項4】 a) 非摂食ダニの唾液腺において発現するmRNAから出発して非誘導cDNAを合成すること；

b) 摂食させたダニの唾液腺において発現するmRNAから出発して誘導cDNAを合成すること；

c) 前記誘導cDNAから前記非誘導cDNAを除くこと；

d) 特異的に誘導されたcDNAを単離してクローニングし、それによりサブトラクティブライブラリーを得ること；

e) 対応する全長型の誘導されたcDNAを得ること

を含む、請求項1～3のいずれかに記載の方法。

【請求項5】 f) 前記全長型の誘導されたcDNA分子を配列決定して、既知のポリペプチド配列およびポリヌクレオチド配列と比較することをさらに含む、請求項4に記載の方法。

【請求項6】 全長型cDNAライブラリーが調製され、前記サブトラクティブライブラリーから単離された少なくとも1つの不完全なcDNAによってスクリーニングされる、請求項4および5のいずれかに記載の方法。

【請求項7】 a) 前記サブトラクティブライブラリーの多数のクローンを無作為に配列決定すること；

b) それらのDNA配列およびアミノ酸翻訳配列をDNAデータベースおよびタンパク質データベースと比較すること；

c) 明確なファミリー配列を同定すること；

d) それらの対応する全長型mRNA配列を特徴付けること
を含む、請求項4および5のいずれかに記載の方法。

【請求項8】 前記サブトラクティブライブラリーの不均質性が調べられる、請求項4に記載の方法。

【請求項9】 関連するDNA配列の「誘導」特性が調べられる、請求項1～8のいずれかに記載の方法。

【請求項10】 少なくとも1つの全長型誘導cDNAが、発現ライブラリーをスクリーニングすることによって得られる、請求項1～9のいずれかに記載の方法。

【請求項11】 摂食させたダニの唾液腺から、特に請求項1～10のいずれかに記載される方法によって得られるcDNAライブラリー。

【請求項12】 請求項4に記載される方法によって得られるサブトラクティブcDNAライブラリー。

【請求項13】 請求項6に記載される方法によって得られる全長型cDNAライブラリー。

【請求項14】 摂食のときに誘導される遺伝子を同定するための、請求項11～13のいずれかに記載されるcDNAライブラリーの使用方法。

【請求項15】 請求項11～13のいずれかに記載されるライブラリーに由来するか、または由来し得る核酸。

【請求項16】 ダニの唾液腺から単離されるか、または単離され得るポリヌクレオチドであって、ダニ唾液腺ポリペプチドおよびそのフラグメントをコードするポリヌクレオチドならびに任意の密接に関連するポリヌクレオチドまたは相補的なポリヌクレオチド。

【請求項17】 イクソデス・リシヌス (*Ixodes ricinus*) の唾液腺から単離されるか、または単離され得る、請求項16に記載のポリヌクレオチド。

【請求項18】 イクソデス・リシヌス (*Ixodes ricinus*) の唾液腺 cDNA に対して相補的な、請求項16に記載のポリヌクレオチド。

【請求項19】 配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号11、配列番号12、配列番号13、配列番号14、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号19、配列番号20、配列番号21、配列番号22、配列番号23、配列番号24、配列番号25、配列番号26、配列番号27、配列番号28、配列番号29またはそれらの相補的な配列あるいはそれらのフラグメントからなる群から選択されるヌクレオチド配列を有する、請求項16～18のいずれかに記載のポリヌクレオチド。

【請求項20】 請求項19に記載されるポリヌクレオチドによってコードされるイクソデス・リシヌス (*Ixodes ricinus*) の唾液腺ペプチドをコードするヌクレオチド配列に対して少なくとも75%の同一性を全長について有するポリヌクレオチドをさらに含む、請求項16～19のいずれかに記載のポリヌクレオチド。

【請求項21】 請求項19に記載されるヌクレオチド配列と少なくとも75%の同一性を有するヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドをさらに含む、請求項16～19のいずれかに記載のポリヌクレオチド。

【請求項22】 請求項19に記載されるヌクレオチド配列と少なくとも80%の同一性を有する、請求項16～21のいずれかに記載のポリヌクレオチド。

【請求項23】 請求項19に記載されるヌクレオチド配列と少なくとも90%の同一性を有する、請求項16～21のいずれかに記載のポリヌクレオチド。

【請求項24】 請求項19に記載されるヌクレオチド配列と少なくとも95%の同一性を有する、請求項16～21のいずれかに記載のポリヌクレオチド。

【請求項25】 請求項19に記載されるヌクレオチド配列と少なくとも98%～99%の同一性を有する、請求項16～21のいずれかに記載のポリヌク

レオチド。

【請求項26】 請求項19に記載されるヌクレオチド配列と少なくとも99%の同一性を有する、請求項16～21のいずれかに記載のポリヌクレオチド。

【請求項27】 請求項10に記載されるヌクレオチド配列に対して、増幅のために使用され得る条件のもとで、あるいはプローブまたはマーカースとして使用される条件のもとでハイブリダイゼーションするのに十分な同一性を有するヌクレオチド配列をさらに含む、請求項16～26のいずれかに記載のポリヌクレオチド。

【請求項28】 請求項16～27のいずれかに記載されるポリヌクレオチドによってコードされる単離されたポリペプチドまたはそのフラグメント。

【請求項29】 アミノ酸配列が、請求項16～27のいずれかに記載されるポリヌクレオチドによってコードされるアミノ酸配列に対して少なくとも75%の同一性を有する、請求項28に記載のポリペプチド。

【請求項30】 アミノ酸配列が、請求項16～27のいずれかに記載されるポリヌクレオチドによってコードされるアミノ酸配列に対して少なくとも80%の同一性を有する、請求項28および29のいずれかに記載のポリペプチド。

【請求項31】 アミノ酸配列が、請求項16～27のいずれかに記載されるポリヌクレオチドによってコードされるアミノ酸配列に対して少なくとも90%の同一性を有する、請求項28～30のいずれかに記載のポリペプチド。

【請求項32】 アミノ酸配列が、請求項16～27のいずれかに記載されるポリヌクレオチドによってコードされるアミノ酸配列に対して少なくとも95%～99%の同一性を有する、請求項28～31のいずれかに記載のポリペプチド。

【請求項33】 「成熟」タンパク質の形態にある、請求項28～32のいずれかに記載されるイクソデス・リシヌス (*Ixodes ricinus*) 唾液腺ポリペプチド。

【請求項34】 より大きなタンパク質の一部としての、請求項28～32のいずれかに記載されるイクソデス・リシヌス (*Ixodes ricinus*)

) 唾液腺ポリペプチド。

【請求項35】 融合タンパク質の一部としての、請求項28～32のいずれかに記載されるイクソデス・リシヌス (*Ixodes ricinus*) 唾液腺ポリペプチド。

【請求項36】 分泌配列またはリーダー配列、プロ配列、多数のヒスチジン残基などの精製において役に立つ配列、あるいは組換え体生産時の安定性に必要なさらなる配列を含む少なくとも1つのさらなるアミノ酸配列を含む請求項28～35のいずれかに記載のイクソデス・リシヌス (*Ixodes ricinus*) 唾液腺ポリペプチド。

【請求項37】 請求項28～36のいずれかに記載されるポリペプチドの規定された配列およびフラグメントの変化体。

【請求項38】 基準体と保存的アミノ酸置換により異なる、請求項37に記載の変化体。

【請求項39】 少なくとも1つの残基が、同様な特性を有する別の残基で置換されている、請求項38に記載の変化体。

【請求項40】 前記置換が、Ala、Val、LeuおよびIleの中で；SerおよびThrの中で；酸性残基のAspおよびGluの中で；AsnおよびGlnの中で；塩基性残基のLysおよびArgの中で；芳香族残基のPheおよびTyrの中で行われる、請求項39に記載の変化体。

【請求項41】 数個のアミノ酸が、任意の組み合わせで、置換、欠失または付加されている、請求項37～40のいずれかに記載の変化体。

【請求項42】 5個～10個のアミノ酸が、任意の組み合わせで、置換、欠失または付加されている、請求項37～41のいずれかに記載の変化体。

【請求項43】 1個～5個のアミノ酸が、任意の組み合わせで、置換、欠失または付加されている、請求項37～42のいずれかに記載の変化体。

【請求項44】 1個～2個のアミノ酸が、任意の組み合わせで、置換、欠失または付加されている、請求項37～43のいずれかに記載の変化体。

【請求項45】 イクソデス・リシヌス (*Ixodes ricinus*) の唾液腺に存在するイクソデス・リシヌス唾液腺ポリペプチドの天然に存在する

対立遺伝子変化体である、請求項37～44のいずれかに記載の変化体。

【請求項46】 ダニ唾液腺ポリペプチドに対する哺乳動物宿主における免疫学的応答を誘導させるための免疫学的組成物またはワクチンであって、

- a) 請求項15～27のいずれかに記載されるダニ唾液腺cDNA；
- b) 請求項28～36のいずれかに記載されるダニ唾液腺ポリペプチド；
- c) 成分(a)または(b)のエピトープ含有フラグメント、アナログ、外膜小胞または細胞（弱毒化されているかまたは弱毒化されていない）；
- d) 可能な場合にはキャリア

からなる群の少なくとも1つを含む免疫学的組成物またはワクチン。

【請求項47】 請求項16～27のいずれかに記載されるポリヌクレオチドによってコードされる少なくとも1つのポリペプチドを含有する、抗凝固性を有する治療剤。

【請求項48】 配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号11、配列番号12、配列番号13、配列番号14、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号19、配列番号20、配列番号21、配列番号22、配列番号23、配列番号24、配列番号25、配列番号26、配列番号27、配列番号28、配列番号29またはそれらの相補的な配列あるいはそれらのフラグメントからなる群から選択されるヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドによってコードされる少なくとも1つのポリペプチドを含有する、抗凝固性を有する治療剤。

【請求項49】 配列番号7、配列番号16、配列番号24およびそれらのフラグメントからなる群から選択されるヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドによってコードされる少なくとも1つのポリペプチドを含有する、抗凝固性を有する治療剤。

【請求項50】 請求項16～27のいずれかに記載されるポリヌクレオチドによってコードされる少なくとも1つのポリペプチドを含有する、免疫調節性を有する治療剤。

【請求項51】 配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列

番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号11、配列番号12、配列番号13、配列番号14、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号19、配列番号20、配列番号21、配列番号22、配列番号23、配列番号24、配列番号25、配列番号26、配列番号27、配列番号28、配列番号29またはそれらの相補的な配列あるいはそれらのフラグメントからなる群から選択されるヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドによってコードされる少なくとも1つのポリペプチドを含有する、免疫調節性を有する治療剤。

【請求項52】 配列番号11、配列番号17、配列番号19、配列番号28、配列番号29およびそれらのフラグメントからなる群から選択されるヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドによってコードされる少なくとも1つのポリペプチドを含有する、免疫調節性を有する治療剤。

【請求項53】 ダニによって運搬される病原体の伝搬を防止するために、単独で使用されるか、または特に請求項46に記載される抗ダニワクチンと組み合わせて使用される請求項47～52のいずれかに記載される治療剤。

【請求項54】 配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号11、配列番号12、配列番号13、配列番号14、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号19、配列番号20、配列番号21、配列番号22、配列番号23、配列番号24、配列番号25、配列番号26、配列番号27、配列番号28、配列番号29またはそれらの相補的な配列あるいはそれらのフラグメントからなる群から選択されるヌクレオチド配列と同一であるか、または実質的に同一であるポリヌクレオチドであって、ダニ（より詳細には、イクソデス・リシヌス (*Ixodes ricinus*)）の唾液腺ポリペプチドをコードするcDNAクローンに対するハイブリダイゼーションプローブとして使用されるか、あるいはダニ唾液腺cDNAに類似する他の遺伝子のクローンを単離するために使用されるポリヌクレオチド。

【請求項55】 疾患または疾患に対する罹患性に対する診断キットであって、

(a) ダニ唾液腺ポリヌクレオチド、好ましくは、請求項19に記載される遺伝子配列のいずれかのヌクレオチド配列、またはそのフラグメント；

(b) (a)の配列に対して相補的なヌクレオチド配列；

(c) ダニ唾液腺ポリペプチド、好ましくは、請求項19に記載される遺伝子配列のいずれかによってコードされるポリペプチド、またはそのフラグメント；

(d) ダニ唾液腺ポリペプチドに対する抗体、好ましくは、請求項19に記載される遺伝子配列のいずれかによってコードされるポリペプチドに対する抗体；
または

(e) ダニ唾液腺ポリペプチドに対する抗体を提示するファージ、好ましくは、請求項19に記載されるcDNAのいずれかによってコードされるポリペプチドに対する抗体を提示するファージ

を含み、さらに、(a)、(b)、(c)、(d)または(e)は実質的な構成要素を含み得る診断キット。

【請求項56】 請求項15～27のいずれかに記載される核酸によってコードされるいずれかのポリペプチドに対する抗イクソデス・リシヌス(*Ixodes ricinus*)ポリペプチド抗体。

【請求項57】 請求項28～36のいずれかに記載される少なくとも1つのイクソデス・リシヌス(*Ixodes ricinus*)ポリペプチドを含む免疫化剤。

【請求項58】 哺乳動物において免疫学的応答を誘導するための方法であって、イクソデス・リシヌス(*Ixodes ricinus*)および関連する種の吸血時に伝搬し得る細菌およびウイルスから前記動物を保護するために抗体および/またはT細胞免疫応答を産生させるのに適切な請求項28～36のいずれかに記載される少なくとも1つのイクソデス・リシヌス唾液腺ポリペプチド、あるいはそのエピトープ含有フラグメント、アナログ、外膜小胞または細胞(弱毒化されているかまたは弱毒化されていない)を前記哺乳動物に接種することを含む方法。

【請求項59】 哺乳動物において免疫学的応答を誘導させるための方法であって、疾患(ライム病、ダニ脳炎ウイルス病など)から前記動物を保護するた

めに抗体を産生させるような免疫学的応答を誘導するために、請求項28～36のいずれかに記載される少なくとも1つのイクソデス・リシヌス (I x o d e s r i c i n u s) 唾液腺ポリペプチドを、イクソデス・リシヌス唾液腺ポリヌクレオチドのインビボでの発現を行わせるベクターを介して送達することを含む方法。

【請求項60】 請求項28～36のいずれかに記載される少なくとも1つのポリペプチドを含むベクター。

【請求項61】 請求項15～27のいずれかに記載される少なくとも1つの核酸を含むベクター。

【請求項62】 請求項60および61のいずれかに記載されるベクターによってトランスフェクションされた細胞株。

【請求項63】 血液学において使用される医薬剤を製造するための、請求項28～36のいずれかに記載される少なくとも1つのポリペプチドの使用方法。

【請求項64】 前記ポリペプチドは、配列番号7、配列番号16、配列番号24およびそれらのフラグメントからなる群から選択されるヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドによって発現される、請求項63に記載の使用方法。

【請求項65】 移植において使用される医薬剤を製造するための、請求項28～36のいずれかに記載される少なくとも1つのポリペプチドの使用方法。

【請求項66】 前記ポリペプチドは、配列番号11、配列番号17、配列番号19、配列番号28、配列番号29およびそれらのフラグメントからなる群から選択されるヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドによって発現される、請求項63に記載の使用方法。

【請求項67】 リウマチ学において使用される医薬剤を製造するための、請求項28～36のいずれかに記載される少なくとも1つのポリペプチドの使用方法。

【請求項68】 一般的な処置において使用される医薬剤を製造するための、請求項28～36のいずれかに記載される少なくとも1つのポリペプチドの使用方法。

【請求項69】 請求項のいずれかに記載される抗体を発現するハイブリドーマ細胞株。

【発明の詳細な説明】

【0001】

技術分野

本発明は、ダニ（より詳細には、節足動物門のイクソデス・リシヌス（*Ixodes ricinus*）ダニ）の唾液腺において発現するタンパク質をコードするDNA配列の分子的特徴付けに関する。これらのタンパク質は、この節足動物とその哺乳動物宿主との相互作用の複雑な機構に参与している。本発明は、新しく同定されたポリヌクレオチド、それらによってコードされるポリペプチド、ならびにそのようなポリヌクレオチドおよびポリヌクレオチドの使用に関し、そしてそれらの製造に関する。

【0002】

背景技術

ダニは、哺乳動物、鳥類および両生類などの非常に多くの動物に感染する外部寄生虫である。ダニは世界のほとんどすべてのところに存在している。ダニの摂食プロセス自体が宿主にとって有害であることが多い。さらに、このようなダニの多くは、特にヒトおよび家畜動物において宿主の病的状態をもたらし、そして場合により死をもたらすウイルス、細菌および原生動物の媒介者である。3つの科のダニが存在する：マダニ科（*Ixodidae*）すなわちマダニ、ヒメダニ科（*Argasidae*）すなわちヒメダニ、およびナツタリエラ科（*Nuttalliellidae*）。すべてのダニの生活環には4つの段階（卵 - 幼生 - 若虫 - 成虫）が含まれる。イクソデス・リシヌスのような大部分の種において、ダニは、それぞれの吸血後、宿主動物からいなくなる。幼生は卵から孵り、植物に登り、その植物から、幼生は、側を通る動物の容易な範囲内に入る。宿主に付くと、幼生は付属し、血を餌とする。若虫および成虫は他の宿主を餌とし、同じ宿主獲得方法を用いる。成虫の交尾は、付着して摂食しているときに宿主上において行われることが多い。産卵が脱離後に行われる。

【0003】

ダニの唾液腺は、吸血の達成において、そして病原体の伝搬において重要な役割を果たしている。吸血のとき、マダニ科のダニは、唾液腺を介して過剰な水分

およびイオンを排除する特別な機構を使用することによって血液を濃縮する。唾液腺の形態学上および生理学上の驚くべき変化がこの吸血のときに生じる。いくつかの唾液腺細胞の細胞質および核は容量を大きくし、これにより唾液腺のサイズおよび重量を顕著に増大させる。メッセンジャーRNA (mRNA) の合成もまた誘導され、新しいタンパク質の発現がもたらされる。吸血が終わると、唾液腺の退化が、「唾液腺退化因子」とも呼ばれている20-ヒドロキシエクジソンによって生じると考えられている。

【0004】

唾液腺には、接合剤、酵素、酵素阻害剤、ヒスタミンのアゴニストおよびアンタゴニスト、抗凝固因子、宿主免疫応答の調節因子、プロスタグランジンの様々な生物活性因子が多数存在する。これらの相互作用因子のいくつかは、未摂食ダニの唾液腺に既に存在しているが、吸血の摂食期に誘導される因子（主として、タンパク質）もある。これらの誘導されたタンパク質性因子は、宿主免疫応答の調節において重要な役割を果たしているようである。これらの因子の1つである65kDaタンパク質がBrossardおよび共同研究者によって単離された（Ganapamo他、1997）。このタンパク質は、I. ricinusを感染させたマウスに由来するリンパ節細胞の特異的なCD4⁺T細胞増殖をインビトロで誘導する（Ganapamo他、1997）。このリンパ節細胞は、コンカナバリン-A（ConA）で刺激されたときに、高レベルのインターロイキン-4（IL-4）および低レベルのインターフェロン- γ （IFN- γ ）を誘導する。このことはサイトカインパターンのT_H2偏りを示唆している（Ganapamo他、1995）。IL-5およびIL-10の産生により、この現象が確認される（Ganapamo他、1996）。この偏った応答は、いくつかの病原体の伝搬に好ましい条件を構成し得る。

【0005】

補体活性化の別経路の阻害、感染動物における胸腺依存性抗原により誘導される抗体の合成低下、およびマイトジェンにより刺激されるTリンパ球の増殖活性の低下が、これらのプロセスを生じさせることの一因である（Wikel他、1996；BrossardおよびWikel、1997）。その上、プロスタグ

ランジン (P G E ₂) および唾液タンパク質が免疫応答の抑制に関わっている。さらに、唾液腺により発現するいくつかのタンパク質性因子は、マダニ科のダニによって伝搬される主要なヒト病原体であるボレリア・ブルグドルフェリ (*Borrelia burgdorferi*) (ライム病の原因因子) の生育を刺激することが知られている (De Silva 他、1995)。

【0006】

発明の開示

イクソデス・リシヌスは、広い意味でボレリア・ブルグドルフェリ (ライム病の原因因子) の知られた媒介者である。ダニの唾液腺は、吸血および病原体伝搬において重要な役割を果たしている。唾液腺において、数種の遺伝子が摂食プロセスのときに誘導され、これにより、宿主の免疫応答および止血応答の調節における重要な役割を果たし得る新しいタンパク質の発現がもたらされる。

【0007】

従って、摂食プロセスのときに誘導されるそのような遺伝子、ならびにそのような状況のもとで発現されるそのようなタンパク質を同定して特徴付けること、そしてそのようにして同定された物質の注目される性質を利用することは重要である。

