

(19) 日本国特許庁(JP)

## 再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

WO2003/048358

発行日 平成17年4月14日(2005.4.14)

(43) 国際公開日 平成15年6月12日(2003.6.12)

(51) Int. Cl.<sup>7</sup>

C 1 2 N 15/09  
 A 6 1 K 31/7088  
 A 6 1 K 38/00  
 A 6 1 K 39/395  
 A 6 1 K 45/00

F I

C 1 2 N 15/00 Z N A A  
 A 6 1 K 31/7088  
 A 6 1 K 39/395 D  
 A 6 1 K 39/395 N  
 A 6 1 K 45/00

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 78 頁) 最終頁に続く

|              |  |          |   |
|--------------|--|----------|---|
| 出願番号         | 特願2003-549536 (P2003-549536)   | (71) 出願人 | 000226862<br>日水製薬株式会社<br>東京都台東区上野三丁目23番9号 |
| (21) 国際出願番号  | PCT/JP2002/012747  | (74) 代理人 | 100099139<br>弁理士 光来出 良彦                   |
| (22) 国際出願日   | 平成14年12月5日(2002.12.5)  | (72) 発明者 | 今川 正良<br>愛知県名古屋市瑞穂区田辺通1-12 ヒルズ2-206       |
| (31) 優先権主張番号 | 特願2001-374785 (P2001-374785)   | (72) 発明者 | 奥 裕一<br>茨城県結城市北南茂呂1075-2 日水製薬株式会社 研究本部内   |
| (32) 優先日     | 平成13年12月7日(2001.12.7)  |          |   |
| (33) 優先権主張国  | 日本国(JP)  |          |   |
| (81) 指定国     | EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SI, SK, TR), CA, JP, US |          |   |

(54) 【発明の名称】 脂肪細胞分化関連遺伝子およびタンパク質

(57) 【要約】

前駆脂肪細胞より脂肪細胞分化誘導開始後12時間以内、特に6時間前後に産出され、配列番号1と同一もしくは少なくとも93%の同一性、及び配列番号9と同一の塩基配列を含むポリヌクレオチドまたは該ポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチド、及び配列番号2で表されるタンパク質の全長にわたり同一もしくは少なくとも96%の同一性、或いは配列番号10で表されるアミノ酸配列を含むタンパク質が提供される。

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

脂肪細胞分化を促進する機能を有し且つ脂肪細胞分化誘導開始後 1 2 時間以内に活性化される性質を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド。

**【請求項 2】**

配列番号 1 で表される塩基配列と同一もしくは少なくとも 9 3 % の同一性を有する塩基配列を含むポリヌクレオチドまたは該ポリヌクレオチドに相補的な請求項 1 記載のポリヌクレオチド。

**【請求項 3】**

配列番号 1 で表される塩基配列の番号 1 0 0 から 2 5 2 0 に対して同一もしくは少なくとも 9 3 % の同一性を有する塩基配列を含むポリヌクレオチドまたは該ポリヌクレオチドに相補的な請求項 1 記載のポリヌクレオチド。

10

**【請求項 4】**

請求項 1、2 または 3 記載のポリヌクレオチドが DNA または RNA であるポリヌクレオチド。

**【請求項 5】**

脂肪細胞分化誘導開始後 1 2 時間以内に活性化されるタンパク質であって、脂肪細胞分化を促進するタンパク質。

**【請求項 6】**

配列番号 2 で表されるタンパク質の全長にわたり同一もしくは少なくとも 9 6 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む請求項 5 記載のタンパク質。

20

**【請求項 7】**

配列番号 1 で表されるポリヌクレオチドと同一もしくは少なくとも 9 3 % の同一性を有する塩基配列を含むポリヌクレオチドまたは該ポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチドを含有する組み換えベクター。

**【請求項 8】**

請求項 7 記載の組み換えベクターを保持する形質転換体。

**【請求項 9】**

請求項 5 または 6 記載のタンパク質に対して免疫学的に特異的な抗体。

**【請求項 10】**

請求項 5 または 6 記載のタンパク質をアンタゴナイズまたはアゴナイズする化合物の同定方法であって、

30

( a ) 請求項 5 または 6 記載のタンパク質を発現している細胞または請求項 5 または 6 記載のタンパク質に応答する細胞に候補化合物を接触させること；

( b ) 結合、または機能的応答の刺激もしくは阻害を観察すること；あるいは候補化合物と接触した細胞の請求項 5 または 6 記載のタンパク質の活性に関する能力を接触しなかった同種の細胞と比較することを特徴とする方法。

**【請求項 11】**

請求項 10 記載の方法によって同定されるアゴニスト。

**【請求項 12】**

請求項 10 記載の方法によって同定されるアンタゴニスト。

40

**【請求項 13】**

請求項 5 または 6 記載のタンパク質の生成に十分な条件下で、請求項 8 記載の形質転換体を培養し、培地または形質転換体からタンパク質を回収することを特徴とするタンパク質またはその塩の製造方法。

**【請求項 14】**

配列番号 1 で表される塩基配列と同一もしくは少なくとも 8 0 % の同一性を有する塩基配列を含むポリヌクレオチド、または該ポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチドを含有する医薬。

**【請求項 15】**

50

配列番号 1 で表される塩基配列と同一もしくは少なくとも 80% の同一性を有する塩基配列を含むポリヌクレオチドまたは該ポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチドのうち、連続する少なくとも 10 個の塩基配列を有するポリヌクレオチドを含む医薬。

【請求項 16】

配列番号 1 で表される塩基配列の番号 100 から 2520 にわたり同一もしくは少なくとも 80% の同一性を有する塩基配列を含むポリヌクレオチドまたは該ポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチドのうち、連続する少なくとも 10 個の塩基配列を有するポリヌクレオチドを含む医薬。

【請求項 17】

配列番号 1 で表される塩基配列と同一もしくは少なくとも 80% の同一性を有する塩基配列を含むポリヌクレオチドまたは該ポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチドを含有する診断薬。

10

【請求項 18】

配列番号 1 で表される塩基配列と同一もしくは少なくとも 80% の同一性を有する塩基配列を含むポリヌクレオチドまたは該ポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチドのうち、連続する少なくとも 10 個の塩基配列を有するポリヌクレオチドを含む診断薬。

【請求項 19】

配列番号 1 で表される塩基配列の番号 100 から 2520 にわたり同一もしくは少なくとも 80% の同一性を有する塩基配列を含むポリヌクレオチドまたは該ポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチドのうち、連続する少なくとも 10 個の塩基配列を有するポリヌクレオチドを含む診断薬。

20

【請求項 20】

請求項 5 または 6 記載のタンパク質またはその塩を含有している医薬。

【請求項 21】

請求項 5 または 6 記載のタンパク質またはその塩の連続する少なくとも 5 個のアミノ酸からなるペプチドを含む医薬。

【請求項 22】

請求項 5 または 6 記載のタンパク質またはその塩を含有している診断薬。

【請求項 23】

請求項 5 または 6 記載のタンパク質またはその塩の連続する少なくとも 5 個のアミノ酸からなるペプチドを含む診断薬。

30

【請求項 24】

請求項 9 記載の抗体を含有する医薬。

【請求項 25】

請求項 9 記載の抗体を含有する診断薬。

【請求項 26】

請求項 11 記載のアゴニストを含有している医薬。

【請求項 27】

請求項 11 記載のアゴニストを含有している診断薬。

【請求項 28】

請求項 12 記載のアンタゴニストを含有している医薬。

40

【請求項 29】

請求項 12 記載のアンタゴニストを含有している診断薬。

【請求項 30】

肥満症、高血圧症、高脂血症、糖尿病、並びに動脈硬化による心臓病及び脳卒中から選ばれた生活習慣病の治療薬である請求項 14、15、16、20、21、24、26 または 28 記載の医薬。

【請求項 31】

肥満症、高血圧症、高脂血症、糖尿病、並びに動脈硬化による心臓病及び脳卒中から選ばれた生活習慣病の診断薬である請求項 17、18、19、22、23、25、27 または

50

29記載の診断薬。

【請求項32】

肥満症の治療薬である請求項14、15、16、20、21、24、26または28記載の医薬。

【請求項33】

肥満症の診断薬である請求項17、18、19、22、23、25、27または29記載の診断薬。

【請求項34】

配列番号9で表される塩基配列と同一もしくは少なくとも89%の相同性を有する塩基配列を含むポリヌクレオチドまたは該ポリヌクレオチドに相補的な請求項1記載のポリヌクレオチド。

10

【請求項35】

配列番号9で表される塩基配列の番号26から2425にわたり同一もしくは少なくとも89%の相同性を有する塩基配列を含むポリヌクレオチドまたは該ポリヌクレオチドに相補的な請求項1記載のポリヌクレオチド。

【請求項36】

請求項34または35記載のポリヌクレオチドがDNAまたはRNAであるポリヌクレオチド。

【請求項37】

配列番号10で表されるアミノ酸配列のタンパク質の全長にわたり同一もしくは少なくとも93%の相同性を有するアミノ酸配列を含む請求項5記載のタンパク質。

20

【請求項38】

請求項37記載のタンパク質をアンタゴナイズまたはアゴナイズする化合物の同定方法であって、

(a) 請求項37記載のタンパク質を発現している細胞または請求項37記載のタンパク質に応答する細胞に候補化合物を接触させること；

(b) 結合、または機能的応答の刺激もしくは阻害を観察すること；あるいは候補化合物と接触した細胞の請求項37記載のタンパク質の活性に関する能力を接触しなかった同種の細胞と比較することを特徴とする方法。

【請求項39】

請求項38記載の方法によって同定されるアゴニスト。

30

【請求項40】

請求項38記載の方法によって同定されるアンタゴニスト。

【請求項41】

請求項34または35記載のポリヌクレオチドを含有する組み換えベクター。

【請求項42】

請求項41記載の組み換えベクターを保持する形質転換体。

【請求項43】

請求項37記載のタンパク質に対して免疫学的に特異的な抗体。

【請求項44】

請求項37記載のタンパク質の生成に十分な条件下で、請求項42記載の形質転換体を培養し、培地または形質転換体からタンパク質またはその塩を回収することを特徴とするタンパク質の製造方法。

40

【請求項45】

請求項34または35記載のポリヌクレオチドを含有している医薬。

【請求項46】

配列番号9で表される塩基配列を含むポリヌクレオチドまたは該ポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチドのうち、連続する少なくとも10個の塩基配列を有するポリヌクレオチドを含む医薬。

【請求項47】

50

配列番号 9 で表される塩基配列の番号 26 から 2425 の塩基配列を含むポリヌクレオチドまたは該ポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチドのうち、連続する少なくとも 10 個の塩基配列を有するポリヌクレオチドを含む医薬。

【請求項 48】

請求項 34 または 35 記載のポリヌクレオチドを含有している診断薬。

【請求項 49】

配列番号 9 で表される塩基配列を含むポリヌクレオチドまたは該ポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチドのうち、連続する少なくとも 10 個の塩基配列を有するポリヌクレオチドを含む診断薬。

【請求項 50】

配列番号 9 で表される塩基配列の番号 26 から 2425 の塩基配列を含むポリヌクレオチドまたは該ポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチドのうち、連続する少なくとも 10 個の塩基配列を有するポリヌクレオチドを含む診断薬。

【請求項 51】

請求項 37 記載のタンパク質またはその塩を含有している医薬。

【請求項 52】

請求項 37 記載のタンパク質またはその塩の連続する少なくとも 5 個のアミノ酸からなるペプチドを含む医薬。

【請求項 53】

請求項 37 記載のタンパク質またはその塩を含有している診断薬。

【請求項 54】

請求項 37 記載のタンパク質またはその塩の連続する少なくとも 5 個のアミノ酸からなるペプチドを含む診断薬。

【請求項 55】

請求項 43 記載の抗体を含有する医薬。

【請求項 56】

請求項 43 記載の抗体を含有する診断薬。

【請求項 57】

請求項 39 記載のアゴニストを含有している医薬。

【請求項 58】

請求項 39 記載のアゴニストを含有している診断薬。

【請求項 59】

請求項 40 記載のアンタゴニストを含有している医薬。

【請求項 60】

請求項 40 記載のアンタゴニストを含有している診断薬。

【請求項 61】

肥満症、高血圧症、高脂血症、糖尿病、並びに動脈硬化による心臓病及び脳卒中から選ばれた生活習慣病の治療薬である請求項 45、46、47、51、52、55、57 または 59 記載の医薬。

【請求項 62】

肥満症、高血圧症、高脂血症、糖尿病、並びに動脈硬化による心臓病及び脳卒中から選ばれた生活習慣病の診断薬である請求項 48、49、50、53、54、56、58 または 60 記載の診断薬。

【請求項 63】

肥満の治療薬である請求項 45、46、47、51、52、55、57 または 59 記載の医薬。

【請求項 64】

肥満の診断薬である請求項 48、49、50、53、54、56、58 または 60 記載の診断薬。

【請求項 65】

10

20

30

40

50

配列番号9で表されるポリヌクレオチドについて、nanochipを用いる方法、ポリヌクレオチド配列を決定する方法、DNAチップ又はDNAアレイを用いる方法、質量分析計を用いる方法、プライマーエクステンションを用いる方法から選ばれた方法を適用することを特徴とする塩基多型を調べる方法。

#### 【発明の詳細な説明】

##### 技術分野

本発明は、脂肪細胞分化の初期に発現するクローン24ポリヌクレオチド及びクローン24タンパク質に関し、さらには該クローン24タンパク質の抗体、アンタゴニスト、アゴニスト、およびこれらの製造、並びにこれらの物質を含有する医薬および診断薬に関する。

10

##### 背景技術

栄養過剰による肥満は、糖尿病・高血圧・動脈硬化などの深刻な生活習慣病の最大の要因となっている。今後の生命科学・健康科学を考えるうえで、肥満の分子機構を解明することは必須の課題といえる。肥満に直接関わるのは脂肪細胞であり、脂肪細胞生成過程が解明されれば肥満の治療に直結する。近年の分子生物学の発展に伴い、脂肪細胞分化の機構が解明されつつある。そこにはキーとなる遺伝子群が存在し、これらが巧妙に情報をやり取りするネットワークを形成していることが知られている。

脂肪細胞分化過程は複雑なステップより成り、脂肪芽細胞(Adipoblast) 前駆脂肪細胞(Preadipocyte) 脂肪細胞(Adipocyte)へ分化する。培養細胞や遺伝子改変個体を用いた系などにより脂肪細胞分化に密接に関連する転写因子が、近年、明らかになりつつある。

20

PPAR(Peroxisome Proliferator-Activated Receptor, ペルオキシソーム増殖剤応答性レセプター)、C/EBP(CCAAT/Enhancer-Binding Protein)ファミリー、及びSREBP-1/ADD1(Sterol Regulatory Element Binding Protein 1またはAdipocyte Determination and Differentiation-dependent Factor 1)は脂肪細胞の分化に最も重要な転写因子といわれている。

PPARは、ファミリーを形成していることが明らかにされ、その中でもPPARは脂肪細胞分化に特に重要であることが明らかになっている。すなわち、脂肪芽細胞や前駆脂肪細胞において、PPARを強制的に発現させると脂肪細胞に分化することが明らかになっている。この結果は、PPARが脂肪細胞の分化に重要な役割を担っていることを証明していると言える。

30

C/EBPもPPARと同様にファミリーを形成しており、最近になって、C/EBPがPPARと同じように脂肪細胞分化のマスターレギュレーターとして機能していることが明らかにされている。また、C/EBPとC/EBPは分化の初期に発現し、C/EBPとPPARの発現を制御していると考えられている。

SREBP1/ADD1は、脂肪細胞の分化を促進することが知られている一方、脂肪細胞の分化過程においてPPARのリガンド生成に関わっていることも明らかにされている。

40

前記3種類の転写因子群(PPAR、C/EBP、SREBP1/ADD1)が、クロストークすることにより分化過程が進行することが明らかになっている。

前記3種類の転写因子群は、脂肪細胞の分化の比較的初期から発現が上昇することが明らかにされており、複数の標的遺伝子の発現を制御するマスターレギュレーターと考えられている。これらの転写因子群を発現時期の面から見ると、C/EBPとC/EBPにおいて比較的初期に発現が増加することが知られている。しかし、前駆脂肪細胞より脂肪細胞へ分化する最も初期に、即ち、分化開始から半日(12時間)以内に、どのような遺伝子が活性化されているかについてはほとんど明らかにされていない。

前駆脂肪細胞より脂肪細胞へ分化する最も初期、即ち、分化開始12時間以内に活性化される遺伝子の発現の有無、その程度、遺伝子産物としてのタンパク質の有無、その量、発

50

現している場所の特定、また、遺伝子の変異を分析することは、肥満のメカニズムを解明し、さらに肥満の進行状況を適切に把握し、肥満の予防あるいは治療に役立たせる上で極めて重要な要素となりうる。そのために、この遺伝子の特定ならびにこの遺伝子産物であるタンパク質を特定し、こうした遺伝子あるいはタンパク質を検出、あるいは測定することが望まれる。

そこで本発明は、前駆脂肪細胞より脂肪細胞へ分化開始12時間以内に活性化される遺伝子を見出し、該遺伝子を含むベクター、該ベクターを保持する形質転換体、該形質転換体から生産されるタンパク質、該タンパク質に特異的な抗体、該タンパク質の製造方法、該タンパク質に対するアゴニストまたはアンタゴニスト、これらの化合物を含む医薬、診断薬を提供することを目的とする。

発明の開示

本発明は、上記課題を解決するために鋭意研究を行った結果、前駆脂肪培養細胞株として周知のマウス3T3-L1細胞(ATCC No. CCL-92.1.)を用い、分化の最も初期の過程で遺伝子の発現の変動を解析するために、脂肪細胞分化誘導前と誘導3時間後においてサブトラクション法によるクローニングを行った。その結果、100近いクローンが、脂肪細胞分化誘導開始後12時間以内に脂肪細胞分化を促進するタンパク質の発現が上昇し、脂肪細胞分化誘導開始後12時間以内に活性化される遺伝子として得られたが、そのうち、特に発現が優れた遺伝子として配列番号1で表される塩基配列のポリヌクレオチドが得られた。配列番号1で表されるポリヌクレオチドの塩基配列は、マウスの脂肪細胞分化の初期、即ち、脂肪細胞分化誘導前と誘導3時間後に発現するcDNAにより決定された。該ポリヌクレオチドをマウスのクローン24ヌクレオチドと呼ぶ。

