

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2006-503591  
(P2006-503591A)

(43) 公表日 平成18年2月2日(2006.2.2)

(51) Int. Cl.		F I		テーマコード (参考)
<b>C 1 2 Q 1/68</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 Q 1/68	Z N A A	4 B O 2 4
<b>G O 1 N 33/53</b>	<b>(2006.01)</b>	G O 1 N 33/53	D	4 B O 6 3
<b>C 1 2 N 15/09</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 N 15/00	A	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 18 頁)

(21) 出願番号	特願2005-501694 (P2005-501694)	(71) 出願人	500091313 ユニヴァーシティ オヴ ピッツバーグ オヴ ザ コモンウェルス システム オ ヴ ハイアー エデュケーション アメリカ合衆国、ペンシルヴァニア州 1 5 2 6 0、ピッツバーグ、ガードナー ス ティール コンファレンス センター 2 0 0
(86) (22) 出願日	平成15年10月23日 (2003.10.23)	(71) 出願人	505127927 ウェイク フォレスト ユニヴァーシティ アメリカ合衆国、ノース カロライナ州 2 7 1 0 6、ウィンストン-サレム、ウェ イク フォレスト ロード 1 8 3 4
(85) 翻訳文提出日	平成17年4月6日 (2005.4.6)	(74) 代理人	100080791 弁理士 高島 一
(86) 国際出願番号	PCT/US2003/033957		
(87) 国際公開番号	W02004/038377		
(87) 国際公開日	平成16年5月6日 (2004.5.6)		
(31) 優先権主張番号	60/420, 768		
(32) 優先日	平成14年10月23日 (2002.10.23)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	60/430, 318		
(32) 優先日	平成14年12月2日 (2002.12.2)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 腎臓疾患または素因を診断する方法

(57) 【要約】

本発明は、被験者または患者におけるウロモジュリン ( U M O D ) の変異を分析することにより、疾患あるいは疾患にかかる素因を診断する方法を提供する。 U M O D における変異の存在は、患者の疾患あるいは疾患にかかる素因の診断を補助する。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

疾患あるいは疾患にかかる素因を診断する方法であって、該方法が ( a ) 被験者から遺伝物質を得ること、( b ) 少なくとも 1 コピーのウロモジュリン ( U M O D ) 遺伝子配列における変異を検出するために遺伝物質を分析することを含み、U M O D 変異の存在が患者における疾患または疾患にかかる素因の診断を補助するものである、方法。

## 【請求項 2】

疾患が髄質嚢胞腎疾患 2 ( M C K D 2 ) である、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 3】

疾患が家族性若年性痛風性腎症 ( F J G N ) である、請求項 1 に記載の方法。

10

## 【請求項 4】

疾患が腎症、腎不全、高尿酸血症、痛風関節炎、または夜尿症である、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 5】

遺伝物質がゲノム DNA である、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 6】

遺伝物質が RNA である、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 7】

遺伝物質が被験者の DNA または RNA の合成コピーである、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 8】

分析することが遺伝物質の少なくとも 1 部の配列を得ることを含む、請求項 1 に記載の方法。

20

## 【請求項 9】

分析することが実質的にすべての遺伝物質の配列を得ることを含む、請求項 1 または 8 に記載の方法。

## 【請求項 10】

さらに、遺伝物質の配列を野生型 U M O D 遺伝子の配列と比較すること、および遺伝物質と野生型 U M O D 遺伝子の配列間の差異を同定することを含む、請求項 8 または 9 に記載の方法。

## 【請求項 11】

分析することが、遺伝物質を所定の U M O D 変異に実質的に特異であるハイブリダイゼーションプローブにさらすこと、および遺伝物質に対し該プローブのハイブリダイゼーションが存在するかしないかを検出することを含む、請求項 1 に記載の方法。

30

## 【請求項 12】

疾患あるいは疾患にかかる素因を診断する方法であって、該方法が ( a ) 被験者から U M O D タンパク質を得ること、( b ) 変異 U M O D タンパク質を検出するために U M O D タンパク質を分析することを含み、変異 U M O D タンパク質の存在が患者における疾患または疾患にかかる素因の診断を補助するものである、方法。

## 【請求項 13】

腎疾患が髄質嚢胞腎疾患 2 ( M C K D 2 ) である、請求項 12 に記載の方法。

40

## 【請求項 14】

腎疾患が家族性若年性痛風性腎症 ( F J G N ) である、請求項 12 に記載の方法。

## 【請求項 15】

疾患が腎症、腎不全、高尿酸血症、痛風関節炎、または夜尿症である、請求項 12 に記載の方法。

## 【請求項 16】

分析することが、U M O D タンパク質を変異 U M O D タンパク質に選択的な抗体にさらすことを含む、請求項 12 に記載の方法。

## 【請求項 17】

分析することが、U M O D タンパク質を正常 U M O D タンパク質に選択的な抗体にさら

50

すことを含む、請求項 1 2 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

連邦によって後援された研究と開発に関する声明

本発明は、ナショナル・インスティテュート・オブ・ダイアベティス・アンド・ダイジェスティブ・アンド・キドニー・ディジーズ(National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases)によって授けられた助成金番号 D K 6 2 2 5 2 に基づき、部分的に政府の援助によってなされたものである。合衆国政府は本発明において一定の権利を有することがある。

10

【0002】

発明の分野

本発明は疾患または疾患を発症する素因を診断するための方法および試薬に関する。

【背景技術】

【0003】

発明の背景

髄質嚢胞腎疾患 2 (すなわち、「MCKD2」、Online Mendelian Inheritance in Man Ref. 0MIN603860 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=603860>)) および家族性若年性痛風性腎症(すなわち、「FJGN」Online Mendelian Inheritance in Man Ref. 0MIM162000 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=162000>)) は、高尿酸血症、痛風、夜尿症および進行性腎不全の若年性発症を特徴とする、常染色体優性腎疾患である。どちらの病気も、腎移植を行わない限り、通常は死に至る。

20

【0004】

MCKD2 および FJGN 両方の臨床的徴候は存在および重篤度によって異なるため、顕著な病状が出る前は、どちらの病気もはっきりとした診断が難しい。そのため、現在、どちらの病気も一般的に早期に治療できず、また通常これらの病気において予防は不可能である。したがって、MCKD2 および FJGN のような疾患、あるいはかかる疾患を発症する素因を診断するための、より感度のよい方法および試薬が必要とされている。

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

30

【0005】

本発明の要旨

本発明は、被験者または患者におけるウロモジュリン(UMOD、タム-ホースフォールグリコプロテイン(Tamm-Horsfall glycoprotein)としても知られている(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=191845>参照))の変異を分析することによって、疾患あるいは疾患にかかる素因を診断する方法を提供する。UMODにおける変異の存在は、患者の疾患あるいは疾患にかかる素因の診断を補助する。

【0006】

本発明の方法は、現行の方法よりも早期に疾患(例えば、MCKD2、FJGN、腎症、腎不全、高尿酸血症、痛風関節症、夜尿症など)を診断することを可能にし、それにより顕著な病状が発現する前の、上記疾患の診療及び治療を容易にすることができる。使用目的によっては、本発明の方法はかかる疾患を発症する素因を、症状を示していない患者においてさえも同定することができる。さらに該方法は、潜在的な組織提供者あるいは提供された組織または器官(例えば、腎臓若しくは腎組織)を調べ、提供された組織を受け取る移植受容者が上記疾患を発症する危険性を最小限に抑えるために使用されうる。本発明のこれらの利点およびその他の利点、そしてさらなる発明の特徴は、以下に提供される発明の詳細から明らかとなるであろう。