【0008】

従って、第1の局面において、本発明は、ダニの摂食期のときにダニ (好ましくは、イクソデス・リシヌス) の唾液腺において誘導される c D N A のライブラリーを作製するための方法に関する。この方法は、

a) ダニの摂食期のときに誘導される m R N A を選択的にクローニングして対応する c D N A ライブラリーを得ること ;

b) 工程 a) で得られたライブラリーにおいて同定されたいくつかの不完全な c D N A 配列に対応する全長型 c D N A をクローニングすることを含む。

【0009】

より詳細には、誘導された遺伝子は、吸血の遅い摂食期のときに誘導される遺伝子である。

【0010】

好ましい局面において、この方法は、

- a) 非摂食ダニの唾液腺において発現するmRNAから出発して非誘導cDNAを合成すること；
- b) 摂食させたダニの唾液腺において発現するmRNAから出発して誘導cDNAを合成すること；
- c) 前記誘導cDNAから前記非誘導cDNAを除くこと；
- d) 特異的に誘導されたcDNAを単離してクローニングし、それによりサブトラクティブライブラリーを得ること；
- e) 対応する全長型の誘導されたcDNAを得ること；
- f) 前記全長型の誘導されたcDNA分子を配列決定して、既知のポリペプチド配列およびポリヌクレオチド配列と比較することを含む。

【0011】

さらなる好ましい局面において、全長型cDNAライブラリーが調製され、サブトラクティブライブラリーから単離された不完全なcDNAによってスクリーニングされる。

【0012】

より詳細には、この方法は、

- a) 前記サブトラクティブライブラリーの多数のクローンを無作為に配列決定すること；
- b) それらのDNA配列およびアミノ酸翻訳配列をDNAデータベースおよびタンパク質データベースと比較すること；
- c) 明確なファミリー配列を同定すること；
- d) それらの対応する全長型mRNA配列を特徴付けることを含む。

【0013】

前記方法の他の特徴は下記に記載される。

【0014】

別の局面により、本発明は、摂食させたダニの唾液腺から得られるライブラリー、特に、上記に記載された方法またはその均等的な方法によって得られるライブラリーに関し、そしてダニが摂食しているときに誘導される遺伝子を同定する際におけるそのようなライブラリーの使用に関する。

【0015】

上記に記載された方法によって同定される配列は3つのクラスに分けることができる：i)第1のクラスは、推定的な抗凝固配列または抗補体配列と呼ばれる；ii)第2のクラスは、推定的な免疫調節配列と呼ばれる；iii)最後のクラスは、既知のポリヌクレオチド配列およびポリペプチド配列に対する低い相同性を示す配列、または相同性を示さない配列を含む。

【0016】

他の局面により、本発明は、ダニの唾液腺から単離されるか、または単離され得るポリヌクレオチド、前記ポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチド、ならびに前記ポリヌクレオチドおよび前記ポリペプチドの使用に関する。

【0017】

さらに別の局面により、本発明は、前記核酸または前記ポリヌクレオチドを含むベクターを含む。

【0018】

本発明のさらに別の局面は、前記ベクターでトランスフェクションされた細胞株を含む。

【0019】

本発明のさらに別の局面は、前記の細胞株を培養することによってポリペプチドを製造する方法を含む。この方法は、ポリペプチドを精製するさらなる工程を含むことができる。

【0020】

別の局面において、本発明は、前記ポリペプチドに対する抗体に関する。

【0021】

さらなる局面において、本発明は、抗体を発現するハイブリドーマ細胞株を含む。

【0022】

なおさらなる局面において、本発明は、前記の核酸、ポリヌクレオチド、ポリペプチドまたは抗体と、薬学的に受容可能なキャリアとを含む組成物に関する。

【0023】

本発明の別の局面は、医学的処置の方法において使用される前記組成物に関する。

【0024】

前記ポリヌクレオチド、前記ポリペプチド、前記使用、および上記に述べられたそれらを含む本発明の別の局面は、下記にさらに規定され、記載される。

図面の簡単な説明

図1は、配列16および配列24に対して特異的なRACEアッセイ(Frohman他、1995)である。逆転写工程を、吸血させたダニの唾液腺から抽出されたmRNAの10ngを使用して行った。最も明るいバンドは、標的化mRNAの3'端に対応するcDNAフラグメントを表す。増幅産物をアガロースゲル電気泳動に供し、その後、DNAフラグメントを臭化エチジウムで染色した。分子量マーカー(MW)はSmartラダー(Life technologies、Rockville、Maryland、米国)であった。矢印は、予想される増幅産物の位置を示す。

図2は、サブトラクティブライブラリーにおいて単離された5個の選択された全長型cDNAおよび9個のcDNAフラグメントの示差的な発現分析である。PCRアッセイを、吸血させたダニ(E)または未摂食ダニ(UF)のいずれかの唾液腺から抽出されたmRNAに対する逆転写手法から得られたcDNAをDNAテンプレートとして使用して行った。これらのRNAメッセージはまた、逆転写アッセイにおけるテンプレートとしても使用された。PCR混合物およびRT-PCR混合物の両方の10マイクロリットルを、増幅されたDNA産物を検出するためにアガロース電気泳動および臭化エチジウム染色に供した。[++]強い陽性；[+]陽性；[-]陰性。

【0025】

発明の説明

本発明者らは、吸血の遅い摂食期のときにイクソデス・リシヌスの唾液腺に誘導される様々な遺伝子の特徴付けを行った。これらの遺伝子のクローニングを、2つの相補的DNA(cDNA)ライブラリーを調製することによって行った。第1のライブラリーは、Lisitsyn他(Science、259、946~951、1993)によって記載され、Diatchenko他(Proc. Natl. Acad. Sci. USA、93、6025~6030、1996)によって改良された方法論に基づくサブトラクティブライブラリーである。このライブラリーにより、ダニの摂食期のときに選択的に誘導されたmRNAがクローニングされた。第2のライブラリーは、mRNAの基本的な性質(その3'端におけるポリAテールおよびその5'端におけるキャップ構造の存在)を使用することによって構築された全長型cDNAライブラリーである。このcDNAライブラリーは、目的物と考えられ、かつサブトラクティブcDNAライブラリーにおいて同定されたいくつかの不完全なcDNA配列に対応する全長型cDNAのクローニングを可能にした。

【0026】

サブトラクティブライブラリーは、非誘導cDNA(非摂食ダニの唾液腺において発現するmRNAから合成)を、誘導されたcDNA(遅い摂食期の終わりの唾液腺において発現するmRNAから合成)から除くことによって調製された。この誘導cDNAは制限酵素で消化され、2つの部分に分けられ、そして特定のアダプターを加えることによって区別されるように修飾された。誘導cDNAの場合のように、非誘導cDNAもまた同じ制限酵素で消化され、次いで、修飾された誘導cDNAのそれぞれの部分に過剰に混合された。非誘導cDNA/誘導cDNAのそれぞれの混合物を変性工程に供し、その直後にハイブリダイゼーション工程を行い、相同的な誘導cDNAを非誘導cDNAによって捕獲した。その後、それぞれの混合物を一緒に混合して、再び新しい変性/ハイブリダイゼーションサイクルに供した。ハイブリダイゼーションしたcDNA分子の中で、この最後の混合物は、その5'端および3'端に異なるアダプターを有する誘導cDNAを含む。これらの関連するcDNAを、cDNA分子の各末端に位置するそれぞれのアダプターに特異的なプライマーを使用してポリメラーゼ連鎖反応

(PCR)によって増幅した。その後、PCR産物をA-TクローニングによりpCRII(商標)ベクターに連結し、TOP-10大腸菌株にクローン化した。このサブトラクティブライブラリーの不均質性を組換えクローンの配列決定によって評価した。これらのcDNA配列の「誘導(された)」特性を、吸血させたダニおよび非摂食ダニの唾液腺から抽出されたmRNAに対する逆転写PCR(RT-PCR)によって調べた。最後に、全長型の誘導されたcDNAを、サブトラクティブライブラリーから単離されたいくつかの不完全な誘導cDNAをプローブとして使用して発現ライブラリーをスクリーニングすることによって得た。これらの全長型の誘導されたDNA分子を配列決定し、既知のポリペプチド配列およびポリヌクレオチド配列と比較した。

【0027】

全長型cDNAライブラリーを、「CapFinder PCR cDNAライブラリー構築キット」(Clontech)で開発された方法を使用することによって調製した。このライブラリー構築キットでは、第1鎖合成において特徴的なCapSwitch(商標)オリゴヌクレオチド(特許出願中)が利用され、長距離のPCR増幅がその後に行われて高収率の全長型二本鎖cDNAが得られる。汎用されるcDNA合成法はすべて、第1鎖反応においてmRNAを一本鎖DNAに転写する逆転写酵素の活性に依存している。しかし、逆転写酵素は必ずしもmRNA配列全体を転写することができないので、遺伝子の5'端部は、cDNA集団において実際よりも少なく表される傾向がある。これは、長いmRNAの場合、特に第1鎖合成がオリゴ(dT)プライマーのみで開始される場合、あるいはmRNAが持続性の二次構造を有する場合には特に当てはまる。さらに、第2鎖合成の後に平滑なcDNA端を得るためにT4DNAポリメラーゼを使用することは、一般に、元のmRNAよりも5ヌクレオチド~30ヌクレオチド短い不均一な5'端をもたらす(D'Alessio, 1988)。CapFinderによるcDNA合成法では、修飾されたオリゴ(dT)プライマーが、第1鎖反応を開始させるために使用され、そしてCapSwitchオリゴヌクレオチドが、逆転写酵素に対する5'端における短い延長されたテンプレートとして作用する。逆転写酵素がmRNAの5'端に達すると、酵素はテンプレ-

トを切り替えて、CapSwitchオリゴヌクレオチドの最後まで複製を続ける。この切り替えは、ほとんどの場合、7-メチルグアノシンのキャップ構造のところで生じる。この構造はすべての真核生物mRNAの5'端に存在している(Furuichi & Miura, 1975)。得られる全長型の一本鎖cDNAは、mRNAの完全な5'端、ならびにその後の増幅におけるユニバーサルPCR開始部位(CapSwitchアンカー)として後で役に立つCapSwitchオリゴヌクレオチドに相補的な配列を含有する。CapSwitchアンカーを含む一本鎖cDNAは、(精製工程を介在させることなく)PCRに直接使用される。CapSwitchアンカー配列を5'端に有する、オリゴ(dT)で開始されたそのような一本鎖cDNAのみがテンプレートとして使用することができ、そして3'端および5'端のPCRプライマーを使用して指数関数的に増幅され得る。ほとんどの場合、不完全なcDNAおよびポリA-RNAから転写されたcDNAはCapSwitchアンカーによって認識されず、従って増幅されない。

【0028】

これらの反応の最後において、全長型cDNAのPCR産物をpCRIIクローニングベクター(Invitrogen)に連結して、XL2大腸菌株の形質転換のために使用した。その後、この全長型cDNAライブラリーを、サブトラクティブライブラリーから単離された不完全な誘導cDNAをプローブとして使用することによってスクリーニングした。

【0029】

サブトラクティブライブラリーの89個のクローンを無作為に配列決定し、それらのDNA配列およびアミノ酸翻訳配列をDNAデータベースおよびタンパク質データベースと比較した。これらの中で、27個の異なるファミリー配列が同定された。その内の3個が、それらの対応する全長型mRNA配列のさらなる特徴付けのために選択された。これらの3つの配列は、i)ヒト外因型凝固インヒビター(TFPI)、ii)ヒトトロンビンインヒビター遺伝子、およびiii)ヘビ毒液亜鉛依存性メタロペプチダーゼタンパク質の配列と一致した。これらの遺伝子は、血液凝固の阻害に関与し得るタンパク質をコードしている。それ以

外の24個のファミリー配列は、データベースに存在するポリヌクレオチド配列およびポリペプチド配列との低い相同性を示したか、または相同性を示さなかった。3個の以前に選択されたサブラクティブクローンに特異的なオリゴヌクレオチドプローブを使用して全長型cDNAライブラリーをスクリーニングすることにより、対応する全長型cDNAが回収された。このライブラリーを無作為にスクリーニングすることにより、2つの他のクローンが選択された。1つは、インターフェロン様タンパク質に対して非常に相通的であり、これに対して、もう一方は、ドブネズミ (*Rattus norvegicus*) の白血球共通抗原関連タンパク質に対する相同性を示している。

【0030】

定義

「推定的な抗凝固性、抗補体性および免疫調節性」のポリペプチドは、表において規定された遺伝子によってコードされるアミノ酸配列を有するポリペプチドを示す。これらは、データベースに既に存在する抗凝固性ポリペプチド、抗補体性ポリペプチドおよび免疫調節性ポリペプチドとの相同性を示す。これらのポリペプチドは、クラスIおよびクラスIIの配列に属する(表を参照のこと)。

【0031】

「推定的な抗凝固性、抗補体性および免疫調節性」のcDNAは、表において規定されたヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチド、またはその対立遺伝子変化体および/またはそれらの相補体を示す。これらは、データベースに既に存在する抗凝固性ポリヌクレオチド、抗補体性ポリヌクレオチドおよび免疫調節性ポリヌクレオチドとの相同性を示す。これらのcDNAは、クラスIおよびクラスIIの配列に属する(表を参照のこと)。

【0032】

いくつかのポリペプチド配列またはポリヌクレオチド配列は、データベースにおいて既に存在するポリペプチドまたはポリヌクレオチドとの低い相同性を示すか、または相同性を示さない。これは、クラスIIIに属する(表を参照のこと)。

【0033】

「ポリペプチド」は、ペプチド結合または修飾されたペプチド結合（すなわち、ペプチド等配電子体）によって相互に連結された2つ以上のアミノ酸を含む任意のペプチドまたはタンパク質を示す。「ポリペプチド」は、ペプチド、オリゴペプチドまたはオリゴマーと広く呼ばれている短い鎖のもの、およびタンパク質と一般には呼ばれているより長い鎖のものの両方を示す。ポリペプチドは、遺伝子によってコードされる20個のアミノ酸とは異なるアミノ酸を含有することができる。「ポリペプチド」は、翻訳後修飾などの天然のプロセス、またはこの分野でよく知られている化学的な修飾技術のいずれかによって修飾されたアミノ酸配列を含む。そのような修飾は、基本的な教本およびより詳細な専門書において、そして多数の研究文献において十分に記載されている。修飾は、ペプチド骨格、アミノ酸側鎖およびアミノ末端またはカルボキシル末端を含むポリペプチド内のどこでも行うことができる。同じタイプの修飾が所与ポリペプチド内のいくつかの部位において同じ程度または異なる程度で存在し得ることが理解される。また、所与ポリペプチドは多くのタイプの修飾を含むことができる。ポリペプチドは、ユビキチン化の結果として分枝状になっていてもよく、またポリペプチドは、分枝を伴って、あるいは分枝を伴うことなく、環状であってもよい。環状ポリペプチド、分枝状ポリペプチドおよび分枝した環状ポリペプチドは、天然の翻訳後修飾プロセスから生じることがあり、あるいは合成的な方法によって作製することができる。修飾には、アセチル化、アシル化、ADP-リボシル化、アミド化、共有結合によるフラビン結合、共有結合によるヘム成分の結合、共有結合によるヌクレオチドまたはヌクレオチド誘導体の結合、共有結合による脂質または脂質誘導体の結合、共有結合によるホスホチジルイノシトールの結合、架橋、環化、ジスルフィド結合の形成、脱メチル化、共有結合架橋の形成、シスチンの形成、ピログルタル酸の形成、ホルミル化、 α -カルボキシル化、グリコシル化、GPIアンカーの形成、ヒドロキシル化、ヨウ素化、メチル化、ミリストイル化、酸化、タンパク質分解的な処理、ホスホリル化、プレニル化、ラセミ化、セレノイル化、硫酸化、アルギニル化などのタンパク質へのアミノ酸のアミノの転移RNA媒介付加、およびユビキチン化が含まれる。例えば、PROTEINS - STRUCTURE AND MOLECULAR PROPERTIES、第

2版(T. E. Creighton, W. H. Freeman and Company, New York, 1993年); Wolt, F., Posttranslational Protein Modifications: Perspectives and Prospects (POSTTRANSLATIONAL COVALENT MODIFICATION OF PROTEINS (B. C. Johnson編, Academic Press, New York, 1993年)の1頁~12頁); Seifter他、「タンパク質修飾および非タンパク質補因子の分析」、Meth Enzymol (1990) 182: 626~646; Rattan他、「タンパク質合成: 翻訳後修飾およびエージング」、Ann NY Acad Sci (1992) 663: 48~62を参照のこと。

【0034】

「ポリヌクレオチド」は、一般には、任意のポリリボヌクレオチドまたはポリデオキシリボヌクレオチドを示す。これは、修飾されていないRNAまたはDNA、あるいは修飾されたRNAまたはDNAであり得る。「ポリヌクレオチド」には、限定されないが、一本鎖DNAおよび二本鎖DNA、一本鎖領域および二本鎖領域の混合であるDNA、一本鎖RNAおよび二本鎖RNA、ならびに一本鎖領域および二本鎖領域の混合であるRNA、一本鎖であり得るか、またはより典型的には二本鎖であり得るか、または一本鎖領域および二本鎖領域の混合であり得るDNAおよびRNAのハイブリッド分子が含まれる。さらに、「ポリヌクレオチド」は、RNAまたはDNAまたはRNAとDNAとの両方を含む三重鎖領域を示す。用語ポリヌクレオチドはまた、1つまたは2つ以上の修飾された塩基を含有するDNAまたはRNA、ならびに安定性のために、または他の理由のために骨格が修飾されたDNAまたはRNAを含む。「修飾(された)」塩基には、例えば、トリチル化された塩基、およびイノシンなどの非通常型塩基が含まれる。様々な修飾がDNAおよびRNAに対して行われる。従って、「ポリヌクレオチド」は、典型的には、自然界に見出されるポリヌクレオチドの化学的、酵素的または代謝的に修飾された形態、ならびにウイルスおよび細胞に特徴的なDNAおよびRNAの化学的形態を包含する。「ポリヌクレオチド」はまた、オリ

ゴヌクレオチドと呼ばれることが多い比較的短いポリヌクレオチドを包含する。

【0035】

「変化体」は、この用語が本明細書中で使用されている場合、それぞれ、基準のポリヌクレオチドまたはポリペプチドから異なっているが、本質的な性質を保持しているポリヌクレオチドまたはポリペプチドである。ポリヌクレオチドの典型的な変化体は、ヌクレオチド配列が、別の基準ポリヌクレオチドとは異なる。変化体のヌクレオチド配列における変化は、基準ポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドのアミノ酸配列を変化させてもよく、あるいはアミノ酸配列を変化させなくてもよい。ヌクレオチドの変化は、上記で議論されたように、基準配列によってコードされるポリペプチドにおけるアミノ酸の置換、付加、欠失、融合および短縮化を生じさせることがある。ポリペプチドの典型的な変化体は、アミノ酸配列が別の基準ポリペプチドとは異なる。一般に、差は、基準ポリペプチドおよび変化体の配列が全体的に非常に類似し、そして多くの領域において同一であるように制限される。変化体ポリペプチドおよび基準ポリペプチドは、1つまたは2つ以上の置換（好ましくは、保存的）、付加、欠失の任意の組合せによってアミノ酸配列が異なり得る。置換または挿入されるアミノ酸残基は、遺伝暗号によってコードされるアミノ酸残基であってもよく、あるいはそうでなくてもよい。ポリヌクレオチドまたはポリペプチドの変化体は、対立遺伝子変化体などの天然に存在するものであってもよく、あるいは天然に存在することが知られていない変化体であってもよい。ポリヌクレオチドおよびポリペプチドの天然に存在しない変化体は、変異誘発技術によって、または直接的な合成によって作製することができる。変化体は、基準ポリペプチドの生物学的活性の1つまたは2つ以上を保持しなければならない。例えば、変化体は、基準ポリペプチドと類似するような抗原性活性または免疫学的活性を有しなければならない。抗原性は、標準的な免疫学的実験を使用して、好ましくは、基準ポリペプチドに対するポリクローナル血清を使用して試験することができる。免疫原性は、精製された基準ポリペプチドに対する抗体応答を、（変化体ポリペプチドに対して生成されたポリクローナル血清を使用して）標準的なELISA試験で測定することによって試験することができる。好ましくは、変化体は、上記の生物学的活性のすべ