即ち、本発明のポリヌクレオチドは、脂肪細胞分化を促進する機能を有し且つ脂肪細胞分化誘導開始後12時間以内に活性化される性質を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチドである。

本明細書において、活性化とは、発現することあるいは発現が亢進することを意味する。配列番号1で表される塩基配列と同一性を有する塩基配列を含むポリヌクレオチド、または該ポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチドを<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>において検索したところ、機能が全く記載されていないチャイニーズハムスター由来のmRNAの配列が該当し、アクセッション番号がAF371372で、2794bpの長さで登録されていることが分かった。配列番号1で表される塩基配列と該チャイニーズハムスター由来のmRNAの塩基配列との同一性は88.12%であり、また、配列番号1で表される塩基配列における開始コドンから終始コドンまで(塩基配列の番号100から2520まで)と前記公知のチャイニーズハムスターのORFの配列の同一性は、91.72%である。

本発明のポリヌクレオチドは、好ましくは、配列番号1で表される塩基配列と同一、もしくは少なくとも93%、95%または98%の同一性を有する塩基配列を含むポリヌクレオチドまたは該ポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチドであって、脂肪細胞分化誘導開始後12時間以内に活性化される脂肪細胞分化を促進するタンパク質をコードし、且つ、脂肪細胞分化誘導開始後12時間以内に活性化されるポリヌクレオチドである。

また、本発明のポリヌクレオチドは、配列番号1で表される塩基配列の番号100から2520にわたり同一もしくは少なくとも93%、95%または98%の同一性を有する塩基配列を含むポリヌクレオチドまたは該ポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチドであって、脂肪細胞分化誘導開始後12時間以内に活性化し且つ脂肪細胞分化を促進する機能を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチドである。

配列番号1で表されるマウスの塩基配列のポリヌクレオチドに基づき、新規な塩基配列のヒトのポリヌクレオチドがヒトホモログのクローニングにより決定されたので、該塩基配列を配列番号9に示す。

即ち、本発明のヒトのポリヌクレオチドは、配列番号9で表される塩基配列を含むポリヌクレオチドまたは該ポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチドであって、脂肪細胞分化を促進する機能を有し且つ脂肪細胞分化誘導開始後12時間以内に活性化される性質を

10

20

30

40

50

有するタンパク質をコードするポリヌクレオチドであり、例えば、cDNAが挙げられる。該ポリヌクレオチドをヒトのクローン24ヌクレオチドと呼ぶ。

また、本発明のヒトのポリヌクレオチドは、配列番号9で表される塩基配列の番号26から2425を含むポリヌクレオチドまたは該ポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチドであって、脂肪細胞分化を促進する機能を有し且つ脂肪細胞分化誘導開始後12時間以内に活性化される性質を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチドである。

配列番号1で表されるマウスのクローン24ポリヌクレオチドと配列番号9で表されるヒトのクローン24ポリヌクレオチドとの一致率は、2089/2444 (mouse vs human)、即ち、85.47%となる。

前記チャイニーズハムスター由来のmRNAの配列と配列番号9で表される塩基配列のヒトポリヌクレオチドの相同性は87.36%であり、また、配列番号9で表される塩基配列のヒトポリヌクレオチドにおける開始コドンから終始コドンまで(塩基配列の番号26から2425まで)と前記公知のチャイニーズハムスターのORFの配列の相同性は、87.53%である。

配列番号9の観点から、本発明のポリヌクレオチドは、前記公知のチャイニーズハムスターのORFの配列の相同性(87.36%)の関係から、本発明のポリヌクレオチドは、配列番号9で表される塩基配列と同一もしくは少なくとも89%、91%または93%の相同性を有する塩基配列を含むポリヌクレオチドまたは該ポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチドも含む。

前記配列番号9で表されるヒトポリヌクレオチドにおける開始コドンから終始コドンまで(塩基配列の番号26から2425まで)と前記公知のチャイニーズハムスターのORFの配列の相同性(87.53%)の関係から、本発明のポリヌクレオチドは、配列番号9で表される塩基配列の番号26から2425にわたり同一もしくは少なくとも89%、91%または93%の相同性を有する塩基配列を含むポリヌクレオチドまたは該ポリヌクレオチドに相補的な配列のポリヌクレオチドを含む。

本発明の上記各ポリヌクレオチドは、脂肪細胞分化誘導開始後12時間以内、特に6時間前後のマウスの細胞、ヒトの細胞、その他の動物の細胞から抽出することができる。また、ゲノムDNA、細胞・組織由来のcDNA、細胞・組織由来のcDNAライブラリー、合成DNAの何れからでも本発明のポリヌクレオチドを得ることができる。本発明の「ポリヌクレオチド」には、DNAまたはRNAがある。

本明細書で単に「クローン」と呼ぶ場合には、クローン24ヌクレオチド又はクローン24ポリヌクレオチドを意味することがある。

本発明のタンパク質は、脂肪細胞分化誘導開始後12時間以内、特に6時間前後に活性化されるタンパク質であって、脂肪細胞分化を促進するタンパク質である。

本発明のタンパク質は、好ましくは、下記配列番号2で表されるタンパク質のアミノ酸配列の全長にわたり少なくとも96%、98%または100%の相同性を有するアミノ酸配列を含むタンパク質である。さらに好ましくは、本発明のタンパク質は、配列番号1で表されるポリヌクレオチドの塩基配列の番号100から2520にわたり少なくとも96%、98%または100%の相同性を有する塩基配列を含むポリヌクレオチドの遺伝子翻訳産物である。

下記配列番号2で表されるタンパク質のアミノ酸配列と100%の相同性を有する塩基配列を含むポリヌクレオチドには、マウスの脂肪細胞分化の初期に活性化されるタンパク質が挙げられる。該タンパク質をマウスのクローン24タンパク質と呼ぶ。

また、本発明のヒトのタンパク質は、配列番号10で表されるアミノ酸配列を含むタンパク質である。本発明のヒトのタンパク質は、下記配列番号9で表されるポリヌクレオチドの塩基配列の番号26から2425を含むポリヌクレオチドの遺伝子翻訳産物である。本発明は配列番号10の観点から、配列番号10で表されるアミノ酸配列のタンパク質の全長にわたり少なくとも93%、95%または97%の相同性を有するアミノ酸配列を含むタンパク質またはその塩を含む。

下記配列番号10で表されるタンパク質は、ヒトの脂肪細胞分化誘導開始後12時間以内

10

20

30

40

50

、特に、6時間前後に活性化されるタンパク質であって、脂肪細胞分化を促進するタンパク質である。該タンパク質をヒトのクローン24タンパク質と呼ぶ。

本発明のポリヌクレオチドは、脂肪細胞分化誘導開始後12時間以降に発現するタンパク質であるPPAR、C/EBP $\beta$ 、C/EBP $\delta$ 、SREBP-1の発現に関係し、特に、PPARの発現に密接に関係する。本発明のタンパク質は、PPARファミリーやC/EBPファミリー、SREBP-1/ADD1などの転写因子に直接的あるいは間接的に作用していると考えられるし、或いはこれ以外の経路を刺激している可能性も考えられる。

本発明のポリヌクレオチドあるいは、該ポリヌクレオチドの遺伝子翻訳産物として生産されるタンパク質またはペプチドは、肥満、高血圧、高脂血症、糖尿病、動脈硬化による心臓病や脳卒中等から選ばれる生活習慣病の治療または診断に有用である。

#### 配列の相同性

本発明における相同性に関する記載において、例えば、「塩基配列と同一もしくは少なくとも93%の相同性」とする理由は、<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>にアクセス番号がAF371372で、2794bpの長さで登録されているチャニーズハムスター由来のmRNAの配列と、配列番号1で表される塩基配列との相同性は88.12%であり、また、配列番号1で表される塩基配列における開始コドンから終始コドンまで(塩基配列の番号100から2520まで)と前記公知のチャニーズハムスターのORFの配列の相同性は、91.72%であることから、該mRNAの配列を除外するためである。

また、本発明の別の発明において「塩基配列の全長にわたり相同性を少なくとも80%」とする理由は、マウスとヒトの間にはアミノ酸レベルで84%の相同性があることが既に報告されているからである[Y. Zhangら、Nature, 第372巻、第425頁(1994)、特開平8-333394号公報]。高血圧、糖尿病、肥満などの生活習慣病に関わる遺伝子群は相同性が動物間で80%以上保存されていることが分かっている(特開平11-75865号公報)ことから、本発明のポリヌクレオチドおよび本発明のタンパク質においてもヒトなどの霊長類、ウサギなどの齧歯類なども本配列を基本とし、相同性が80%以上を越えると考えることが妥当である。該妥当性は、前記したとおり、配列番号1で表されるマウスのクローン24ポリヌクレオチドと配列番号9で表されるヒトのクローン24ポリヌクレオチドとの一致率が、85.47%であることから実証される。

#### 本発明のポリヌクレオチドのクローニング

本発明のタンパク質をコードするポリヌクレオチドのクローニングの手段としては、例えば、本発明のタンパク質の部分塩基配列を有する合成DNAプライマーを用いてPCR法によって増幅するか、または適当なベクターに組み込んだDNAを本発明のタンパク質の一部あるいは全領域をコードするDNA断片もしくは合成DNAを用いて標識したものとハイブリダイゼーションによって選別することができる。ハイブリダイゼーションの方法は、例えば、モレキュラー・クローニング(Molecular Cloning) 2nd(J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989)に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。クローン化されたタンパク質をコードするDNAは目的によりそのまま、または所望により制限酵素で消化したり、リンカーを付加したりして使用することができる。該DNAはその5'末端側に翻訳開始コドンとしてのATGを有し、また3'末端側には翻訳終止コドンとしてのTAA、TGAまたはTAGを有していてもよい。これらの翻訳開始コドンや翻訳終止コドンは、適当な合成DNAアダプターを用いて付加することもできる。

#### ポリヌクレオチドを発現させるベクター等

本発明のベクターは、配列番号1で表されるポリヌクレオチドと同一もしくは少なくとも93%の相同性を有する塩基配列を含むポリヌクレオチドまたは該ポリヌクレオチドに相

補的なポリヌクレオチドを含有させた組み換えベクターであり、好ましくは、配列番号1で表される塩基配列の番号100から2520の塩基配列を含むポリヌクレオチドを含有させた組み換えベクターである。

また、ヒトの脂肪細胞分化に関するポリヌクレオチドを含有する本発明のベクターは、配列番号9で表される塩基配列を含むポリヌクレオチドまたは該ポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチドを含有させた組み換えベクターであり、好ましくは、配列番号9で表される塩基配列の番号26から2425の塩基配列を含むポリヌクレオチドまたは該ポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチドを含有させた組み換えベクターである。

本発明のポリヌクレオチド配列を有するベクターは既知の方法で構築することが可能である。こうした目的に適したベクターは、本発明のポリヌクレオチドの挿入部位の上流にプロモーター領域を有する。このプロモーターは既知のものを使用することが可能であり、宿主細胞により選択することが可能である。例えば、宿主を大腸菌などの細菌にした場合は、lacプロモータ、trpプロモータ、T7プロモータ、tacプロモータ、PLプロモータなどを利用することが可能である。酵母を宿主とする場合には、GAPDHプロモータ、ADHプロモータ、PGKプロモータ、PH05プロモータなどが挙げられる。動物由来の細胞を宿主とした場合には、ヒトサイトメガロウイルスプロモータ、SV40ウイルス由来のプロモータ、EF-1プロモータ、アクチンプロモータ、メタロチオネインプロモータなどが挙げられる。本発明のポリヌクレオチドを発現するベクターにおける本発明のポリヌクレオチドの挿入部位下流には、転写終結シグナルがあることが望ましい。さらに、該ベクターには薬剤耐性マーカーなどの識別マーカーがあることが望ましい。

#### 宿主

本発明で使用可能な宿主には、例えば、エシェリヒア属菌、バチルス属菌、酵母、昆虫細胞、昆虫、動物細胞などを用いることができる。

エシェリヒア属菌の具体例としては、Escherichia coli JM109〔ATCC53323、東洋紡株式会社製〕、JM103〔ヌクイレック・アシズ・リサーチ、(Nucleic Acids Research)、9巻、309(1981)〕、K12・DH1〔プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー(Proc. Natl. Acad. Sci. USA)、60巻、160(1968)〕、JA221〔ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー(Journal of Molecular Biology)〕、120巻、517(1978)〕、HB101〔ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー、41巻、459(1969)〕、C600〔ジェネティクス(Genetics)、39巻、440(1954)〕などが挙げられる。

バチルス属菌としては、例えば、バチルス・サブチルス(Bacillus subtilis) MI114〔ジーン、24巻、255(1983)〕、207-21〔ジャーナル・オブ・バイオケミストリー(Journal of Biochemistry)、95巻、87(1984)〕などが挙げられる。

酵母としては、例えば、サッカロマイセスセレビスエ(Saccharomyces cerevisiae) AH22、AH22R-、NA87-11A、DKD-5D、20B-12、シゾサッカロマイセスポンベ(Schizosaccharomyces pombe) NCYC1913、NCYC2036、サッカロマイセスピキアパストリス(Saccharomyces picijapastoris)などが挙げられる。

昆虫細胞としては、例えば、ウイルスがAcNPVの場合は、夜盗蛾の幼虫由来株化細胞(Spodoptera frugiperda cell; Sf細胞)、Trichoplusia niの中腸由来のMG1細胞、Trichoplusia niの卵由来のHigh Five TM細胞、Mamestra brassicae由来の細胞またはEstigmene acrea由来の細胞などが挙げられる。ウイルスがBmNPVの場合は、蚕由来株化細胞(Bombyx mori N細胞; BmN細胞)などが挙げられる。該Sf細胞としては、例えば、Sf9細胞(ATCC CRL1711)、Sf

10

20

30

40

50

21細胞(以上、Vaughn, J. L.ら、イン・ヴィボ(in Vivo), 13, 213-217, (1977))などが挙げられる。

昆虫としては、例えば、カイコの幼虫などが挙げられる〔前田ら、ネイチャー(Nature), 315巻, 592(1985)〕。

動物細胞としては、例えば、サル細胞COS-7, Ver0, チャイニーズハムスター細胞CHO(以下、CHO細胞と略記), dhfr遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞CHO〔略語: CHO(dhfr-)細胞〕, マウスL細胞, マウスAtT-20, マウスミエローマ細胞, ラットGH3, ヒトFL細胞などが用いられる。

#### 形質転換体の製造

本発明の形質転換体は、前記組み換えベクターを前記宿主に保持させたものである。

エシェリヒア属菌を形質転換するには、例えば、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユエスエー(Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 69巻, 2110(1972)やジーン(Gene), 17巻, 107(1982)などに記載の方法に従って行なうことができる。

バチルス属菌を形質転換するには、例えば、モレキュラー・アンド・ジェネラル・ジェネティクス(Molecular & General Genetics), 168巻, 111(1979)などに記載の方法に従って行なうことができる。

酵母を形質転換するには、例えば、メソズ・イン・エンザイモロジー(Methods in Enzymology), 194巻, 182-187(1991)、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユエスエー(Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 75巻, 1929(1978)などに記載の方法に従って行なうことができる。

昆虫細胞または昆虫を形質転換するには、例えば、バイオ/テクノロジー(Bio/Technology), 6, 47-55(1988)などに記載の方法に従って行なうことができる。

動物細胞を形質転換するには、例えば、細胞工学別冊8新細胞工学実験プロトコール・263-267(1995)(秀潤社発行)、ウイルス学(Virology), 52巻, 456(1973)に記載の方法に従って行なうことができる。

#### 形質転換体の培養

本発明の形質転換体の培養は以下の条件を考慮したタンパク質の生成に十分な条件下で、形質転換体を培養することができ、その結果、培地または形質転換体からタンパク質を回収することができる。

宿主がエシェリヒア属菌、バチルス属菌である形質転換体を培養する際、培養に使用される培地としては液体培地が適当であり、その中には該形質転換体の生育に必要な炭素源、窒素源、無機物その他が含有せしめられる。炭素源としては、例えば、グルコース、デキストリン、可溶性澱粉、ショ糖など、窒素源としては、例えば、アンモニウム塩類、硝酸塩類、コーンステープ・リカー、ペプトン、カゼイン、肉エキス、大豆粕、バレイショ抽出液などの無機または有機物質、無機物としては、例えば、塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウムなどが挙げられる。また、酵母、ビタミン類、生長促進因子などを添加してもよい。培地のpHは約5~8が望ましい。

エシェリヒア属菌を培養する際の培地としては、例えば、グルコース、カザミノ酸を含むM9培地〔ミラー(Miller), ジャーナル・オブ・エクスペリメンツ・イン・モレキュラー・ジェネティクス(Journal of Experiments in Molecular Genetics), 431-433, Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1972〕が好ましい。ここに必要によりプロモーターを効率よく働かせるために、例えば、3-インドリルアクリル酸のような薬剤を加えることができる。宿主がエシェリヒア属菌の場合、培養は通常約15~43で約3~24時間行ない、必要により、通気や攪拌を加えることもできる。宿主がバチルス属菌の場合、培養は通常約30~40で約6~24時間行ない、必要により通気や攪拌を加えることもできる。宿主が酵母である形質転換体を培養する際、培地

10

20

30

40

50

としては、例えば、バークホルダー (Burkholder) 最小培地 [Bostian, K. L. ら、「プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 77 巻, 4505 (1980)] や 0.5% カザミノ酸を含有する SD 培地 [Bitter, G. A. ら、「プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 81 巻, 5330 (1984)] が挙げられる。培地の pH は約 5 ~ 8 に調整するのが好ましい。培養は通常約 20 ~ 35 で約 24 ~ 72 時間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

宿主が昆虫細胞または昆虫である形質転換体を培養する際、培地としては、Grace's Insect Medium (Grace, T. C. C., ネイチャー (Nature), 195, 788 (1962)) に非動化した 10% ウシ血清等の添加物を適宜加えたものなどが用いられる。培地の pH は約 6.2 ~ 6.4 に調整するのが好ましい。培養は通常約 27 で約 3 ~ 5 日間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