40

【発明を実施するための最良の形態】

【0007】

発明の詳細な説明

50

本発明は、被験者におけるUMODの変異を分析することによって、疾患あるいは疾患にかかると診断する方法を提供する。本発明の方法によれば、あらゆる個体を試験することができる。しかしながら、通常、被験者（または患者）は、例えば、MCKD2、FJGN、腎症、腎不全、高尿酸血症、痛風関節症および夜尿症などの病歴を有する家系に属している。かかる家系出身の無症候個体を試験して、彼らが上記疾患にかかると診断することができるか、あるいは彼らが彼らの子孫において疾患を起こしうる対立遺伝子のキャリアであるかどうかを調べることができる。その上、この方法を出生前に用いて、胎児が生後、MCKD2、FJGN、腎症、腎不全、高尿酸血症、痛風関節症および夜尿症を発症する傾向を調べることができる。あるいは、本発明の方法を用いて、症状を示す患者、通常、高尿酸血症、腎不全および/または夜尿症を示すような患者を診断することができる。かかる患者のために、本発明の方法はより早期に、および/またはより明瞭な診断を提供することができ、したがってより早期の診療および治療を容易にすることができる。さらに、移植の必要がある人々は提供腎臓やその他の腎組織を家族員の近親者から受け取ることが多いので、本発明の方法を用いて提供者や提供された組織を調べ、移植受容者が異常UMODタンパク質を生成する腎組織を受け取らないことを確実にすることができる。

#### 【0008】

1つの実施態様では、本発明の方法は、被験者から得た遺伝物質を分析することを含む。遺伝物質は、例えば、被験者から直接得たDNAまたはRNAであってもよく、あるいは遺伝物質を被験者の細胞内で遺伝物質から（例えば、PCR、RT-PCR、若しくはその他の適切な技術を介して）複製または増幅してもよい。例えば、細胞を尿サンプルから集めて遺伝物質を得てもよい。十分な量の遺伝物質が試験に利用できるようにするため、通常、被験者から得た細胞から増幅した遺伝物質を本発明の方法によって分析する。望ましくは、患者由来のUMOD遺伝子を分析のために増幅するため、この配列の全てまたは一部に隣接するプライマーを用いてPCRあるいはRT-PCRストラテジーを使用する。MCKD2および/またはFJGNは常染色体優性疾患であるので、本発明の方法に応じて両方を分析するため、被験者由来のUMOD遺伝子の両方のコピーを増幅/複製するのが最も好ましい。

#### 【0009】

どのようにして得たかに関わらず、遺伝物質を分析して、UMOD遺伝子における変異（例えば、2つのUMOD対立遺伝子の少なくとも1つにおける変異）を検出する。この目的のために、遺伝物質（例えば、gDNA, cDNA, RNAなど）の種類に適切な変異を検出することができる任意の試験を用いてもよい。例えば、一部の遺伝物質または実質的に全ての遺伝物質を配列決定してもよく、また配列を野生型UMOD配列（例えば、GenBank登録番号：AY162963、AY162964、AY162965、AY162967、AY162968、AY162969およびAY162970参照）と比較して変異を検出してもよい（例えば、図5参照）。あるいは、遺伝物質を所定のUMOD変異に実質的に特異であるハイブリダイゼーションプローブで（例えば、ノザンまたはサザンハイブリダイゼーション、PCR、あるいは当業者によく知られている周知であるようなその他の適当な方法によって）プローブすることができる。例えば、MCKD2および/またはFJGNに関連した公知のUMOD変異の1つは、UMOD遺伝子のエクソン4から27ベースペアの欠失（図6参照）であり、この欠失をまたぐように設計されたプローブを使用して、この変異を（例えば、ELISAによって）素早く分析することができる。

#### 【0010】

別の実施態様では、本発明の方法は、被験者から得たUMODタンパク質を分析することを含む。UMODタンパク質は尿サンプルまたはそこから単離された細胞中などから任意の適切な方法によって得られうる。その後、被験者から得たUMODタンパク質を分析し、変異を検出する。例えば、UMODタンパク質を精製し（部分的にもしくは実質的に、（例えば、Tamm and Horsfall, J. Exp. Med., 95, 71-97 (1952)参照）、そして、野

生型UMODタンパク質ではなく、公知の変異UMODタンパク質を認識する抗体を1つ以上用いて、免疫組織学的(immunohistological)技術(例えば、ウェスタンブロッティング、ELISA, 免疫沈降など)によって分析できる。もう1つの方法として、あるいは上記の方法と併せて、被験者由来のUMODタンパク質サンプルを、公知の変異UMODタンパク質ではなく、野生型UMODタンパク質を認識する抗体を1つ以上用いて分析することができる。したがって、使用目的によっては、所定の被験者の免疫学的UMODプロファイルを作成したり、またさらには、存在する変異および野生型UMODタンパク質の量および/または種類を定量的に決定したりすることさえも可能である。

#### 【0011】

免疫学的特性評価の代わりとして、被験者由来のタンパク質を形態学的に分析することができる。この場合、UMODは、約85kDの単量体サブユニットから構成され、分子量の30%の炭水化物と残りの70%のポリペプチド鎖を有する、その天然形態における重合体であることが知られている(Fletcher et al., Biochem. J., 120, 425-32 (1970))。電子顕微鏡観察により、高分子量の会合体がジグザグまたはらせん構造を有する薄くて絡み合った繊維で構成されていることが明らかになっている。最近の分析は、お互いに巻きついた2つのプロトフィラメントからなるフィラメントが、右巻きの螺旋を形成していることを示している(Jovine et al., Nat. Cell. Biol., 4, 457-61 (2002))。UMODは透明帯(zona pelucida)(ZP)ドメインを含有しており、これはZP-含有タンパク質をフィラメントへの重合を担うことが示されてきた(Jovine et al.)。また、UMODは多数のシステイン残基を含有しており(モノマーにつき48個)、24個の分子内ジスルフィド結合の潜在的形成を可能にする。これらのシステイン残基は生物種間で高く保全される(図6)。UMODタンパク質の変異はその一次および二次構造、並びに結合力を改変し、またその特徴的な三次構造を形成することができる。よって、使用目的によっては、変異UMODタンパク質の形態学的分析として、被験者からのUMODの構造を野生型タンパク質のそれと比較することが可能である。

#### 【0012】

当然に、遺伝子およびタンパク質分析の両方を互いに組み合わせて使用し、被験者における変異UMODを検出することも可能である。しかしながら、もし上記疾患と一致するその他の症状を伴う場合、分析の方法に関わらず、被験者由来の変異もしくは異常UMOD遺伝物質および/またはタンパク質の存在を裏付ける試験結果は、被験者におけるMCKD2、FJGN、腎症、腎不全、高尿酸血症、痛風関節症または夜尿症の診断を補助する。無症候被験者のUMOD陽性の結果は、上記疾患を発症する素因の診断を補助する。

#### 【0013】

以下の実施例により本発明をさらに例示するが、当然に、これらはいかなる形にしる本発明の範囲を制限するように解釈されるべきではない。

#### 【実施例】

#### 【0014】

##### 実施例1

本実施例は、FJGNを有する3つのファミリーおよびMCKD2を有する1つのファミリーにおいて、疾患表現型により分離した4つのUMOD遺伝子変異の存在を示している。これらの知見は、MCKD2およびFJGNはUMOD遺伝子の変異に起因し、対立遺伝子の疾患であることの直接の証拠を提供する。したがって、UMOD変異を分析してFJHNおよび/またはMCKD2を発症する傾向を同定することが可能である。

#### 【0015】

##### 患者および方法

##### 家系図および診断法

調査参加者を4つのファミリーから得た。ファミリー1は数世代にわたる大きなファミリーであり、このファミリーにおいて7世代遡って疾患をたどった。この家系は300人以上を超える家族員を含み、家系図全体を表すには大きすぎた。図1は、サンプルの大部分をそこから得たこのファミリーの選択した部分の家系図を示す。このファミリーは、常