てを保持する。

【0036】

「同一性」は、ヌクレオチド配列またはアミノ酸配列の同一性の尺度である。一般に、配列は、最大限の一致が得られるようにアラインメントされる。「同一性」自体は、この分野で認識されている意味を有し、公表された技術を使用して計算することができる。例えば、COMPUTATIONAL MOLECULAR BIOLOGY、Lesk, A.M. 編、Oxford University Press、New York、1988年；BIOCOMPUTING: INFORMATICS AND GENOME PROJECTS、Smith, D.W. 編、Academic Press、New York、1993年；COMPUTER ANALYSIS OF SEQUENCE DATA, PART I、Griffin, A.M. および Griffin, H.G. 編、Humana Press、New Jersey、1994年；SEQUENCE ANALYSIS IN MOLECULAR BIOLOGY、von Heijne, G.、Academic Press、1987年；SEQUENCE ANALYSIS PRIMER、Gribskov, M. および Devereux, J. 編、M Stockton Press、New York、1991年を参照のこと。2つのポリヌクレオチド配列またはポリペプチド配列の間における同一性を測定するための方法が多数存在するが、用語「同一性」は当業者には十分に知られている (Carillo, H. および Lipton, D.、SIAM J Applied Math (1998) 48: 1073)。2つの配列の間における同一性または類似性を決定するために広く用いられている方法には、「Guide to Huge Computers」 (Martin J. Bishop 編、Academic Press、San Diego、1994年)、Carillo, H. および Lipton, D.、SIAM J Applied Math (1998) 48: 1073に開示されている方法が含まれるが、それらに限定されない。同一性および類似性を決定する方法は、コンピュータープログラムにコード化されている。2つの配列の間における同一性または類似性を決定する好ましいコンピュータープログラム方

法には、GCGプログラムパッケージ(Devereux, J.他, J Molec Biol (1990) 215:403)が含まれるが、これに限定されない。最も好ましくは、同一性レベルを決定するために使用されるプログラムは、下記の実施例において使用されているようなGAPプログラムであった。

【0037】

例示として、基準ヌクレオチド配列に対して、例えば、少なくとも95%の「同一性」を有するヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドによって、ポリヌクレオチド配列が基準ヌクレオチド配列の各100ヌクレオチドにつき平均して5個までの点変異を含み得ることを除いて、ポリヌクレオチドのヌクレオチド配列が基準配列と同一であることが意図される。すなわち、基準ヌクレオチド配列に対して少なくとも95%の同一性を有するヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドを得るために、基準配列における5%までのヌクレオチドが欠失していてもよく、または別のヌクレオチドで置換されていてもよく、あるいは基準配列における総ヌクレオチドの5%までの多数のヌクレオチドが基準配列に挿入されていてもよい。基準配列のこれらの変異は、基準ヌクレオチド配列の5'端位置もしくは3'端位置に、またはそのような末端位置の間の任意のところに存在していてもよく、基準配列内のヌクレオチド間に個々に、または基準ヌクレオチド内の1つもしくは2つ以上の連続した群で点在していてもよい。

【0038】

本発明のポリペプチド

本発明は、I. ricinusの唾液腺によって分泌される様々なタンパク質(またはポリペプチド)に関する。これらのポリペプチドには、表に規定されるcDNAによってコードされるポリペプチド;ならびに表に規定されるcDNAによってコードされるアミノ酸配列を含むポリペプチド;および表に規定されるcDNAによってコードされるアミノ酸配列に対してその全長にわたって少なくとも75%の同一性(好ましくは少なくとも80%の同一性、より好ましくは少なくとも90%の同一性)を有するアミノ酸配列を含むポリペプチドが含まれる。95%~99%の同一性を有する配列が非常に好ましい。

【0039】

I . r i c i n u s の唾液腺ポリペプチドは、「成熟」タンパク質の形態であってもよく、あるいは融合タンパク質などのより大きなタンパク質の一部であってもよい。分泌配列またはリーダー配列、プロ配列、多数のヒスチジン残基などの精製を助ける配列、あるいは組換え生産時の安定性に必要な配列を含有するさらなるアミノ酸配列を含むことは好都合である。

【0040】

I . r i c i n u s 唾液腺ポリペプチドのフラグメントもまた本発明に含まれる。フラグメントは、上記のI . r i c i n u s 唾液腺ポリペプチドのアミノ酸配列の一部（しかし、すべてではない）と同じであるアミノ酸配列を有するポリペプチドである。I . r i c i n u s 唾液腺ポリペプチドの場合と同様に、フラグメントは、「独立型」であってもよく、あるいは一部または領域を形成するより大きなポリペプチド内に含まれてもよく、最も好ましくは、1個の連続した領域として含まれ得る。本発明のポリペプチドフラグメントの代表的な例には、例えば、アミノ酸番号が約1～20から、約21～40から、約41～60から、約61～80から、約81～100から、そして約101から、ポリペプチドの最後までに由来するフラグメントが含まれる。これに関連して、「約」は、いずれかの端において、または両端において、数個、5個、4個、3個、2個または1個のアミノ酸だけ大きいか、または小さい具体的に示された範囲を含む。

【0041】

好ましいフラグメントには、例えば、I . r i c i n u s 唾液腺ポリペプチドのアミノ酸配列を有するポリペプチドが含まれるが、アミノ末端を含む連続した一連の残基の欠失、またはカルボキシル末端および/もしくは膜貫通領域を含む連続した一連の残基の欠失、または1つがアミノ末端を含み、1つがカルボキシル末端を含む2つの連続した一連の残基の欠失は除かれる。 - ヘリックスおよび - ヘリックス形成領域、 - シートおよび - シート形成領域、ターンおよびターン形成領域、コイルおよびコイル形成領域、親水性領域、疎水性領域、両親媒性領域、 両親媒性領域、柔軟性領域、表面形成領域、基質結合領域、ならびに高抗原性指標領域を含む様々なフラグメントなどの構造的または機能的な属性によって特徴付けられるフラグメントもまた好ましい。他の好ましいフラグ

メントは、生物学的に活性なフラグメントである。生物学的に活性なフラグメントは、*I. ricinus* 唾液腺タンパク質の活性を媒介するフラグメントであり、これには、類似する活性または改善された活性を有するフラグメント、あるいは望ましくない活性を低下させたフラグメントが含まれる。動物またはヒトにおいて抗原性または免疫原性であるフラグメントもまた含まれる。

【0042】

好ましくは、これらのポリペプチドフラグメントはすべて、抗原性活性を含む、*I. ricinus* 唾液腺ポリペプチドの生物学的活性の一部（例えば、抗原性または免疫原性）を保持する。規定された配列およびフラグメントの変化体もまた本発明の一部を形成する。好ましい変化体は、保存的なアミノ酸置換によって基準体から異なる変化体、すなわち、残基が同様の特性の別の残基で置換されている変化体である。典型的なそのような置換は、Ala、Val、LeuおよびIleの中で；SerおよびThrの中で；酸性残基のAspおよびGluの中で；AsnおよびGlnの中で；そして塩基性残基のLysおよびArgの中で；あるいは芳香族残基のPheおよびTyrの中で行われる。特に好ましいものは、数個、5個～10個、1個～5個または1個～2個のアミノ酸が任意の組合せで置換、欠失または付加されている変化体である。最も好ましい変化体は、*I. ricinus* の唾液腺に存在する *I. ricinus* 唾液腺ポリペプチドの天然に存在する対立遺伝子変化体である。

【0043】

本発明の *I. ricinus* 唾液腺ポリペプチドは任意の好適な方法で調製することができる。そのようなポリペプチドには、単離された天然に存在するポリペプチド、組換え産生されたポリペプチド、合成的に製造されたポリペプチド、またはこれらの方法の組合せにより製造されたポリペプチドが含まれる。そのようなポリペプチドの調製手段は、この分野では十分に理解されている。

【0044】

本発明のポリヌクレオチド

本発明の別の局面は、*I. ricinus* 唾液腺の様々なcDNA（ポリヌクレオチド）に関する。これらには、*I. ricinus* 唾液腺のポリペプチドお

よびフラグメントをそれぞれコードする単離されたポリヌクレオチド、ならびにそれらに非常に関連するポリヌクレオチドが含まれる。より詳細には、本発明の *I. ricinus* 唾液腺 cDNA には、*I. ricinus* 唾液腺ポリペプチドをコードし、表に規定される cDNA のヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドが含まれる。*I. ricinus* 唾液腺 cDNA にはさらに、表に規定される cDNA によってコードされる *I. ricinus* 唾液腺ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列に対してその全長にわたって少なくとも 75% の同一性を有するポリヌクレオチド配列、および表に規定される cDNA のヌクレオチド配列に対して少なくとも 75% の同一性を有するヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドが含まれる。この点に関して、少なくとも 80% の同一性のポリヌクレオチドが特に好ましく、そして少なくとも 90% の同一性を有するポリヌクレオチドがとりわけ好ましい。さらに、少なくとも 95% の同一性を有するポリヌクレオチドが非常に好ましく、少なくとも 98% ~ 99% の同一性を有するポリヌクレオチドが一層非常に好ましく、少なくとも 99% の同一性を有するポリヌクレオチドが最も好ましい。*I. ricinus* 唾液腺 cDNA には、増幅のために使用され得る条件のもとで、あるいはプローブまたはマーカーとして使用される条件のもとでハイブリダイゼーションするために、表に規定された cDNA のヌクレオチド配列に対して十分な同一性を有するヌクレオチド配列もまた含まれる。本発明はまた、そのような *I. ricinus* 唾液腺 cDNA に対して相補的であるポリヌクレオチドをも提供する。

【0045】

表に規定された cDNA によってコードされる *I. ricinus* 唾液腺ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列は、表に規定される遺伝子に含まれるポリペプチドのコード配列と同一であり得るか、あるいは、遺伝暗号の冗長性（縮重）の結果として、表に規定される遺伝子によってそれぞれコードされるポリペプチドをもコードする配列であり得る。

【0046】

本発明のポリヌクレオチドが *I. ricinus* 唾液腺ポリペプチドの組換え製造のために使用される場合、ポリヌクレオチドは、成熟ポリペプチドまたはそ

のフラグメントのコード配列だけ；リーダー配列または分泌配列、プレタンパク質配列またはプロタンパク質配列またはプレポリタンパク質配列をコードする配列などの他のコード配列あるいは他の融合ペプチド部分と読み枠を合わせた成熟ポリペプチドまたはフラグメントのコード配列を含むことができる。例えば、融合ポリペプチドの精製を容易にするマーカー配列をコードさせることができる。本発明のこの局面のいくつかの好ましい実施形態において、マーカー配列は、pQEベクター(Qiagen, Inc.)において提供され、Gentz他、Proc. Natl. Acad. Sci. USA(1989)、86:821~824に記載されているようなヘキサヒスチジンペプチドであるか、またはHA標識であるか、またはグルタチオン-s-トランスフェラーゼである。ポリヌクレオチドはまた、転写される非翻訳配列、スプライシングシグナルおよびポリアデニル化シグナル、リボソーム結合部位、およびmRNAを安定化する配列などの非コード5'配列および3'配列を含むことができる。

【0047】

さらなる好ましい実施形態は、表により規定されるcDNAによってそれぞれコードされる*I. ricinus*唾液腺ポリペプチドのアミノ酸配列を含む*I. ricinus*唾液腺タンパク質変化体をコードするポリヌクレオチドである。この場合、変化体は、数個、10個~25個、5個~10個、1個~5個、1個~3個、1個~2個または1個のアミノ酸残基が任意の組合せで置換、欠失または付加されている。最も好ましい変化体ポリヌクレオチドは、*I. ricinus*における*I. ricinus*唾液腺タンパク質の対立遺伝子変化体をコードするそのような天然に存在する*I. ricinus*配列である。

【0048】

本発明はさらに、本明細書中上記に記載された配列にハイブリダイゼーションするポリヌクレオチドに関する。この点に関して、本発明は、本明細書中上記に記載されたポリヌクレオチドにストリンジェントな条件のもとでハイブリダイゼーションするポリヌクレオチドに特に関する。本明細書中で使用されている用語「ストリンジェントな条件」は、少なくとも80%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、なおさらにより好ましくは97%~99%

%の同一性が配列間に存在する場合にだけ、ハイブリダイゼーションが生じることを意味する。

【0049】

表に規定されるいずれかの遺伝子のヌクレオチド配列またはそのフラグメントに対して同一であるか、または十分に同一である本発明のポリヌクレオチドは、*I. ricinus* 唾液腺ポリペプチドをそれぞれコードするcDNAクローンに対するハイブリダイゼーションプローブとして、そして*I. ricinus* 唾液腺cDNAに対して大きな配列類似性を有する他の遺伝子のcDNAクローン(*I. ricinus*以外の種に由来するホモログ体およびオルソログ体をコードするcDNAを含む)を単離するためのハイブリダイゼーションプローブとして使用することができる。そのようなハイブリダイゼーション技術は当業者には知られている。典型的には、これらのヌクレオチド配列は、80%の同一性、好ましくは90%の同一性、より好ましくは95%の同一性を基準となるヌクレオチド配列に対して有する。プローブは、一般に、少なくとも15個のヌクレオチドを含み、好ましくは、そのようなプローブは、少なくとも30個のヌクレオチドを有し、そして少なくとも50個のヌクレオチドを有してもよい。特に好ましいプローブは、30ヌクレオチド~50ヌクレオチドの間で変化する。1つの実施形態において、*I. ricinus*以外の種に由来するホモログ体およびオルソログ体を含む*I. ricinus* 唾液腺ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを得ることには、適切なライブラリーを、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件のもとで、表により規定された遺伝子配列のいずれかに含まれるヌクレオチド配列またはそのフラグメントを有する標識されたプローブを用いてスクリーニングする工程；および前記ポリヌクレオチド配列を含む全長型のcDNAクローンを単離する工程が含まれる。従って、別の局面において、本発明の*I. ricinus* 唾液腺ポリヌクレオチドには、表に規定されたcDNAに含まれるヌクレオチド配列を有するヌクレオチド配列にストリンジェントな条件のもとでハイブリダイゼーションするヌクレオチド配列を含むヌクレオチド配列またはそのフラグメントがさらに含まれる。また、*I. ricinus* 唾液腺ポリペプチドに関して、上記のハイブリダイゼーション条件によって得られるヌク

レオチド配列によりコードされるアミノ酸配列を含むポリペプチドも含まれる。そのようなハイブリダイゼーション技術は当業者には十分に知られている。ストリンジентなハイブリダイゼーション条件は、上記に定義されている通りであり、あるいは、50%ホルアミド、5×SSC(150mMのNaCl、15mMクエン酸三ナトリウム)、50mMリン酸ナトリウム(pH7.6)、5×デンハルト溶液、10%デキストラン硫酸および20マイクログラム/mlの変性させた剪断サケ精子DNAを含む溶液において42℃で一晩のインキュベーションが行われ、その後、フィルターが0.1×SSCにおいて約65℃で洗浄される条件である。

【0050】

本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチドは、動物およびヒトの疾患に対する処置および診断を発見するための研究試薬および材料として用いることができる。

【0051】

診断アッセイ

本発明はまた、診断試薬として使用される*I. ricinus*唾液腺ポリペプチドまたは*I. ricinus*唾液腺ポリヌクレオチドの使用に関する。

【0052】

診断に必要な材料は、被験者の細胞から、例えば、血液、尿、唾液、組織生検などから得ることができる。

【0053】

従って、別の局面において、本発明は、疾患または疾患に対する罹患性に対する診断キットに関する。このキットは下記を含む：

(a) *I. ricinus*唾液腺ポリヌクレオチド、好ましくは、表により規定された遺伝子配列のいずれかのヌクレオチド配列、またはそのフラグメント；

(b) (a)の配列に対して相補的なヌクレオチド配列；

(c) *I. ricinus*唾液腺ポリペプチド、好ましくは、表に規定された遺伝子配列のいずれかによってコードされるポリペプチド、またはそのフラグメント；

(d) *I. ricinus* 唾液腺ポリペプチドに対する抗体、好ましくは、表に規定された遺伝子配列のいずれかによってコードされるポリペプチドに対する抗体；または

(e) *I. ricinus* 唾液腺ポリペプチドに対する抗体を提示するファージ、好ましくは、表に規定されたcDNA配列のいずれかによってコードされるポリペプチドに対する抗体を提示するファージ。

【0054】

任意のそのようなキットにおいて、(a)、(b)、(c)、(d)または(e)は実質的な構成要素を含み得ることが理解される。

【0055】

抗*I. ricinus* 唾液腺ポリペプチド抗体はポリクローナル抗体を含むことができる。ポリクローナル抗体を調製する方法は当業者には知られている。ポリクローナル抗体は、例えば、免疫化剤および所望する場合にはアジュバントを1回または2回以上注射することによって哺乳動物において生じさせることができる。典型的には、免疫化剤および/またはアジュバントは、多数回の皮下注射または腹腔内注射によって哺乳動物に注射される。免疫化剤には、*I. ricinus* 唾液腺ポリペプチドまたはその融合タンパク質を含むことができる。免疫化剤を、免疫化している哺乳動物において免疫原性であることが知られているタンパク質に結合することは有用であり得る。そのような免疫原性タンパク質の例には、キーホールリンペットヘモシアニン、血清アルブミン、ウシチログロブリンおよびダイズトリプシン阻害剤が含まれるが、これらに限定されない。用いることができるアジュバントの例には、フロイント完全アジュバントおよびMPL TDMアジュバントが含まれる。免疫化プロトコルは、過度な実験を行うことなく、当業者により選択され得る。

【0056】

あるいは、抗*I. ricinus* 唾液腺ポリペプチド抗体はモノクローナル抗体であり得る。モノクローナル抗体は、KohlerおよびMilstein、*Nature*、256:495(1975)によって記載された方法などのハイブリドーマ法を使用して調製することができる。ハイブリドーマ法では、マウス

、ハムスターまたは他の適切な宿主動物が、典型的には、免疫化剤に特異的に結合する抗体を産生するか、または産生し得るリンパ球を誘発させる免疫化剤で免疫化される。あるいは、リンパ球はインビトロで免疫化することができる。

【0057】

免疫化剤には、典型的には、*I. ricinus* 唾液腺ポリペプチドまたはその融合タンパク質が含まれる。一般に、ヒト起源の細胞が所望される場合には、末梢血リンパ球（「PBL」）が使用され、あるいはヒト以外の哺乳動物源が所望される場合には、脾臓細胞またはリンパ節細胞が使用される。その後、リンパ球は、ハイブリドーマ細胞を形成させるために、ポリエチレングリコールなどの好適な融合剤を使用して不死化細胞株と融合させられる（Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press (1986年)、59頁~103頁）。不死化された細胞株は、通常、形質転換された哺乳動物細胞であり、具体的には、齧歯類、ウシおよびヒトを起源とするミエローマ細胞である。通常、ラットまたはマウスのミエローマ細胞株が用いられる。ハイブリドーマ細胞は、融合されていない不死化細胞の増殖または生存を阻害する1つまたは2つ以上の物質を含有することが好ましい好適な培養培地において培養することができる。例えば、親細胞がヒポキサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ（HGPR TまたはHPR T）の酵素を有しない場合、ハイブリドーマに対する培養培地は、典型的には、ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジンを含む（「HAT培地」）。これらの物質により、HGPR T欠損細胞の増殖が阻害される。

【0058】

好ましい不死化細胞株は、効率的に融合し、選択された抗体産生細胞によって高レベルの安定した抗体産生を維持し、そしてHAT培地などの培地に対して感受性を有する細胞株である。より好ましい不死化細胞株はネズミのミエローマ細胞であり、これは、例えば、Salk Institute Cell Distribution Center (San Diego, California) および American Type Culture Collectio

n (Rockville, Maryland) から得ることができる。ヒトミエローマ細胞株およびマウス - ヒトヘテロミエローマ細胞株もまた、ヒトモノクローナル抗体を産生させるために記載されている (Kozbor, J. Immunol. 133:3001 (1984); Brodeur 他、Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, Marcel Dekker, Inc., New York (1987年)、51頁~63頁)。

【0059】

ハイブリドーマ細胞が培養される培養培地は、その後、*I. ricinus* 唾腺ポリペプチドに対するモノクローナル抗体の存在についてアッセイされ得る。好ましくは、ハイブリドーマ細胞によって産生されたモノクローナル抗体の結合特異性が、免疫沈殿によって、あるいは、放射免疫アッセイ (RIA) または酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA) などのインビトロ結合アッセイによって決定される。そのような技術およびアッセイはこの分野では知られている。モノクローナル抗体の結合親和性は、例えば、Munson および Pollard、Anal. Biochem. 107:220 (1980) のスキャッチャード分析によって決定され得る。

【0060】

所望するハイブリドーマ細胞が同定された後、クローンは、限界希釈法によってサブクローン化され、そして標準的な方法によって増殖させることができる (Goding、上記)。この目的に好適な培養培地には、例えば、ダルベッコ改変イーグル培地および RPMI - 1640 培地が含まれる。あるいは、ハイブリドーマ細胞は、哺乳動物体内の腹水などのインビボで増殖させることができる。