宿主が動物細胞である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、約 5 ~ 20% の胎児牛血清を含む MEM 培地 [サイエンス (Science), 122 巻, 501 (1952)], DMEM 培地 [ウイルス学 (Virology), 8 巻, 396 (1959)], RPMI 1640 培地 [ジャーナル・オブ・ザ・アメリカン・メディカル・アソシエーション (The Journal of the American Medical Association) 199 巻, 519 (1967)], 199 培地 [プロシーディング・オブ・ザ・ソサイエティ・フォー・ザ・バイオリジカル・メディスン (Proceeding of the Society for the Biological Medicine), 73 巻, 1 (1950)] などが用いられる。pH は約 6 ~ 8 であるのが好ましい。培養は通常約 30 ~ 40 で約 15 ~ 60 時間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。以上のようにして、形質転換体の細胞内に本発明のタンパク質を生成せしめることができる。

#### 無細胞系によるタンパク質生成

上述した形質転換体を培養することによってタンパク質を生成させる以外に、インビトロテック社 (<http://www.inbitrotech.co.jp/>) の高効率無細胞タンパク質合成システムや Roche 社のインビトロトランスレーション・トランスクリプションシステムなどを用いた無細胞培養システムを用いることによって、当該タンパク質を生成させることも可能である。

#### タンパク質の分離精製

上記培養物から本発明のタンパク質を分離精製するには、例えば、下記の方法により行なうことができる。本発明のタンパク質を培養菌体あるいは細胞から抽出するに際しては、培養後、公知の方法で菌体あるいは細胞を集め、これを適当な緩衝液に懸濁し、超音波、リゾチームおよび/または凍結融解などによって菌体あるいは細胞を破壊したのち、遠心分離やろ過によりタンパク質の粗抽出液を得る方法などが適宜用いられる。緩衝液の中に尿素や塩酸グアニジンなどの蛋白質変性剤や、トリトン X-100 (登録商標、Union Carbide 社製) などの界面活性剤が含まれていてもよい。これらの公知の分離、精製法としては、塩析や溶媒沈澱法などの溶解度を利用する方法、透析法、限外ろ過法、ゲルろ過法、および SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法などの主として分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィーなどの荷電の差を利用する方法、アフィニティークロマトグラフィーなどの特異的新和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィーなどの疎水性の差を利用する方法、等電点電気泳動法などの等電点の差を利用する方法などが用いられる。

上記各方法で得られるタンパク質が遊離体で得られた場合には、公知の方法あるいはそれに準じる方法によって塩に変換することができ、逆に塩で得られた場合には公知の方法あるいはそれに準じる方法により、遊離体または他の塩に変換することができる。なお、組換え体が産生するタンパク質を、精製前または精製後に適当な蛋白修飾酵素を作用させる

ことにより、任意に修飾を加えたり、ポリペプチドを部分的に除去することもできる。蛋白修飾酵素としては、例えば、トリプシン、キモトリプシン、アルギニルエンドペプチダーゼ、プロテインキナーゼ、グリコシダーゼなどが用いられる。かくして生成する本発明のタンパク質またはその塩の存在は、標識したリガンドとの結合実験および特異抗体を用いたエンザイムイムノアッセイなどにより測定することができる。

#### ヒトホモログのクローニング

脂肪細胞分化誘導開始 12 時間以内に活性化されるポリヌクレオチドであって、前記に決定した配列番号 1 で示されるマウスの全長 DNA 配列を NCBI Genome Sequencing (Human Genome Database) でホモロジーサーチすることによって相同性の高い配列を見出して、ヒトホモログの全長を予測することができる。ヒトホモログのクローニングには RT-PCR 法などが適用できる。このようにして予測し、実際に RT-PCR 法により配列決定を行ったヒトホモログの全長は、配列番号 9 で示される塩基配列である。また、配列番号 9 で示されるヒトホモログの全長の塩基配列から、該塩基配列は 800 アミノ酸からなるタンパク質をコードする遺伝子であり、該タンパク質のアミノ酸配列は、配列番号 10 であると予想される。

10

#### アンタゴニストおよびアゴニストの同定方法

本発明のタンパク質をアンタゴナイズまたはアゴナイズする化合物の同定方法は次の工程 (a) (b) の工程を含む。

(a) 本発明のタンパク質を発現している細胞または本発明のタンパク質に応答する細胞に候補化合物を接触させる工程；

20

(b) 結合、または機能的応答の刺激もしくは阻害を観察する工程；あるいは候補化合物と接触した細胞の本発明のタンパク質の活性に関する能力を接触しなかった同種の細胞と比較する工程。

上記同定方法により、本発明のアンタゴニスト或いはアゴニストを同定することができる。

#### ポリヌクレオチドの検出方法；ポリヌクレオチドによる診断

診断対象者の本発明のタンパク質の活性化に関連した、診断対象者における疾病、またはかかる疾病に対する感受性の診断は次のように行うことができる。即ち、診断対象者のゲノム中の本発明のタンパク質をコードしている塩基配列中の変異の存在または不存在を決定すること；および/または該対象者由来の試料中の本発明のタンパク質の存在または量を分析することにより行う。

30

本発明のポリヌクレオチドを検出あるいは測定するには、本発明のポリヌクレオチドの塩基配列から連続する 8 塩基以上 100 塩基以下の配列を有するプライマーを合成し、細胞あるいは血液などから mRNA を抽出し、RT-PCR 法により mRNA を DNA に変換しながら増幅する、あるいは T7-based mRNA 増幅法 (Van Gelder R. N. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 1663-1667, 1990) により、目的ポリヌクレオチドを増幅し、増幅されたポリヌクレオチドを種々の電気泳動で検出することが可能である。また、Cy3-dUTP あるいは Cy5-dUTP をポリヌクレオチド増幅時に添加して、増幅ポリヌクレオチドを蛍光標識し、DNA マイクロアレイ等 (Brown, P. O. et al.: Nature Genet., 21 sup.: 33-37, 1999) により検出することも可能である。

40

また、抽出した mRNA の量を定量する方法としては、蛍光色素を用いた定量的 PCR 法が行われる (羊土社 non-RI 実験の最新プロトコール 栗原ら編 1999 83-89)。この方法により、細胞中の mRNA がどの程度存在するかがわかる。この発現の程度によって、肥満の状況を把握することができる。

DNA マイクロアレイを用いて、複数のポリヌクレオチドを同時に検出、測定することも可能である。例えば、糖尿病、高血圧、肥満などの生活習慣病に関連する、本発明のポリヌクレオチドを含む複数のポリヌクレオチドを基盤上に結合させておき、上述したような方法で、検体から調製した標識ポリヌクレオチドを反応させてどのポリヌクレオチドが活

50

性化しているのか、存在しているのかということ判定することが可能となる。この判定によって、生活習慣病の状況を把握し、治療に役立てることが可能になる。また、本発明のポリヌクレオチドを含む複数の肥満関連ポリヌクレオチドを基盤上に結合させておき、同様の手技により、肥満の状況、程度を把握することが可能となり、治療に役立てることが可能となる。

また、本発明のポリヌクレオチドを検出するにはアプライドバイオシステム社のABI PRISM 310あるいはPRISM 3100あるいはPRISM 3700などを利用したキャピラリー電気泳動による検出も可能である。

ポリヌクレオチド中の特定の核酸塩基が他の塩基と置換されていることにより、遺伝子産物としてのタンパク質の活性が変化する、本発明のタンパク質のその受容体への結合能が変化する、或いは該タンパク質の薬剤に対する反応性が変化する、或いは該タンパク質の安定性が変化する、或いは該タンパク質の合成が途中で停止してしまうなどの、遺伝子多型 (single nucleotide polymorphisms、以下SNPs) が、非常に重要であることがわかってきているが、本発明のポリヌクレオチドにおいても、このSNPsを検出する意義は非常に重要である。

本発明の脂肪細胞分化関連のポリヌクレオチドの高密度のSNPマーカーの遺伝子地図がつけられれば、糖尿病の原因遺伝子を特定できるSNPsを用いて健康者と患者間の比較が容易にできる。高密度のSNPマップを使えば家族と関連のない大規模なサンプルを用いて相関解析 (Whole Genome Association Study) が可能となる。SNPsは、特に1塩基が置換することにより、対応するアミノ酸が変化し、この変化によって本来の蛋白質の物性の変化が生じる。例えば、酵素においては活性中心近傍のアミノ酸が変化することによる酵素活性の低下や亢進が挙げられ、受容体であれば受容中心近傍のアミノ酸が変化することによる結合力の低下や上昇が挙げられる。それぞれの人の遺伝子多型に応じて、薬剤の投与量を調整したり、異なる薬剤を選択することをテーラードメディスンなどと云われる。

本発明のポリヌクレオチドにおけるSNPsを検出する方法としては、例えば、アメリカ Nanogen社 (<http://www.nanogen.com>) の nanochip を用いる方法 (Gillesら、Nature biotechnology 365-370 17 1999)、ポリヌクレオチド配列を決定する方法 (<http://www.pyrosequencing.com>)、DNAチップ又はDNAアレイを用いた方法、質量分析計を用いる方法 (Leglerら、Transfusion, 36: 426-431, 1996)、プライマーエクステンションを用いた方法、Luminex法 (Iannoneら、Cytometry, 39: 131-140, 2000) などが適用可能である。

上記各ポリヌクレオチドの検出のために構成される診断薬は、配列番号1で表される塩基配列の同一もしくは少なくとも80%の相同性を有する塩基配列を含むポリヌクレオチド或いは該ポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチドのうち、連続する少なくとも10個の塩基配列を有するポリヌクレオチドを含む診断薬が挙げられる。

また、配列番号1で表される塩基配列の番号100から2520にわたり同一もしくは少なくとも80%の相同性を有する塩基配列を含むポリヌクレオチドまたは該ポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチドのうち、連続する少なくとも10個の塩基配列を有するポリヌクレオチドを含む診断薬とすることができる。特に、ヒトのポリヌクレオチドの検出のために構成される診断薬は、配列番号9に表される塩基配列を含むポリヌクレオチドまたは該ポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチドのうち、連続する少なくとも10個の塩基配列を有するポリヌクレオチドを含む診断薬である。

さらに好ましいヒトのポリヌクレオチドの検出のために構成される診断薬は、配列番号9で表される塩基配列の番号26から2425の塩基配列を含むポリヌクレオチドまたは該ポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチドのうち、連続する少なくとも10個の塩基配列を有するポリヌクレオチドを含む診断薬である。

タンパク質またはペプチドの検出、およびタンパク質またはペプチドに対する抗体の検出

10

20

30

40

50

### および診断への応用

本発明のタンパク質を検出するには、免疫測定法が一般的に用いられる。例えば、配列番号2または配列番号10で示されるタンパク質、あるいはそれらの各配列に含まれる3個以上の連続したアミノ酸配列からなるペプチドを、マウス、ラット、ウサギ、ヤギ、ブタ、ウシ、ヒツジ、ニワトリなどに免疫して抗体を産生させることができる。この免疫を行う際に、通常、アジュバントといわれる物質を加えるのが一般的である。アジュバントとしては、フロイントのコンプリートアジュバント、インコンプリートアジュバント、明礬など種々の公知のアジュバントを用いることができる。マウスを免疫した場合には、一定期間免疫を行った後、免疫したマウスの脾臓を取り出して、抗体産生細胞であるこの脾臓細胞とミエローム細胞と融合させて、クローニングを行って配列番号2のタンパク質を特異的に結合する抗体を産生するハイブリドーマを調製する。

10

ハイブリドーマを培養することによって、産生する抗体を種々の方法で精製し、得られた抗体を固相に結合させる。これとは別に、該抗体を酵素、蛍光色素、金属コロイド、ラテックス、DNA、RNAなどで標識して標識化抗体を得る。前記固相化抗体と該標識化抗体を、細胞、血液あるいはその分画フラクションを検体として反応させ、固相に結合した標識物の有無、あるいは量を測定することにより、検体中の本発明のタンパク質の量を測定することができる。

本発明のタンパク質は、脂肪細胞内に特異的に見出されるために、その量を測定することによって肥満の程度、状況を把握することが可能となる。

検体中に含まれる本発明のタンパク質の量を測定するには、該タンパク質あるいは該タンパク質の一部となるペプチドを抗原として、家兎、ネズミ、ヒツジ、ヤギなどに免疫して抗体を調製する（この場合、特定の認識部位に結合することが出来るモノクローナル抗体を調製することも含まれる。）。ここで得られた抗体を、ポリスチレン、ラテックス、ニトロセルロースなどの材質のものに物理的に吸着させる、あるいは、抗体にビオチンを予め導入しておき、固相に予め結合させておいたストレプトアビジンまたはアビジンなどと反応させて固相を調製する、あるいは、固相上に存在するカルボキシル基、アミノ基、スルフヒドリル基などを介して、抗体を共有結合させることにより、抗体結合固相を調製する。ここで得られた抗体結合固相と、細胞、血液あるいはその分画フラクションを検体として反応させ、検体中に含まれる抗原を固相に結合させ、次いで、抗体結合固相に結合した抗原に、上述した工程によって調製した抗体に、放射性同位元素、酵素、蛍光色素、核酸、ビオチンなどの標識を結合させた標識抗体を反応させる。なお、抗体結合固相と検体と標識抗体を反応させる工程は、同時に行うこともできる。こうして固相に結合した標識物を、測定することによって検体中に含まれる該タンパク質を測定することが出来る。

20

30

抗体を検出する方法は、これとは別に以下のような方法でも可能である。すなわち、本発明のタンパク質あるいは該タンパク質の一部となるペプチドを抗原として固相化して抗原固定化固相とし、次いで、該抗原固定化固相に対して、抗原に標識した物質と、細胞、血液あるいはその分画フラクションを検体として反応させ、結合した標識物を、定量することによって、検体中に含まれる抗体量を測定することができる。したがって、本発明のタンパク質に対して免疫学的に特異的な抗体を検出する診断薬を構築できる。

以上、いずれも抗原あるいは抗体を直接固相化した反応系を説明したが、米国特許第5,789,165のように、固相にオリゴヌクレオチドを結合させておき、このオリゴヌクレオチドに相補的なオリゴヌクレオチドを結合させた抗原あるいは抗体を結合させた反応系も適用可能である。さらに、特開平10-253632号公報、EP0905517A1の記載にあるように、異なる項目を同時に検出あるいは測定することも可能となる。例えば、糖尿病、高血圧、肥満などの生活習慣病に関連するマーカーを同時に検出することにより、どのタンパク質がどの程度検出されるかによって生活習慣病がどの程度のレベルであるのかを判断することも可能になると考えられる。また、肥満関連のタンパク質あるいはペプチドなどのマーカーを同時に検出、測定することによって、肥満の状況を把握し治療に役立てることも可能になると考えられる。

40

本発明のタンパク質、あるいは該タンパク質に対する抗体を免疫学的に検出するためには

50

上述した方法以外に、免疫凝集法による方法（特開平6-3358号公報）、Biacore International AB（スウェーデン）社（<http://www.biacore.co.jp>）のBIAcoreなどによる表面プラズモン共鳴（Surface Plasmon Resonance = SPR）による方法、水晶発振子を用いた方法（特開平9-292397号公報）、などによる方法が挙げられる。

以上の本発明のタンパク質を検出するためのに構成される診断薬は、本発明のタンパク質またはその塩を含有している診断薬が挙げられる。また、好ましい態様の本発明の診断薬は、本発明のタンパク質またはその塩の連続する少なくとも5個のアミノ酸からなるタンパク質またはペプチドを含む診断薬が挙げられる。また、本発明のタンパク質を検出するための別の診断薬は、本発明のタンパク質に対する抗体を含有する診断薬が挙げられる。

10

#### 治療目的の使用

本発明は、過剰または不十分な量の本発明のタンパク質あるいは該タンパク質の一部を構成するペプチドの活性に関連する、肥満症、高血圧症、高脂血症、糖尿病、腎臓疾患、インスリン耐性、脂肪異常栄養、CNS疾患、並びに動脈硬化による心臓病又は脳卒中、等の生活習慣病のごとき異常な状態の治療方法を提供する。本発明のタンパク質あるいは該タンパク質の一部を構成するペプチドの活性が過剰な場合、いくつかの方法を用いることができる。

1つの手段は、有効量の上記阻害剤化合物（アンタゴニスト）を医薬上許容される担体と調合してなる医薬を治療対象者に投与して、本発明のタンパク質あるいはペプチドへのリガンドの結合をブロックすることあるいは第2のシグナルを阻害することにより活性化を阻害し、そのことにより異常な状態を改善することを特徴とする。

20

他の手段は、本発明のポリヌクレオチドを活性化する治療上有効量の化合物（すなわち、アゴニスト）を医薬上許容される担体と調合してなる医薬を投与し、そのことにより異常な状態を改善することを特徴とする。

もう1つのアプローチにおいて、本発明のタンパク質あるいはペプチドと競争してリガンドに結合する能力を有している可溶性形態の本発明のタンパク質あるいはペプチドまたはそれらの塩を投与してもよい。かかる競争物質の典型的な具体例は本発明のタンパク質あるいは該タンパク質の一部を構成するペプチドを含む。即ち、本発明の医薬は該タンパク質或いはその塩、または該タンパク質或いはその塩の連続する少なくとも5個のアミノ酸からなるペプチドを含む医薬とすることができる。

30

さらにもう1つの方法において、発現ブロック法を用いて本発明のポリヌクレオチドまたは該ポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチドを投与して、遺伝子の活性化を阻害してもよい。

このような本発明の医薬は、配列番号1で表されるクローン24ポリヌクレオチドの塩基配列と同一もしくは少なくとも80%の相同性を有する塩基配列を含むポリヌクレオチド、または該ポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチドを含有する医薬である。好ましくは、配列番号1で表される塩基配列と同一もしくは少なくとも80%の相同性を有する塩基配列を含むポリヌクレオチドまたは該ポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチドのうち、連続する少なくとも10個の塩基配列を有するポリヌクレオチドを含む医薬であり、さらに好ましくは、配列番号1で表される100から2520番目にわたり同一もしくは少なくとも80%の相同性を有する塩基配列を含むポリヌクレオチドあるいは該ポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチドに対し、相補的であり且つ連続する少なくとも10個の塩基配列を有するポリヌクレオチドを含む医薬である。