10

20

30

40

50

染色体優性様式で遺伝した、高尿酸血症、尿酸の分画排出の低減、および腎不全の長い病歴有しており、それらはF J H Nと一致する臨床所見を伴っていた。ファミリー2は、同じくF J H Nを高浸透常染色体優性形質として分離した数世代にわたる大きなファミリーであった。ファミリー3はこれまで、常染色体優性様式で遺伝した髄質嚢胞疾患、高尿酸血症および痛風(Thompson et al., Arch. Intern. Med., 138, 1614-17 (1978))を患っていると報告されてきた(図1参照)。サンプルをファミリー4の罹患家族員の1人から得た。ファミリー4はこれまで文献において家族性高尿酸血症および腎臓病を患っているが髄質嚢胞は患っていないと広く述べられてきており、所見はF J H Nの診断と一致する(Massari et al., Arch. Intern. Med., 140, 680-84 (1980))。ファミリー5は、家族員がF J G Nの診断と一致する症状を示していたので調べた。

10

## 【0016】

血中尿酸および血中クレアチニン測定を行い、尿酸およびクレアチニンの24時間蓄尿を得た。クレアチニン測定はジャッフェ(Jaffe)アルカリ性ピクリン酸塩反応速度法によって行った(Tietz NW. Clinical Guide to Laboratory Tests, 3d edition. WB Saunders Company, Philadelphia, PA; 186-87 (1995))。尿酸測定はADVIA 1650ケミストリーシステムで行った。尿酸定量法は、トリンダー(Trinder)様エンドポイントを有するウリカーゼを用いたフォサッティ(Fossati)酵素反応の基づくものである(Fossati, Clin. Chem., 26, 227-231(1980))。コックロフト-ゴールト(Cockcroft-Gault)式によって判定されるように(Cockcroft et al., Nephron, 16, 31-41 (1976))、クレアチニンクリアランスの評価を、患者の体重または標準体重のうちどちらか少ない方を用いて行った。腎不全を概算クレアチニンクリアランスが80ml/分未満のものとして定義した。夜尿症は4歳以降の持続的な夜尿と定義した。

20

## 【0017】

もし以下の基準を満たすならば、患者が確実に罹患しているとみなした:(1)高尿酸血症(集団の年齢および性別を調節した平均よりも2標準偏差(s.d.)高いレベルの血中尿酸レベルとして定義する(Wilcox, J. Pediatr., 128:731-41(1996);Mikkelsen et al., Am. J. Med., 39, 242-51 (1965)) )または痛風の病歴およびアロプリノールの現行治療、および(2)尿酸の分画排出の低減(男性で<5%、女性で<6%)または80ml/分未満の低下したクレアチニンクリアランス。(一般的に、クレアチニンクリアランスが80ml/分未満の個体は、尿酸の分画排出の上昇が現れ始める(Rieselbach et al., Nephron, 14, 81-87 (1975))、そのため、腎不全を有する家族員では尿酸の分画排出をF J H Nの決定因子として用いることができない。)血中尿酸レベルが集団の年齢および性別により調節した平均の1標準偏差以内であれば、家族員を臨床的に罹患していないと定義する(Wilcox; Mikkelsen et al.)。

30

## 【0018】

## DNA - マーカー解析

ゲノムDNAを末梢血液からQIAamp血液キット(Qiagen)を用いた標準方法によって抽出した。遺伝子の連鎖の調査を、F J H Nと診断された2つの数世代にわたる大ファミリー出身の90個体において行った(図1、ファミリー1およびファミリー2)。有効な家族員を、候補インターバル(candidate interval)にまたがるSTRP-タイプ(Short Tandem Repeat Polymorphism)遺伝子マーカーについて遺伝子型を調べた。以前に報告された9つのSTRP遺伝子座に加え、9つの新規なSTRP遺伝子座を5.6Mbのインターバルの物理的地図から作成した(図2、図3)。これらのマーカー遺伝子座を、蛍光ラベルしたプライマーを用いてPCR増幅し、従来法での遺伝子型決定を可能にした(Hart et al., Am. J. Hum. Genet., 70, 943-54 (2002))。PCR生成物をABI 377蛍光シーケンサーで検出し、GENESCAN 2.1 (Applied Biosystems)で分析した。

40

## 【0019】

パラメトリック連鎖計算: LODスコアおよびハロタイプ解析

候補インターバルのサブローライゼーションを遺伝連鎖調査およびファミリー1とフ

50

ファミリー 2 における F J H N 形質により分離したハロタイプの最小重複部位の評価の方法によって得た。標準の二点および多重連鎖解析を、V I T E S S E プログラムを用いて行った (O' Connele et al., Nat. Genet., 11, 402-08 (1995))。連鎖解析の条件は、常染色体優性トランスミッション、95 ~ 100% の浸透率、0.0001 の疾患対立遺伝子頻度および 1% の表現型模写率を含むものであった。ハロタイプの同定を可能にするため、F J H N 候補遺伝子領域の物理的地図を作成した。この地図により、この領域内の公知の S T R P マーカーの正確なローカライゼーションが可能となり、またインターバルにまたがる所望のローケーションの新規な S T R P マーカーを同定することができた。

#### 【0020】

候補 F J G N 候補インターバルの物理的地図の作成；S T R P および遺伝子同定 10  
 候補インターバルにまたがる新規な S T R P タイプマーカーを同定し、インターバル内の全ての公知および推定遺伝子を同定できるようにするため、詳細な物理的 / 遺伝的地図の作成が始められた (Zhang et al., Cyto. Genet. Cell. Genet., 95, 146-52 (2001))。最終アラインメントは 5.6 百万ベース領域にまたがる 67 B A C S を含有していた。この領域は B A C 配列が整列できない 2 つのギャップを含む。このコンティグ (contig) をすべての公知の遺伝子で調べ、S T R P 遺伝子座を N C B I ヒトゲノム配列サイトおよび G E N E M A P 9 9 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/seq/> および <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genemap/>) を通じて同定し、また B A C コンティグで確認された遺伝子および S T R P 遺伝子座を新しい地図上で位置づけた。新規な S T R P マーカーをタンデムリピーツファインダー (Tandem Repeats Finder) (Benson, Nucl. Acids. Res., 27, 57 20  
 3-80 (1999); <http://c3.biomath.mssm.edu/trf.advanced.submit.html>) を用いて同定した。次いで候補 S T R P サイトを選び、プライマーを O l i g o 4 . 0 ソフトウェアを用いて設計した。

#### 【0021】

候補領域における遺伝子を同定するためにいくつかの情報源を用いた：U C S C の Human Genome Project Working Draft (<http://genome.ucsc.edu/>)、Sanger Center ' s ENSEMBLE database (<http://ensembl.org/>) および Locus Link (Benson)。また、B L A S T 非重複 (non-redundant) データベースおよび d b E S T データベースを調べた B A C コンティグ配列に、N C B I B L A S T (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) および e P C R を用いた。その時点で利用可能な全ての情報を用いて、c D N A コンティグを個々の候補 30  
 遺伝子のために作成した。遺伝子のより正確な表現のため、すべての E S T データを含めた。イントロン / エクソンの境界は、G E N I O / s p l i c e (<http://genio.informatik.uni-stuttgart.de/GENIO/splice/>) で示されたコンセンサスプライス配列を用いてマニュアルで決定した。利用可能な N C B I データ (電子リファレンスにおける登録番号；NCBI Locus Link, NCBI Entrez) [図 2 で示した遺伝子に関する NCBI Locus Link (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/LocusLink/>) - Locus ID 番号は：XT1-64131, COQ7-10229, B/K-51760, G104-162074, GPRC5B-51704, GP2-2813, UMOD-7369, BUCS1-116285; (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez/>) で提供される NCBI Entrez 遺伝子登録番号：XT1-XM\_485032, COQ7-NM\_016138, B/K-NM\_016524, G104-XM\_091332 GPRC5B-NM\_016235, GP2-NM\_001502, UMOD-NM\_003361, BUCS1-NM\_052956) ] からのデータと同様にプライマリーコンティグか 40  
 ら得たデータを用いて、ゲノム D N A からの候補遺伝子を増幅するためのプライマーを設計した。連鎖およびハプロタイプ解析により、F J H N 候補領域を約 1.7 M b インターバルに細分化した。5 つの公知の遺伝子をこのインターバルで位置特定した。加えて、インテグレイテッドバイオインフォマティクスおよびベンチラボアプローチを用いて、今まで特徴付けられていなかった遺伝子座をインターバル中で位置特定した。これら遺伝子のうち 4 つすべてのエクソンおよびイントロン - エクソン境界を、ファミリー 1 およびファミリー 2 の罹患および非罹患家族員から得たゲノム D N A の配列解析によって解析した。