【0061】

サブクローンによって分泌されるモノクローナル抗体は、例えば、プロテイン A - セファロース、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析またはアフィニティークロマトグラフィーなどの従来免疫グロブリン精製手順によって培養培地または腹水から単離または精製することができる。

【0062】

モノクローナル抗体はまた、米国特許第4,816,567号に開示された方法などの組換えDNA法によって作製することができる。本発明のモノクローナル抗体をコードするDNAは、従来の手順を使用して(例えば、ネズミ抗体の重鎖および軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合し得るオリゴヌクレオチドプローブを使用することによって)容易に単離および配列決定することができる。本発明のハイブリドーマ細胞は、そのようなDNAの好ましい供給源として役に立つ。DNAは、ひとたび単離されると、発現ベクター内に入れることができ、その後、発現ベクターは、組換え宿主細胞においてモノクローナル抗体を合成させるために、サルCOS細胞、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞、またはそうでなければ免疫グロブリンタンパク質を産生しないミエローマ細胞などの宿主細胞にトランスフェクションされる。DNAはまた、例えば、相同的なネズミの配列の代わりに、ヒトの重鎖および軽鎖の定常ドメインに対するコード配列を使用することによって改変することができ(米国特許第4,816,567号、Morrisson他、上記)、あるいは非免疫グロブリンポリペプチドに対するコード配列のすべてまたは一部を免疫グロブリンのコード配列に共有結合させることによって改変することができる。そのような非免疫グロブリンポリペプチドは、本発明の抗体の定常ドメインの代わりに使用することができ、あるいは本発明の抗体の1つの抗原結合部位の可変領域の代わりに使用して、キメラな二価抗体を作製することができる。

【0063】

抗体は一価抗体であってもよい。一価抗体を調製する方法はこの分野では十分に知られている。例えば、1つの方法は、免疫グロブリンの軽鎖および改変された重鎖の組換え発現を含む。重鎖は、一般には、重鎖の架橋を妨げるように、Fc領域内の任意のところで短縮化される。あるいは、架橋を形成しないように、関係するシステイン残基が別のアミノ酸残基で置換されるか、または欠失される。

【0064】

インビトロ方法もまた、一価抗体を調製することに適している。抗体を消化して、そのフラグメント(特に、Fabフラグメント)を作製することが、この分

野で知られている日常的な技術を使用して達成され得る。

【0065】

ペプチドで哺乳動物を免疫化することの代わりとして、あるいはその補完として、タンパク質に特異的な抗体を、例えば、機能的な免疫グロブリン結合ドメインをその表面に提示する バクテリオファージまたは繊維状バクテリファージを使用して、発現させた免疫グロブリン可変ドメインの組換え産生ライブラリーから得ることができる（例えば、国際特許公開WO92/01047を参照のこと）。ライブラリーは固有的であってもよく、すなわち、いずれかのタンパク質（またはフラグメント）で免疫化されていない生物から得られた配列から構築されるか、あるいは目的とする抗原にさらされた生物から得られた配列を使用して構築されたライブラリーであり得る。

【0066】

ワクチン

本発明の別の局面は、哺乳動物において免疫学的応答を誘導させる方法に関し、この方法は、*I. ricinus* および関連する種の吸血のときに伝搬し得る細菌およびウイルスから前記動物を保護するために、抗体応答および/またはT細胞免疫応答を産生するのに適切な *I. ricinus* 唾液腺ポリペプチドあるいはエピトープ含有フラグメント、アナログ、外膜小胞または細胞（弱毒化されているかまたは弱毒化されていない）を哺乳動物に接種することを含む。特に、本発明は、表に規定されたcDNAによってコードされる *I. ricinus* 唾液腺ポリペプチドの使用に関する。本発明のさらに別の局面は、哺乳動物において免疫学的応答を誘導する方法に関する。この方法は、そのような免疫学的応答を誘導して、前記動物を疾患（ライム病、ダニ脳炎ウイルス病など）から保護する抗体を産生させるために、*I. ricinus* 唾液腺ポリペプチドのインビボでの発現を行わせるベクターを介して *I. ricinus* 唾液腺ポリペプチドを送達することを含む。

【0067】

本発明のさらなる局面は、哺乳動物宿主内に導入されたときに、その哺乳動物において *I. ricinus* 唾液腺ポリペプチドに対する免疫学的応答を誘導す

る免疫学的組成物またはワクチン配合物に関する。この場合、組成物は、*I. ricinus* 唾液腺cDNA、あるいは*I. ricinus* 唾液腺ポリペプチドまたはエピトープ含有フラグメント、アナログ、外膜小胞または細胞（弱毒化されているかまたは弱毒化されていない）を含み、ワクチン配合物は好適なキャリアをさらに含むことができる。*I. ricinus* 唾液腺ポリペプチドのワクチン組成物は、好ましくは、経口的に、または（皮下、筋肉内、静脈内、皮内などの注射を含む）非経口的に投与される。非経口投与に好適な配合物には、抗酸化剤、緩衝剤、静菌剤、および受容者の血液に関して配合物を等張性にする溶質を含み得る水性および非水性の滅菌された注射液；ならびに懸濁剤または増粘剤を含み得る水性および非水性の滅菌された懸濁剤が含まれる。これらの配合物は、単回用量容器または多回用量容器で、例えば、密封されたアンプルおよびバイアルで提供されてもよく、また使用直前に無菌の液体キャリアを添加することのみを必要とする凍結乾燥状態で保存することができる。ワクチン配合物はまた、この分野で知られている水中油システムまたは他のシステムなどの、配合物に対する免疫原性を増強するアジュバントシステムを含むことができる。投薬量は、ワクチンの比活性に依存し、日常的な実験によって容易に決定することができる。

【0068】

さらに別の局面は、本発明のポリヌクレオチドを含む免疫学的／ワクチン組成物に関する。そのような技術はこの分野では知られている。例えば、Wolf 他、*Science* (1990)、247:1465~8を参照のこと。

【0069】

治療剤

本発明の別の局面は、これらの*I. ricinus* 唾液腺ポリペプチドの治療剤としての使用に関する。考えられる製造物について特定の潜在的な治療領域を検討する際、これらの製造物による病院分野範囲は、血液学（特に、凝固診療所）、移植（免疫抑制管理のため）、リウマチ学（抗炎症のため）、および一般的な処置（特異的または改善された麻酔剤のため）である。

【0070】

【表1】

表1：サブトラクティブライブラリーおよびcDNA全長ライブラリーにおいて同定された配列

遺伝子配列	モチーフ	データベースにおける類似配列	スコア	クラス
配列1		有意な同一性なし		III
配列2		有意な同一性なし		III
配列3		有意な同一性なし		III
配列4		有意な同一性なし		III
配列5	原核生物の膜リポタンパク質脂質結合部位	有意な同一性なし		III
配列6		R. melioli 窒素固定 (fixP) ヒトのアポリポタンパク質 B-100 cAMP 応答エレメント (CRE-BP1) 結合タンパク質のヒト mRNA ヒトBACクローニング345D13 ヒト外因性凝固インヒビターPI-2	0.00089 0.0045 0.057 4.7 ¹³ 4 ¹²	III III III I I
配列7	Kunitzファミリーのセリンプロテアーゼ阻害剤			III
配列8	原核生物の膜リポタンパク質脂質結合部位	有意な同一性なし		III
配列9		GTP結合タンパク質のエンドウマメ mRNA	0.48	III
配列10		有意な同一性なし		III
配列11		IL-11R-β 遺伝子	0.18	II
配列12		有意な同一性なし		III
配列13		C. glaucosporioides クチナーゼ 遺伝子	0.082	III
配列14		有意な同一性なし		III
配列15		トロンボスポンジモチーフ含有分泌性タンパク質のマウス mRNA	0.014	III
配列16	亜鉛依存性メタロプロテアーゼファミリー	ジャララギンに対するB. jararacaの mRNA Agkistrodon contortrixメタロプロテアーゼ前駆体 卵巣INF-αの0. aries 遺伝子 インターフェロン-ω 45 インターフェロン-ω 20 RCPT PGE2 PGE受容体EP2	1.1 ³ 3.9 ⁵ 0.7 0.88 0.89 0.85 0.85	I I II II II III III
配列18		有意な同一性なし		III
配列19		ヒトIL2受容体Tacタンパク質に指向するIgG1のL鎖 MAK447/179の断鎖可変領域	0.19 0.2	II II
配列20		有意な同一性なし		III
配列21		有意な同一性なし		III
配列22		ハツカネズミニューロアグチン	0.42	III
配列23		有意な同一性なし		III
配列24		ヒトロニン阻害剤 細胞質抗プロテイナーゼ 38 kDa 細胞内セリンプロテイナーゼ	2.1 ¹² 2.3 ¹²	I I
配列25		有意な同一性なし		III
配列26		有意な同一性なし		III
配列27		ハツカネズミ転写因子ELF3 (Fasta)	0.053	III
配列28		ヒトの推定的なインターフェロン関連タンパク質 (SM15) mRNA	1.70E-22	II
配列29		白血球共通抗原関連タンパク質に対するR. norvegicusの mRNA	4.80E-09	II

クラスI：推定的な抗凝固因子ホモログ；クラスII：推定的な免疫調節因子ホモログ；クラスIII：データベースにおいて見出された相溶性が低いか、または相溶性がデータベースにおいて認められない。

【表2】

表2. 選択されたクロロンの生物学的特徴

選択された5クロロンの全長配列を、tFastaおよびBlastpのアルゴリズムを使用してEMBL/GenBankデータベースと比較した。これらの配列を、「-3位におけるスクレオチド」と題された欄に示されるKozakコンセンサス配列の存在について分析した。GCG*プログラム（アルゴリズムを適用することによって、推定アミノ酸配列を、特定のタンパク質ユニットまたはタンパク質モチーフ（アルゴリズムモチーフ）の存在について、そしてシグナルペプチド配列の存在（von HeijneおよびMcGeoch分析）について分析した。

クロロン	データベースに対する全長配列の類似性	tFasta/Blastpスコア ^a	ORF (aa)	モチーフ	シグナルペプチドスコア ^b	Sp長/確率	-3位におけるスクレオチド ^c
配列28	ヒトの推定的なインタンターフェロン関連遺伝子(SKMc15) [U09585]	$1.0 \cdot 10^{-36} / 1.10^{11}$	426		$5.4/F^d$	10 aa / $0.4 \cdot 10^1$	G
配列29	R. norvegicusの白血球共通抗原(LAR)mRNA [X83546]	$7.0 \cdot 10^{-11} / N$	274		10.2/S	10 aa / $7.4 \cdot 10^7$	A
配列16	トロンボスポンジンモチーフを含む有する分泌タンパク質のマウスmRNA [D67076]	$0.002 / 6 \cdot 10^7$	489	メタロペプチダーゼ	7.9/S	19 aa / $7.4 \cdot 10^4$	G
配列24	ブタ白血球エラスターゼ阻害剤mRNA [P80229]	$0 / 7 \cdot 10^{41}$	378	セルピン	8.5/S	51 aa / $3.28 \cdot 10^3$	A
配列7	ヒト外因性凝固インヒビター [P48307]	$4.8 \cdot 10^{-12} / 2 \cdot 10^5$	87	Kunitz	6.5/S	19 aa / $4.8 \cdot 10^{-4}$	G

a スコアなし [N]

b 成功 [S] および失敗 [F]

c グアニン [G] およびアデニン [A]

d von Heijne分析

e McGeoch分析

* GCG = Genetic Computer Group (Madison, Wisconsin), バージョン10.0 (Unix, 1999年1月)

【0071】

実施例

この研究で使用された生物学的材料

病原体を含まない5日間の吸血または非摂食のイクソデス・リシヌスのメス成

虫の唾液腺がこの研究では使用された。これらの唾液腺を取り出したとき、直ちに液体窒素で凍結して、 -80°C で保存した。RNAメッセンジャー(mRNA)を抽出するために、唾液腺を、乳鉢および乳棒を使用して液体窒素中ですりつぶした。mRNAを、オリゴdTセルロース(Fast Track 2.0キット、Invitrogen、Groningen、オランダ)を使用することによって精製した。2 μg のmRNAが摂食させたダニの200個の唾液腺から抽出され、1.5 μg のmRNAが非摂食ダニの1,000個の唾液腺からも抽出された。

【0072】

実施例1：表象的差分分析(RDA)サブトラクティブライブラリーの構築

すべての手順を、HubankおよびSchatz(1994)によって記載されている通りに行った。二本鎖cDNAを、Superscript Choice System(Life Technologies、Rockville、Maryland、米国)を使用して合成した。cDNAをDpnII制限酵素で消化し、Rリンカーに連結し、R-24プライマー(HubankおよびSchatz、1994)を用いて増幅し、最後に同じ酵素で再び消化して、摂食ダニの唾液腺に由来するcDNAからなる「テスター」プール、および非摂食ダニの唾液腺に由来するcDNAからなる「ドライバー」プールを作製した。サブトラクティブハイブリダイゼーション法の第1回目には、1:100のテスター/ドライバー比を使用した。2回目および3回目には、それぞれ、1:400および1:200,000の比を用いた。3回のサブトラクションおよび増幅を行った後、DpnIIで消化された示差的な生成物を、サイズに従って、4つの異なる画分に1.7%電気泳動アガロースゲルで分割して、pTZ19rクローニングベクターのBamHI部位にサブクローン化した。連結産物を使用して、TOP-10E大腸菌コンピテント細胞(Invitrogen、Groningen、オランダ)を形質転換した。このサブトラクティブライブラリーの9600クローンを無作為に選択し、100個のマイクロプレートに個々に入れて、 -80°C で保存した。このサブトラクティブライブラリーを、pT19rクローニングベクター内に位置する領域に特異的なM13フォワードプライマーおよ

びリバースプライマーを使用して、89個の無作為に選ばれたクローンを配列決定することによって分析した。これらの89クローンのDNA配列を比較して、27個の異なるファミリー配列が同定された。データベースに存在する配列に対するこれらの配列の相同性を表1に示す。このサブラクティブ配列1~27は配列表ファイルで示されている(完全なmRNA配列が示される配列16および配列24を除く;実施例2もまた参照のこと)。3つの配列(配列7、配列16および配列24)を、それらの対応する全長型mRNA配列のさらなる特徴付けのために選択した。これらの3つの配列は、配列7、配列16および配列24にそれぞれ対応する、i)ヒト外因性凝固インヒビター(TFPI)、ii)ヘビ毒液の亜鉛依存性メタロペプチダーゼタンパク質、およびiii)ヒトロンピン阻害剤タンパク質の各配列と一致した。これらの遺伝子は、血液凝固の阻害に関与し得るタンパク質をコードしている。

【0073】

実施例2:全長型cDNAライブラリーの構築およびこの全長型cDNAライブラリーをスクリーニングすることによる全長型cDNA配列の回収

このライブラリーを、吸血させたダニの唾液腺から抽出されたmRNAを使用して作製した。mRNA(80ng)を、変性させたオリゴdTプライマー(5'-A(T)30VN-3')、SmartTMオリゴヌクレオチド(Clontech、Palo Alto、米国)およびSuperscript II逆転写酵素(Life Technologies、Rockville、Maryland、米国)を使用する逆転写に供した。一本鎖cDNAの混合物を、LA Taqポリメラーゼ(Takara、滋賀、日本)、修飾オリゴdTプライマー、およびSmartTMオリゴヌクレオチドの5'端に位置する領域に特異的な3'-「Smart」プライマーを含むホットスタートPCRアッセイにおけるテンプレートとして使用した。適用されたPCRプロトコルは、95℃で1分間、その後、95℃で25秒間/68℃で5分間の25回、そして72℃で10分であった。増幅された二本鎖cDNAの混合物をCentricon30濃縮器(Millipore、Bedford、米国)で精製した。cDNAを、0.8%ハイグレードアガロース電気泳動ゲルで、0.3kb~0.6kb、0.

6 kb ~ 1 kb、1 kb ~ 2 kbおよび2 kb ~ 4 kbの範囲にある4つの画分に分け、Qiaex II抽出キット(Qiagen、Hilden、ドイツ)を使用することによって別々に回収した。これらの4つの画分を、TOPOクロニングキット(Invitrogen、Groningen、オランダ)に含まれるpCRIIクロニングベクターに個々に連結した。その後、連結された画分を使用して、XL2-Blueウルトラコンピテント大腸菌細胞(Stratagene、Heidelberg、ドイツ)を形質転換した。得られた組換えクローンをマイクロプレートにおいて個々に-80℃で保存した。10個のクローンを部分的および完全な配列決定のために無作為に選んだ。この手順の結果、2つのcDNA配列(配列28および配列29、表1を参照のこと)が、配列データベースに対するそれらの相同性のために選択された。1つは、インターフェロン様タンパク質に対して非常に相同的であり(配列28)、これに対して、もう一方は、ドブネズミ(*Rattus norvegicus*)白血球共通抗原関連タンパク質に対する相同性を示している(配列29)。

【0074】

全長型cDNAライブラリーの4つの異なる画分を、サブラクティブcDNAライブラリーにおいて同定された選択クローンに対して特異的な放射能標識オリゴヌクレオチドプローブを用いてスクリーニングした。これらのオリゴプローブの標識を、Current Protocols in Molecular Biology(Ausubel他編、1995年、J.Wiley and sons)に記載されているように行った。その後、これらの4つの画分をニトロセルロースメンブランに置き、37℃で一晩生育させた。これらのメンブランをNaOH(0.2M)/NaCl(1.5M)中で変性し、Tris(0.5M)pH7.5-NaCl(1.5M)中で中和して、2XSSC(NaCl(0.3M)/クエン酸三ナトリウム二水和物(0.03M))中で固定した。メンブランを80℃で90分間加熱し、プレハイブリダイゼーション溶液(6XSSC、10Xデンハルド溶液、0.1%SDS)中で55℃で90分間インキュベーションし、そして最後に、特異的な放射能標識オリゴヌクレオチドプローブを含有する55℃の予熱されたハイブリダイゼーション溶液に一晩入れた。ハ

イブリダイゼーションさせたメンブランを、55 で、6XSSC溶液中で、10分間、3回洗浄し、乾燥して、Kodak社のX-OMATフィルムに-80で一晩感光させた。全長型cDNAライブラリーはまた、1組のクローンを配列決定することによっても分析された。得られたDNA配列をENBL/GenBankデータベースと比較して、他の対応するクローンを回収するオリゴヌクレオチドプローブを作製するために使用した。このようにして、配列28および配列29の完全なコンセンサスmRNA配列が、これらの配列に対応する2つの他のクローンを回収することによって確認された。サブラクティブクローン16に対応する全長型cDNAクローンが1個だけ単離された。従って、配列16および配列24の完全な配列を同定するために、cDNA末端の迅速な増幅(RACE)法を適用した。

【0075】

RACE法を、Frohman他(1995)によって記載されているように行った。逆転写工程を、吸血させたダニの唾液腺から抽出されたmRNAの10ngと、Thermoscript逆転写酵素(Life Technologies、Rockville、Maryland、米国)とを使用して行った。遺伝子に特異的なプライマー(GSP)はすべて、長さが18塩基であり、G/C比が61%であった。増幅産物をアガロースゲル電気泳動に供して、等速電気泳動手順を使用することによって回収した。cDNAをpCRII-TOPOクローニングベクター(Invitrogen、Groningen、オランダ)にクローン化した。コンセンサスcDNA配列を同定するために、種々のクローンを配列決定し、それらの配列をそれらの既知の対応する配列と比較した。従って、サブラクティブライブラリーにおいて同定されたクローン16およびクローン24の完全なcDNA配列がこのRACE法によって得られた(図1)。

【0076】

実施例3：5個の選択されたクローンの全配列の分析

選択されたクローン(配列7、配列16、配列24、配列28および配列29)の配列により、アミノ配列が推定されるオープンリーディングフレームの同定が可能になる。これらの潜在的な翻訳産物は、87アミノ酸~489アミノ酸の

間のサイズを有する(表2を参照のこと)。それらのそれぞれの性質をシリコ(silico)で評価するために、前記の5つのオープンフレームのアミノ酸配列およびヌクレオチド配列を、tFastaおよびBlastpの各アルゴリズムを使用してデータベースと比較した。これらの比較により、配列7はヒト外因性凝固インヒビター(TFPI)に対して非常に相長的であることが示される。TFPIは、Kunitzプロテアーゼ阻害剤(KPI)タイプの3つのドメインを有するセリンプロテアーゼの阻害剤である。これらのユニットまたはモチーフはそれぞれ、異なるタイプのプロテアーゼに特異的な親和性を有している。第1および第2のKPIドメインは、VIIa凝固因子およびXa凝固因子のそれぞれの阻害に関与している。第3のKPIドメインは、明らかに、阻害活性を有していない。配列7のクローンによってコードされる配列はTFPIの第1のKPIドメインの領域に対して相長的であること、そしてKPIはその中に完全に保たれていることには留意しなければならない。この類似性は、配列7のタンパク質が潜在的なVIIa因子の阻害剤であることを示唆している。