40

特に、ヒトのクローン24ポリヌクレオチドについては、配列番号9で表される塩基配列を含むポリヌクレオチドまたは該ポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチドである。好ましくは、配列番号9で表される塩基配列を含むポリヌクレオチドまたは該ポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチドのうち、連続する少なくとも10個の塩基配列を有するポリヌクレオチドを含む医薬であり、さらに好ましくは、配列番号9における、26から2425番目の塩基配列を含むポリヌクレオチドあるいは該ポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチドに対し、相補的であり且つ連続する少なくとも10個の塩基配列を有

50

するポリヌクレオチドを含む医薬である。

これらの医薬は、ATGの前後の配列のアンチセンスを治療薬に利用するものである。これらの医薬には公知の方法で、細胞内で生成した、あるいは別個に投与された、アンチセンス配列を用いることができる。例えば、Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression, CRC Press, Boca Raton, FL (1988) 中、O'Connor, J. Neurochem (1991) 56: 560。別法として、遺伝子とともに三重らせんを形成するオリゴヌクレオチドを提供してもよい。例えば、Lee et al., Nucleic Acids Res (1979) 6: 3073; Cooney et al., Science (1988) 241: 456; Dervan et al., Science (1991) 251: 1360。これらのオリゴマーはそれ自体投与することができ、あるいは関連オリゴマーをインビボで活性化させることもできる。別法として、遺伝子治療を用いて、治療対象者中の細胞による本発明のポリヌクレオチドの細胞内での生成を有効ならしめてもよい。例えば、上記のごとく本発明のポリヌクレオチドを処理加工して複製欠損レトロウイルスベクターに入れて活性化するようにしてもよい。次いで、レトロウイルス発現構築物を単離し、本発明のタンパク質をコードしているRNAを含むレトロウイルスプラスミドベクターでトランスダクションしたパッケージング細胞中に導入して、次いでパッケージング細胞が目的のポリヌクレオチドを含む感染性ウイルス粒子を生成するようにしてもよい。これらのプロデューサー細胞を治療対象者に投与して細胞をインビボで処理加工して、インビボでタンパク質を活性化するようにしてもよい。遺伝子治療の方法には、Human Molecular Genetics, T. Strachan and A. P. Read, BIOS Scientific Publishers Ltd (1986) 中、第20章、Gene Therapy and other Molecular Genetic-based Therapeutic Approaches (およびその中の引用文献) が適用可能である。本発明のクローン24タンパク質、またはヒトのクローン24タンパク質あるいはそれらのタンパク質を構成するアミノ酸配列の一部からなるペプチドに対する抗体を含有させて医薬とすることができる。このような抗体を投与した場合には、脂肪細胞分化活性を減弱させることが期待できる。

#### 処方および投与

本発明のタンパク質の増強された活性化を必要とする治療対象者の治療方法においては、可溶性形態の配列番号2で表される本発明のタンパク質の全長にわたり同一もしくは少なくとも80%の相同性を有するアミノ酸配列を含むタンパク質、または該タンパク質の一部を構成するペプチド、またはそれらの塩、ならびに該タンパク質または該タンパク質の一部を構成するペプチドに対する抗体、アゴニスト、アンタゴニストペプチド、またはそれらの小型分子の治療上有効量を医薬として治療対象者に投与してもよい。

かかる処方は、治療上有効量の前記物質、またはそれらの塩、および医薬上許容される担体または賦形剤を含んでなる。かかる担体としては、セイライン、緩衝化セイライン、デキストロース、水、グリセロール、エタノール、およびそれらの混合物が挙げられるが、これらに限らない。処方は投与経路に適したものとすべきであり、当業者によく知られている。さらに本発明は、上記本発明成分の1種またはそれ以上を充填した、1個またはそれ以上の容器を含んでなる医薬パックおよびキットにも関する。

本発明のタンパク質および他の化合物を単独で使用してもよく、あるいは治療化合物のごとき他の化合物と一緒に使用してもよい。医薬組成物の全身投与の好ましい形態は、注射、典型的には静脈注射を包含する。皮下、筋肉内または腹腔内のごとき他の注射経路を用いることもできる。全身投与のための別の手段は、胆汁酸塩またはフシジン酸または他の界面活性剤のごとき浸透剤を用いる経粘膜または経皮投与を包含する。さらに、腸溶処方またはカプセル処方ごうまく処方されるならば、経口投与も可能である。これらの化合物の投与は局所的なものであってもよく、膏薬、パスタ、ゲル等の形態であってもよい。

必要な用量範囲は、ペプチド、投与経路、処方の性質、治療対象者の症状の性質、および

担当医師の判断による。適当な用量は治療対象者の体重1kgあたり0.1ないし100μgの範囲である。しかしながら、種々の使用化合物および種々の投与経路のさまざまな有効性を考慮すれば、必要な用量は広範囲なものと思われる。例えば、経口投与には静脈注射よりも多い用量が必要であると考えられる。当該分野においてよく理解された最適化のための標準的な常套の実験を用いてこれらの用量の変更を行うことができる。

しばしば「遺伝子治療」と称される上記治療方法において、治療に使用する本発明のタンパク質を治療対象者中において生成させることもできる。よって、例えば、レトロウイルスプラスミドベクターを用いることにより、タンパク質をコードしているDNAまたはRNAのごときポリヌクレオチドを用いて治療対象者由来の細胞をエクスピボで処理加工してもよい。次いで、処理された細胞を治療対象者に導入する。

10

#### 実施例 1

##### 脂肪細胞への分化の確認

脂肪細胞に分化することが可能なマウス3T3-L1細胞(ATCC No. CCL-92.1.)を、基本培地(DMEM, 40μg/ml KM, 10% Calf Serum)を用いて5% CO<sub>2</sub>、37°Cにおいてcollagen type I dish(FALCON社製)中で培養した。細胞がコンフルントに達してから2日間おき、細胞が休止期に入った後、培地を分化誘導培地(DMEM, 40μg/ml KM, 10% FBS, 0.5mM 1-メチル-3-イソブチルキサンチン(以下、Mixと呼ぶ)、10μg/ml インシュリン、1μM Dexamethasone(以下、Dexと呼ぶ))に変えこの分化条件において48時間培養し、培地を分化促進培地(DMEM, 40μg/ml KM, 10% FBS, 5μg/ml insulin)に変えた。2日おきに分化促進培地で培地交換を行った。マウス3T3-L1細胞(ATCC No. CCL-92.1.)は、4日目頃から小さな脂肪滴を含み始め、一週間後には成熟した脂肪細胞へ分化することを確認した。

20

#### 実施例 2

##### mRNAの調製

脂肪細胞分化誘導前と分化誘導開始3時間後のマウス3T3-L1細胞(ATCC No. CCL-92.1.)からTRIzol(GIBCO BRL社製)を用いて、TRIzol(GIBCO BRL社製)に添付されている取扱説明書に従い、各々のマウス3T3-L1細胞起源の全量RNAを調製した。これらの各全量RNAからOligotex-dT30(第一化学薬品社製)を用いて、添付されている取扱説明書に従って、脂肪細胞分化誘導前のmRNAと、脂肪細胞分化誘導3時間後のmRNAを調製した。

30

#### 実施例 3

##### PCR-select cDNA Subtraction法による脂肪細胞分化誘導後3時間目の活性化の測定

公知のPCR select cDNA subtraction kit(CLONTech Laboratories社製)に従って以下のi)-vii)工程を行った。

i) テスターcDNA、ドライバーcDNAの合成

前記実施例2で調製したマウス3T3-L1細胞(ATCC No. CCL-92.1.)由来の脂肪細胞分化誘導前のmRNAをドライバーmRNAとし、前記実施例2で調製した脂肪細胞分化誘導3時間後のmRNAをテスターmRNAとした。これらのドライバーmRNAおよびテスターmRNAから1本鎖cDNAを合成し、次いで、2本鎖のドライバーcDNA、テスターcDNAを合成した。

40

ii) 制限酵素RsaIによる2本鎖cDNAの切断

前記工程i)で得られた2本鎖のドライバーcDNAとテスターcDNAの各々を制限酵素RsaIで切断し、平滑末端(blunt end)の断片を作った。iii) アダプターのライゲーション

前記工程ii)で得られた切断されたテスターcDNAを二つのグループに分け、一方にアダプター1をライゲーションし、他方にアダプター2をライゲーションした。

iv) ファーストハイブリダイゼーション

50

前記工程 i i i ) で得られたアダプターをライゲーションした 2 種類のテスター c D N A と過剰量のドライバー c D N A との間で別々にハイブリダイゼーションを行った。

v ) セカンドハイブリダイゼーション

さらに過剰量のドライバー c D N A と、前記 i v ) 工程で得られたドライバー c D N A をハイブリダイズしてなる 2 種類のテスター c D N A を合わせ、ハイブリダイゼーションを行った。

v i ) ファースト P C R

前記 i v ) 工程で得られたハイブリダイズされたテスター c D N A を 2 種類のアダプター部位間で共通なプライマーを用いて P C R 法を行って D N A を増幅させた。

v i i ) セカンド P C R

最後に 2 種類のアダプター部位に特異的な 2 種類のプライマーを用いて P C R 法を行い D N A を増幅させた。

ドライバー c D N A とハイブリダイズしてなるテスター c D N A は増幅されなかった。一方、テスター特異的、つまり分化誘導 3 時間後に活性化が増加しているポリヌクレオチド ( 遺伝子 ) のみ増幅された。

実施例 4

P C R 産物のサブクローニング及びクローン 2 4 のプラスミド

図 1 にクローン 2 4 マウス c D N A の略図を示す。前記実施例 3 のサブトラクション法で得られたセカンド P C R 法を行った後の増幅されたポリヌクレオチドを含む反応液をフェノール抽出、C I A A 抽出後、E t O H 沈殿を行い、D N A のペレットを滅菌水 1 7  $\mu$  l に溶解し、1 0 u n i t s の R s a I で 1 0 m M T r i s - H C l ( p H 7 . 5 ) , 1 0 m M M g C l <sub>2</sub> , 1 m M D T T 条件下、3 7 °C 一晩反応させアダプターを切断した。0 . 7 % アガロースゲルで電気泳動後、D E 8 1 ( W h a t m a n 社製 ) を用いて精製して、D N A 断片 S u ( 図 1 参照 ) を得た。

該 D N A 断片 S u の情報を元にプライマーを設計し、5 ' - R A C E を行った結果、約 2 K のバンドが得られたので、これを回収してヌクレオチド R - 5 ' と呼んだ ( 図 1 参照 ) 。該ヌクレオチド R - 5 ' を T ベクター ( p B l u e s c r i p t K S + ) にサブクローニングして、D S Q - 1 0 0 0 ( 島津製作所社製 ) により、塩基配列を決定した。一方、クローン 2 4 の 3 ' 側の配列を用いてデータベースに対して検索すると一致する塩基配列が E S T に登録されており、この塩基配列を参考にプライマーを設計し R T - P C R を行った。その結果、約 7 0 0 b p のバンドが得られたので、これを回収してヌクレオチド R T と呼んだ ( 図 1 参照 ) 。該、ヌクレオチド R T を T ベクター ( p B l u e s c r i p t K S + ) にサブクローニングして、D S Q - 1 0 0 0 ( 島津製作所社製 ) により、塩基配列を決定した。このようにして、マウス 3 T 3 - L 1 細胞 ( A T C C N o . C C L - 9 2 . 1 . ) 由来のクローン 2 4 の c D N A 全長である 2 7 8 2 b p のクローンポリヌクレオチドを得た。該ポリヌクレオチドをクローン 2 4 ポリヌクレオチドと呼ぶ。

翻訳開始コドンは 1 0 0 塩基目の A T G を翻訳開始コドンと仮定した。その結果クローン 2 4 ポリヌクレオチドは 8 0 7 アミノ酸をコードする遺伝子であると予想された。決定したクローン 2 4 ポリヌクレオチドの塩基配列と、該塩基配列から予想したアミノ酸配列に対してデータベースを用いたホモロジー検索を <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> において検索したところ、機能が全く記載されていないチャイニーズハムスター由来の m R N A の配列が該当し、アクセッション番号が A F 3 7 1 3 7 2 で、2 7 9 4 b p の長さで登録されていることが分かった。配列番号 1 で表される塩基配列と該チャイニーズハムスター由来の m R N A の塩基配列との相同性は 8 8 . 1 2 % であり、また、配列番号 1 で表される塩基配列における開始コドンから終始コドンまで ( 塩基配列の番号 1 0 0 から 2 5 2 0 まで ) と前記公知のチャイニーズハムスター由来の O R F の配列の相同性は、9 1 . 7 2 % であるから、クローン 2 4 ポリヌクレオチドは新規の遺伝子であると考えられる。

5 ' 末端を脱リン酸化した p B l u e s c r i p t K S + / E c o R V ベクター 5 0 n g と D N A 断片 1 5 0 n g をそれぞれライゲーション反応を行った。ライゲーション反応

液 1.2  $\mu$ l をコンピテントセルとして Escherichia coli JM109 (ATCC 53323、東洋紡株式会社製) に heat shock 法によりトランスフォームして、サブクローニングされたクローン 24 のプラスミドを得た。本実施例 4 で製造された形質転換体は、国際寄託当局である独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに FERM BP-7803 として寄託されている。該形質転換体は、該国際寄託当局に 2000 年 11 月 29 日 (原寄託日) に FERM P-18131 号として原寄託され、そして、該原寄託より 2001 年 11 月 16 日にブダペスト条約に基づく寄託へ移管された。

#### 実施例 5

##### 塩基配列およびアミノ酸配列の決定

クローン 24 ポリヌクレオチドの塩基配列の決定は、ABI PRISM 310 (Perkin-Elmer 社製) および DSQ 1000 (島津製作所社製) を用いて行った。得られたクローン 24 ポリヌクレオチドの塩基配列を、配列番号 1 に示す。クローン 24 ポリヌクレオチドは 2782 塩基から構成されていることが分かった。また、クローン 24 ポリペプチドのコドン配列からアミノ酸配列を推定すると、該ポリヌクレオチドはアミノ酸が 807 個のクローン 24 タンパク質をコードすることが分かる。クローン 24 タンパク質のアミノ酸配列を配列番号 2 に示す。

#### 実施例 6

##### 既存塩基配列、アミノ酸配列との比較

クローン 24 ポリペプチドの塩基配列およびクローン 24 タンパク質のアミノ酸配列について、Genbank、EMBL、EST、Swiss Prot の各々のデータベースでホモロジー検索を行った。FASTA および BLASTN を行った結果、クローン 24 ポリペプチドの塩基配列については登録されている機能が既知のポリヌクレオチドとは相同性が無く、前駆脂肪細胞が脂肪細胞に分化する際に特異的に活性化されるポリヌクレオチドとして新規の物質であることが分かった。

また、BLASTNP を行った結果、クローン 24 タンパク質のアミノ酸配列についても登録されている機能が既知のタンパク質とは相同性が無く、前駆脂肪細胞が脂肪細胞に分化する際に特異的に活性化されるタンパク質として新規の物質であることが分かった。

#### 実施例 7

##### インサートの回収およびプローブの作成

前記実施例 4 で得られたサブクローニングされたクローン 24 のプラスミドを Molecular Cloning に記載の方法に従いアルカリ SDS 法により調製し、このプラスミドを制限酵素 XbaI, HindIII で切断後、1.0% アガロースゲルで電気泳動し、インサートに相当するバンドを DE81 (Whatman 社製) を用いて回収した。50 ~ 100 ng の DNA 断片を BcaBEST<sup>TM</sup> Labeling kit (Takara 社製) を用いて [<sup>32</sup>P] dCTP (Amersham Pharmacia Biotech 社製) で標識し、標識プローブを得た。得られた標識プローブを Sephadex G-50 (Amersham Pharmacia Biotech 社製) を用いたカラムに通し、<sup>32</sup>P 標識プローブを調製した。

#### 実施例 8

##### ノザンプロット解析

脂肪細胞分化誘導開始前 (0 時間) と分化誘導開始 0.5、1、3、6、12、24 時間後のマウス 3T3-L1 細胞 (ATCC No. CCL-92.1) からそれぞれ調製した総 RNA 25  $\mu$ g を 1% 変性ゲル (2% formaldehyde, 1x Mops, 1% アガロース) で電気泳動した。ゲルを 50 mM NaOH 25 分 (アルカリ変性)、200 mM NaOAc (pH 4.0)、40 分 (中和) 処理後、RNA を Hybond N+ (Amersham Pharmacia Biotech 社製) にトランスファーした。トランスファーは 12 時間以上行い、バッファーは 20x SSC を用いた。トランスファーしたフィルターを 50 mM NaOH, 5 分間処理後、2x SSC で洗浄し、80、2 時間乾燥させた。その後、UV 照射を行い固定した。

10

20

30

40

50

ハイブリダイゼーションバッファー ( 5 × S S P E , 5 0 % f o r m a l d e h y d e , 5 × D e n h a l t ' s , 0 . 1 % S D S , 2 0 μ g / m l s a l m o n s p e r m D N A ) で 4 2 ° C 一晩、プレハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーションバッファーを新しく変えた後、熱変性したプローブを加え 4 2 ° C 一晩、ハイブリダイゼーションを行った。その後、フィルターを一次洗浄液 ( 2 × S S P E 0 . 1 % S D S ) を用いて室温で 1 0 分間、さらに一次洗浄液を用いて 5 5 ~ 6 5 ° C で 1 5 分間、二次洗浄液 ( 1 × S S P E 0 . 1 % S D S ) を用いて 6 5 ° C で 1 5 分間、三次洗浄液 ( 0 . 5 × S S P E 0 . 1 % S D S ) を用いて 6 5 ° C で 1 0 分間の条件で洗浄し、オートラジオグラフィを行った。得られた結果を、図 2 に示す。