#### 【0022】

U M O D エクソン配列決定

UMOD 遺伝子のゲノム構造をバイオインフォマティクスに決め、配列解析で確認した。イントロン - エクソン境界 (表 2) を含む、12 エクソン中 11 を増幅するためのオリゴヌクレオチドプライマーを、Oligo 4.02 (National Biosciences) を用いて設計した。UMOD 遺伝子の OCR 増幅を、表 2 に示したようにして行った。増幅した DNA を QIAquick PCR 精製キット (Qiagen) で精製し、ピッツバーグ大学のゲノミクス・アンド・プロテオミクス・コア (Genomics and Proteomics Core) 研究所による ABI 3700 DNA アナライザー (Applied Biosystems) のビックダイ・ターミネータ・サイクル (BigDye Terminator Cycle) 配列決定キットを用いて配列決定した。配列解析を Sequencher 4.1 ソフトウェア (GeneCodes) で行った。

#### 【0023】

##### 結果

##### 臨床所見

5 年間にわたり、ファミリー 1 の 72 人に対し臨床試験を行った。31 人が罹患したとみなされる厳密な基準を満たし (尿酸の分画排出の低減を伴った高尿酸血症または腎不全)、22 人が正常だと診断され、そして非罹患配偶者が 10 人いた。9 人の家族員には規定の診断をすることができなかった。34 人の個体が高尿酸血症を患い、28 人が腎不全を患っていた。ファミリー 2 および 3 の家系図により、高尿酸血症または腎不全を患った全ての個体を同定する。

#### 【0024】

##### 腎生検

ファミリー 1 の 3 人の家族員における腎生検によって病理学的サンプルを得た。3 つすべての生検により、尿細管萎縮および間質性繊維症の組織学的変化が明らかになった。糸球体硬化症は全体的に存在し、糸球体腎炎の徴候はなかった。ファミリー 2 における 39 歳の罹患女性の生検標本によって、広範囲に及ぶ尿細管萎縮が明らかになった。ファミリー 3 において、いくつかの生検標本を得た。最初のもは 34 歳男性のものであり、報告により、濃密な無細胞性硝子状物質によって細管が覆われていることが明らかになった (Thompson et al., Arch Intern Med, 138, 1614-17 (1978))。髓質嚢胞が存在した。別の家族員において、生検調査により、繊維組織によって細管が覆われていることも明らかになった。3 つ目の場合、細管は濃密な無細胞性硝子状物質によって覆われていた (Thompson et al.)。ファミリー 4 において、生検サンプルによって、間質性繊維症をともなった局所性尿細管萎縮およびリンパ球浸潤が明らかになった。つまり、全ての生検標本により間質性繊維症をともなった局所性尿細管萎縮が示された。解剖報告により、濃密な無細胞性硝子状物質によって覆われた細管が明らかになった。PAS 陽性物質の間質沈積もまた、髓質嚢胞腎疾患において確認されている (Zagar et al., Lab. Invest., 38, 52-57 (1978)); Resnick et al., Lab. Invest., 38, 550-55 (1978))。これらの沈積物の免疫染色は、タム - ホースフォールタンパク質に対する抗体に著しく陽性であることがわかった。

#### 【0025】

##### 候補インターバルの物理的地図

FJHN / MCKD 2 候補インターバルの既存の遺伝的および物理的地図は一般に統合性に乏しく、インターバルをまたぐ比較的少数の多型性遺伝子マーカー (STRPs) を同定した。これは、キーマーカー (D16S3056) が調査したファミリーにおいて情報価値がなかったため、問題であった。FJHN / MCKD 2 候補インターバルの統合された物理的および遺伝的地図の作成 (図 2 にまとめた) によって、これまでの連鎖調査の結果を正確に方向付けることが可能になり、公知の遺伝子を正確に候補インターバルに局在させ、また新規な STRP 遺伝子座を作成することができた。新規な STRP 遺伝子座マーカーのアベイラビリティにより、ハプロタイプ解析によって候補インターバルを細分化ができた。8 つの公知の STRP および 8 つの新規の STRP の位置を図 2 に示す。これらの STRP を増幅するために用いたオリゴヌクレオチドプライマーおよび条件を表 1 に示す。現在の連鎖データを含む、ほとんどの報告におけるコンセンサス候補インターバルは、16p13.11 (D16S499) から 16p12.2 (D16S403) に位

10

20

30

40

50

置する候補インターバルを裏付けている。F J H NおよびM C K D 2として報告されたすべての連鎖インターバルが染色体16pにマッピングされる一方で、すべてが重複するわけではないことは図2から明らかである。

#### 【0026】

##### 連鎖解析

遺伝連鎖解析の結果により、2つのファミリー（ファミリー1およびファミリー2）におけるF J H Nの遺伝子を約1.7-Mbの重複インターバルに位置づけた（図2）。ファミリー1では、その遺伝子を2349B8（16）からD16S403（Z<sub>MAX</sub> = 12.5@D16S3041、q = 0.01）に線引きされた約3.8-Mbのインターバルに位置づけ、またファミリー2では、連鎖インターバルはD16S404およびD16S3046（Z<sub>MAX</sub> = 3.2@D16S3041、q = 0.00）間の~17-Mbであった。D16S404はテロマー的に約14-Mb、D16S499へ伸びている。これらの知見は、F J H Nの染色体16pへの連鎖に関するこれまでの5つの報告のうち4つ（Dahan et al., J. Am. Soc. Nephrol., 12, 2348-57 (2001); Hateboer et al., Kidney Int., 60, 1233-39 (2001); Scolari et al., Am. J. Hum. Genet., 64, 1655-60 (1999); Stiburkova et al., Am. J. Hum. Genet., 66, 1989-94 (2000)）と一致した。本発明の候補インターバルは5つめの調査（Kamatani et al., Arthritis Rheum., 43, 925-29 (2000)）のインターバルとは重複しなかったが、これはおそらく遺伝的異質性を反映している（彼らは日本のF J H Nファミリーを調査している唯一のグループである）。

10

#### 【0027】

##### 候補遺伝子評価；変異解析

F J H Nに関する公知の連鎖報告の全てと本発明の連鎖データを統合することにより、本発明の連鎖結果における2349B8（16）からD16S3036の最小重複（< 0.3-Mb）のインターバルとDahanおよびその同僚らのそれ[Dahan et al., 前述]とが一致した（図2参照）。この遺伝子同定アプローチにより、公知の遺伝子の1つ（B/Kタンパク質；NM\_016524）および仮想遺伝子の1つ（G104；XM\_091332）をこの共通のインターバル中で同定した。B/K遺伝子および仮想遺伝子G104のコード領域（イントロン-エクソン接合部を含む）に関して、ファミリー1およびファミリー2の罹患および非罹患家族員から得たゲノムDNAの直接配列解析では、どちらのファミリーにおいてもF J H N形質の原因となるDNAの変異は何も同定されなかった。

20

30

#### 【0028】

F J H Nの明確な診断は問題が多く（特に、軽度の場合や若い個体の場合）、また家族員の間違った診断は候補遺伝子部位の境界に直接影響するかもしれないため、本解析をファミリー1およびファミリー2から得た連鎖および遺伝子型データのみを用いて進めた。したがって、上記の診断基準に基づいて罹患していると診断されなかった個体を本解析から除いた。同様に、正常な腎機能（計算したクレアチンクリアランスが100ml/分を超える）かつ血中尿酸レベルが年齢と性別で調整した平均の1標準偏差以内である個体（Wilcox; Mikkelsen et al.）を本解析から除き、候補インターバルを細分化した。