【0077】

配列28のクローンから推定されるアミノ配列は、3つのデータベース配列、すなわち、マウスのTIS7タンパク質、ラットPC4タンパク質およびヒトSKMc15タンパク質と大きな相同性を有する。これらの3つのタンパク質は、推定的なインターフェロン型因子として記載されている。これらのタンパク質は、B2インターフェロンタンパク質の非常に十分に保存された領域を有する。従って、配列28のタンパク質は免疫調節活性を有することが提案される。

【0078】

配列16および配列24をデータベースと比較し、その結果、セリンプロテアーゼ阻害剤のスーパーファミリー(セルピン)に属するGloydiushalys(ヘビの垂目)M12bメタロペプチダーゼおよびブタエラスターゼの阻害剤とのそれらの相同性がそれぞれ示される。これらの2クローンのアミノ配列はまた、前記ファミリーの特異的なユニットを有している。前記タンパク質は、抗凝固性および免疫調節性を有することが提案される。

【0079】

最後に、配列29のクローンは、ドブネズミの白血球共通抗原(LAR)との弱い類似性を有する。後者は、接着分子である。従って、配列29のタンパク質は、LARタンパク質によって発現される免疫調節性に関連する免疫調節性を有することが考えられる。

【0080】

それらの潜在的な性質により、調べられたタンパク質の大部分は、吸血のときにダニの唾液に分泌されることが予想される。従って、試験を、推定されたアミノ配列の開始部におけるシグナルペプチドの存在を見出すために行った。Von Heijne分析法による結果はすべて陽性であった。McGeoch法によって、シグナルペプチド配列が、配列7、配列16、配列24および配列29の推定されたアミノ配列について検出された。前記タンパク質はダニの唾液腺に分泌されることが考えられる。さらに、Kozakコンセンサス配列の存在が、すべての調べられたクローンの上流に認められた。このことは、それらのmRNAがタンパク質に翻訳され得ることを示している。

【0081】

実施例4：サブトラクティブcDNAライブラリーおよび全長型cDNAライブラリーにおいて単離されたcDNAクローンの評価および示差的発現

5個の全長型の選択されたクローン(配列7、配列16、配列24、配列28および配列29)および9個のサブトラクティブクローンに対応するmRNAに示差的な発現を、PCRアッセイおよびRT-PCRアッセイを使用して評価した(図2)。

【0082】

PCRアッセイを、吸血させたダニまたは非摂食ダニのいずれかの唾液腺から抽出されたmRNAに対する逆転写手順から得られたcDNAをDNAテンプレートとして使用して行った。それぞれのPCRアッセイには、それぞれの標的のサブトラクティブcDNA配列または全長型cDNA配列に特異的なプライマー対が含まれた。PCRアッセイは、1 μ Mのプライマー、0.2mMのデオキシヌクレオチド(dATP、dCTP、dGTPおよびdTTP; Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, ドイツ)、PCR緩

衝液(10mMのTris-HCl、50mMのKCl、2.5mMのMgCl₂、pH8.3)および2.5UのTaqDNAポリメラーゼ(Boehringer Mannheim GmbH、Mannheim、ドイツ)を含有する50μlの最終容量で行われた。DNAサンプルは、下記の条件のもとで35サイクルにわたって増幅された: 94 で1分間、72 で1分間および64 で1分間、その後、72 で7分間の最終的な伸長工程。

【0083】

RT-PCRアッセイを、5個の選択された全長型cDNAクローンおよび5個のcDNAサブトラクティブクローンに対して行った。逆転写アッセイにおけるテンプレートとして使用されたmRNAは、吸血させた*I. ricinus*ダニまたは非摂食*I. ricinus*ダニの唾液腺から抽出された。逆転写アッセイを、1つの特異的なプライマー(これは、選択された配列の1つを標的とする)と「Thermoscript逆転写酵素」(Life Technologies、Rockville、Maryland、米国)とを使用して、60で50分間行った。各PCRアッセイには、逆転写に特異的なプライマーおよび別の特異的なプライマーが用いられた。PCRアッセイは、1μMのプライマー、0.2mMのデオキシヌクレオチド(dATP、dCTP、dGTPおよびdTTP;Boehringer Mannheim GmbH、Mannheim、ドイツ)、PCR緩衝液(10mMのTris-HCl、50mMのKCl、2.5mMのMgCl₂、pH8.3)および2.5UのExpand High Fidelityポリメラーゼ(Roche、Bruxelles、ベルギー)を含有する50μlの最終容量で行われた。一本鎖DNAサンプルは、下記の条件のもとで30サイクルにわたって増幅された: 95 で1分間、72 で30秒間および60 で1分間、その後、72 で7分間の最終的な伸長工程。図2は、吸血させたダニおよび非摂食ダニの唾液腺において類似したレベルで発現している配列28を除いて、選択された配列の発現が5日間吸血させたダニの唾液腺において誘導されていることを示している。それ以外のmRNAの発現は、吸血のときに特異的に誘導され得るか、あるいは増大し得る。

【0084】

実施例5：哺乳動物細胞における組換えタンパク質の発現

単離された配列の性質の研究には、これらの配列によってコードされるタンパク質を大量に産生させて、精製することを可能にする発現系におけるその発現が含まれる。これらの実験を下記ならびに実施例6に記載する。

【0085】

5.1 pCDNA3.1-His/V5 (Invitrogen) ベクターにおける配列のサブクローニング

5個の選択されたクローン(配列7、配列16、配列24、配列28および配列29)のDNA配列をpCDNA3.1-His/V5発現ベクターに移した。前記ベクターは、6個のヒスチジンのテールならびにV5エピトープに融合された異種タンパク質の真核生物細胞における発現を可能にする。種々のDNAを、対応するクローンに特異的なプライマーを使用することによってRT-PCRにより作製した。これらのプライマーは、タンパク質を6xHIS/エピトープV5テールに融合させるために、各オープンリーディングフレームまたは相の停止コドンが除かれるように構築された。さらに、プライマーは、発現ベクターにおけるクローニングに適合した制限部位を含有した。増幅のときには、高忠実度(Promega)Pfuポリメラーゼを使用するように注意した。

【0086】

配列16および配列24の組換えタンパク質の一過性発現を、配列16および配列24のpCDNA3.1-His/V5構築物をCOSI細胞にトランスフェクションした後、Fugen6(Boehringer)を使用して測定した。トランスフェクションした24時間後、48時間後および72時間後に対応する培養培地のタンパク質抽出物を、クーマシーブルーで染色することによって、あるいは、一方では抗6xヒスチジン抗体を使用し、もう一方ではアルカリホスファターゼに結合させたニッケルキレートビーズを使用するウエスタンブロットによってアクリルアミドゲルで分析した。これらの分析は、前記タンパク質が細胞培養培地に発現していることを示していた。

【0087】

実施例6：大腸菌におけるタンパク質の発現

6.1 pMAL-C2E発現ベクターへのコード配列の挿入

pMAL-C2E(NEB)ベクターを使用することによって、様々なタンパク質を細菌において発現させることも行われた。前記ベクターは、マルトース結合タンパク質(MBP)と融合した様々なタンパク質を発現する。この場合、目的とするタンパク質は、MBPをタンパク質から分離し、かつプロテアーゼのエンテロキナーゼに特異的な部位のためにMBPから分離することができる。

【0088】

試験される5個の配列を、pMAL-C2Eベクターを使用して最適に発現させるために、STOPコドンの上流に位置する20塩基に対して、そしてオープンリーディングフレームまたは相のATGの下流に位置する20塩基に対して相補的なPCRプライマー対を構築した。そのようにして、増幅されたcDNAフラグメントは、その停止コドンを備えた標的mRNAのコード配列のみを含んだ。目的とするタンパク質をそのN末端によりMBPに融合させた。一方、これらのプライマーは発現ベクターに特異的な特定の制限部位を含んでいたため、cDNAの直接的なクローニングを行うことが可能であった。PfuDNAポリメラーゼ(Promega)の使用により、増幅された配列に持ち込まれるエラーを心配する必要もなくcDNAを増幅することが可能になった。

【0089】

配列7、配列16、配列24および配列29の各クローンのコード配列をそのようにして構築した。大腸菌のコンピテントTG1細胞を、これらの構築物を使用してトランスフェクションした。プラスミドDNAのこれらのミニ調製物の酵素消化により、配列7、配列16、配列24および配列29の各pMALC2-Eクローンの大部分が効果的に組換えになったことを調べることが可能になった。

【0090】

6.2 組換えタンパク質の発現

大腸菌TG1にクローン化された様々な構築物から出発して、MBPと融合させた組換えタンパク質の発現研究を、配列28を除く、目的とするすべての配列(すなわち、配列7、配列16、配列24および配列29)について開始した。

配列7、配列16、配列24および配列29の代表的なクローンならびに陰性コントロール（非組換えプラスミド）の培養を行い、それにおける組換えタンパク質の発現を誘導させた。これらの培養物を遠心分離して、沈殿物（塊状物）を培地から分離し、沈殿物を15mMのTris（pH7.5）に再懸濁してフレンチプレスに通した。クーマシーブルーで着色される（10%）アクリルアミドゲルによって、あるいはウサギ抗MBP抗体を使用するウエスタンブロットによってこれらのサンプルを分析することにより、配列7（約50kDa）、配列16（約92kDa）、配列24（約80kDa）および配列29（約67kDa）の組換えタンパク質の発現が示された。

【0091】

実施例7：抗体の産生

配列7、配列16および配列24の各タンパク質を、前記タンパク質に対する抗体を産生させる目的で4匹のマウスからなる群に注射した。注射された最初の抗原は、完全フロイントアジュバントを用いて作製された。2週間後に、想起注射を、不完全フロイントアジュバントを用いて行った。配列16を注射したマウスの血清は、抗MBP抗体に関する陽性の試験をもたらした。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

(1) INFORMATION FOR SEQ ID N°: 1

5

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS :

(a) LENGTH : 194 base pairs

(b) TYPE : nucleic acid

(c) STRANDEDNESS : single

10

(d) TOPOLOGY : linear

(ii) MOLECULE TYPE : cDNA

(iii) SEQUENCE DESCRIPTION : SEQ ID N°1 :

15

1 ATACCTTCCA CTTGTAGCCC TTCCTCATCC GATATGGTGA CGGATGCCAT

51 TGCATCCTCG TCGTGGAAGA GGTCCICTTC TAAATAAGAC CGATCCATAT

20

101 ATGTGTSTTT GCGAATGCCG TCGACGTAGC TGCTGACTAG AAACCTGTCG

151 GCTAGGACAG AACTTTTCTT CAGGTTTAGC GTAATGTCCT CGTT

25

(2) INFORMATION FOR SEQ ID N°: 2

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS :

(a) LENGTH : 607 base pairs

(b) TYPE : nucleic acid

30

(c) STRANDEDNESS : single

(d) TOPOLOGY : linear

(ii) MOLECULE TYPE : cDNA

35

(iii) SEQUENCE DESCRIPTION : SEQ ID N°2 :

1 TACCNNGGAA TCCAAAACCA ATTTTATTG GAACTTGCAC GTCTTCTTCA

51 AGGGGGTGGC ACCTCTGCAT TTATGAAGTT CGTCTTGGCA TTTTATTTTT

40

101 TGGTTCCTTC ATTGCRGAAC TCGCAAATGC ACTTCCCGTG CTTGTCCGAT

151 TTCGCCCAA AAGGGCATGG CATTCTTCC GGCAGATTAA CTTTTTCAAA

45

201 TTCACGGTTC TGAACCAATA ATAGATCGTG GCAATGTTG TGCTGTTTGC

251 GATTTGCAAA CGAGCTGTAG GCACCATTGG ACTCAAAGGT GCGCACAACA
 301 TGGGGCCGAA CTGTGAAAAA CAAATTAAGG CTNCTTGTG ATAACGCTAG
 5 351 TCTTGGTACG CCGTTAGAGG TCGATGTCGC GCCTCGCGAT TGCAAAGTCA
 401 CTTGCACTTA TCAAGCTCCT GGAGAAAAAT GGGTGCAACG GGGGGATCAG
 10 451 CGTTTGTACT TGCAAACATT TGTGGAGACG GTAAACCWGT ATTTCCGGGA
 501 ACTCAGATGC TCCAGCGTGA AGCTCGTCTT AATAAAAGTT GTAAATTCGA
 551 GTATNGATGA AGAACTGAAA TTCGAGGCAT TTAGAAACAC CACGAGAAGC
 15 601 AGCGGAA

(3) INFORMATION FOR SEQ ID N°: 3

20

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS :

- (a) LENGTH : 259 base pairs
- (b) TYPE : nucleic acid
- (c) STRANDEDNESS : single
- (d) TOPOLOGY : linear

25

(ii) MOLECULE TYPE : cDNA

(iii) SEQUENCE DESCRIPTION : SEQ ID N°3 :

30

1 GATCCTAGGC CTGAAAATGA GTGTCCATCG TCTTCAGATA GTGCCACATT
 51 GTAATTGGTA CAAGCTCCAT TTTCGTCAGC GCTGTTTGTG ATGCTGCCGC
 35 101 CTACTTTTCC TTCGGCACTC CATAAGTTAA ACCCTGTCAT TATAAGTGTG
 151 ATTGCCGTAT CTCGGCTGAA TGGGTTCCAT TTTTCTCTTA AATAATCAGC
 201 TGTCCATATT CCATGTATTG TGTTTCATGAG TATGTGATTC TCATCGTATA
 40 251 TCTTCCGCT

45

(4) INFORMATION FOR SEQ ID N°: 4

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS :
- 5 (a) LENGTH : 170 base pairs
- (b) TYPE : nucleic acid
- (c) STRANDEDNESS : single
- (d) TOPOLOGY : linear

10 (ii) MOLECULE TYPE : cDNA

(iii) SEQUENCE DESCRIPTION : SEQ ID N°4 :

1 CCACTCGAAA ATGGAGGTT TGAACATTT CAGTACCCCT GTGAAC TGTG

15 51 GCTTTGCAAT GTAACAGCAA AAACACTTAC AGTTGAAGGG TGCAGTGTCA

101 GACGCTATGG AAGTTGCATC CAGGAGCACR ACCCTGATTA C TACTGGGCA

151 CGTTGCTRTC CGGGTCTGTC

20

(5) INFORMATION FOR SEQ ID N°: 5

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS :
- 25 (a) LENGTH : 168 base pairs
- (b) TYPE : nucleic acid
- (c) STRANDEDNESS : single
- (d) TOPOLOGY : linear

30 (ii) MOLECULE TYPE : cDNA

(iii) SEQUENCE DESCRIPTION : SEQ ID N°5 :

1 GTATGTTACC ATGTCCAACC CGGTATTAA ATACACCAAG TCGTAGGATT

35 51 TGTAGGCAGC TGCATTGCCC TTGACGTACT CTCTCAACGT TGCCAAGGAC

101 TCAGGCCCAT AAATGTAGTG GGGTTGACCT TGAAC TCTTC GTAAAAAGCG

40 151 TTC TTTCTCC GTCGTGAG

45

(6) INFORMATION FOR SEQ ID N°: 6

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS :
- (a) LENGTH : 247 base pairs
 - (b) TYPE : nucleic acid
 - (c) STRANDEDNESS : single
 - (d) TOPOLOGY : linear

(ii) MOLECULE TYPE : cDNA

(iii) SEQUENCE DESCRIPTION : SEQ ID N°6 :

```
1  CCGAAMATAA  AACTTAGTCT  CACCAATATA  CGTTTGCCIA  ACGCGAAGGA
15  51  ACAGGCACAA  ATATACTACG  AGCAGGACAT  TCTCAAGAAC  ACGGTTCAEG
    101  GAGTGTGGAC  GAGAATTCAC  TCAAAATATC  CGTTCCTGA  AGATGAGGGA
    151  ATTACACTGA  TAATGACAGG  GTTTGATTIA  TGGAGTGCCG  ATTAACTGT
20  201  AGGCGGCACC  ATAACAAACA  GCGCTGAGAA  AAGCGGAGCT  TGTACGA
```

(7) INFORMATION FOR SEQ ID N°: 7

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS :
5 (a) LENGTH : 261 base pairs
(b) TYPE : nucleic acid
(c) STRANDEDNESS : single
(d) TOPOLOGY : linear

10 (ii) MOLECULE TYPE : cDNA

(iii) FEATURE :
(a) NAME/KEY : CDS
(b) LOCATION : 1 .. 261

15 (iv) SEQUENCE DESCRIPTION : SEQ ID N°7

1 ATG CCT TTT ATT TTC GTG GTG AGC TTA GTC ATT GTG GCC TGC ATC GTG
GTA GAC ACA
20 Met Pro Phe Ile Phe Val Val Ser Leu Val Ile Val Ala Cys Ile Val
Val Asp Thr

58 GCC AAC CAC AAA GGT AGA GGG CGG CCT GCG AAG TGT AAA CTT CCT CCG
GAC GAC GGA
25 Ala Asn His Lys Gly Arg Gly Arg Pro Ala Lys Cys Lys Leu Pro Pro
Asp Asp Gly

115 CCA TGC AGA GCA CGA ATT CCG AGT TAC TAC TTT GAT AGA AAA ACC AAA
ACG TGC AAG
30 Pro Cys Arg Ala Arg Ile Pro Ser Tyr Tyr Phe Asp Arg Lys Thr Lys
Thr Cys Lys

172 GAG TTT ATG TAT GGC GGA TGC GAA GGA AAC GAA AAC AAT TTT GAA AAC
ATA ACT ACG
35 Glu Phe Met Tyr Gly Gly Cys Glu Gly Asn Glu Asn Asn Phe Glu Asn
Ile Thr Thr

229 TGC GAA GAG GAA TGC AGA GCA AAA AAA GTC TAG
 Cys Gln Glu Glu Cys Arg Ala Lys Lys Val End

5

(8) INFORMATION FOR SEQ ID N°: 8

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS :
 (a) LENGTH : 292 base pairs
 (b) TYPE : nucleic acid
 (c) STRANDEDNESS : single
 (d) TOPOLOGY : linear

- (ii) MOLECULE TYPE : cDNA

15

- (iii) SEQUENCE DESCRIPTION : SEQ ID N°8 :

1 CATCGMAGCC ATAGTATATT TTGCACTTGT CTTCCGTTTC GTCGTAGTAG
 20 51 GACCGATTCC ACATTGTAGT ACACCAGTCA CTTATATCCT GCGGGCGGTG
 101 CTTGCATTTG TCCTGAACAA ATCTTCGACA GCGCTTGTCG CAGGCCTCCT
 151 GGGAAATAGAA GCGGTTCTCT CTTCCGCATC TCCATTGGA ATCATAGAAA
 25 201 CATCTTTGAG TTTGAATATT GTAGCGATAA TAATCGGTAT CAGTTTCTTT
 251 GCATGGTCCT GGGAGGGGTT TGGCGCAGGG GCCGTATTCA GG

30

(9) INFORMATION FOR SEQ ID N°: 9

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS :
 (a) LENGTH : 270 base pairs
 (b) TYPE : nucleic acid
 (c) STRANDEDNESS : single
 (d) TOPOLOGY : linear

- (ii) MOLECULE TYPE : cDNA

40

- (iii) SEQUENCE DESCRIPTION : SEQ ID N°9 :

1 GGTAATAGTT GTCAAATTCC ATTAATGTAT CCTGAAATGT GACCATATCT
 45 51 TTGTTTCCCC TGTAAAATCT CATAAAAGGC TGTGTGTTTT CCTTAAGAAG

101 TGTAACAGCC ACGATGGTCA ATCTCACGGA TGGATGTGTG ACACITTTAT
 151 ATCTCAGGTT TGCCGACATT GCCATTACAG ATAAATAGTT GATAATTTCT
 5 201 TTCTTGITAT AGTTGTAAGC AGCGCATGTT GTTGCATCAA GCACCACATG
 251 CACTTCAGGC AATATGGTTT

10

(10) INFORMATION FOR SEQ ID N°: 10

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS :
 (a) LENGTH : 316 base pairs
 15 (b) TYPE : nucleic acid
 (c) STRANDEDNESS : single
 (d) TOPOLOGY : linear

(ii) MOLECULE TYPE : cDNA
 20

(iii) SEQUENCE DESCRIPTION : SEQ ID N°10 :