図 2 のオートラジオグラムによれば、クローン 2 4 ポリペプチドより調製した標識プローブは、脂肪細胞分化誘導開始前 ( 0 時間 ) の細胞から調製した m R N A とは反応しないが、分化誘導開始 6 時間目をピークとして、3 時間目から 1 2 時間目の細胞から調製した m R N A は反応することが分かった。このことから、クローン 2 4 ポリペプチドにクローニングされている配列は、脂肪細胞分化に特異的に活性化されている配列であることが分かった。

#### 実施例 9

##### m R N A の局在部位の特定

###### i ) プラスミドの構築

配列番号 1 で示されるクローン 2 4 のポリヌクレオチドの全長を R T - P C R により増幅し、回収精製後、G F P 発現ベクターである、p E G F P ( C l o n t e c h 社製 ) にサブクローニングした。

###### i i ) プラスミドの精製

前記のサブクローニングしたプラスミドを、T r i t o n l y s i s 法により、塩化セシウムを用いて 2 回超遠心分離を行い、スーパーコイルプラスミド D N A を精製した。

###### i i i ) トランスフェクション

l i p o f e c t a m i n e ( G I B C O B R L 社製 ) 法を用い、前記工程で得られたスーパーコイルプラスミド D N A を、脂肪細胞に分化する機能が失われたマウス N I H / 3 T 3 c l o n e 5 6 1 1 細胞 ( J C R B 0 6 1 5 ) にトランスフェクションした。トランスフェクトされた細胞を 2 日後に P B S ( - ) で 3 回洗浄した。次いで、径 6 c m のシャーレに収容されている 4 % パラホルムアルデヒドを含む P B S ( - ) 3 m l で 3 0 分間処理して細胞を固定した。次いで、細胞を P B S で二回洗浄し、洗浄後蛍光顕微鏡 ( B X - 5 0 、 O L Y M P U S 社製 ) で G F P の発現を観察した。図 3 ( c ) は、上記工程により細胞内に発現した G F P を示す顕微鏡写真である。図 3 ( a ) は対照として細胞全体を写した顕微鏡写真である。図 3 ( b ) は D A P I 法により細胞質内の核のみを染色した顕微鏡写真である。

図 3 ( a ) ~ ( c ) の写真を比較すると、クローン 2 4 タンパク質をコードする m R N A は核内のみが存在することが明らかである。クローン 2 4 ポリヌクレオチドから推定されるクローン 2 4 タンパク質のアミノ酸配列がロイシンジッパー構造を形成するかどうかについて、他のロイシンジッパー構造を持つタンパク質である c - f o s 、 C / E B P 、 C R E B 、 J u n B とを比較すると、何れのタンパク質も、その配列においてロイシンとロイシンの間隔が 7 個又は 1 4 個で共通するために、クローン 2 4 タンパク質もロイシンジッパー構造を持つと推定される。また、クローン 2 4 タンパク質をコードする m R N A が核内のみが存在することは、該ロイシンジッパー構造を介してダイマーを形成し、核内で転写因子として機能しているためと推定される。図 4 はクローン 2 4 ポリペプチドの模式図であり、該配列中において、ロイシンジッパー構造と考えられる配列部位を特に示す。

#### 実施例 1 0

##### クローン 2 4 過剰発現 N I H / 3 T 3 細胞株の作製

###### i ) プラスミドの構築

クローン 2 4 の塩基配列 8 7 b p から 2 6 3 6 b p を下記の配列番号 1 1 で表される塩基

配列のオリゴヌクレオチドを上層プライマーとし、下記の配列番号12で表される塩基配列のオリゴヌクレオチドを下層プライマーとしてAmpli-Taq Gold (Perkin-Elmer社製)を用いてRT-PCRにより増幅した。0.8%アガロースで電気泳動し、DE81 (Whatman社製)で回収精製後、Tベクター (pBluescript SK+) にサブクローニングした。トランスフォームには大腸菌DH5を用いた。塩基配列をDSQ-1000 (島津製作所社製)により確認後、制限酵素BamHI、XhoIで切断しフラグメントを回収精製し、pDON-AI (Takara社製)のBamHI、SalI部位にサブクローニングした。

配列番号11

CGC AGG CCT AAG GAT GAA GGC G

配列番号12

CAG GGT CTT CTG TGG CCC TGC TCC

ii) プラスミドの調製

CONCERT (GIBCO BRL社の登録商標) High purity Plasmid Midiprep Systems (GIBCO BRL社製)を用いてその取扱説明書に従って行った。

iii) PT67パッケージング細胞の培養

10% FBSを含む高グルコースダルベッコ変法イーグル培地 (GIBCO BRL社製) 中、5% CO<sub>2</sub>下、37℃で培養した。

20

iv) トランスフェクション及びウイルス液の回収

トランスフェクションを行う前日に、PT-67細胞を10cm plateあたり7.0 × 10<sup>5</sup>個まいた。トランスフェクション当日にクローン24の全長配列を挿入したpDON-AI (Takara社製)あるいはインサートを含まないpDON-AI 14 μgをリン酸カルシウム法によってトランスフェクションした。トランスフェクション後72時間の細胞培養上清をウイルス液として回収した。

v) 標的細胞NIH/3T3の培養

10% calf serumを含むダルベッコ変法イーグル培地 (日水製薬株式会社製) 中、5% CO<sub>2</sub>下、37℃で培養した。

30

vi) ウイルスの感染及び単一細胞株のクローニング

感染前日に標的細胞NIH/3T3を10cm plateあたり5.0 × 10<sup>5</sup>個まいた。感染当日8 μg/ml ポリブレン (SIGMA社製)と共に作製したウイルス液5mlを含む培養液を標的細胞NIH/3T3に加えた。感染24時間後に細胞を1/4、1/10、1/100、1/1000へと段階希釈し、0.5 mg/mlのG418 (ナカライテスク社製)を含む培地中で10日間程度培養し、G418耐性の細胞株、すなわち目的遺伝子が染色体中に組み込まれた細胞、即ち、クローン24過剰発現NIH/3T3細胞株を得た。

実施例11

作製した細胞のクローン24発現の確認

40

i) 総RNAの回収

前記実施例10で得られたクローン24過剰発現NIH/3T3細胞、及び空ベクターをトランスフェクションしたコントロールNIH/3T3細胞の双方からTRIzol (GIBCO BRL社製)に添付されている取扱説明書に従い総RNAを回収した。

ii) プロブの作製

pBluescript SK+クローン24を制限酵素、PstIで切断し、0.8%アガロース電気泳動後、クローン24 cDNA断片に相当する1.2 kbpのバンドを精製した。60 ngに相当するDNA断片をBcaBEST (Takara社の登録商標) Labeling kit (Takara社製)を用いて[<sup>-32</sup>P]dCTP (Amersham pharmacia biotech社製)で標識しプロブを調製した。

50

### iii) ノザンプロット解析

回収した総RNA 10 µgを1%変性ゲル(2% formaldehyde、1×MOP S、1%アガロース)で電気泳動した。ゲルを50mM NaOH 25分(アルカリ変性)、200mM NaOAc (pH4.0) 40分(中和処理)した後に、RNAをHybond N+(商品名、Amersham pharmacia biotech社製)にトランスファーした。トランスファーは12時間以上行い、バッファーは20×SSCを用いた。トランスファーしたフィルターを50mM NaOHで5分間処理後、2×SSCで洗浄し、80℃2時間乾燥後、UV照射を行い固定した。

ハイブリダイゼーションバッファー(5×SSPE、50% formamide、5×Denhalt's、0.1% SDS、20 µg/ml salmon sperm DNA)で42℃一晩、プレハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーションバッファーを新しく替えた後、熱変性したプローブを加え42℃一晩、ハイブリダイゼーションを行った。その後、フィルターを1次洗浄液(2×SSPE、0.1% SDS)を用いた42℃15分間、更に洗浄液を替えて65℃15分間洗浄し、オートラジオグラフィを行った。得られたオートラジオグラムを図5に示す。

この結果から、実施例10において調製したクローン24過剰発現NIH/3T3細胞株中で、実施例10i)において構築したプラスミドに由来するクローン24のmRNAが発現していることがわかった。

### 実施例12

#### クローン24過剰発現NIH/3T3細胞の脂肪細胞分化

##### i) 分化誘導

前記実施例10で得られたクローン24過剰発現NIH/3T3細胞を10% calf serumを含むダルベッコ変法イーグル培地(日水製薬株式会社製)中、5% CO<sub>2</sub>下、37℃でcollagen type I dish(FALCON社製)中で培養した。細胞がコンフルントに達してから2日後に細胞が休止期に入った後、培地を分化誘導培地[DMEM、10% FBS、0.5mM 1-メチル-3-イソブチルキサンチン(以下、MIXと呼ぶ)、10 µg/ml インスリン、1 µM Dexamethasone(以下、DEXと呼ぶ)、BRL49653(Smithkline Beecham Pharmaceutical社製)]に変え、この条件で48時間培養し、培地を分化促進培地(DMEM、10% FBS、5 µg/ml インスリン、BRL49653)に変えた。2日おきに分化促進培地で培地交換を行い、8日後まで培養を継続した。

##### ii) Oil-Red-O染色

分化誘導後8日目の細胞の培養液を除かずに氷冷した4% paraformaldehyde/PBS(-) 5mlを加え、室温で20分間放置した。培地を除き氷冷した4% paraformaldehyde/PBS(-) 5mlを加え、室温で1時間放置した。蒸留水で3回洗浄し、Oil-Red-O染色液(0.5% Oil-Red-O、60% 2-プロパノール)を5ml加え室温に1時間放置した。蒸留水で3回洗浄後、風乾した。染色したプレートを図7に示す。顕微鏡で観察したところコントロール細胞では脂肪滴は確認されなかったがクローン24過剰発現NIH/3T3細胞では脂肪滴の蓄積が確認された。すなわち、脂肪細胞に分化したことが確認された。

### 実施例13

#### ヒトホモログのクローニング

##### i) NCBI Genome Sequencing (Human Genome Database)を用いたヒトホモログの配列の予想

前記実施例7で決定したクローン24マウスポリヌクレオチドの全長配列をNCBI Genome SequencingのBLAST the Human genome (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/seq/>)でホモロジーサーチすることによって相同性の高い配列を10番染色体上に見出した。イニシャルメチオニンを含むエキソンを第1エキソンとしたとき、該配列は計21個のエキソンにより構成されていた。全てのエキソン、イントロン間にはgt-a gルールが保存

10

20

30

40

50

されていたことからヒトホモログの全長配列を予想することが出来た。

i i) H e l a細胞の培養

ヒトホモログのクローニングはRT - PCRにより行った。テンプレートにはH e l a細胞を用いた。H e l a細胞の培養にはMEM (商品名、日水製薬株式会社製)、10% FBS (商品名、大日本製薬株式会社製)を用いた。

i i i) 総RNAの回収

コンフレントに培養したH e l a細胞からTRIzol (GIBCO BRL社製)を用いて、その取扱説明書に従い、総RNAを回収した。

i v) Reverse Transcriptase Coupled Polymerase Chain Reaction (RT - PCR)によるヒトホモログのクローニング

10

前記工程i)で予想された全長配列をもとに下記の配列番号3~8で表される塩基配列のオリゴヌクレオチドをプライマーとして組み合わせて用い、下記組成のRT - PCR反応組成でRT - PCRを行った。cDNAテンプレートには前記工程i i)及びi i i)で作製したH e l a細胞の総RNAからReverTra Dash (TOYOBO社製)を用いてその取扱説明書に従って作製した。

配列番号3 (upper layer): 5'-GCC GGC ATT CAT TTA AGG CC-3'

配列番号4 (lower layer): 5'-CTT CGC ATG AAC AGG CTC AC-3'

配列番号5 (upper layer): 5'-CAG ATC CCA AGC TTT CGC-3'

配列番号6 (lower layer): 5'-AGC AAA CTT GGC AAG ACC-3'

配列番号7 (upper layer): 5'-AAG AAG GCC CAG AGG TCA-3'

配列番号8 (lower layer): 5'-GTC CAC TGA CTT CAT TCC-3'

RT - PCR反応組成:

2 μl 10×PCR buffer for KOD-Plus-  
2 μl 2 mM dNTPs

0.8 μl 25 mM MgSO<sub>4</sub>

2 μl cDNAテンプレート

1.2 μl 上層及び下層プライマー (各10 mM)

11.6 μl sterile H<sub>2</sub>O

0.4 μl KOD-Plus-DNA Polymerase (1.0 U / μl)

上記プライマーの組み合わせは、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とし、RT - PCRの反応条件は、1 cycle: 94 2分、30 cycles: 94 15秒、60 30秒、68 2分とした。

v) RT - PCR断片の精製及び塩基配列の決定

40

PCRの反応生成物を0.7%アガロースゲル電気泳動により分離後、DE81 (Whatman社製)を用いて回収精製した。DNA断片をpBluescript KS+にサブクローニングし、DSQ-1000 (島津製作所社製)により、塩基配列を決定した。また、配列番号3 / 配列番号4より得られた反応性生物はサブクローニングせずにGene Rapid (Amersham pharmacia biotech社製)により、塩基配列を決定した。

v i) クローン24ヒトホモログの全長配列の決定

図6にクローン24ヒトホモログcDNAの略図を示す。配列番号3 / 配列番号4の組み合わせによりRT - PCRを行い、検出した394 bpのバンドについて配列を決定し、該バンドをRT - 1と称した。この領域における配列は前記工程i)により予想した配列

50

と100%同一であることが明らかとなった。

配列番号5 / 配列番号6の組み合わせによりRT-PCRを行い、検出した1554bpのバンドについて配列を決定し、該バンドをRT-2と称した。予想した配列との一致率は、1553 / 1554で、99.94%であった。

配列番号7 / 配列番号8の組み合わせによりRT-PCRを行い、検出した907bpのバンドについて配列を決定し、該バンドをRT-3と称した。この領域における配列は前記工程i)により予想した配列と100%同一であることが明らかとなった。

上記のようにしてクローニングされたクローン24ヒトホモログポリヌクレオチドの全長の核酸配列は、配列番号9に示される。

また、配列番号2に示したマウスのクローン24ポリヌクレオチドと配列番号9に示したヒトホモログとの一致率は、2089 / 2444 = 85.47%であった。

クローン24ヒトホモログポリヌクレオチドにおいて、マウスクローン24においてイニシャルメチオニンと定めたアミノ酸に対応する26塩基目のATGを翻訳開始コドンと仮定した。その結果、クローン24ヒトホモログポリヌクレオチドは800アミノ酸からなるタンパク質をコードする遺伝子であると予想され、該タンパク質のアミノ酸配列は、配列番号10であると予想される。

#### 実施例14

##### クローン24に対する抗体の確認

##### i) マレイミド基導入KLHの調製

Keyhole limpet hemocyanin (商品名、Calbiochem社製、以下、KLHと称す。) 5mgを含む0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液pH7.0とEMCS (商品名、同仁化学社製) 1mgを37℃1時間反応させた後、0.1Mリン酸緩衝液pH6.0で平衡化したPD10 (商品名、アマシャムファルマシアバイオテク社製) で未反応のEMCSを除去し、マレイミド基導入KLHを得た。

##### ii) PEPTIDE 4 導入KLHの調製

前記工程i) で得られたマレイミド基導入KLH 2mgと、配列番号2のマウスのクローン24タンパク質における、266番目から282番目までの17個のアミノ酸からなる配列である、Lys Asp Ile Thr Pro Ser Tyr Lys Ile Arg Pro Leu Thr Glu Ala Glu Lys (配列番号13、以下、PEPTIDE 4と称す。) なる配列の末端に、Cysを導入した、Cys Lys Asp Ile Thr Pro Ser Tyr Lys Ile Arg Pro Leu Thr Glu Ala Glu Lys (配列番号14) 1mgとを、37℃1時間反応させた後、未反応のペプチドを透析により除去し、PEPTIDE 4 導入KLHを得た。

##### iii) PEPTIDE 8 導入KLHの調製

マレイミド基導入KLH 2mgと、配列番号2のマウスのクローン24タンパク質における、426番目から446番目までの21個のアミノ酸からなる配列である、Leu Arg Ile Lys Glu Val Glu Val Lys Lys Asp Thr Glu Asp Ile Asn Lys Pro Lys Arg Phe (配列番号15、以下、PEPTIDE 8と称す。) なる配列の末端に、Cysを導入した、Cys Leu Arg Ile Lys Glu Val Glu Val Lys Lys Asp Thr Glu Asp Ile Asn Lys Pro Lys Arg Phe (配列番号16) 1mgとを、37℃1時間反応させた後、未反応のペプチドを透析により除去し、PEPTIDE 8 導入KLHを得た。

##### iv) PEPTIDE 10 導入KLHの調製

マレイミド基導入KLH 2mgと、配列番号2のマウスのクローン24タンパク質における、750番目から765番目までの16個のアミノ酸からなる配列である、Glu Ser Ser His Ser Lys Arg Lys Asp Lys Phe Leu Pro Gly Asp Ser (配列番号17、以下PEPTIDE 10と称す。) なる配列の末端に、Cysを導入した、Cys Glu Ser Ser His

10

20

30

40

50

Ser Lys Arg Lys Asp Lys Phe Leu Pro Gly  
Asp Ser (配列番号18) 1mgとを、37 1時間反応させた後、未反応のペプチドを透析により除去し、PEPTIDE10導入KLHを得た。

#### v) 家兎に対する免疫

前記工程ii)、iii)、iv)により調製した、PEPTIDE4導入KLH、PEPTIDE8導入KLH、PEPTIDE10導入KLH、それぞれ50 $\mu$ gをフロイント・コンプリート・アジュバントと混合してエマルジョンを作製し、これをそれぞれ家兎背部皮下に免疫した。さらに、この免疫1ヶ月後に同エマルジョンを用いて追加免疫を行い、この1週間後に各々の家兎について採血を行った。