#### 【0029】

ハプロタイプ解析によって、ファミリー1およびファミリー2におけるF J H N形質により分離した最も小さい共通のハプロタイプが同定された（図3）。本配列解析により、公知の遺伝子（B/Kタンパク質）および仮想の遺伝子（G104）がインターバル2349B8（16）~D16S3036から除かれ、候補インターバルを、D16S3036~D16S3046から約1.2-Mbに細分化できた。これで、4つの遺伝子：ブチリル（Butyrl）コエンザイムAシンターゼ1（BUCS1）；グリコプロテイン2（GP2）；Gプロテイン共役型受容体、ファミリーCグループ5、メンバーB（GPRC5B）およびUMODを含む候補インターバルが修正された。GPRC5BおよびUMODの配列解析を、罹患および非罹患家族員から得たゲノムDNAで行った。GPRC5B配列データにおいて、コード領域多型は検出されなかった。UMOD遺伝子全体のゲノム構成を決定するため、利用可能なすべてのUMOD mRNAおよびESTデータを整理して

40

50

、考えられるあらゆるスプライス改変体を同定した。バイオインフォマティックスアプローチを用いて、UMOD遺伝子のゲノム構造を決定した(図4参照)。このアプローチにより、12個のUMODエクソンが同定がされ、これはこれまで報告されたエクソンより1つ多い(Pennica et al., Science, 236, 83-88 (1987))。本アプローチによって同定され、ESTデータによって支持される、新規のエクソンはエクソン2である。エクソン1および2はエクソン3のATG開始部位とコードしない。ESTデータに基づくと、エクソン1から転写が始まりエクソン3へ進行するか、エクソン2において転写が始まりエクソン3へ進行するかのいずれかであるために、代わりにの5'転写開始部位があるようである。どちらの場合も、得られたタンパク質は同一である。

#### 【0030】

UMOD配列解析をファミリー1およびファミリー2で行った。配列解析の結果により、ファミリー1および2の、UMODのエクソン4における2つの異なる変異が明らかになった(図5A、5B)。変異は命名法ガイドラインにそって記載した(Antonarakis, Hum. Mutat., 11, 1-3 (1998); Den Dunnen et al., Hum. Mutat., 15, 7-12 (2000))。それぞれのファミリーにおいて(ファミリー1におけるg.1966\_1992delおよびファミリー2におけるg.1880G>A)、UMODエクソン4遺伝子変異は疾患表現型と完全に分離していた。MCKD2におけるUMOD変異の関与の可能性を評価するため、MCKD2を分離する、より小さいファミリーの3人の罹患家族員および5人の非罹患家族員(ファミリー3、図1)の配列解析を行った。このファミリーの解析により、UMODにおいて、またエクソン4においても、3つ目の新規な変異(g.1744G>T)を同定した(図5C)。FJHNにおけるUMOD変異の普遍性を評価するため、我々はこれまでに報告された大親族の罹患家族員に対し変異解析を行った(Massari et al., Arch. Intern. Med., 140, 680-84 (1980))。この解析により、UMODのエクソン4における4つ目の新規な変異(g.2086T>C)が明らかになった(図5D)。ファミリー5における罹患個体は別の変異を含有していた(g.2105G>A、c.668G>A、p.C223Y)。

#### 【0031】

ファミリー1、ファミリー2およびファミリー3における特定のUMOD遺伝子変異は、罹患した家族員(ファミリー1およびファミリー2におけるFJHN;並びにファミリー3におけるMCKD2)においてそれぞれ分離していた。これらの変異の中で試験された100の対照染色体において同定されたものはなかった。50人の白人対照(100染色体)におけるUMOD遺伝子の配列解析では、UMODエクソン内の2つのサイレント多型の存在が明らかになった。以前に報告された、C174に位置する同義的SNP(Pirulli et al., J. Nephrol., 14, 392-96 (2001))は、我々のサンプルで、82%のT対立遺伝子頻度および18%のC対立遺伝子頻度を有している。V287に位置している新規な同義的SNPは87%のG対立遺伝子頻度および13%のA対立遺伝子頻度を有している。UMOD翻訳に影響を与える多型は、調べた100の対照染色体いずれにおいても検出されなかった。

#### 【0032】

##### 遺伝子型 - 表現型相互関係

ファミリー1では、36人の家族員が変異を持ち、26人の家族員が持っていなかった。遺伝的に罹患している36人中32人(89%)の個体が高尿酸血症を患っていた(前述の方法にて定義)。遺伝的に罹患している32人中28人(88%)の家族員が、18歳以降で測定したとき、90ml/分未満の概算クレアチンクリアランスを有していた。UMOD変異を持っている36人中10人(28%)の個体が夜尿症を患っていた。尿酸の分画排出は、遺伝的に罹患しているすべての男性において6%未満、そして概算クレアチンクリアランスが70ml/分より高い遺伝的に罹患しているすべての女性においては5%未満であった。(患者の尿酸の分画排出は腎機能が低下するにつれて増加する(Rieselbach et al., Nephron, 14, 81-87 (1975))。UMOD変異を持っている36人中32人の個体は、罹患されていると診断されるのに必要である厳密な臨床基準を満たしていた。残りの4人は、尿酸の分画排出が低かったにも関わらず正常な血中尿酸レベルを有し

10

20

30

40

50

ていた女性であった。これらの女性のうち2人は軽度の腎不全を有していた。これらの女性のうち3人を数年間にわたって試験したところ、血中尿酸レベルは正常かボーダーライン上のままであった。UMOD変異を持たない5人の家族員では、血中尿酸レベルが上昇はしたが平均の2標準偏差より高くはならなかった。

【0033】

ファミリー2においては、変異を有する9人中9人の患者が高尿酸血症を患い、また9人中9人の患者が腎不全を患っていた。ファミリー3においては、変異を持っている3人の家族員中2人が高尿酸血症を患っており、また罹患家族員の3人全員が腎不全を患っていた。

【0034】

最近、研究の1つが、MCKD2を分離する大きなイタリア人ファミリーの候補遺伝子としてUMODを除外してきたこと(Pirulli et al., 前述)を考えると、これらのデータは驚くべきものである。この研究はUMODコード領域全体が配列決定されていることを報告したが、これは本研究で用いたプライマーセットと異なるもので行われた。エクソン4の配列における方法論的な差異によりこの異なる結果の説明がつくと考えられる。しかしながら、その他の可能性も考慮しなければならない。エクソン全体の欠失が野生型対立遺伝子のみでのPCR増幅をもたらし、変異の存在を隠しているのかもしれない。Pirulliらは非コーディングエクソン1および2も、UMODの5'調節領域も解析していない。エクソン1、エクソン2または調節領域の変異がUMOD生成の損失をもたらしている可能性がある(Salowsky et al., Gene, 293, 9-19 (2002); Flagiello, Mutations in b

10

20

【0035】

本明細書中で引用された刊行物、特許出願、及び特許を含む全ての参考文献は、それぞれの参考文献が参照により、一つ一つ具体的に援用されることが示され、本明細書にその参考文献の全体が記述されているのと同程度まで、参照によって本明細書中に援用されるものとする。

【0036】

本明細書に他に記述がないか又は文脈に明らかに矛盾していない限り、本発明を表す文脈における用語「a」、「an」、「the」および類似表現の使用は(特に請求の範囲中の文脈において)、単数および複数の両方を包含していると解釈されるものとする。他に注釈がなければ、用語「含有する(comprising)」、「有する(having)」、「含む(including)」、及び「含有する(containing)」は制限のない用語(つまり、「含むがそれに制限されない」という意味)として解釈されるものとする。本明細書における値の範囲の列挙は、本明細書に他に記述がない限り、範囲内に含まれるそれぞれ個々の値を個別に言及する簡略な方法として働くことを単に意図されたもので、それぞれ個々の値は個別に本明細書中に記述されたものの如く本明細書中に包含される。本明細書中他に記述がないか、又は文脈に明らかに矛盾していない限り、本明細書中に記載した全ての方法は任意の適当な順序でも行われうる。本明細書中に提供された任意のまたは全ての実施例、又は例示的な言葉(例えば「~のような(such as)」)の使用は、単に発明をより明快にするよう