1 AGAAAGCAGT CATATTGGCC ATCCACAGGT CACAATGGTT CTCTCCTTGA
 25 51 CCTGGCATCG GGATTGGAAG TATGGTGCAG TTCACGTAGT TGGAATACAA
 101 CACGAAATGT GTTCGTTGGT ACGCCAATAG GGGTTCTCGC AAAGAACATA
 151 TCATTTGGAG GAAGGCGTAG TCCGTCGAGA TATCCCAAAA CTAGGGTTTC
 30 201 ATTGCGTGGC AACCAACTGC CCCCACTTCT GTATGTGTAC TGTAAGGAGT
 251 RGTGAAACGG YGTCCTCTTT CCCATAACCT TGAAGTTTTC ACACCTGCAGA
 35 301 GGATTACCTC TCAAAA

(11) INFORMATION FOR SEQ ID N°: 11

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS :
 (a) LENGTH : 241 base pairs
 40 (b) TYPE : nucleic acid
 (c) STRANDEDNESS : single
 (d) TOPOLOGY : linear

45

(ii) MOLECULE TYPE : cDNA

(iii) SEQUENCE DESCRIPTION : SEQ ID N°11 :

1 AAGGTAGCAA GGGTGGTAGG CTTTCCTCAC AAAGAGTCTG GCTCCGTGA
 5
 51 TAACCATATC CATTTCCTCAC CGTATACCCG TCATCCAACG TCAATTGTGT
 101 TACAAGGCAG ATAATGTCAA AATGGCTCTG GTCCTATAA TAGTCGGATA
 10 151 ATGTAGAAAT CGCTCCATGT GGCCAAATAG ATGTTCTCTT TTCATACTGT
 201 TTTAACTTTA ATTGTAGGTC CGCCTCGTTC TCGAGGTATG T

15 (12) INFORMATION FOR SEQ ID N°: 12

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS :

(a) LENGTH : 636 base pairs
 (b) TYPE : nucleic acid
 20 (c) STRANDEDNESS : single
 (d) TOPOLOGY : linear

(ii) MOLECULE TYPE : cDNA

25 (iii) SEQUENCE DESCRIPTION : SEQ ID N°12 :

1 TTCCCCNAAT TGGCCTTGGC ANNCTTGCAA GTGGACNCTA GAGGCTCCGA
 51 AGATGGACAG ATTGCGCATG AAATATTTGA AATCGAGCAG AATGGTGATT
 30 101 TTAGGAGCGA TTATATTGTG CCACCCAGTT TGAAAGTGCA AGAACGCACA
 151 GTGGTTTACC GTAACAAGTA CACCAGAGTT CCTGTAAATT TTACCGTCGA
 35 201 AGTTGCCATG CTGATTGATA AGTATTTATA CWAGGAGTTC AAGAACGAGA
 251 GGCACATCGT ACGGTACCTG GCTATGATAC TGACTTTGAT AAATCTGAGG
 301 TATGCCGACA CACATGACCC GTACATCCAG TTCTTCTCA CACAAGTGTT
 40 351 CGTGGGGAAM WCTGGCGATC ATATGGGCCA CATGCCCTTC CGACGAGCGT
 401 TCTTGTTCAG GCGCCGGCAT TATGCGCAGT TTAGGCCCAA TMACACCTTC
 45 451 CACTTGTAAT TCTCCGTTGT TGGATAGTGT AAGTGAGGCC ATTGCATCAG

501 CATCGTGGAA GARGCCTTCC TCCAAGTAGG AACCGCCCAT TTAGGTTTGC
 551 TTTCCCAATC GGCCAATTA ANTTTTAAAA AAAATTCCCC CCCCCAAAAAT
 5 601 TAATTTTTTT TAAAGGTGGA TTGTGATTTC TCCGTT

(13) INFORMATION FOR SEQ ID N°: 13

- 10 (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS :
 (a) LENGTH : 432 base pairs
 (b) TYPE : nucleic acid
 (c) STRANDEDNESS : single
 (d) TOPOLOGY : linear
- 15 (ii) MOLECULE TYPE : cDNA
- (iii) SEQUENCE DESCRIPTION : SEQ ID N°13 :

20 1 GATCCCAAAA GTGCCCTGG ARCGACGGTT ACATCATGAG CTACGTCATA
 51 AACTTCAAAA ACCACTTCAA ATTTTCTCCC TGCTGTGTAG AATCAATTCG
 101 ATTCTGCGCA CGAGAGCGGG ACTGCCTCTA CAAAGTCAAT GCCAAGGATG
 25 151 CTGTAAAAAG CCTAATATCT CTGCCCGGAT TTAGGATATC GCCAACGAGT
 201 TTCTGTCAAT TTATGCATCC GCTTTACGGC GGTGTCCATA GCGATAAGAA
 30 251 AGCAGGTCTG TCCGATTGCG TACAGACGTG TAGAACGGCC AAAAATCGAC
 301 GAGGAGGCTA CCATTCATGG ATTCACGGGG CACTTGACGG GGTTCCTTGC
 35 351 GACAAGAGAA ACCCCAAGAA GGCTGCATA AACGGGAAAT GCACCCTCCT
 401 TAAGAGCATG CCCACACAGAA CGTACCGGGA AT

40

(14) INFORMATION FOR SEQ ID N°: 14

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS :
 (a) LENGTH : 466 base pairs
 (b) TYPE : nucleic acid
 (c) STRANDEDNESS : single
 (d) TOPOLOGY : linear

(ii) MOLECULE TYPE : cDNA

(iii) SEQUENCE DESCRIPTION : SEQ ID N°14 :

1 AGGGCGTTCT TTGCTTYACA GGAACRGCA TATGGGCCAC GTGACCTTC
 51 AATGACCGCT CCAAATCTGG CATAGGTGA AYTCCAAAGT CGTGGCGCAG
 151 CAGGCCTYCC ACATTCACTC CATCCTCGTC TTTTAGGATG ACTGCCGCCA
 201 TAAGTATTGA CCAACGATCG GCCGAATGAT TACGGCTCAC CAAACACATC
 251 AAATACCCCC GTCAAAGTCAA GAGCTGGAAG CACAAAGCAT AGTATGTACA
 301 AGATACCCCTT GGAAATCTTT CCCGAAGTTC ACCTTGTGGT GGACAGCACA
 351 TTTGCCAAAAG CTTTTAAATT TGACGTGTAC AAAGTAACGC GTTACTTCGC
 401 AGTGCTTACA AATGCGGCTA ATCTTAGGTA TGCCAGCTTC GTATTTCCAA
 451 AAGTACAGCT CAGGAT

(15) INFORMATION FOR SEQ ID N°: 15

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS :
 (a) LENGTH : 377 base pairs
 (b) TYPE : nucleic acid
 (c) STRANDEDNESS : single
 (d) TOPOLOGY : linear

(ii) MOLECULE TYPE : cDNA

(iii) SEQUENCE DESCRIPTION : SEQ ID N°15 :

1 CTCGTCGACA CATTCTCCTA AAATGCAAGC CTTTTTTTTT CCACAAGGTG

51 TACCGTCGAC TACACTGAGT CTCCAATAAA TATGTTTTCC GGTGCAATTT
 101 ACCTTGCACT CTTTGACGCC GTATGTAGGG TCAGCGTGCA TGCCTTCGTC
 5 151 GTACATATAC ACCCTCTGAC AGTAGTTGCT CAGTGTGTC ATCCTACCAG
 201 GAAGCTTAGA CGAACGTTTT ATTGTTTTTG TCGTGTAICG TTCTCTAAGG
 251 CATTGAATT CCGGACGGTT GTAGAGGTTG CTGACTTCTC GCTGGCAGCA
 10 301 ATAAGAGAAC TGATACTGGC GCTCGTCTTG CATCTTGTA A CTCATGAGGT
 351 ATCCGTCATC CCATGGGCAG TCCGCAG

15

(16) INFORMATION FOR SEQ ID N°: 16

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS :
 (a) LENGTH : 1670 base pairs
 (b) TYPE : nucleic acid
 (c) STRANDEDNESS : single
 (d) TOPOLOGY : linear
- (ii) MOLECULE TYPE : cDNA
- (iii) FEATURE :
 (a) NAME/KEY : CDS
 (b) LOCATION : 54 .. 1520
- (iv) SEQUENCE DESCRIPTION : SEQ ID N°16 :

1 AAGGAAGAAG TTAGGCGTAG GCTTTGGGAA ACCGGTCATC CTCGAAACCA GAG
 54 ATG TCG GGA CTC AGC CTG AAA TTG TGG ATT GTA GCG TTC TTT TCT
 35 Met Ser Gly Leu Ser Leu Lys Leu Trp Ile Val Ala Phe Phe Ser
 99 TTC TGC TTG GCC GAG AAA GAG CAT GGG ATC GTG TAC CCC AGG ATG CTT
 Phe Cys Leu Ala Glu Lys Glu His Gly Ile Val Tyr Pro Arg Met Leu
 40 147 GAA AGC AGA GCA GCA ACT GGA GAG AGA ATG CTT AAA ATC AAC GAT GAC
 Glu Ser Arg Ala Ala Thr Gly Glu Arg Met Leu Lys Ile Asn Asp Asp
 195 CTG ACG TTG ACG CTG CAG AAG AGT AAG GTC TTC GCT GAC GAC TTT CTC
 Leu Thr Leu Thr Leu Gln Lys Ser Lys Val Phe Ala Asp Asp Phe Leu
 45 243 TTC AGC ACG ACC GAC GGA ATT GAA CCT ATT GAT TAC TAC ATC AAA GCC

Phe Ser Thr Thr Asp Gly Ile Glu Pro Ile Asp Tyr Tyr Ile Lys Ala
 291 GAA GAC GCT GAA CGT GAC ATC TAC CAC GAC GCA ACT CAC ATG GCA TCA
 Glu Asp Ala Glu Arg Asp Ile Tyr His Asp Ala Thr His Met Ala Ser
 5
 339 GTA AGG GTA ACG GAC GAT GAT GGC GTG GAA GTG GAA GGA ATT CTT GGA
 Val Arg Val Thr Asp Asp Asp Gly Val Glu Val Glu Gly Ile Leu Gly
 387 GAG AGG CTT CGT GTT AAA CCT TTG CCG GCA ATG GCC CGC AGC AGC GAT
 10 Glu Arg Leu Arg Val Lys Pro Leu Pro Ala Met Ala Arg Ser Ser Asp
 435 GGC CTC AGA CCG CAT ATG TTG TAC GAA GTC GAC GCA CAC GAA AAC GGC
 Gly Leu Arg Pro His Met Leu Tyr Glu Val Asp Ala His Glu Asn Gly
 15
 483 CGG CCA CAT GAT TAT GGT TCA CCG AAC ACA ACA AAT ACC CCC GTA GAG
 Arg Pro His Asp Tyr Gly Ser Pro Asn Thr Thr Asn Thr Pro Val Glu
 531 AGA AGA GCT GGA GGC ACA GAA CCC CAG ATG TAC AAG ATA CCA GCG GAA
 Arg Arg Ala Gly Gly Thr Glu Pro Gln Met Tyr Lys Ile Pro Ala Glu
 20
 579 ATC TAT CCC GAA GTT TAC CTT GTG GCG GAT AGT GCC TTT GCC AAA GAA
 Ile Tyr Pro Glu Val Tyr Leu Val Ala Asp Ser Ala Phe Ala Lys Glu
 627 TTT AAC TTT GAT GTG AAC GCC GTT ACG CGT TAC TTC GCA GTG CTT ACA
 25 Phe Asn Phe Asp Val Asn Ala Val Thr Arg Tyr Phe Ala Val Leu Thr
 675 AAT GCG GCT AAT CTT AGC TAT GAA AGC TTC AAA TCT CCA AAG GTA CAG
 Asn Ala Ala Asn Leu Arg Tyr Glu Ser Phe Lys Ser Pro Lys Val Gln
 30
 723 CTC AGG ATC GTT GGC ATA ACG ATG AAC AAA AAC CCA GCA GAC GAG CCA
 Leu Arg Ile Val Gly Ile Thr Met Asn Lys Asn Pro Ala Asp Glu Pro
 771 TAC ATT CAC AAT ATA CGG GGA TAT GAG CAG TAC CGG AAT ATT TTG TTT
 Tyr Ile His Asn Ile Arg Gly Tyr Glu Gln Tyr Arg Asn Ile Leu Phe
 35
 819 AAG GAA ACA CTG GAG GAT TTC AAC ACT CAG ATG AAG TCA AAA CAT TTT
 Lys Glu Thr Leu Glu Asp Phe Asn Thr Gln Met Lys Ser Lys His Phe
 867 TAT CGT ACT GCC GAT ATC GTG TTT CTC GTG ACA GCA AAA AAT ATG TCC
 40 Tyr Arg Thr Ala Asp Ile Val Phe Leu Val Thr Ala Lys Asn Met Ser
 915 GAA TGG GTT GGT AGC ACA CTA CAA TCA TGG ACT GGC GGG TAC GCT TAC
 Glu Trp Val Gly Ser Thr Leu Gln Ser Trp Thr Gly Gly Tyr Ala Tyr
 45
 963 GTA GGA ACA GCG TGT TCC GAA TGG AAA GTA GGA ATG TGT GAA GAC CGA
 Val Gly Thr Ala Cys Ser Glu Trp Lys Val Gly Met Cys Glu Asp Arg

1011 CCG ACA AGC TAT TAC GGA GCT TAC GTT TTC GCC CAT GAG CTG GCG CAT
 Pro Thr Ser Tyr Tyr Gly Ala Tyr Val Phe Ala His Glu Leu Ala His
 5 1059 AAT TTG GGT TGT CAA CAC GAT GGA GAT GGT GCC AAT AGC TGG GTG AAA
 Asn Leu Gly Cys Gln His Asp Gly Asp Gly Ala Asn Ser Trp Val Lys
 1107 GGG CAC ATC GGA TCT GCG GAC TGC CCA TGG GAT GAC GGA TAC CTT ATG
 Gly His Ile Gly Ser Ala Asp Cys Pro Trp Asp Asp Gly Tyr Leu Met
 10 1155 AGC TAC AAG ATG GAA GAC GAG CGC CAG TAT AAG TTT TCT CCC TAC TGC
 Ser Tyr Lys Met Glu Asp Glu Arg Gln Tyr Lys Phe Ser Pro Tyr Cys
 1203 CAG AGA GAA GTC AGG AAC CTC TAC AGG CGT CCG GAA TTC AAA TGC CTC
 15 Gln Arg Glu Val Arg Asn Leu Tyr Arg Arg Pro Glu Phe Lys Cys Leu
 1251 ACT GAA CGA AAA GCG AAA AAA ACA ATC CGC TCG TCT AAG CTA CCT GGT
 Thr Glu Arg Lys Ala Lys Lys Thr Ile Arg Ser Ser Lys Leu Pro Gly
 20 1299 GTG ATG ACA TCA TCG AGC AAC TAT TGC CGG AGG GTG TAC ATG TAC GAA
 Val Met Thr Ser Ser Ser Asn Tyr Cys Arg Arg Val Tyr Met Tyr Glu
 1347 AAA GGC ATG CAC GCC GAC GAG GCA TaT GGC GTC AAG GAC TGC AGG GTA
 Lys Gly Met His Ala Asp Glu Ala Tyr Gly Val Lys Asp Cys Arg Val
 25 1395 AAA TGC ACC ACC ACA TCA AGA ATG TAT TGG CTA CTC GGT GTA GTC GAC
 Lys Cys Thr Thr Thr Ser Arg Met Tyr Trp Leu Leu Gly Val Val Asp
 1443 GGT ACA CCT TGC GGA AAT GGA AAG GCT TGC ATT CTT GGG AAA TGC AGG
 30 Gly Thr Pro Cys Gly Asn Gly Lys Ala Cys Ile Leu Gly Lys Cys Arg
 1491 AAC AAA ATC AAA ATA AGC AAG AAG GAC TGA GAGGTTGATA ATATCAAATT
 Asn Lys Ile Lys Ile Ser Lys Lys Asp End
 35 1541 AATCATGATA TTTCAACCAC ATGACTTCGT GCTCAACTGG TAGCCCCAAA TAAATTTTAA
 1601 AAAAAATCCC AATATGCGTG GTAGAAAABAG CAGCAAACAA TAAAATTCT AAAAAATGCT
 1661 TGCAAAAATG
 40

45 (17) INFORMATION FOR SEQ ID N°: 17

- 5 (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS :
 (a) LENGTH : 158 base pairs
 (b) TYPE : nucleic acid
 (c) STRANDEDNESS : single
 (d) TOPOLOGY : linear

(ii) MOLECULE TYPE : cDNA

- 10 (iii) SEQUENCE DESCRIPTION : SEQ ID N°17 :

1 CACCAGTGAT GCTTATTGTT GCACTGCACT TGTGATAAT ATCCGGTCGT
 51 CGAATTGCAC TTCGGAACCT CCACTCCAAC TTGGCGAGCC GTGGATTTTG
 15 101 ACTTCTCGTG ATGCTCCACC AGACAGTTGC AGGACTTCAG CTGCCTAGAT
 151 GGAGCCTT

20

(18) INFORMATION FOR SEQ ID N°: 18

- 25 (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS :
 (a) LENGTH : 146 base pairs
 (b) TYPE : nucleic acid
 (c) STRANDEDNESS : single
 (d) TOPOLOGY : linear

(ii) MOLECULE TYPE : cDNA

30

(iii) SEQUENCE DESCRIPTION : SEQ ID N°18 :

1 CTGTTGTTGA ACTGAAATAA ATAACAAAAA AATCATAAAG NTGGAGGAAA
 35 51 GATGATCGAN TCCCCGCCCC TTGACAATCG TCCGATAAAA ACCAACTATA
 101 TTCNGTCCTT TTTACAAACA ATTCCAANTG TCTGACCGAA CCGCGA

40

45

(19) INFORMATION FOR SEQ ID N°: 19

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS :
 (a) LENGTH : 140 base pairs
 (b) TYPE : nucleic acid
 (c) STRANDEDNESS : single
 (d) TOPOLOGY : linear

(ii) MOLECULE TYPE : cDNA

(iii) SEQUENCE DESCRIPTION : SEQ ID N°19 :

1 CTNGGACGAN GTCCTATGAC TTGGGCTTAN GTTCTTAGT CTTCTTCGGT
 51 TTCTTCTTTT TTIGCTTCGG TTTTTCGGTG GGCGCAGGTG TATAGTCATC
 15 101 AGTGTCCGGTGGCCCATCCG AATGAGTTGT CAAATGACAT

(20) INFORMATION FOR SEQ ID N°: 20

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS :
 (a) LENGTH : 143 base pairs
 (b) TYPE : nucleic acid
 (c) STRANDEDNESS : single
 (d) TOPOLOGY : linear

(ii) MOLECULE TYPE : cDNA

(iii) SEQUENCE DESCRIPTION : SEQ ID N°20 :

1 TGCCGAAAAA TAACGATGAT TTGACGTTGA CTCTGCAGAA GAGTAAGGTT
 51 TTCACCGACA GTTTTCTGTT TAGCAGCAGC AAGGATAACG AGCCTATCGA
 35 101 TTACTACGTG AGAGCCGAAG ATGCCGAACG AGACATATAT CAC

(21) INFORMATION FOR SEQ ID N°: 21

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS :
 (a) LENGTH : 140 base pairs
 (b) TYPE : nucleic acid
 (c) STRANDEDNESS : single
 (d) TOPOLOGY : linear

45

(ii) MOLECULE TYPE : cDNA

(iii) SEQUENCE DESCRIPTION : SEQ ID N°21 :

5 1 TGTTCCTACA GACTCGACGT TTCGAGCTTG CTCGCCATT MAAGACAACG
51 CACTCACAGA ATATTTAAGT GCGTTCGTGA WAGCTGTGGG CTTACGATTG
101 CAGGCGCTTC ANTCACCAGC TGTGATATTA MAGTTCCTAG
10

(22) INFORMATION FOR SEQ ID N°: 22

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS :

15 (a) LENGTH : 144 base pairs
(b) TYPE : nucleic acid
(c) STRANDEDNESS : single
(d) TOPOLOGY : linear

20 (ii) MOLECULE TYPE : cDNA

(iii) SEQUENCE DESCRIPTION : SEQ ID N°22 :

25 1 TCACGATAGT TGAACGTTG AAACCTGAAA TACTCCCACA GTGGTTGGAT
51 GCTTCAGAAC TGCTAAGAAC TTCACACTTT GCAAGAAGTW CCAAAATGAA
101 AGCCGGGATG ACCGATGATT TAGCTTCCAT CTTCTATCAC TTGA
30

(23) INFORMATION FOR SEQ ID N°: 23

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS :

35 (a) LENGTH : 95 base pairs
(b) TYPE : nucleic acid
(c) STRANDEDNESS : single
(d) TOPOLOGY : linear

40 (ii) MOLECULE TYPE : cDNA

(iii) SEQUENCE DESCRIPTION : SEQ ID N°23 :