#### vi) ブロッキング済みペプチド固相化モジュールの調製

前記クローン24タンパク質由来のPEPTIDE4, PEPEIDE8およびPEPTIDE10、並びに、クローン24タンパク質由来ではない、マウス由来の14個のアミノ酸からなるPEPTIDE2(配列番号19)および13個のアミノ酸からなるPEPTIDE5(配列番号20)をそれぞれPBS(日水製薬社製)で希釈して、10 $\mu$ g/mlになるように各ペプチド溶液を調製した。各ペプチド溶液を、それぞれ、96穴タイタープレートモジュール(Nalge Nunc International社製)に50 $\mu$ lずつ分注し、37 1時間インキュベートして、それぞれのペプチドを固相化した。この後、モジュールをPBSで洗浄後、0.5%の牛血清アルブミンを含むPBSを200 $\mu$ lずつ分注し、37 1時間インキュベートして、ブロッキングを行った。

vii) 前記工程v)で調製した各家兎抗ペプチド血清をPBSで1000倍希釈したものを、前記工程vi)で調製した、ブロッキング済みペプチド固相化モジュールに、それぞれ50 $\mu$ l分注し、37 1時間反応させた。モジュールをPBSで洗浄後、ペルオキシダーゼ標識ヤギ抗家兎イムノグロブリン(Biosource International社製)をPBSで1500倍希釈したものを50 $\mu$ l分注し、37 1時間反応させた。モジュールを洗浄後、ABTS peroxidase substrate(KPL社製)を加え、室温10分間反応後、ABTS peroxidase stop solution(KPL社製)を加え、405nmにおける吸光度を測定した。この成績を図8に示した。この成績から、PEPTIDE4導入KLHを免疫した抗体はPEPTIDE4を固定したモジュールに、PEPTIDE8導入KLHを免疫した抗体はPEPTIDE8を固相化したモジュールに、PEPTIDE10導入KLHを免疫した抗体はPEPTIDE10を固相化したモジュールに反応し、他のペプチドを固相化したモジュールには反応しないことがわかった。

本実施例の結果から、本発明のマウスのクローン24タンパク質のタンパク質の一部を家兎に免疫することによって、抗体が得られることが確認できた。この抗体を用いると、免疫した抗原あるいは免疫した抗原から構成されるタンパク質を測定する免疫検出系を構築可能であることが分かる。

#### 産業上の利用可能性

本発明のポリヌクレオチド及びタンパク質は、脂肪細胞分化誘導開始後12時間以内、特に6時間前後の細胞から抽出されるポリヌクレオチド並びにタンパク質であり、脂肪細胞分化誘導開始後12時間以内に活性化されるポリヌクレオチド及びタンパク質としては新規なものである。これらのポリヌクレオチドおよびタンパク質は、肥満のメカニズムを解明し、さらに肥満の進行状況を適切に把握し、肥満の予防あるいは治療に役立たせる上で極めて有用な物質である。

本発明のポリヌクレオチド、並びにポリヌクレオチドから推定されるタンパク質またはペプチド、およびこれらのペプチドに対する、抗体、アンタゴニストまたはアゴニストは、肥満を含む糖尿病・高血圧・動脈硬化などの生活習慣病の治療、および診断に有用である。

#### 【配列表】

10

20

30

40

## SEQUENCE LISTING

<110> Nissui Pharmaceutical Co., Ltd.

<120> Genes and proteins associated with adipocyte differentiation

<130> NSM4227PCT

<160> 20

<210> 1

<211> 2782

<212> DNA/RNA

<213> Mouse

<220>

<221> cDNA to mRNA

<400> 1

GAAAGGTTGC GCTCAGTGCA CGTGTGTCTT TTCCACCCGG CTCCTGCGTG TTCCTCTGTC 60  
CGAGTGATCT TGTCTGTGGT ACTCCTCGCA GGCCTAAGGA TGAAGGCGAG AAGAAATAAA 120  
AAGCAGGTCC CAAGCTTTTCG CAAGTTGATA AAAACTAGTA AAGTGAAACT TGAAAACAAA 180  
TTGAAAATA AGCAATTTAA ACAACAAAGT ACCATCAAGA AGTACCGAAA AGAGCAGAGG 240  
AAACTAAGGC AAGCTGTAAA AGATGCTGTG TCTAAAAAAC CCATTCCGCT GGAGGACCCA 300  
AAGAGCAAAC GGCCAGTTAA AAGGATGGAG AGGGAGGAGG ACCAGGAGCA AGAAGCCCTG 360  
CCTTTGGATA TGATGGACGA GGATGACCTA CAGCTGATGA AGGATTTAGG ACAAAGGCA 420  
TCTTTTCTCA CAAGAGATCT CTCTTCTAGT GAACCAGTCC ATATCAAGAA ACGAAAGCAT 480  
GAGAGTGTGA TAGAGAAATA TGAAAAAGTG CCAAGAACTC TGCAAACCGC ACCGGAGAAG 520  
GAGTTGATTC ACCTGCTCCC TATCAAGGAC AAGAGTGGCA TCATCCCTCA GGCTCGGGAG 600  
AAGCCGGTCA CTGACTTGCA GCAAGAAGAG GAGGCTGAGG AAGAGCTGGA AGATGAGGAA 660  
GAGGTCATTG AAGACCCCAG GAAGGAGCTG ACCATAGAAG AGCATGTGAT CGAGAGAAAG 720  
AAGAACTGC AGGACAAGAA AATACAGATT GCAGCCTTAG CATCTGCTAT TCTGTCAGAT 780

CCAGAAAGTC ATATTA AAAA ACTGAAAGAG TTGCGTTCCA TGCTGATGGA GCAGGACCTT 840  
GATGTGGCTG TCACTGTCCG GAAGTTGGTT ATCATCTCAC TGATGGAGCT GTTTAAGGAC 900  
ATCACTCCCT CGTATAAAAT CCGGCCTCTA ACCGAAGCAG AAAAATCTAC CAAGATTCGT 960  
AAAGAAACCC AGAAGTTAAG AGAATTTGAA GAAGGCCTGG TTAGCCAATA CAAATTTTAT 1020  
TTGGAAAATC TGGAGCAAAT AGTTAAAGAC TGGAAAGCAA GGAAGCTGAA GAAGAGCAAC 1080  
GTGGTGTCCCT TAAAGGCCTA CAAAGGGCTG GCTGAAGTGG CAGTGAAGAG CCTGTGTGAG 1140  
CTGTTGGTGG CCCTGCCCA TTTTAACTTT CACAACAACA TCATTGTACT GATTGTCCCT 1200  
CTGATGAACG ATGGGTCAA ACCGGTATCT GAAATGTGTT GCGAAGCAGT AAAGAAACTC 1260  
TTTAAACAAG ATAAATTAGG CCAAGCTTCT CTGGGTGTCA TTAAAGTCAT CTCTGGTTTT 1320  
GTAAAGGGCA GAAATTACGA AGTTAGGCCA GAGATGTAA AACATTTTTT ATGCCTGCGG 1380  
ATCAAGGAGG TAGAAGTGAA AAAAGATACA GAGGACATTA ACAAGCCCAA AAGGTTTCATG 1440  
ACTTTCAAGG AGAAGAGAAA AACTCTATCA AGAATGCAA GAAAGTGGAA GAAAGCAGAA 1500  
GAGAAACTAG AGCGGGA ACT TCGGGAGGCC GAAGCTTCGG AAAGCACTGA GAAAAAGCTG 1560  
AAACTGCACA CCGAGACTCT GAATATTGTG TTTGTGACCT ACTTCAGAAT ACTGAAGAAG 1620  
GCCAGAAGT CACCTCTTCT GCCAGCGGTT CTAGAAGGCC TTGCCAAGTT TGCACATCTT 1680  
ATAAATGTGG AGTTTTTTGA TGATTTATTA GTGGTTCTTC ATACCCTCAT TGAGTCTGGG 1740  
GAGCTAAGTT ATCAAGAAAG TCTCCACTGT GTTCAA ACTG CTTTTCATAT TCTTTCTGGA 1800  
CAAGGTGATG TTTTAAATAT TGACCCGATG AAATTCATA CACATCTCTA CAAGACTG 1860  
TTCACATTAC ATGCAGGTGC CACCAACGAC GGCATTGAGA TTGTGCTCCA CTGCCTCGAT 1920  
GTCATGCTAA GCAAGCGCAG AAAGCAGGTT TCTCATCAGC GAGCTCTTGC CTTCATCAA 1980  
CGCCTTTGTA CACTTGCTCT GCAGGTTCTT CCAAATCAA GCATTGGCCT TTTAGCAACT 2040  
ACCAGGATAT TGATGCATAC TTTTCCAGA ACAGATCTCT TGCTTGATAA CGAGTCTCAG 2100  
GGCAGCGGGG TGTTTCTACC TGAGCTGGAG GAGCCAGAGT ACTGTAATGC ACAGAACACC 2160  
GCACTGTGGG AGCTGCACAC GCTTCGGAGA CATTACCATC CCATTGTGCG AAGGTTTGCA 2220  
GCACATCTGC TTGCTGGGGC ACCATCCGAA GGCTCTGAGG CCCTCAAGCC CGAGCTGAGC 2280  
CGAAGATCTG CAGTTGAACT TTTTGAGACT TACAGCATGG CAGCAATGAC ATTCAATCCG 2340  
CCTGTTGAAT CTTCACACTC CAAAAGGAAG GATAAATTTT TACCAGGAGA CTCATTTTTG 2400

AATGAAGATT TAAATCAACT AATCAAAAGA TACTGTAATG AAGCTGCTCC TGAGACACCG 2460  
 CTGGATTTTCG CCAAGTGTTT GGAAAGCTCA TCCCGGCAGT ACAGAGTGAA TGGACTGTCT 2520  
 TAGATATCTG CATGTGCATG GCAGAGACAC AAGGATATGT GAGGGCCTGT TTCTGTTTGT 2580  
 ACAAGGAAGA CTTCCCTAAGA ATGATTGAGA ACTGGAGCAG GGCCACAGAA GACCCTGCTC 2640  
 ATTGGCTTGC TTTTCATGCC TTGCTCGGCC TAGCCTTTTT ATACAGTCCA CACCAACTTG 2700  
 TCCAGGAATG GCACTGCCCA TCAGTCATGA AATCTACAAA TGCCCTGCAG ACATGCCATA 2760  
 GTCTAGTCTG TGGAGGCAGT CC 2782

<210> 2

<211> 807

<212> PRT

<213> Mouce

<400> 2

Met Lys Ala Arg Arg Asn Lys Lys Gln Val Pro Ser Phe Arg Lys Leu  
 1 5 10 15  
 Ile Lys Thr Ser Lys Val Lys Leu Glu Asn Lys Leu Lys Asn Lys Gln  
 20 25 30  
 Phe Lys Gln Gln Ser Thr Ile Lys Lys Tyr Arg Lys Glu Gln Arg Lys  
 35 40 45  
 Leu Arg Gln Ala Val Lys Asp Ala Val Ser Lys Lys Pro Ile Pro Leu  
 50 55 60  
 Glu Asp Pro Lys Ser Lys Arg Pro Val Lys Arg Met Glu Arg Glu Glu  
 65 70 75 80  
 Asp Glu Glu Glu Glu Ala Leu Pro Leu Asp Met Met Asp Glu Asp Asp  
 85 90 95  
 Leu Gln Leu Met Lys Asp Leu Gly Gln Lys Ala Ser Phe Leu Thr Arg  
 100 105 110

Asp Leu Ser Ser Ser Glu Pro Val His Ile Lys Lys Arg Lys His Glu  
 115 120 125  
 Ser Val Ile Glu Lys Tyr Glu Lys Val Pro Arg Thr Leu Gln Thr Ala  
 130 135 140  
 Pro Glu Lys Glu Leu Ile His Leu Leu Pro Ile Lys Asp Lys Ser Gly  
 145 150 155 160  
 Ile Ile Pro Gln Ala Arg Glu Lys Pro Val Thr Asp Leu Gln Gln Glu  
 165 170 175  
 Glu Glu Ala Glu Glu Glu Leu Glu Asp Glu Glu Glu Val Ile Glu Asp  
 180 185 190  
 Pro Arg Lys Glu Leu Thr Ile Glu Glu His Val Ile Glu Arg Lys Lys  
 195 200 205  
 Lys Leu Gln Asp Lys Lys Ile Gln Ile Ala Ala Leu Ala Ser Ala Ile  
 210 215 220  
 Leu Ser Asp Pro Glu Ser His Ile Lys Lys Leu Lys Glu Leu Arg Ser  
 225 230 235 240  
 Met Leu Met Glu Gln Asp Pro Asp Val Ala Val Thr Val Arg Lys Leu  
 245 250 255  
 Val Ile Ile Ser Leu Met Glu Leu Phe Lys Asp Ile Thr Pro Ser Tyr  
 260 265 270  
 Lys Ile Arg Pro Leu Thr Glu Ala Glu Lys Ser Thr Lys Ile Arg Lys  
 275 280 285  
 Glu Thr Gln Lys Leu Arg Glu Phe Glu Glu Gly Leu Val Ser Gln Tyr  
 290 295 300  
 Lys Phe Tyr Leu Glu Asn Leu Glu Gln Ile Val Lys Asp Trp Lys Gln  
 305 310 315 320  
 Arg Lys Leu Lys Lys Ser Asn Val Val Ser Leu Lys Ala Tyr Lys Gly

|     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|
|     | 325 | 330 | 335 |
| Leu | Ala | Glu | Val |
| Ala | Val | Lys | Ser |
| Leu | Cys | Glu | Leu |
| Leu | Val | Ala | Leu |
|     | 340 | 345 | 350 |
| Pro | His | Phe | Asn |
| Phe | His | Asn | Asn |
| Ile | Ile | Val | Leu |
| Ile | Val | Pro | Leu |
|     | 355 | 360 | 365 |
| Met | Asn | Asp | Gly |
| Ser | Lys | Pro | Val |
| Ser | Glu | Met | Cys |
| Cys | Glu | Ala | Val |
|     | 370 | 375 | 380 |
| Lys | Lys | Leu | Phe |
| Lys | Gln | Asp | Lys |
| Leu | Gly | Gln | Ala |
| Ser | Leu | Gly | Val |
|     | 385 | 390 | 395 |
| Ile | Lys | Val | Ile |
| Ser | Gly | Phe | Val |
| Lys | Gly | Arg | Asn |
| Tyr | Glu | Val | Arg |
|     | 405 | 410 | 415 |
| Pro | Glu | Met | Leu |
| Lys | Thr | Phe | Leu |
| Cys | Leu | Arg | Ile |
| Lys | Glu | Val | Glu |
|     | 420 | 425 | 430 |
| Val | Lys | Lys | Asp |
| Thr | Glu | Asp | Ile |
| Asn | Lys | Pro | Lys |
| Arg | Phe | Met | Thr |
|     | 435 | 440 | 445 |
| Phe | Lys | Glu | Lys |
| Arg | Lys | Thr | Leu |
| Ser | Arg | Met | Gln |
| Arg | Lys | Trp | Lys |
|     | 450 | 455 | 460 |
| Lys | Ala | Glu | Glu |
| Lys | Leu | Glu | Arg |
| Glu | Leu | Arg | Glu |
| Ala | Glu | Ala | Ser |
|     | 465 | 470 | 475 |
| Glu | Ser | Thr | Glu |
| Lys | Lys | Leu | Lys |
| Leu | His | Thr | Glu |
| Thr | Leu | Asn | Ile |
|     | 485 | 490 | 495 |
| Val | Phe | Val | Thr |
| Tyr | Phe | Arg | Ile |
| Leu | Lys | Lys | Ala |
| Gln | Lys | Ser | Pro |
|     | 500 | 505 | 510 |
| Leu | Leu | Pro | Ala |
| Val | Leu | Glu | Gly |
| Leu | Ala | Lys | Phe |
| Ala | His | Leu | Ile |
|     | 515 | 520 | 525 |
| Asn | Val | Glu | Phe |
| Phe | Asp | Asp | Leu |
| Leu | Val | Val | Leu |
| His | Thr | Leu | Ile |
|     | 530 | 535 | 540 |





CAGATCCCAA GCTTTCGC 18

<210> 6

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 6

AGCAAACCTTG GCAAGACC 18

<210> 7

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 7

AAGAAGGCC AGAGGTCA 18

<210> 8

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 8

GTCCACTGAC TTCATTCC 18

<210> 9

<211> 2451

<212> DNA/RNA

<213> Human being

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; cDNA to mRNA

&lt;400&gt; 9

GCCGGCATTTC ATTTAAGGCC TAAGGATGAA GCGGAGAAGA AATAAAAAAC AGATCCCAAG 60  
CTTTCGCAAG TTAATAAAAA CTAGTAAAGT CAAACTTGAA AACAAGCTAA AAAATAAGCA 120  
GTTTAAACAA CAAAGCACTC TCAAGAAGTA CCGAAAAGAA CAGAGGAAAC TAAGGCAAGC 180  
TGTGAAAGAT GCTGTGTCTA AGAAACCCAT TCCATTGGAG AACCCAAAGG AAAAGCGACC 240  
AGGTAAAAGG ATTGAGAGGG AAGAAGAGGA AGAAGAAGAA GCCCTTCCTT TAGATATGAT 300  
GGATGAAGAT GACTTACAGT TAATGAAGGA TTTAGGACAA AGAGTATCTT TTCTAACAAG 360  
AGATCTTTCT TCTAGTGAGC CTGTTTCATGC GAAGAAACGG AAGCATGAAC GCATTATAGA 420  
TAAATATGAA AAAATACCAA GAACTCTGCA AACTGCACCA GAGAAGGAAC TGATTCAATTT 480  
ACTTCCTATC AAAGATAAAA GTGGTATAAT CCCACAGACT AGGGAGAAGC CAGTTACTGA 540  
TAGTAACAAA GATGAAGAGG ATCAAGAAGA AGAGAGGGAA CTTGAGGAAG AGATCATTGA 600  
AGATCCTATT CAAGAGCTGA CCATAGAAGA ACATTTGATT GAGAGAAAGA AGAAATTACA 660  
GGAGAAGAAG ATGCATATTG CAGCCTTGGC ATCTGCCATA TTATCAGATC CAGAAAATAA 720  
TATTAATAAAA TTGAAAGAAT TACGTTCTAT GTTGATGGAA CAAGATCCTG ATGTGGCTGT 780  
TACTGTTCGA AAGCTGGTAA TTGTTTCTCT GATGCAGTTA TTTAAAGATA TTACTCCTTC 840  
ATATAAAATC CGGCCCTCA CAGAAGCAGA AAAATCTACT AAGACCCGAA AAGAAACCCA 900  
GAAGTTAAGA GAATTTGAAG AAGGCCTGGT TAGCCAATAC AAGTTTTATT TGGAAAATCT 960  
GGAACAAATG GTTAAAGATT GGAAGCAGAG GAAGCTGAAG AAAAGTAATG TAGTTTCCTT 1020  
AAAGGCATAC AAAGGACTGG CAGAAGTCGC TGTGAAGAGC TTGTGTGAGC TGTTGGTGGC 1080  
ACTACCTCAT TTAACTTTC ACAACAACAT CATCGTATTG ATTGTCCCTC TCATGAATGA 1140  
CATGTCAAAA TTGATATCTG AAATGTGTTG TGAAGCTGTG AAGAACTCT TTAAGCAAGA 1200  
TAAATTAGGC CAGGCTTCTC TTGGTGTAAT TAAAGTGATT TCTGGTTTTG TGAAGGGCAG 1260  
AAATTACGAAG TTAGGCCAG AGATGTTAAA AACATTTTTA TGCCTAAGAA TCAAGGAAGT 1320  
AGAAGTGAAAA AAGATACAG AAGACATTAA TAAACCAAAA AAATTTATGA CTTTCAAAGA 1380