30

40

【0037】

本発明の好ましい実施態様を本明細書に記載し、それには本発明者が知る本発明を実施するための最良の態様が含まれている。それらの好ましい実施態様の改変は、前述の説明を読むことによって当業者に明らかになるだろう。本発明者らは当業者がそのような改変を適切に使用することを予期し、さらに本発明がここに具体的に記載した以外の方法で実施されることを意図している。したがって本発明は、適用法で許可されている通り、ここに添付する特許請求の範囲において言及した主題の全ての改変物や等価物を含む。さら

50

には、本明細書中に他に記述がないか、又は文脈に明らかに矛盾していない限り、上述の要素のいかなる組み合わせも、それらの全ての可能な改変において、本発明によって包含されている。

【図面の簡単な説明】

【0038】

【図1-1】図1-1は調査したファミリーの家系図を表す。ファミリー1：300人を超える個体が系統的に7世代にわたって同定された。この親族は全部含めるには多すぎるので、調査した核ファミリーをこのレポートでは示した。これらのファミリーは拡大した親族の異なる部分からのものであり、サブファミリーA、B、CおよびDとして示す。さらに8人の独身者を調査した。罹患家族員における臨床所見はファミリー1におけるF J H Nの臨床診断と一致する。ファミリー2：このファミリーにおける臨床所見はF J H Nの臨床診断と一致する。ファミリー3：臨床所見および腎生検/解剖の報告はM C K D 2の臨床診断と一致した (Thompson et al., Arch. Intern. Med., 138, 1614-17 (1978))

10

。【図1-2】図1-1の続き。

【図2】図2は染色体16p上のF J H N / M C K D 2候補部位の、物理的および遺伝的な統合マップを表す。遺伝子のSTRPマーカーおよびそれらの相対的位置を左に示す。顕著な連鎖結果を示した位置 (LODスコア > 3.0) が今回のレポートにおける2つのファミリー (ファミリー1およびファミリー2) において、並びに別の5つの調査 (参考文献1~5) において示された。9つの公知のSTRPおよび9つの新規なSTRPが同定され、位置特定され、また遺伝子型が特定された。2つの新規STRPの遺伝子座がB A C 2 3 4 9 B 8において同定された。これらの遺伝子座の位置 (2 3 4 9 B 8 (16) - 2および2 3 4 9 B 8 (16) - 1) は図2に示すように54, 000 bp離れている。これらの順列を図3に示す。この領域で同定された遺伝子座を図の右側に示す。

20

【図3】図3は、ファミリー1およびファミリー2における、F J H N表現型により分離した染色体16上の最小遺伝インターバルを示すハプロタイプの結果を表す。F J H N罹患個体を影付きの記号で示し、白丸および四角は非罹患家族員を示し、斜線は死亡した人を示す。遺伝子型が特定された遺伝子STRP座を、それぞれのファミリーにつき左欄に位置的順列でリストする。疾患遺伝子座により分離したハプロタイプには影を付けている。ファミリー2の個体I I - 5は非罹患であるが、インターバルD 1 6 S 4 1 2 - D 1 6 S 3 0 4 6のハプロタイプに関連した疾患を遺伝で受け継いでいる。これはこの領域がF J H N疾患遺伝子座を含んでいないことを示している。四角で囲った部位は両方のファミリーにおけるF J H Nにより分離した最小ハプロタイプ部位を示しており、これはF J H N遺伝子が2 3 4 9 B 8 (16) - 2およびD 1 6 S 3 0 4 6に隣接するインターバル中にあることを示している。

30

【図4】図4はヒトUMOD遺伝子の構造を表す。A. UMOD遺伝子のゲノム構成。エクソンとイントロンはそれぞれ縦四角および横線で示す。それぞれのイントロンのサイズはbpで示している。B. UMOD遺伝子のcDNA構造。翻訳開始および終了のコドンはそれぞれATGおよびTGAでラベルしている。5'および3'の未翻訳領域はグレーで影をつける。矢印は本調査で同定したミスセンス変異を示す。横棒は本調査で同定した欠失を示す。C. 野生型UMODタンパク質の構造。開始Met (initiation met) がアミノ酸1である。シグナルペプチドは黒い四角で示す。EGF様ドメインは点線で示す。ZPドメインはグレーの四角で示す。8つの潜在グリコシル化部位はYで示す。本調査で同定したミスセンス変異は矢印で示し、対応するアミノ酸をその下にリストする。9つのアミノ酸欠失は横棒で示す。追加の最近の予備データはさらなるエクソン (図4に表したものの以外のも) が存在することを示唆している。

40

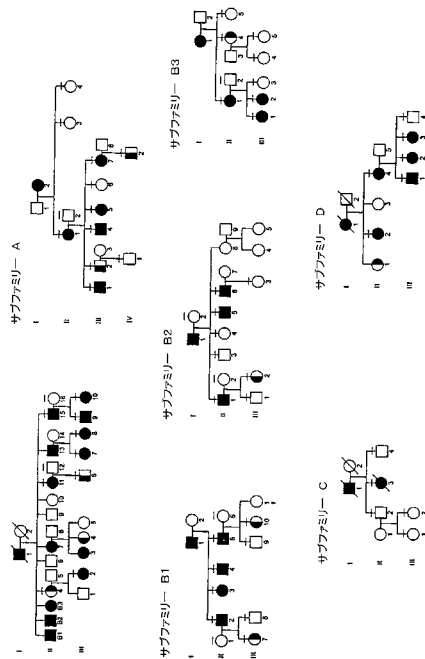
【図5】図5はUMOD配列における変異のダイアグラムである。それぞれのパネルの上の配列は野生型配列を示している。下の配列は罹患個体からのものである。それぞれの変異の説明は、命名法ガイドラインにそって [ゲノム、cDNA、タンパク質] で表した。A. ファミリー1における罹患個体は、アミノ酸177~185のインフレーム欠失をも

50

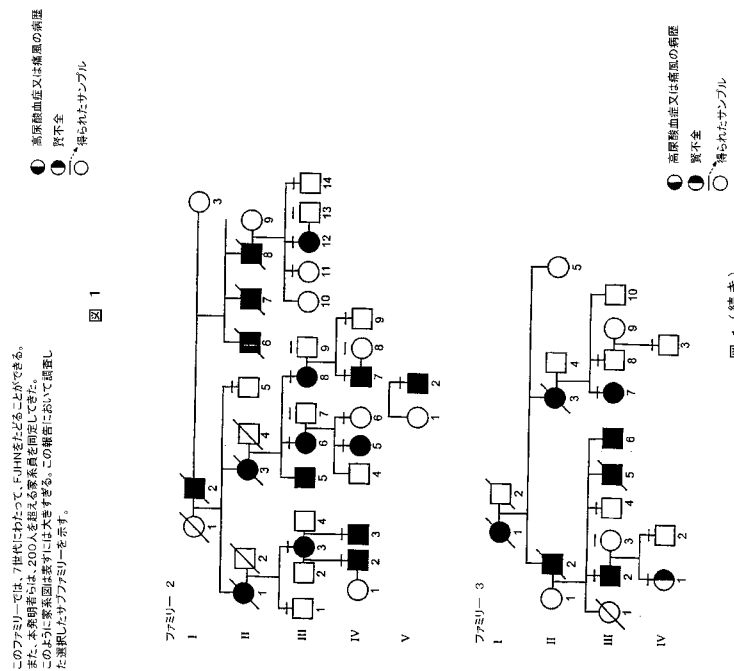
たらず 27bp 欠失が異型接合であった。[g.1966\_1992del; c529\_555del; p.H177\_R185 del.]。B.ファミリー2における罹患個体は、保存的cysをtyrに変えるミスセンス変異が異型接合であった。[g.1880G>A; c.443G>A; p.C148Y]。ファミリー3における罹患個体は、glyをcysに変えるミスセンス変異が異型接合であった。[g.1744G>T; c.307G>T; p.G103C]。D.ファミリー4における罹患個体は、保存的cysをargに変えるミスセンス変異が異型接合であった。[g.2086T>C; c.649T>C; p.C217R]。