45 1 GACCACCCCG TCCGAACCTG CTAAAKCAAG CAATGGAGTG AGGTGTTCTA
51 TCGGGGTTGA TTACACCAAT GGGGCTGCGT GGTGCGTGGT GATTT

(24) INFORMATION FOR SEQ ID N°: 24

5 (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS :
 (a) LENGTH : 1414 base pairs
 (b) TYPE : nucleic acid
 (c) STRANDEDNESS : single
 (d) TOPOLOGY : linear

10 (ii) MOLECULE TYPE : cDNA

(iii) FEATURE :
 (a) NAME/KEY : CDS
 15 (b) LOCATION : 143 .. 1276

(iv) SEQUENCE DESCRIPTION : SEQ ID N°24 :

1 GTAGGGCCGT GCAAGCGAAG GCAGCGAAGG CTGCGAGTGT ACGTGCAGTT CGGAAGTGCA
 20 61 ATATCCTGTT ATTAAGCTCT AATTAGGACA CTGTGAGTCG ATCAGAGGCC TCTCTTAACG

121 CCACATTGAA AAAGGATCCA AG ATG GAG GCA AGT CTG AGC AaC CAC ATC CTT
 25 Met Glu Ala Ser Leu Ser Asn His Ile Leu

173 AAC TTC TCC GTC GAC CTA TAC AAG CAG CTG AAA CCC TCC GGC AAA GAC
 Asn Phe Ser Val Asp Leu Tyr Lys Gln Leu Lys Pro Ser Gly Lys Asp

221 ACG GCA GGA AAC GTC TTC TGC TCA CCA TTC AGT ATT GCA GCT GCT CTG
 30 Thr Ala Gly Asn Val Phe Cys Ser Pro Phe Ser Ile Ala Ala Ala Leu

269 TCC ATG GCC CTC GCA GGA GCT AGA GGC AAC ACT GCC AAG CAA ATC GCT
 Ser Met Ala Leu Ala Gly Ala Arg Gly Asn Thr Ala Lys Gln Ile Ala

317 GCC ATC CTG CAC TCA AAC GAC GAC AAG ATC CAC GAC CAC TTC TCC AAC
 35 Ala Ile Leu His Ser Asn Asp Asp Lys Ile His Asp His Phe Ser Asn

365 TTC CTT TGC AAG CTT CCC AGT TAC GCC CCA GAT GTG GCC CTG CAC ATC
 Phe Leu Cys Lys Leu Pro Ser Tyr Ala Pro Asp Val Ala Leu His Ile

40 413 GCC AAT CGC ATG TAC TCT GAG CAG ACC TTC CAT CCG AAA GCG GAG TAC
 Ala Asn Arg Met Tyr Ser Glu Gln Thr Phe His Pro Lys Ala Glu Tyr

45 461 ACA ACC CTG TTG CAA AAG TCC TAC GAC AGC ACC ATC AAG GCT GTT GAC
 Thr Thr Leu Leu Gln Lys Ser Tyr Asp Ser Thr Ile Lys Ala Val Asp

509 TTT GCA GGA AAT GCC GAC AGG GTC CGT CTG GAG GTC AAT GCC TGG GTT
Phe Ala Gly Asn Ala Asp Arg Val Arg Leu Glu Val Asn Ala Trp Val

5 557 GAG GAA GTC ACC AGG TCA AAG ATC AGG GAC CTG CTC GCA CCT GGA ACT
Glu Glu Val Thr Arg Ser Lys Ile Arg Asp Leu Leu Ala Pro Gly Thr

605 GTT GAT TCA TCG ACA TCA CTT ATA TTA GTG AAT GCC ATT TAC TTC AAA
Val Asp Ser Ser Thr Ser Leu Ile Leu Val Asn Ala Ile Tyr Phe Lys

10 653 GGT CTG TGG GAT TCT CAG TTC AAG CCT AGT GCT ACG AAG CCG GGA GAT
Gly Leu Trp Asp Ser Gln Phe Lys Pro Ser Ala Thr Lys Pro Gly Asp

701 TTT CAC TTG ACA CCA CAG ACC TCA AAG AAA GTG GAC ATG ATG CAC CAG
Phe His Leu Thr Pro Gln Thr Ser Lys Lys Val Asp Met Met His Gln

15 749 GAA GGG GAC TTC AAG ATG GGT CAC TGC AGC GAC CTC AAG GTC ACT GCG
Glu Gly Asp Phe Lys Met Gly His Cys Ser Asp Leu Lys Val Thr Ala

797 CTT GAG ATA CCC TAC AAA GGC AAC AAG ACG TCG ATG GTC ATT CTC CTG
20 Leu Glu Ile Pro Tyr Lys Gly Asn Lys Thr Ser Met Val Ile Leu Leu

845 CCC GAA GAT GTA GAG GGA CTC TCA GTC CTG GAG GAA CAC TTG ACC GCT
Pro Glu Asp Val Glu Gly Leu Ser Val Leu Glu Glu His Leu Thr Ala

25 893 CCG AAA CTG TCG GCT CTG CTC GGC GGC ATG TAT GCG ACG TCC GAT GTC
Pro Lys Leu Ser Ala Leu Leu Gly Gly Met Tyr Ala Thr Ser Asp Val

941 AAC TTG CGC TTG CCG AAG TTC AAA CTA GAG CAG TCC ATA GGT TTG AAG
Asn Leu Arg Leu Pro Lys Phe Lys Leu Glu Gln Ser Ile Gly Leu Lys

30 989 GAT GTA CTG ATG GCG ATG GGA GTC AAG GAT TTC TTC ACG TCC CTT GCA
Asp Val Leu Met Ala Met Gly Val Lys Asp Phe Phe Thr Ser Leu Ala

1037 GAT CTT TCT GGC ATC AGC GCT GCG GGG AAT CTG TGC GCT TCG GAT GTC
35 Asp Leu Ser Gly Ile Ser Ala Ala Gly Asn Leu Cys Ala Ser Asp Val

1085 ATC CAC AAG GCT TTT GTG GAA GTT AAT GAG GAG GGC ACA GAG GCT GCA
Ile His Lys Ala Phe Val Glu Val Asn Glu Glu Gly Thr Glu Ala Ala

40 1133 GCT GCC ACT GCC ATA CCC ATT ATG TTG ATG TGT GCG AGA TTT CCA CAG
Ala Ala Thr Ala Ile Pro Ile Met Leu Met Cys Ala Arg Phe Pro Gln

1181 GTG GTG AAC TTT TTC GTT GAC GGC CCA TTC ATG TTC TTG ATC CAC AGC
Val Val Asn Phe Phe Val Asp Arg Pro Phe Met Phe Leu Ile His Ser

45 1229 CAT GAT CCA GAT GTT GTT CTC TTC ATG GGA TCC ATC CGT GAG CTC TAA

His Asp Pro Asp Val Val Leu Phe Met Gly Ser Ile Arg Glu Leu End

1277 AAAGCATATT CTTAACGGCG GCCAATCAGT CTGTGGAGTT ATCTCTTAGT CACTAATGTG

5 1337 TAACAATTCT GCAATATTCA GCTTGTGTAT TTCAGTAACT TGCTAGATCT TTGTGTGTT

1397 GATGTTAGGC TTCTTGGC

10 (25) INFORMATION FOR SEQ ID N°: 25

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS :

(a) LENGTH : 200 base pairs

(b) TYPE : nucleic acid

15 (c) STRANDEDNESS : single

(d) TOPOLOGY : linear

(ii) MOLECULE TYPE : cDNA

20 (iii) SEQUENCE DESCRIPTION : SEQ ID N°25 :

1 ACCGTAACCA AAATTGTTTC TTTCCAGAAG AATGGTTCAA ACTTTTCAAA

51 CAGATTTGGG AAACCTTTCT TGCACTTTTA AAATCCAATC TACAATCTTT

25

101 CCTCGCACTT CTGAATTGCA TTCCAGTTTA CCTTCCAAGG AAACCTCTTT

151 TGGCAACTGC AGCCGTACTC CATTGGGCA TACCACAGTG CATGCACTTG

30

(26) INFORMATION FOR SEQ ID N°: 26

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS :

(a) LENGTH : 241 base pairs

35 (b) TYPE : nucleic acid

(c) STRANDEDNESS : single

(d) TOPOLOGY : linear

(ii) MOLECULE TYPE : cDNA

40

(iii) SEQUENCE DESCRIPTION : SEQ ID N°26 :

1 CGTATTCTTT GAAGATTGT ATACGAAACA TAAATTCGTC ATGCATACTT

45 51 TTGATGGTTA CACGACATGC GAAGCTGCCG ACAAAGAAGA CTGGGAAGAT

101 AAGAAGCACC TAGTTACGGT AGTGCGTGGA CCGGATAAAC GAAAGTACAC
 151 GTTTCTACGC AACATTCTCA CCTTACAACG GAGAGTGAGA GTTAGCAAAA
 5
 201 CAATGATTGA GCTCGTACGG AACATGTCCT GTAGGACATT T

(27) INFORMATION FOR SEQ ID N°: 27

10

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS :

15

(a) LENGTH : 313 base pairs

(b) TYPE : nucleic acid

(c) STRANDEDNESS : single

(d) TOPOLOGY : linear

(ii) MOLECULE TYPE : cDNA

(iii) SEQUENCE DESCRIPTION : SEQ ID N°27 :

20

1 AAGCANCCGG ACTACCTGCT TGA AACGTT GTACGGGCAA ACTTGGACGG

51 AAAACTCCGA GATGCTACTC CAGTTCTCC CGGAAGCTAC ACGTACGCTG

25

101 AGAATGATAA CTTACCTGC TATTCCAGAA GTACACCGTT TCCGGATGGG

151 GTGAATGTTG TATAACGGCT GCTGGGTGCG GAAGACTATG ATGGATTACG

30

201 CAAAAAAGTT CTAAACGAGT TGTTCCCAT CCCGGAAAAGT CTGCTGTATG

251 CTGACATGAT GCGACTTGTG GCTAAGAAAAG ACAGAGTTGA TCACACTAGT

301 GGATGACCTG GGA

35

(28) INFORMATION FOR SEQ ID N°: 28

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS :

40

(a) LENGTH : 2417 base pairs

(b) TYPE : nucleic acid

(c) STRANDEDNESS : single

(d) TOPOLOGY : linear

(ii) MOLECULE TYPE : cDNA

45

(iii) FEATURE :

- (a) NAME/KEY : CDS
 (b) LOCATION : 218 .. 1495

5 (iv) SEQUENCE DESCRIPTION : SEQ ID N°28 :

1 GTCGTAGTCG TAGTCGTAGT CAGTTGCGCA TGCCGGGGGC TTTCCTGTCT TTCTTGCCTT
 61 TCTGCAGTCG TTCACCAACA TGTGGATACA GCTCCGGAGA TTTGTAAACA AATACTGCAC
 10 121 TTTAAGCAA GACTTGATAT TTAGATCGAT ATCCTCCTGT TGTCGGTCTT GATTAATCGG
 181 CTCTTAGGG TTTTAGAAT AGGCTTTTCG GTACGAG ATG CCC AAA GGA AAG AGG
 15 Met Pro Lys Gly Lys Arg
 236 GGA CCC AAA GCA GGT GGC GCC GCG CGC GGT GCC CGG TGC GAG GCC AGC
 Gly Pro Lys Ala Gly Gly Ala Ala Arg Gly Gly Arg Cys Glu Ala Ser
 284 CTG GCT CCG TCg TCC AGC GAC GAG GAG TCC AAC GCA GAC ACG GCG AGC
 20 Leu Ala Pro Ser Ser Ser Asp Glu Glu Ser Asn Ala Asp Thr Ala Ser
 332 GTG CTG AGC TGC GCC TCG GAG TCT CGC TGT GGC AGT GAC GGC ACC GTT
 Val Leu Ser Cys Ala Ser Glu Ser Arg Cys Gly Ser Asp Gly Thr Val
 25 380 GGA GAC CCA GAA GCG GAG GAG GCT GTG CTG CAT GAC GAC TTT GAA GAC
 Gly Asp Pro Glu Ala Glu Glu Ala Val Leu His Asp Asp Phe Glu Asp
 428 AAA CTC AAG GAG GCC ATC GAC GGA GCT TCG CAG AAG AGT GCC AAA GGA
 Lys Leu Lys Glu Ala Ile Asp Gly Ala Ser Gln Lys Ser Ala Lys Gly
 30 476 CGG CTG TCG TGC CTG GAG GCG ATT CGC AAG GCC TTT TcC ACC AAA TAC
 Arg Leu Ser Cys Leu Glu Ala Ile Arg Lys Ala Phe Ser Thr Lys Tyr
 524 CTG TAC GAC TTC CTC ATG GAC AGA CCG AGC ACG CTG TGC GAC CTG GTG
 35 Leu Tyr Asp Phe Leu Met Asp Arg Pro Ser Thr Val Cys Asp Leu Val
 572 GAG CGT GGG GTG CGC AAG GGC CGA GGG GAG GAG GCG GCC CTG TGC GCC
 Glu Arg Gly Val Arg Lys Gly Arg Gly Glu Glu Ala Ala Leu Cys Ala
 40 620 ACT CTC GGG GCC CTG GCC TGC GTC CAG CTC GGG GTC GGG GCC GAG GCG
 Thr Leu Gly Ala Leu Ala Cys Val Gln Leu Gly Val Gly Ala Glu Ala
 668 GAC GCC CTG TTC GAC GCC CTG CGC CAG CCG CTC TGC ACT TTG CTG CTT
 Asp Ala Leu Phe Asp Ala Leu Arg Gln Pro Leu Cys Thr Leu Leu Leu
 45 716 GAC GGG GCC CAG GGG CCC TCC CCC AGG GCC AGG TGT GCC ACT GCC CTC

Asp Gly Ala Gln Gly Pro Ser Pro Arg Ala Arg Cys Ala Thr Ala Leu
 764 GGC CTC TGC TGC TTC GTG GTG GAC TCG GAC AAC CAG CTG GTG CTG CAG
 Gly Leu Cys Cys Phe Val Val Asp Ser Asp Asn Gln Leu Val Leu Gln
 5
 812 CCG TGC ATG GAG GTG CTC TGG CAG GTG GTG GGT GCC AAG GCG GGC CCC
 Pro Cys Met Glu Val Leu Trp Gln Val Val Gly Ala Lys Ala Gly Pro
 10
 860 GGC TCT CCG GTG CTC CAG GCA GCG GCC CTG CTC GCC TGG GGC CTC CTG
 Gly Ser Pro Val Leu Gln Ala Ala Ala Leu Leu Ala Trp Gly Leu Leu
 908 CTC ACC GTG GCT CCG GTC GAC CGC CTG CTG GCG CTC ACG CGC ACG CAC
 Leu Ser Val Ala Pro Val Asp Arg Leu Leu Ala Leu Thr Arg Thr His
 15
 956 CTG CCC CGG CTG CAG GAG CTG CTG GAG AGC CCC GAC CTG GAC CTG CGC
 Leu Pro Arg Leu Gln Glu Leu Leu Glu Ser Pro Asp Leu Asp Leu Arg
 20
 1004 ATT GCG GCC GGG GAG GTG ATC GCC GTC ATG TAC GAG GGG GCC AGG GAC
 Ile Ala Ala Gly Glu Val Ile Ala Val Met Tyr Glu Gly Ala Arg Asp
 1052 TAC GAC GAG GAC TTT GAG GAG CCC TCG GAG TCC CTG TGT GCC CAG CTG
 Tyr Asp Glu Asp Phe Glu Glu Pro Ser Glu Ser Leu Cys Ala Gln Leu
 25
 1100 CGC CAG CTG GCC ACG GAC AGC CAG AAG TTT CGG GCC AAG AAG GAG CGG
 Arg Gln Leu Ala Thr Asp Ser Gln Lys Phe Arg Ala Lys Lys Glu Arg
 1148 CGC CAG CAG CGC TCC ACC TTC AGG GAC GTC TAC CGG GCC GTC AGG GAG
 Arg Gln Gln Arg Ser Thr Phe Arg Asp Val Tyr Arg Ala Val Arg Glu
 30
 1196 GGG GCC TCT CCC GAC GTG AGC GTC AAG TTT GGC CGG GAA GTC CTG GAA
 Gly Ala Ser Pro Asp Val Ser Val Lys Phe Gly Arg Glu Val Leu Glu
 1244 CTG GAC ACC TGG AGT CGC AAG CTG CAG TAC GAC GCT TTC TGC CAG CTG
 Leu Asp Thr Trp Ser Arg Lys Leu Gln Tyr Asp Ala Phe Cys Gln Leu
 35
 1292 CTG GGC TCC GGC ATG AAC CTG CAC CTG GCC GTG AAC GAG CTG CTG AGG
 Leu Gly Ser Gly Met Asn Leu His Leu Ala Val Asn Glu Leu Leu Arg
 40
 1340 GAC ATC TTT GAA CTG GGG CAG GTG CTG GCA ACC GAG GAC CAC ATT ATC
 Asp Ile Phe Glu Leu Gly Gln Val Leu Ala Thr Glu Asp His Ile Ile
 1388 TCC AAG ATC ACC AAG TTC GAA AGG CAC ATG GTG AAC ATG GCC AGC TGC
 Ser Lys Ile Thr Lys Phe Glu Arg His Met Val Asn Met Ala Ser Cys
 45
 1436 CGG GCC CGC ACC AAG ACA CGC AAC CGG CTG AGG GAC AAG CGC GCC GAC
 Arg Ala Arg Thr Lys Thr Arg Asn Arg Leu Arg Asp Lys Arg Ala Asp

1484 GTG GTC GCC TGA ACCTGCGGAG GGATGCTTAG CTATGCACTC GCCGGCCTAC
Val Val Ala End

5 1536 CCTGGCGGGA CTCGATGCCA CTCACGAGTC GGCGETCGCA AATTCGCCGC CCATCGTTAC
1596 GCAATGGGAG ACAAAGCTGC TTTTGGCATT ACCGTTTGAG GTCGGECTCA ACCCATAGAT
10 1656 GAATTICTTT TTTGTGGCCG TTTCTGGGTT ACATGTTTTG GGGGAAGGGA GTGGAAGTGT
1716 CCGGTICTTT GGCACACGTC AGTTGCTCT TGATGCGCGA CGTCTTGTA TTTGGGtACT
1776 GCCGACACCA AGCGTTTCGG CGATTCCTGG AAAAGAGTGC CTCTCGCTCG ACGTTTGGTT
15 1836 GTTTTCTGCG TGGTCCGTCG TCGACCTTCG TTCGTCCAAA GACGCCGTCC GGTTTCAtAC
1896 TCCCCCCCCG ACACATATCG AGGCCAATTA AATTGCTAAG GGTGCCGTTG TCGTGCATCT
1956 GGCAGGCTCA GAAGTGGCTT ATTTGTCTTT TAATTTTGCC GATGCACGCA AAAATTGTCA
20 2016 TTTCTTGAAA GTTTCTCTTT TATTGCGTAC ACAATTCAAC TTTTATGTAA TTTCTGATGG
2076 TCTGTTTTAC GTGTGCGTGT GTAAAACGTA ACTTTGGAAG AATTTTTATG CACACTGAAC
25 2136 AAACGCTCGG TCCTGGGGTT GAAAGTCTC GGTGTGTGCA TGAGCTAAAG TGCAACTGCT
2196 TTGTTCCGAA GTTTTTCTAG TCGCCGAAAT GTACCATTGT GGACCTTGT GCGAGAGACC
2256 TTGTTCTTCT GGGGGAGCTG CTGTAGCGTG GCAAGCCACT ATTTGGGAG CGACATTGCA
30 2316 GAGAAAATCG GCTTTTAGAA AGGCACCTGC GCGGCGAGTG GACGTTTTTT CGTATATACT
2376 GCGAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AA

35

(29) INFORMATION FOR SEQ ID N°: 29

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS :
- 40 (a) LENGTH : 933 base pairs
(b) TYPE : nucleic acid
(c) STRANDEDNESS : single
(d) TOPOLOGY : linear
- (ii) MOLECULE TYPE : cDNA
- 45 (iii) FEATURE :

(a) NAME/KEY : CDS
 (b) LOCATION : 32 .. 853

(iv) SEQUENCE DESCRIPTION : SEQ ID N°29 :

5
 1 GATTGGGAAG CTCCTATTCC TCACTTGAAA C ATG GCT GGA CTC GGC TCC
 Met Ala Gly Leu Arg Ser

10
 50 TGC ATC CTC CTG GCT CTT GCC ACT AGT GCC TTC GCC GGC TAC CTT CAC
 Cys Ile Leu Leu Ala Leu Ala Thr Ser Ala Phe Ala Gly Tyr Leu His