AAAGAGAAAAT CTCTATCAA GAATGCAGAG AAAGTGGAAG AAAGCAGAAG AGAAACTAGA 1440  
 GCGAGAGCTTC GAGAGGCAG AAGCTTCAGA GAGTACTGAG AAAAACTTA AACTGCACAC 1500  
 AGAGACTCTGA ATATTGTGT TTGTAACCTA CTTCAGAATA TTGAAGAAGG CCCAGAGGTC 1560  
 ACCTCTCCTGC CAGCAGTTC TAGAAGGTCT TGCCAAGTTF GCTCACCTTA TAAATGTGGA 1620  
 ATTTTTTGATG ATCTGTTAG TAGTTCTTCA TACTCTCATT GAGTCTGGTG ACCTAAGCTA 1680  
 TCAAGAAAGTC TTCACTGTG TCCAGACTGC TTTTCATATT CTTTCTGGAC AAGGTGATGT 1740  
 TCTGAATATTG ATCCATTGA AATTCTACAC ACATCTCTAC AAAACACTGT TCAAATTACA 1800  
 TGCAGGTGCTA CCAATGAAG GTGTTGAGAT TGTA CTCCAG TGCCTTGATG TCATGCTAAC 1860  
 TAAGCGCAGAA AGCAAGTTT CTCAGCAGCG AGCTCTTGCC TTCATCAAAC GCCTTTGTAC 1920  
 CCTTGCTCTTC ATGTTCTTC CAAATTCAAG TATTGGCATT TTAGCAACTA CCAGAATATT 1980  
 AATGCATACTT TCCCCAAAA CAGATCTACT GCTTGACAGT GAATCTCAGG GAAGTGGAGT 2040  
 TTTCTTCTCTG AACTGGATG AGCCTGAGTA CTGCAATGCT CAGAACACTG CTCTGTGGGA 2100  
 ACTGCATGCTC TGCGGAGGC ATTATCATCC CATAGTGCAG AGATTTGCAG CCCACCTGAT 2160  
 CGCTGGAGCAC CTTCTGAAG GCTCTGGAGC ACTCAAACCA GAGTTGAGTC GAAGATCTGC 2220  
 TACTGAACTTT TTGAGGCAT ATAGCATGGC AGAAATGACA TTCAATCCTC CTGTTGAATC 2280  
 TTCAAACCCCA AAATAAAGG GTAAATTTTT ACAAGGGGAT TCATTTTTGA ATGAAGATTT 2340  
 AAATCAGCTAA TCAAAAGAT ACTCCAGTGA AGTTGCTACT GAATCGCCTC TGGATTTTAC 2400  
 GAAATATTTGA AAACATCAC TACTACTAGTA GAGGAATGAA GTCAGTGGAC T 2451

<210> 10

<211> 800

<212> PRT

<213> Human being

<400> 10

Met Lys Ala Arg Arg Asn Lys Lys Gln Ile Pro Ser Phe Arg Lys Leu

1

5

10

15

Ile Lys Thr Ser Lys Val Lys Leu Glu Asn Lys Leu Lys Asn Lys Gln



Ser Met Leu Met Glu Gln Asp Pro Asp Val Ala Val Thr Val Arg Lys  
                           245                          250                          255  
 Leu Val Ile Val Ser Leu Met Glu Leu Phe Lys Asp Ile Thr Pro Ser  
                           260                          265                          270  
 Tyr Lys Ile Arg Pro Leu Thr Glu Ala Glu Lys Ser Thr Lys Thr Arg  
                           275                          280                          285  
 Lys Glu Thr Gln Lys Leu Arg Glu Phe Glu Glu Gly Leu Val Ser Gln  
                           290                          295                          300  
 Tyr Lys Phe Tyr Leu Glu Asn Leu Glu Gln Met Val Lys Asp Trp Lys  
 305                          310                          315                          320  
 Gln Arg Lys Leu Lys Lys Ser Asn Val Val Ser Leu Lys Ala Tyr Lys  
                           325                          330                          335  
 Gly Leu Ala Glu Val Ala Val Lys Ser Leu Cys Glu Leu Leu Val Ala  
                           340                          345                          350  
 Leu Pro His Phe Asn Phe His Asn Asn Ile Ile Val Leu Ile Val Pro  
                           355                          360                          365  
 Leu Met Asn Asp Met Ser Lys Leu Ile Ser Glu Met Cys Cys Glu Ala  
                           370                          375                          380  
 Val Lys Lys Leu Phe Lys Gln Asp Lys Leu Gly Gln Ala Ser Leu Gly  
 385                          390                          395                          400  
 Val Ile Lys Val Ile Ser Gly Phe Val Lys Gly Arg Asn Tyr Glu Val  
                           405                          410                          415  
 Arg Pro Glu Met Leu Lys Thr Phe Leu Cys Leu Arg Ile Lys Glu Val  
                           420                          425                          430  
 Glu Val Lys Lys Asp Thr Glu Asp Ile Asn Lys Pro Lys Lys Phe Met  
                           435                          440                          445  
 Thr Phe Lys Glu Lys Arg Lys Ser Leu Ser Arg Met Gln Arg Lys Trp

|   |     |     |
|---|-----|-----|
| 450   | 455 | 460 |
| Lys Lys Ala Glu Glu Lys Leu Glu Arg Glu Leu Arg Glu Ala Glu Ala |     |     |
| 465   | 470 | 475 |
| Ser Glu Ser Thr Glu Lys Lys Leu Lys Leu His Thr Glu Thr Leu Asn |     |     |
|   | 485 | 490 |
| Ile Val Phe Val Thr Tyr Phe Arg Ile Leu Lys Lys Ala Gln Arg Ser |     |     |
|   | 500 | 505 |
| Pro Leu Leu Pro Ala Val Leu Glu Gly Leu Ala Lys Phe Ala His Leu |     |     |
|   | 515 | 520 |
| Ile Asn Val Glu Phe Phe Asp Asp Leu Leu Val Val Leu His Thr Leu |     |     |
|   | 530 | 535 |
| Ile Glu Ser Gly Asp Leu Ser Tyr Gln Glu Ser Leu His Cys Val Gln |     |     |
| 545   | 550 | 555 |
| Thr Ala Phe His Ile Leu Ser Gly Gln Gly Asp Val Leu Asn Ile Asp |     |     |
|   | 565 | 570 |
| Pro Leu Lys Phe Tyr Thr His Leu Tyr Lys Thr Leu Phe Lys Leu His |     |     |
|   | 580 | 585 |
| Ala Gly Ala Thr Asn Glu Gly Val Glu Ile Val Leu Gln Cys Leu Asp |     |     |
|   | 595 | 600 |
| Val Met Leu Thr Lys Arg Arg Lys Gln Val Ser Gln Gln Arg Ala Leu |     |     |
|   | 610 | 615 |
| Ala Phe Ile Lys Arg Leu Cys Thr Leu Ala Leu His Val Leu Pro Asn |     |     |
| 625   | 630 | 635 |
| Ser Ser Ile Gly Ile Leu Ala Thr Thr Arg Ile Leu Met His Thr Phe |     |     |
|   | 645 | 650 |
| Pro Lys Thr Asp Leu Leu Leu Asp Ser Glu Ser Gln Gly Ser Gly Val |     |     |
|   | 660 | 665 |
|   |     | 670 |

Phe Leu Pro Glu Leu Asp Glu Pro Glu Tyr Cys Asn Ala Gln Asn Thr  
                   675                                  680                                  685  
 Ala Leu Trp Glu Leu His Ala Leu Arg Arg His Tyr His Pro Ile Val  
                   690                                  695                                  700  
 Gln Arg Phe Ala Ala His Leu Ile Ala Gly Ala Pro Ser Glu Gly Ser  
 705                                  710                                  715                                  720  
 Gly Ala Leu Lys Pro Glu Leu Ser Arg Arg Ser Ala Thr Glu Leu Phe  
                                   725                                  730                                  735  
 Glu Ala Tyr Ser Met Ala Glu Met Thr Phe Asn Pro Pro Val Glu Ser  
                   740                                  745                                  750  
 Ser Asn Pro Lys Ile Lys Gly Lys Phe Leu Gln Gly Asp Ser Phe Leu  
                   755                                  760                                  765  
 Asn Glu Asp Leu Asn Gln Leu Ile Lys Arg Tyr Ser Ser Glu Val Ala  
                   770                                  775                                  780  
 Thr Glu Ser Pro Leu Asp Phe Thr Lys Tyr Leu Lys Thr Ser Leu His  
 785                                  790                                  795                                  800

<210> 11

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 11

CGCAGGCCTA AGGATCAAGG CG 12

<210> 12

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 12

CAGGGTCTTC TGTGGCCCTG CTCC 14

<210> 13

<211> 17

<212> PRT

<213> Mouce

<400> 13

Lys Asp Ile Thr Pro Ser Tyr Lys Ile Arg Pro Leu Thr Glu Ala Glu Lys

1

5

10

15

<210> 14

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 14

Cys Lys Asp Ile Thr Pro Ser Tyr Lys Ile Arg Pro Leu Thr Glu Ala Glu Lys

1

5

10

15

<210> 15

<211> 21

<212> PRT

<213> Mouce

<400> 15

Leu Arg Ile Lys Glu Val Glu Val Lys Lys Asp Thr Glu Asp Ile Asn Lys Pro

1

5

10

15

Lys Arg Phe

20

<210> 16

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 16

Cys Leu Arg Ile Lys Glu Val Glu Val Lys Lys Asp Thr Glu Asp Ile Asn Lys

1

5

10

15

Pro Lys Arg Phe

20

<210> 17

<211> 16

<212> PRT

<213> Mouce

<400> 17

Glu Ser Ser His Ser Lys Arg Lys Asp Lys Phe Leu Pro Gly Asp Ser

1

5

10

15

<210> 18

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 18

Cys Glu Ser Ser His Ser Lys Arg Lys Asp Lys Phe Leu Pro Gly Asp Ser

1

5

10

15

&lt;210&gt; 19

&lt;211&gt; 14

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mouce

&lt;400&gt; 19

Glu Val Ser Gly Glu Asp Ser Glu Glu Lys Asp Asn Arg Lys

1

5

10

&lt;210&gt; 20

&lt;211&gt; 13

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mouce

&lt;400&gt; 20

Glu Thr Gly Ile Asp Asp Ile Pro Asp Val Lys Asn Asp

1

5

10

## 【図面の簡単な説明】

図1は、クローン24マウスcDNAの略図、及びサブトラクション法で得られたDNA断片Suの情報を元にした、クローン24の塩基配列の決定のサブクロニングを示す。図2は、クローン24より調製した標識プローブは、分化誘導開始6時間目をピークとして、3時間目から12時間目の細胞から調製したmRNAは反応することを示すオートラジオグラムである。

図3(c)は、細胞内に発現したクローン24のGFPを示す顕微鏡写真である。図3(a)は対照として細胞全体を写した顕微鏡写真である。図3(b)はDAPI法により細胞質内の核のみを染色した顕微鏡写真である。

図4は、クローン24ポリペプチドの模式図であり、該配列中において、ロイシンジッパー構造と考えられる配列部位を特に示す。

図5は、クローン24過剰発現NIH/3T3細胞のオートラジオグラフィーを示す。

図6は、クローン24ヒトホモログcDNAの略図を示す。

図7は、分化誘導後8日目のクローン24過剰発現NIH/3T3細胞及びコントロール細胞のOil-Red-O染色の結果を示す。

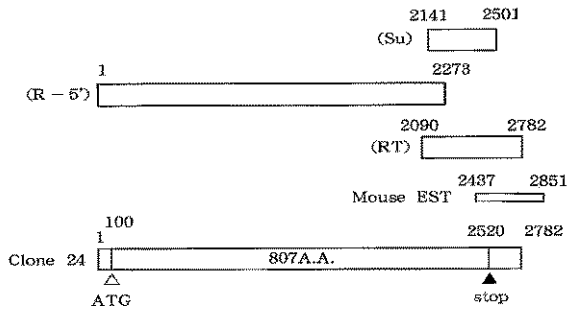
図8は、クローン24に対する抗体を確認するために、クローン24タンパク質を構成する一部のペプチドであるPEPTIDE 4、PEPTIDE 8、PEPTIDE 8を各々免疫して得た各抗体は、各ペプチドを固相化したモジュールに反応することを示すグラフである。

30

40

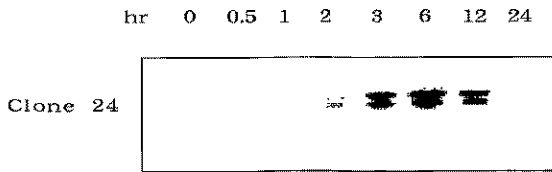
【図1】

図 1



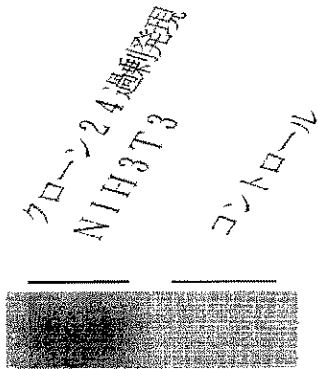
【図2】

図 2



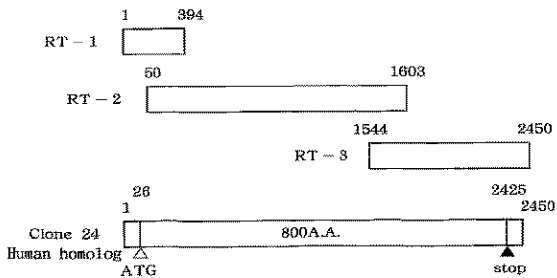
【図5】

図 5



【図6】

図 6



【図3】

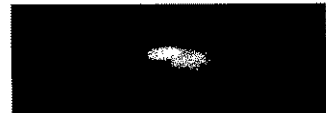
図 3

クローン 2 4

(a) 細胞全体



(b) DAPI

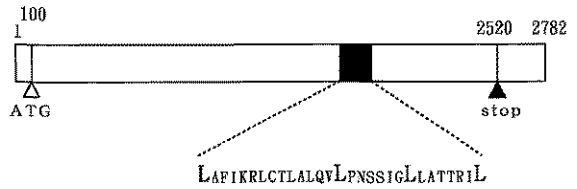


(c) GFP



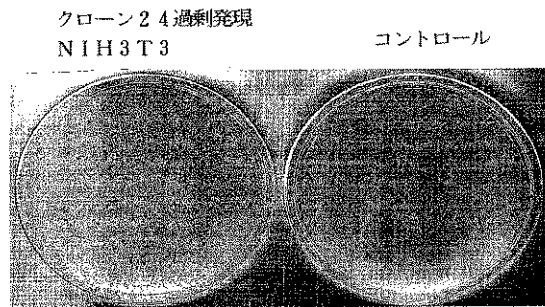
【図4】

図 4

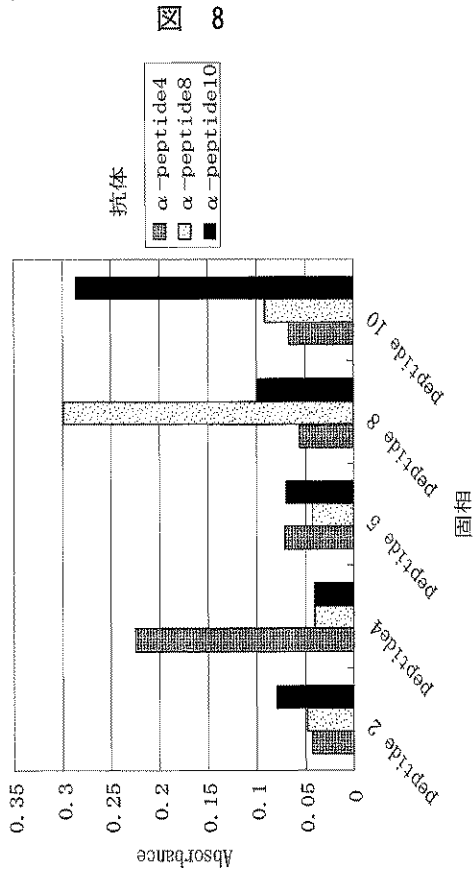


【図7】

図 7



【 図 8 】



【 手続補正書 】

【 提出日 】 平成 16 年 6 月 22 日 (2004.6.22)

【 手続補正 1 】

【 補正対象書類名 】 明細書

【 補正対象項目名 】 全文

【 補正方法 】 変更

【 補正の内容 】

【 発明の詳細な説明 】

【 技術分野 】

【 0 0 0 1 】

本発明は、脂肪細胞分化の初期に発現するクローン 2 4 ポリヌクレオチド及びクローン 2 4 タンパク質に関し、さらには該クローン 2 4 タンパク質の抗体、アンタゴニスト、アゴニスト、およびこれらの製造、並びにこれらの物質を含有する医薬および診断薬に関する。