【図6】図6. ヒトUMOD (GenBank登録番号: M17778)、ウシUMOD (GenBank登録番号: S75958)、マウスUMOD (GenBank登録番号: NM\_009470)、ラットUMOD (GenBank登録番号: M63510)のアミノ酸配列のアラインメント。48個のC残基全てが保存され、星印をつけて太文字で示されている。矢印は本調査で同定したミスセンス変異の位置を示している。ファミリー1において欠失した9つのアミノ酸は太文字と下線で示している。

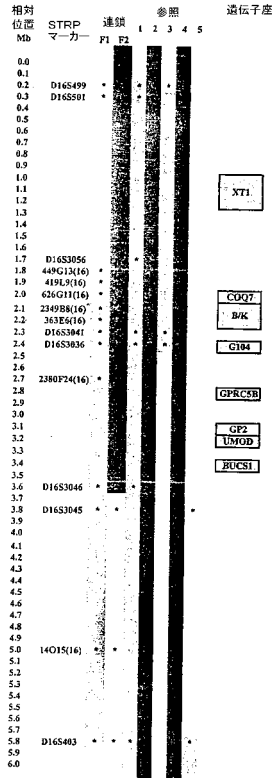
【図1-1】



【図1-2】



【 図 2 】



\* 本報告で用いたSTRPマーカーは2349B(16)-1と2349B(16)-2(図3)は54,000bp分離している。  
 F1=本調査におけるファミリー1、F2=本調査におけるファミリー2

遺伝子座  
 1) Siburkova et al. 2000  
 2) Hatteboer et al. 2001  
 3) Dehau et al. 2001  
 4) Scolari et al. 1999  
 5) Kamataki et al. 2000

遺伝子座  
 B/K=脳質タンパク質  
 COQ7=コエンザイムQ7  
 XM=118731脳質タンパク質中に含まれるG104-EST  
 GP2=グロブリン2  
 GPRC5B=Gプロテイン共役型受容体、ファミリーC  
 グループB、メンバーB  
 UMOD=ウロモジュリン  
 XT1=キヌシロシトランスフェラーゼ