15
 98 GGT GGC CTT ACC CAC GGC GCT GGG TAC GGT TAC GGT GTC GGC TAC GGT
 Gly Gly Leu Thr His Gly Ala Gly Tyr Gly Tyr Gly Val Gly Tyr Gly

20
 146 TCC GGC CTT GGC TAT GGC CTT GGC TAC GGT TCC GGC CTT GGC TAT GGA
 Ser Gly Leu Gly Tyr Gly Leu Gly Tyr Gly Ser Gly Leu Gly Tyr Gly

25
 194 CAA GCT GTT GGC CTT GGA CAC GGC TTT GGC TAT TCT GGT CTG ACC GGC
 His Ala Val Gly Leu Gly His Gly Phe Gly Tyr Ser Gly Leu Thr Gly

30
 242 TAC AGT GTG GCT GCC CCA GCT AGC TAC GCC GTT GCT GCT CCA GCC GTC
 Tyr Ser Val Ala Ala Pro Ala Ser Tyr Ala Val Ala Ala Pro Ala Val

35
 290 AGC CGC ACC GTT TCC ACT TAG CAC GCT GCT CCA GCT GTG GCC ACC TAC
 Ser Arg Thr Val Ser Thr Tyr His Ala Ala Pro Ala Val Ala Thr Tyr

40
 338 GCC GCT GCT CCT GTC GCC ACC TAT GCT GTT GCT CCA GCT GTC ACT AGG
 Ala Ala Ala Pro Val Ala Thr Tyr Ala Val Ala Pro Ala Val Thr Arg

45
 386 GTT TCC CCC GTT CGC GCC GCC CCA GCT GTG GCC ACG TAC GCC GCC GCT
 Val Ser Pro Val Arg Ala Ala Pro Ala Val Ala Thr Tyr Ala Ala Ala

50
 434 CCA GTC GCC ACC TAC GCC GCT GCT CCA GCT GTG ACC AGG GTG TCC ACC
 Pro Val Ala Thr Tyr Ala Ala Ala Pro Ala Val Thr Arg Val Ser Thr

55
 482 ATT CAC GCT GCC CCG GCT GTG GCC AAT TAC GCC GTC GCT CCA GTC GCC
 Ile His Ala Ala Pro Ala Val Ala Asn Tyr Ala Val Ala Pro Val Ala

60
 530 ACC TAT GCC GCT GCT CCA GCT GTG ACC AGG GTG TCC ACC ATC CAC GCC
 Thr Tyr Ala Ala Ala Pro Ala Val Thr Arg Val Ser Thr Ile His Ala

65
 578 GCT CCA GCC GTG GCT AGC TAC CAG ACC TAC CAC GCT CCA GCT GTC GCC
 Ala Pro Ala Val Ala Ser Tyr Gln Thr Tyr His Ala Pro Ala Val Ala

70
 626 ACT GTG GCT CAT GCT CCA GCT GTG GCC AGC TAC CAG ACC TAC CAC GCT
 Thr Val Ala His Ala Pro Ala Val Ala Ser Tyr Gln Thr Tyr His Ala

```

674  GCC CCA GCC GTG GCT ACC TAC GCC CAT GCC GCT CCC GTC TAC GGC TAT
      Ala Pro Ala Val Ala Thr Tyr Ala His Ala Ala Pro Val Tyr Gly Tyr

5   722  GGT GTC GGT ACC CTC GGA TAT GGT GTC GGC CAC TAC GGC TAC GGA CAC
      Gly Val Gly Thr Leu Gly Tyr Gly Val Gly His Tyr Gly Tyr Gly His

      770  GGT CTT GGC AGC TAC GGC CTG AAC TAC GGT TAC GGC CTC GGC ACC TAC
      Gly Leu Gly Ser Tyr Gly Leu Asn Tyr Gly Tyr Gly Leu Gly Thr Tyr

10  818  GGT GAC TAC ACC ACC CTT CTC CGC AAG AAG AAG TAA ATGGCA CATCTCAAGA
      Gly Asp Tyr Thr Thr Leu Leu Arg Lys Lys Lys End

      870  GAGCCCATTG GACTGCCATC GACATTCTTC TTCAATAAAA GAGCCCGAAG ATGGCATTAT

15  930  TTTT

```

【図面の簡単な説明】

【図1】

配列16および配列24に対して特異的なRACEアッセイ(Frohman
他、1995)である。

【図2】

サブトラクティブライブラリーにおいて単離された5個の選択された全長型c
DNAおよび9個のcDNAフラグメントの示差的な発現分析である。

【参考文献】

参考文献

- Ganapamo et al, 1997 : Identification of an Ixodes ricinus salivary gland fraction through its ability to stimulate CD4 T cells present in BALB/c mice lymph nodes draining the tick fixation site. Ganapamo-F; Rutti-B; Brossard-M. Parasitology; 1997 Jul; 115 (Pt 1): 91-6
- Ganapamo et al, 1995 : In vitro production of interleukin-4 and interferon-gamma by lymph node cells from BALB/c mice infested with nymphal Ixodes ricinus ticks. Ganapamo-F; Rutti-B; Brossard-M. Immunology; 1995 May; 85(1): 120-4
- Ganapamo et al, 1996 : Immunosuppression and cytokine production in mice infested with Ixodes ricinus ticks: a possible role of laminin and interleukin-10 on the in vitro responsiveness of lymphocytes to mitogens. Ganapamo-F; Rutti-B; Brossard-M. Immunology; 1996 Feb; 87(2): 259-63
- Wikel et al, 1996 : Host immunity to ticks. Wikel-SK. Annu-Rev-Entomol.; 1996; 41: 1-22
- Wikel and Brossard, 1997 : Immunology of interactions between ticks and hosts. Brossard-M; Wikel-SK. Med-Vet-Entomol.; 1997 Jul; 11(3): 270-6
- De Silva et al, 1995 : Growth and migration of Borrelia burgdorferi in Ixodes ticks during blood feeding. Aravinda M De Silva, Erol Fikrig. Am. J. Trop. Med. Hyg.; 53(4), 1995 pp 397-404
- Hubank and Schatz, 1994 : Identifying differences in mRNA expression by representational difference analysis of cDNA. Hubank-M; Schatz-DG. Nucleic-Acids-Res.; 1994 Dec 25; 22(25): 5640-8
- Frohman, 1995 : Rapid amplification of cDNA Ends. In PCR Primer. A laboratory manual (Dieffenbach, C. W. and Dveksler, G. S., eds), pp.381-409, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

【图1】

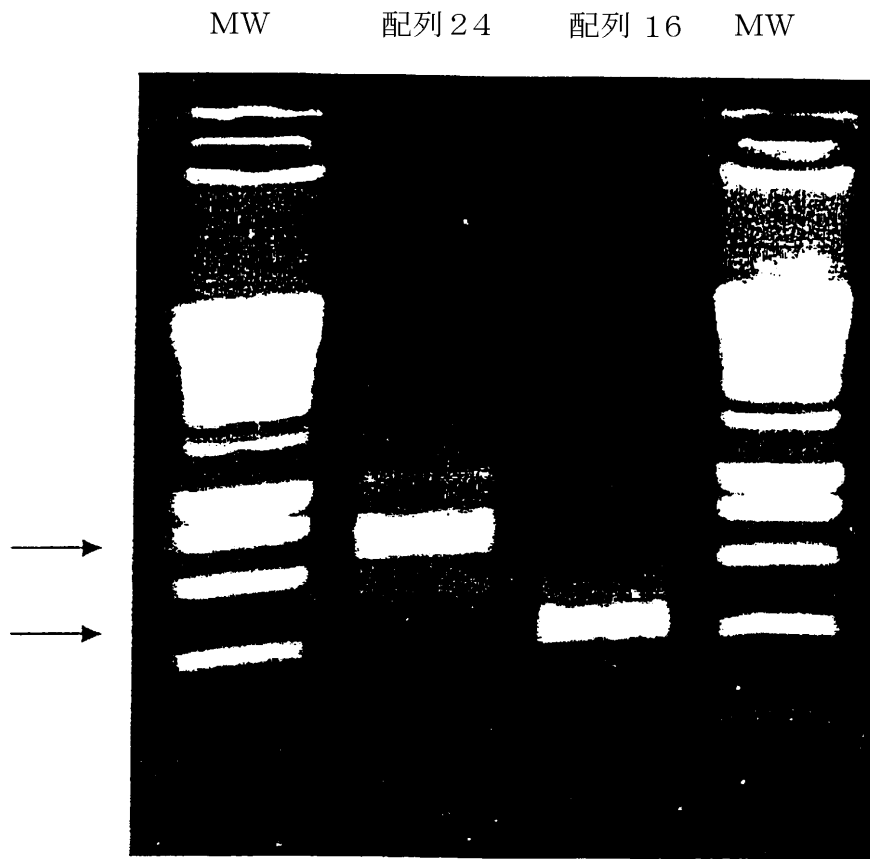


Figure 1.

【図2】

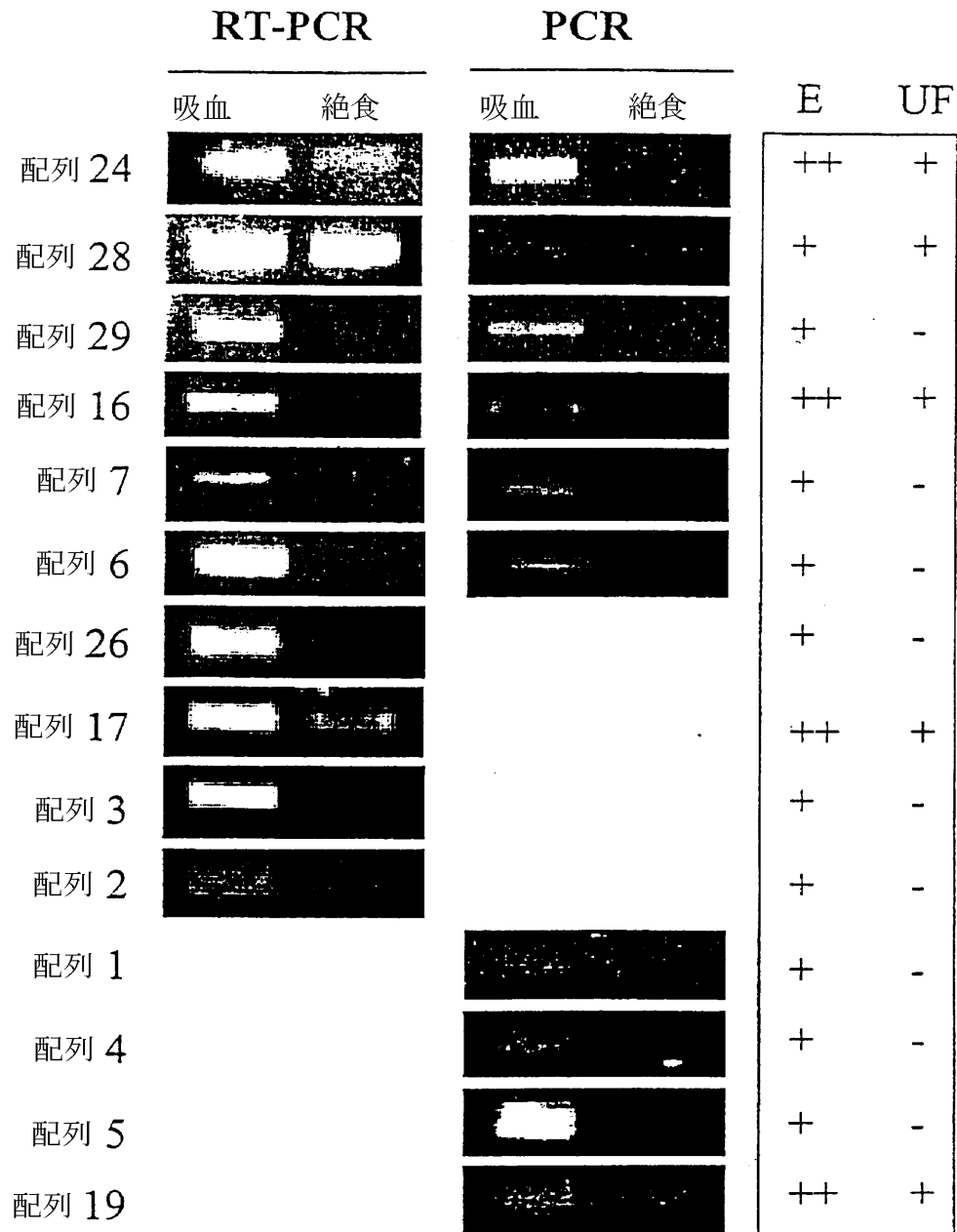


FIGURE 2.

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		International Application No. PCT/BE 00/00061
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC 7 C12N15/12 C07K14/435 A61K38/17 G01N33/50 C12Q1/68 C07K16/18 C12N5/20		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12N C07K A61K G01N C12Q		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) BIOSIS, EPO-Internal		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	G R NEEDHAM ET AL: "Characterization of Ixodid Tick salivary-gland gene products, using recombinant DNA technology" EXPERIMENTAL AND APPLIED ACAROLOGY, GB, CHAPMAN & HALL, vol. 7, 1989, pages 21-32, XP002093753 ISSN: 0168-8162 the whole document --- -/--	1, 11, 13, 14
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 24 October 2000		Date of mailing of the international search report 08. 01. 2001
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5918 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer ESPEN, J

2

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/BE 00/00061

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>BIOR ABDEL A D ET AL: "Differentially expressed genes in tick salivary glands." FASEB JOURNAL, vol. 13, no. 7, 23 April 1999 (1999-04-23), page A1368 XP000946819</p> <p>Annual Meeting of the American Societies for Experimental Biology on Biochemistry and Molecular Biology 99; San Francisco, California, USA; May 16-20, 1999 ISSN: 0892-6638 abstract</p> <p>---</p>	1,11,13, 14
P,X	<p>DAS SUBRATA ET AL: "Salp16, a gene induced in Ixodes scapularis salivary glands during tick feeding." AMERICAN JOURNAL OF TROPICAL MEDICINE AND HYGIENE, vol. 62, no. 1, January 2000 (2000-01), pages 99-105, XP000952000 ISSN: 0002-9637 the whole document</p> <p>---</p>	1,11,13, 14
X	<p>LUO C ET AL: "Cloning and sequence of a gene for the homologue of the stearyl CoA desaturase from salivary glands of the tick Amblyomma americanum." INSECT MOLECULAR BIOLOGY, vol. 6, no. 3, 1997, pages 267-271, XP000952079 ISSN: 0962-1075 abstract; figure 1</p> <p>---</p>	1,11,13, 14
A	<p>WO 95 04750 A (ATHENA NEUROSCIENCES INC ; BARD FREDERIQUE (US); YEDNOCK THEODORE A) 16 February 1995 (1995-02-16)</p> <p>-----</p>	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/BE 00/00061**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. Claims Nos.:
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:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. 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. 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.:

claims 1-14

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. Claims: Invention 1; Claims 1-14

Methods for producing a library of cDNAs which are induced in the salivary glands of a tick during the tick feeding phase; cDNA library obtainable from fed tick salivary glands

2. Claims: Invention 2; Claims: in part: 15-69; all as far as applicable

Polynucleotide isolatable from tick salivary glands relating to SEQ ID NO 1; polypeptide encoded by said polypeptide and variant thereof; immunological composition or vaccine comprising said polynucleotide or polypeptide; therapeutic agent comprising said polypeptide; diagnostic kit comprising said polynucleotide or a nucleotide sequence complementary to that, said polypeptide, said antibody, or a phage displaying said antibody; antibody directed against said polypeptide; hybridoma cell line expressing said antibody; immunizing agent including said polypeptide; vector including said polypeptide or nucleic acid; use of said polypeptide for making a medicinal agent

Inventions 3-30; Claims: in part 15-69; all as far as applicable

as invention 2 but limited to subject-matter relating to SEQ ID NOs 2-29; wherein invention 3 is limited to SEQ ID NO 2, invention 4 is limited to SEQ ID NO 3, etc. ..., and invention 30 is limited to SEQ ID NO 29

Invention 31; Claims: in part 15-18; all as far as applicable

as invention 2 but limited to sequences as far as not covered by inventions 2-30

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/BE 00/00061

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9504750 A	16-02-1995	AU 7523194 A US 5811514 A	28-02-1995 22-09-1998

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マ-コ-ト' (参考)
A 6 1 P 23/00		A 6 1 P 31/04	4 H 0 4 5
29/00	1 0 1	31/12	
31/04		37/02	
31/12		C 0 7 K 14/435	
37/02		16/18	
C 0 7 K 14/435		C 1 2 N 1/15	
16/18		1/19	
C 1 2 N 1/15		1/21	
1/19		C 1 2 Q 1/68	A
1/21		G 0 1 N 33/53	D
5/10			M
C 1 2 Q 1/68		33/566	
G 0 1 N 33/53		C 1 2 N 15/00	Z N A A
		5/00	A
33/566			B
		A 6 1 K 37/02	

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

(72)発明者 ルブル, ジェラルール
ベルギー, ベ - 1190 ブリュッセル,
リュ ロダンバック 108

Fターム(参考) 4B024 AA01 BA31 CA04 DA02 DA06
GA11 HA01
4B063 QA01 QA13 QQ43 QR32 QR35
QR62 QS16 QS25 QS34
4B065 AA26X AA99Y AB01 BA02
CA24 CA45
4C084 AA02 AA03 AA07 AA13 AA17
BA35 BA44 CA53 MA17 MA22
MA23 MA52 MA55 MA66 NA14
ZA042 ZA542 ZB072 ZB152
ZB332 ZB352 ZC752
4C085 AA03 BB11 DD62 EE01 EE03
EE06 FF24 GG02 GG03 GG04
GG05 GG08
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10
CA51 DA86 EA22 EA31 FA74

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2003502039A5	公开(公告)日	2007-08-09
申请号	JP2001503642	申请日	2000-06-06
[标]申请(专利权)人(译)	伊诺让SA		
申请(专利权)人(译)	Enojan ES呢.		
当前申请(专利权)人(译)	Enojan ES呢.		
[标]发明人	ゴドフルワエドモン ボランアレックス ルブルジェラール		
发明人	ゴドフルワ, エドモン ボラン, アレックス ルブル, ジェラール		
IPC分类号	C12N15/09 A61K39/00 A61K48/00 A61P7/02 A61P23/00 A61P29/00 A61P31/04 A61P31/12 A61P37/02 C07K14/435 C07K16/18 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12Q1/68 G01N33/53 G01N33/566 C12N5/10 A61K38/00		
CPC分类号	A61K38/00 A61K2121/00 C07K14/43527 Y10S435/975 A61P7/02 A61P23/00 A61P29/00 A61P31/04 A61P31/12 A61P37/02 Y02A50/401		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K39/00.H A61K48/00 A61P7/02 A61P23/00 A61P29/00.101 A61P31/04 A61P31/12 A61P37/02 C07K14/435 C07K16/18 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12Q1/68.A G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566 C12N5/00.A C12N5/00.B A61K37/02		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/BA31 4B024/CA04 4B024/DA02 4B024/DA06 4B024/GA11 4B024/HA01 4B063/QA01 4B063/QA13 4B063/QQ43 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063/QR62 4B063/QS16 4B063/QS25 4B063/QS34 4B065/AA26X 4B065/AA99Y 4B065/AB01 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA45 4C084/AA02 4C084/AA03 4C084/AA07 4C084/AA13 4C084/AA17 4C084/BA35 4C084/BA44 4C084/CA53 4C084/MA17 4C084/MA22 4C084/MA23 4C084/MA52 4C084/MA55 4C084/MA66 4C084/NA14 4C084/ZA042 4C084/ZA542 4C084/ZB072 4C084/ZB152 4C084/ZB332 4C084/ZB352 4C084/ZC752 4C085/AA03 4C085/BB11 4C085/DD62 4C085/EE01 4C085/EE03 4C085/EE06 4C085/FF24 4C085/GG02 4C085/GG03 4C085/GG04 4C085/GG05 4C085/GG08 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA51 4H045/DA86 4H045/EA22 4H045/EA31 4H045/FA74		
优先权	1999013425 1999-06-09 GB		
其他公开文献	JP2003502039A		

摘要(译)

本发明涉及DNA序列的分子表征，该DNA序列编码在节肢的唾液腺，尤其是节肢动物门的蓖麻I中表达的蛋白质。表征了在慢血喂养阶段在伊克氏菌唾液腺中诱导的基因。这些基因的克隆不包括诱导的cDNA（由进食后期的唾液腺中表达的mRNA合成）和未诱导的cDNA（由非进食蠕类的唾液腺中的mRNA合成）通过建立减法cDNA文库来完成。全长cDNA文库是通过从减法cDNA文库中发现的不完整序列开始的，这些序列被发现是目标不完整序列。本发明还包括新近鉴定和衍生的多核苷酸的各种用途。