図 2

【 図 3 】

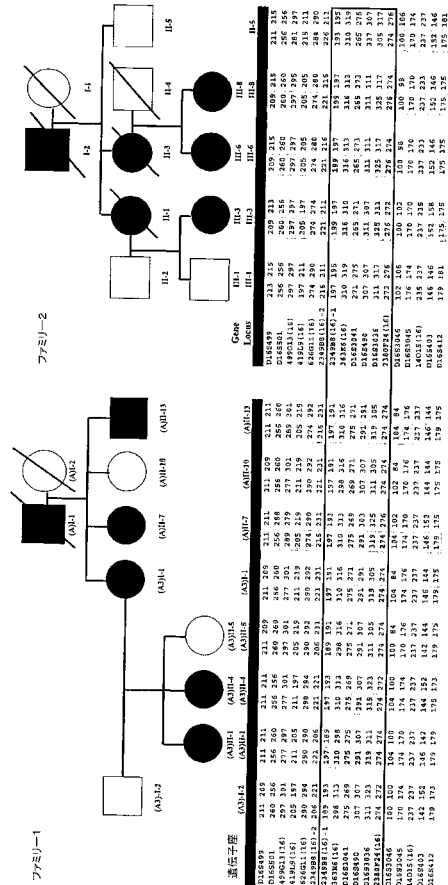


図 3

【 図 4 】

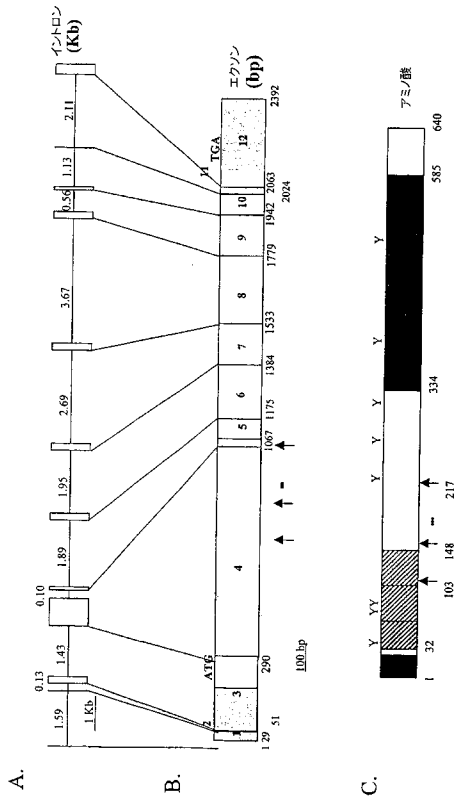


図 4

【 図 5 】

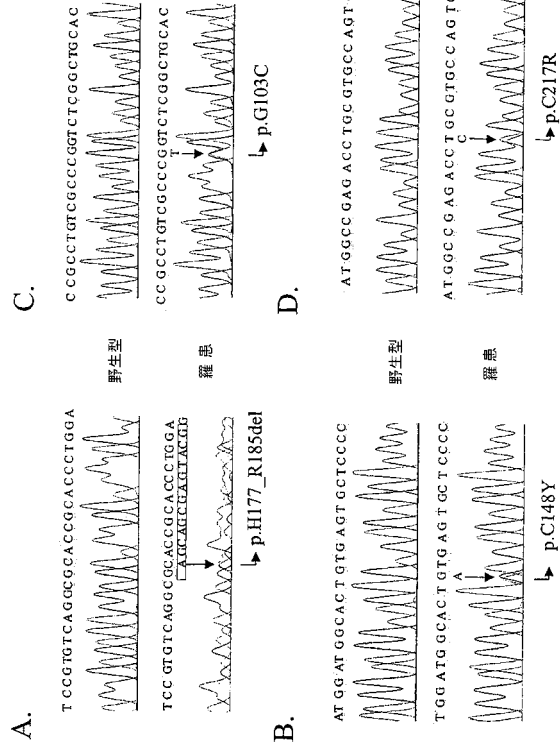


図 5

【 図 6 】

```

Homo sapiens      MCG-PSLITNMLAV-VVASNFIITNATDTSEARNWCSCHSNATCTEDEAVTTCTCCBSPT 57
Bos taurus        MKCLFSFNFMMMAAVTTSKVIIIPATITTSKAKSCSECHSNATCTVDGAATTCACCGGFT 59
Mus musculus      MG-1P1TVMMLVMVMTSFTLABASNSTEARRCSECHSNATCTVDGVTTTCCGCGFT 57
Rattus norvegicus MGQLLSLTLWLLVMVTPFTVAGANDSPEARRCSECHSNATCVLGGVTTTCCGAGFT 59

Homo sapiens      GDGLTCVLDLCAIPGAHNCSANSSCVNTPGFSFCVCPGFRLLPGLGCTDVDECAEPGL 117
Bos taurus        GDGLTCVLDLCAVIGAHNCSATRSQVTLGSHFTVCPGFRLLSSELACEDVDECAEPGL 119
Mus musculus      GDGLVCEMDKCATFTHNCS-NSICVNTSSEFSSQDQFRLLPELGGCTDVDECAEPGL 116
Rattus norvegicus GDGLVCEMDLDECATFTHNCS-NSICMNTLSQVETCSQDQFRLLPELGGCIDVNECTKQGL 118

Homo sapiens      SHCHALATCVVVGSLVLCVCPAGYRGGWHCECSPGSGGPGGLDCVPEG--DALVCAIDPCQ 175
Bos taurus        SRCHALATCINGBNYCVCPAGYLDGRHCECSPGSGGPGGLDCVREG--DALVCAIDPCQ 177
Mus musculus      SNCHALATCVVVTGSLVLCVCPGEGFTCDGWYCECSPSGCEPGLDLPQGHGKLVQDQPCN 176
Rattus norvegicus SNCHSLATCVVVTGSLVLCVCPGEGFTCDGWYCECSPSGCEPGLDLPQGHGKLVQDQPCN 178

Homo sapiens      AHRLLEDEYRSTEYGGYAGDTLHGMVFEVQQAAMATCTVLRKNTAAPMLNGTH 235
Bos taurus        VHLLEDEYRSTEYGGYIGDVLGQVYRFPVQGVRLCTCVVLRKNTAAPMLNGTH 237
Mus musculus      TYETLLEYRSTEYGGYSCDAGLHGMYRFPQGGVMAETCVVLRKNTAAPMLNGSH 236
Rattus norvegicus VYETLLEYRSTDIYGYSQSDSMHGWYRFPQGGVMAETCVVLRKNTAAPMLNGSH 238

Homo sapiens      PSSDEGIVSRKACAHWSGHCLMDASVQKACAGGYVYVNLTAPEPCHLAYCTDPSSEVEG 295
Bos taurus        PSSDEGIVNRVACARNSGDCCLMDAPIQVACAGGYVYVNLTAPEPCHLAYCTDPSSEVEG 297
Mus musculus      PSSDEGIVRTACAHWSGHCLMDASVQKACAGGYVYVNLTAPEPCHLAYCTDPSSEVEG 296
Rattus norvegicus PSSREGIVSRKACAHWSGHCLMDASVQKACAGGYVYVNLTAPEPCHLAYCTDPSSEVEG 298

Homo sapiens      TCSECSITDEDCNSNNGWHQCKQDFNITDLSLLEHREKCGANMKVSLKQKLSLGF 355
Bos taurus        TCSECRVDEDCISDNGRWRQCKQDFNITDLSLLEHREKCGVDDIKLSLQKLSLGF 357
Mus musculus      TCSECRVDEDCISDNGRWRQCKQDFNITDLSLLEHREKCGANMKVSLKQKLSLGF 356
Rattus norvegicus TCSECRVDEDCVSGHWRQCKQDFNITDLSLLEHREKCGANMKVSLKQKLSLGF 358

Homo sapiens      KVFMVLSDSRCSGFNRDRDHWVSVTPARDGFCCTVLRNETHATYSNTLYLASEIIR 415
Bos taurus        KVFMVLSDSRCSGFNRDRDHWVSVTPARDGFCCTVLRNETHATYSNTLYLASEIIR 417
Mus musculus      KVFMVLSDRCSGFSERDERDMSIVTPARDGFCCTVLRNETHATYSNTLYLASEIIR 416
Rattus norvegicus KVFMVLSDRCSGFSERDERDMSIVTPARDGFCCTVLRNETHATYSNTLYLASEIIR 418

Homo sapiens      DLNIRINFCASYFLDMKVLKTSIQMVSALNISMGGTFTVRMALEQSPAYTQPCGS 475
Bos taurus        DLNIRINFCASYFLDMKVLKTSIQMVSALNISMGGTFTVRMALEQSPAYTQPCGS 477
Mus musculus      DLIRINFCASYFLDMKVLKTSIQMVSALNISMGGTFTVRMALEQSPAYTQPCGS 476
Rattus norvegicus DLIRINFCASYFLDMKVLKTSIQMVSALNISMGGTFTVRMALEQSPAYTQPCGS 478

Homo sapiens      SVLSTEAFLYVGTMLDGGDLSEFALLMTCYATPSSNATDPLKYFIIQRCPRADSTI 535
Bos taurus        SVLSTEAFLYVGTMLDGGDLSEFALLMTCYATPSSNATDPLKYFIIQRCPRADSTI 537
Mus musculus      SVMLSTEAFLYVGTMLDGGDLSEFALLMTCYATPSSNATDPLKYFIIQRCPRADSTI 536
Rattus norvegicus SVMLSTEAFLYVGTMLDGGDLSEFALLMTCYATPSSNATDPLKYFIIQRCPRADSTI 538

Homo sapiens      QVVENGESSQRFPSVQNFRAFQYDLVYLDCVFLCDTINRCKKPTCSGTRFRSSGVIDQ 595
Bos taurus        QVVENGESSQRFPSVQNFRAFQYDLVYLDCVFLCDTINRCKKPTCSGTRFRSSGVIDQ 597
Mus musculus      QVVENGESSQRFPSVQNFRAFQYDLVYLDCVFLCDTINRCKKPTCSGTRFRSSGVIDQ 596
Rattus norvegicus QVVENGESSQRFPSVQNFRAFQYDLVYLDCVFLCDTINRCKKPTCSGTRFRSSGVIDQ 598

Homo sapiens      SRVNLNLPITRKGQATVSRAP-SSLGLKVLNPLLSATLILFQ 640
Bos taurus        TRVNLNLPITRKGQATVSRAP-SSLGLKVLNPLLSATLILFQ 643
Mus musculus      TRVNLNLPITRKGQATVSRAP-SSLGLKVLNPLLSATLILFQ 642
Rattus norvegicus TRVNLNLPITRKGQATVSRAP-SSLGLKVLNPLLSATLILFQ 644

```

図 6

【 配列表 】

200650359100001.app

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US03/33957

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>			
IPC(7) : C07H 21/02, 21/04; C12Q 1/68; C07K 14/435; G01N 33/53 US CL : 435/6, 7.1; 536/23.1, 23.5; 530/350			
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC			
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>			
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 435/6, 7.1; 536/23.1, 23.5; 530/350			
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) Please See Confirmation Sheet			
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>			
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	
X, P	HART et al. Mutations of the UMOD gene are responsible for medullary cystic kidney disease 2 and familial juvenile hyperuricaemic nephropathy. Journal of Medical Genetics. December 2002, Vol. 39, pages 882-892, especially Figure 5 and pages 887-888.	1-17	
A	PIRULLI et al. Molecular analysis of uromodulin and SAH genes, positional candidates for autosomal dominant medullary cystic kidney disease linked to 16p12. Journal of Nephrology. September-October 2001, Vol 14, No. 5, pages 392-396, especially the Abstract.	1-17	
<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	"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
"B"	earlier application or patent published on or after the international filing date	"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
"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)	"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
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&"	document member of the same patent family
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report	
29 March 2004 (29.03.2004)		13 AUG 2004	
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703)305-3230		Authorized officer Carla Myers Telephone No. 703-308-0190	

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

PCT/US03/33957

**Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:**

WEST: US, EP, JP, WO Patents; DIALOG: MEDLINE, CA, BIOSIS, EMBASE, SCISEARCH

search terms: UMOD, uromodulin, Tamm-Horsfall, THP, mutation, polymorphism, variant, allele, SNP, deletion, insertion, substitution

## フロントページの続き

(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, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, 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, EG, 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, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(72) 発明者 ハート、トーマス シー .  
アメリカ合衆国、メリーランド州 20854、ポトマック、ブリアブッシュ レイン 1234  
1

(72) 発明者 ハート、パトリシア スザンヌ  
アメリカ合衆国、メリーランド州 20854、ポトマック、ブリアブッシュ レイン 1234  
1

(72) 発明者 ゴリー、マイケル  
アメリカ合衆国、ペンシルヴェニア州 15116、グレンシャウ、ブリドル ドライヴ 119

(72) 発明者 プレイヤー、アンソニー ジェイ .  
アメリカ合衆国、ノース カロライナ州 27106、ウィンストン - サレム、レッド コッパー  
サークル 1610

F ターム(参考) 4B024 AA11 BA80 CA01 CA11 DA03 HA12  
4B063 QA07 QA17 QQ43 QQ52 QR32 QR55 QS32