【 背景技術 】

【 0 0 0 2 】

栄養過剰による肥満は、糖尿病・高血圧・動脈硬化などの深刻な生活習慣病の最大の要因となっている。今後の生命科学・健康科学を考えるうえで、肥満の分子機構を解明することは必須の課題といえる。肥満に直接関わるのは脂肪細胞であり、脂肪細胞生成過程が解明されれば肥満の治療に直結する。近年の分子生物学の発展に伴い、脂肪細胞分化の機構が解明されつつある。そこにはキーとなる遺伝子群が存在し、これらが巧妙に情報をやり取りするネットワークを形成していることが知られている。

【 0 0 0 3 】

脂肪細胞分化過程は複雑なステップより成り、脂肪芽細胞 ( Adipoblast ) 前駆脂肪細胞 ( Preadipocyte ) 脂肪細胞 ( Adipocyte ) へ分化す

る。培養細胞や遺伝子改変個体を用いた系などにより脂肪細胞分化に密接に関与する転写因子が、近年、明らかになりつつある。

【0004】

P P A R (Peroxisome Proliferator Activated Receptor, ペルオキシソーム増殖剤応答性レセプター)、C / E B P (CCAAT / Enhancer Binding Protein)ファミリー、及びS R E B P - 1 / A D D 1 (Sterol Regulatory Element Binding Protein 1 または Adipocyte Determination and Differentiation dependent Factor 1)は脂肪細胞の分化に最も重要な転写因子といわれている。

【0005】

P P A Rは、ファミリーを形成していることが明らかにされ、その中でもP P A Rは脂肪細胞分化に特に重要であることが明らかになっている。すなわち、脂肪芽細胞や前駆脂肪細胞において、P P A Rを強制的に発現させると脂肪細胞に分化することが明らかになっている。この結果は、P P A Rが脂肪細胞の分化に重要な役割を担っていることを証明していると言える。

10

【0006】

C / E B PもP P A Rと同様にファミリーを形成しており、最近になって、C / E B PがP P A Rと同じように脂肪細胞分化のマスターレギュレーターとして機能していることが明らかにされている。また、C / E B PとC / E B Pは分化の初期に発現し、C / E B PとP P A Rの発現を制御していると考えられている。

【0007】

S R E B P 1 / A D D 1は、脂肪細胞の分化を促進することが知られている一方、脂肪細胞の分化過程においてP P A Rのリガンド生成に関わっていることも明らかにされている。

20

前記3種類の転写因子群(P P A R、C / E B P、S R E B P 1 / A D D 1)が、クロストークすることにより分化過程が進行することが明らかになっている。

【0008】

前記3種類の転写因子群は、脂肪細胞の分化の比較的初期から発現が上昇することが明らかにされており、複数の標的遺伝子の発現を制御するマスターレギュレーターと考えられている。これらの転写因子群を発現時期の面から見ると、C / E B PとC / E B Pにおいて比較的初期に発現が増加することが知られている。しかし、前駆脂肪細胞より脂肪細胞へ分化する最も初期に、即ち、分化開始から半日(12時間)以内に、どのような遺伝子が活性化されているかについてはほとんど明らかにされていない。

30

【0009】

前駆脂肪細胞より脂肪細胞へ分化する最も初期、即ち、分化開始12時間以内に活性化される遺伝子の発現の有無、その程度、遺伝子産物としてのタンパク質の有無、その量、発現している場所の特定、また、遺伝子の変異を分析することは、肥満のメカニズムを解明し、さらに肥満の進行状況を適切に把握し、肥満の予防あるいは治療に役立たせる上で極めて重要な要素となりうる。そのために、この遺伝子の特定ならびにこの遺伝子産物であるタンパク質を特定し、こうした遺伝子あるいはタンパク質を検出、あるいは測定することが望まれる。

40

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

そこで本発明は、前駆脂肪細胞より脂肪細胞へ分化開始12時間以内に活性化される遺伝子を見出し、該遺伝子を含むベクター、該ベクターを保持する形質転換体、該形質転換体から生産されるタンパク質、該タンパク質に特異的な抗体、該タンパク質の製造方法、該タンパク質に対するアゴニストまたはアンタゴニスト、これらの化合物を含む医薬、診断薬を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0011】

50

本発明は、上記課題を解決するために鋭意研究を行った結果、前駆脂肪培養細胞株として周知のマウス 3T3-L1 細胞 (ATCC No. CCL-92.1.) を用い、分化の最も初期の過程で遺伝子の発現の変動を解析するために、脂肪細胞分化誘導前と誘導 3 時間後においてサブトラクション法によるクローニングを行った。その結果、100 近いクローンが、脂肪細胞分化誘導開始後 12 時間以内に脂肪細胞分化を促進するタンパク質の発現が上昇し、脂肪細胞分化誘導開始後 12 時間以内に活性化される遺伝子として得られたが、そのうち、特に発現が優れた遺伝子として配列番号 1 で表される塩基配列のポリヌクレオチドが得られた。配列番号 1 で表されるポリヌクレオチドの塩基配列は、マウスの脂肪細胞分化の初期、即ち、脂肪細胞分化誘導前と誘導 3 時間後に発現する cDNA により決定された。該ポリヌクレオチドをマウスのクローン 24 ヌクレオチドと呼ぶ。

10

**【0012】**

即ち、本発明のポリヌクレオチドは、脂肪細胞分化を促進する機能を有し且つ脂肪細胞分化誘導開始後 12 時間以内に活性化される性質を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチドである。

本明細書において、活性化とは、発現することあるいは発現が亢進することを意味する。

**【0013】**

配列番号 1 で表される塩基配列と同一性を有する塩基配列を含むポリヌクレオチド、または該ポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチドを <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> において検索したところ、機能が全く記載されていないチャイニーズハムスター由来の mRNA の配列が該当し、アクセッション番号が AF371372 で、2794 bp の長さで登録されていることが分かった。配列番号 1 で表される塩基配列と該チャイニーズハムスター由来の mRNA の塩基配列との同一性は 88.12% であり、また、配列番号 1 で表される塩基配列における開始コドンから終始コドンまで (塩基配列の番号 100 から 2520 まで) と前記公知のチャイニーズハムスターの ORF の配列の同一性は、91.72% である。

20

**【0014】**

本発明のポリヌクレオチドは、好ましくは、配列番号 1 で表される塩基配列と同一、もしくは少なくとも 93%、95% または 98% の同一性を有する塩基配列を含むポリヌクレオチドまたは該ポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチドであって、脂肪細胞分化誘導開始後 12 時間以内に活性化される脂肪細胞分化を促進するタンパク質をコードし、且つ、脂肪細胞分化誘導開始後 12 時間以内に活性化されるポリヌクレオチドである。

30

**【0015】**

また、本発明のポリヌクレオチドは、配列番号 1 で表される塩基配列の番号 100 から 2520 にわたり同一もしくは少なくとも 93%、95% または 98% の同一性を有する塩基配列を含むポリヌクレオチドまたは該ポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチドであって、脂肪細胞分化誘導開始後 12 時間以内に活性化し且つ脂肪細胞分化を促進する機能を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチドである。

**【0016】**

配列番号 1 で表されるマウスの塩基配列のポリヌクレオチドに基づき、新規な塩基配列のヒトのポリヌクレオチドがヒトホモログのクローニングにより決定されたので、該塩基配列を配列番号 9 に示す。

40

**【0017】**

即ち、本発明のヒトのポリヌクレオチドは、配列番号 9 で表される塩基配列を含むポリヌクレオチドまたは該ポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチドであって、脂肪細胞分化を促進する機能を有し且つ脂肪細胞分化誘導開始後 12 時間以内に活性化される性質を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチドであり、例えば、cDNA が挙げられる。該ポリヌクレオチドをヒトのクローン 24 ヌクレオチドと呼ぶ。

**【0018】**

また、本発明のヒトのポリヌクレオチドは、配列番号 9 で表される塩基配列の番号 26

50

から 2 4 2 5 を含むポリヌクレオチドまたは該ポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチドであって、脂肪細胞分化を促進する機能を有し且つ脂肪細胞分化誘導開始後 1 2 時間以内に活性化される性質を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチドである。

【 0 0 1 9 】

配列番号 1 で表されるマウスのクローン 2 4 ポリヌクレオチドと配列番号 9 で表されるヒトのクローン 2 4 ポリヌクレオチドとの一致率は、2 0 8 9 / 2 4 4 4 (mouse vs human)、即ち、8 5 . 4 7 %となる。

【 0 0 2 0 】

前記チャイニーズハムスター由来の mRNA の配列と配列番号 9 で表される塩基配列のヒトポリヌクレオチドの相同性は 8 7 . 3 6 %であり、また、配列番号 9 で表される塩基配列のヒトポリヌクレオチドにおける開始コドンから終始コドンまで (塩基配列の番号 2 6 から 2 4 2 5 まで) と前記公知のチャイニーズハムスターの ORF の配列の相同性は、8 7 . 5 3 %である。

【 0 0 2 1 】

配列番号 9 の観点から、本発明のポリヌクレオチドは、前記公知のチャイニーズハムスターの ORF の配列の相同性 ( 8 7 . 3 6 % ) の関係から、本発明のポリヌクレオチドは、配列番号 9 で表される塩基配列と同一もしくは少なくとも 8 9 %、9 1 %または 9 3 %の相同性を有する塩基配列を含むポリヌクレオチドまたは該ポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチドも含む。

【 0 0 2 2 】

前記配列番号 9 で表されるヒトポリヌクレオチドにおける開始コドンから終始コドンまで (塩基配列の番号 2 6 から 2 4 2 5 まで) と前記公知のチャイニーズハムスターの ORF の配列の相同性 ( 8 7 . 5 3 % ) の関係から、本発明のポリヌクレオチドは、配列番号 9 で表される塩基配列の番号 2 6 から 2 4 2 5 にわたり同一もしくは少なくとも 8 9 %、9 1 %または 9 3 %の相同性を有する塩基配列を含むポリヌクレオチドまたは該ポリヌクレオチドに相補的な配列のポリヌクレオチドを含む。

【 0 0 2 3 】

本発明の上記各ポリヌクレオチドは、脂肪細胞分化誘導開始後 1 2 時間以内、特に 6 時間前後のマウスの細胞、ヒトの細胞、その他の動物の細胞から抽出することができる。また、ゲノム DNA、細胞・組織由来の cDNA、細胞・組織由来の cDNA ライブラリー、合成 DNA の何れからでも本発明のポリヌクレオチドを得ることができる。本発明の「ポリヌクレオチド」には、DNA または RNA がある。

【 0 0 2 4 】

本明細書で単に「クローン」と呼ぶ場合には、クローン 2 4 ヌクレオチド又はクローン 2 4 ポリヌクレオチドを意味することがある。

【 0 0 2 5 】

本発明のタンパク質は、脂肪細胞分化誘導開始後 1 2 時間以内、特に 6 時間前後に活性化されるタンパク質であって、脂肪細胞分化を促進するタンパク質である。

【 0 0 2 6 】

本発明のタンパク質は、好ましくは、下記配列番号 2 で表されるタンパク質のアミノ酸配列の全長にわたり少なくとも 9 6 %、9 8 %または 1 0 0 %の相同性を有するアミノ酸配列を含むタンパク質である。さらに好ましくは、本発明のタンパク質は、配列番号 1 で表されるポリヌクレオチドの塩基配列の番号 1 0 0 から 2 5 2 0 にわたり少なくとも 9 6 %、9 8 %または 1 0 0 %の相同性を有する塩基配列を含むポリヌクレオチドの遺伝子翻訳産物である。

【 0 0 2 7 】

下記配列番号 2 で表されるタンパク質のアミノ酸配列と 1 0 0 %の相同性を有するアミノ酸配列を含むタンパク質には、マウスの脂肪細胞分化の初期に活性化されるタンパク質が挙げられる。該タンパク質をマウスのクローン 2 4 タンパク質と呼ぶ。

【 0 0 2 8 】

また、本発明のヒトのタンパク質は、配列番号10で表されるアミノ酸配列を含むタンパク質である。本発明のヒトのタンパク質は、下記配列番号9で表されるポリヌクレオチドの塩基配列の番号26から2425を含むポリヌクレオチドの遺伝子翻訳産物である。本発明は配列番号10の観点から、配列番号10で表されるアミノ酸配列のタンパク質の全長にわたり少なくとも93%、95%または97%の相同性を有するアミノ酸配列を含むタンパク質またはその塩を含む。

#### 【0029】

下記配列番号10で表されるタンパク質は、ヒトの脂肪細胞分化誘導開始後12時間以内、特に、6時間前後に活性化されるタンパク質であって、脂肪細胞分化を促進するタンパク質である。該タンパク質をヒトのクローン24タンパク質と呼ぶ。

#### 【0030】

本発明のポリヌクレオチドは、脂肪細胞分化誘導開始後12時間以降に発現するタンパク質であるPPAR、C/EBP $\beta$ 、C/EBP $\delta$ 、SREBP-1の発現に関係し、特に、PPARの発現に密接に関係する。本発明のタンパク質は、PPARファミリーやC/EBPファミリー、SREBP-1/ADD1などの転写因子に直接的あるいは間接的に作用していると考えられるし、或いはこれ以外の経路を刺激している可能性も考えられる。

#### 【発明の効果】

#### 【0031】

本発明のポリヌクレオチドあるいは、該ポリヌクレオチドの遺伝子翻訳産物として生産されるタンパク質またはペプチドは、肥満、高血圧、高脂血症、糖尿病、動脈硬化による心臓病や脳卒中等から選ばれる生活習慣病の治療または診断に有用である。

#### 【発明を実施するための最良の形態】

#### 【0032】

##### 配列の相同性

本発明における相同性に関する記載において、例えば、「塩基配列と同一もしくは少なくとも93%の相同性」とする理由は、<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>にアクセス番号がAF371372で、2794bpの長さで登録されているチャニーズハムスター由来のmRNAの配列と、配列番号1で表される塩基配列との相同性は88.12%であり、また、配列番号1で表される塩基配列における開始コドンから終始コドンまで(塩基配列の番号100から2520まで)と前記公知のチャニーズハムスターのORFの配列の相同性は、91.72%であることから、該mRNAの配列を除外するためである。

#### 【0033】

また、本発明の別の発明において「塩基配列の全長にわたり相同性を少なくとも80%」とする理由は、マウスとヒトの間にはアミノ酸レベルで84%の相同性があることが既に報告されているからである[Y. Zhangら、Nature, 第372巻、第425頁(1994)、特開平8-333394号公報]。高血圧、糖尿病、肥満などの生活習慣病に関わる遺伝子群は相同性が動物間で80%以上保存されていることが分かっている(特開平11-75865号公報)ことから、本発明のポリヌクレオチドおよび本発明のタンパク質においてもヒトなどの霊長類、ウサギなどの齧歯類なども本配列を基本とし、相同性が80%以上を越えると考えることが妥当である。該妥当性は、前記したとおり、配列番号1で表されるマウスのクローン24ポリヌクレオチドと配列番号9で表されるヒトのクローン24ポリヌクレオチドとの一致率が、85.47%であることから実証される。

#### 【0034】

##### 本発明のポリヌクレオチドのクローニング

本発明のタンパク質をコードするポリヌクレオチドのクローニングの手段としては、例えば、本発明のタンパク質の部分塩基配列を有する合成DNAプライマーを用いてPCR法によって増幅するか、または適当なベクターに組み込んだDNAを本発明のタンパク質の一部あるいは全領域をコードするDNA断片もしくは合成DNAを用いて標識したもの

10

20

30

40

50

とのハイブリダイゼーションによって選別することができる。ハイブリダイゼーションの方法は、例えば、モレキュラー・クローニング (Molecular Cloning) 2nd (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。クローン化されたタンパク質をコードするDNAは目的によりそのまま、または所望により制限酵素で消化したり、リンカーを付加したりして使用することができる。該DNAはその5'末端側に翻訳開始コドンとしてのATGを有し、また3'末端側には翻訳終止コドンとしてのTAA、TGAまたはTAGを有していてもよい。これらの翻訳開始コドンや翻訳終止コドンは、適当な合成DNAアダプターを用いて付加することもできる。

10

## 【0035】

ポリヌクレオチドを発現させるベクター等

本発明のベクターは、配列番号1で表されるポリヌクレオチドと同一もしくは少なくとも93%の相同性を有する塩基配列を含むポリヌクレオチドまたは該ポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチドを含有させた組み換えベクターであり、好ましくは、配列番号1で表される塩基配列の番号100から2520の塩基配列を含むポリヌクレオチドを含有させた組み換えベクターである。

## 【0036】

また、ヒトの脂肪細胞分化に関するポリヌクレオチドを含有する本発明のベクターは、配列番号9で表される塩基配列を含むポリヌクレオチドまたは該ポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチドを含有させた組み換えベクターであり、好ましくは、配列番号9で表される塩基配列の番号26から2425の塩基配列を含むポリヌクレオチドまたは該ポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチドを含有させた組み換えベクターである。

20

## 【0037】

本発明のポリヌクレオチド配列を有するベクターは既知の方法で構築することが可能である。こうした目的に適したベクターは、本発明のポリヌクレオチドの挿入部位の上流にプロモーター領域を有する。このプロモーターは既知のものを使用することが可能であり、宿主細胞により選択することが可能である。例えば、宿主を大腸菌などの細菌にした場合は、lacプロモータ、trpプロモータ、T7プロモータ、tacプロモータ、PLプロモータなどを利用することが可能である。酵母を宿主とする場合には、GAPDHプロモータ、ADHプロモータ、PGKプロモータ、PH05プロモータなどが挙げられる。動物由来の細胞を宿主とした場合には、ヒトサイトメガロウイルスプロモータ、SV40ウイルス由来のプロモータ、EF-1プロモータ、アクチンプロモータ、メタロチオネインプロモータなどが挙げられる。本発明のポリヌクレオチドを発現するベクターにおける本発明のポリヌクレオチドの挿入部位下流には、転写終結シグナルがあることが望ましい。さらに、該ベクターには薬剤耐性マーカーなどの識別マーカーがあることが望ましい。

30

## 【0038】

宿主

本発明で使用可能な宿主には、例えば、エシェリヒア属菌、バチルス属菌、酵母、昆虫細胞、昆虫、動物細胞などを用いることができる。

40

## 【0039】

エシェリヒア属菌の具体例としては、*Escherichia coli* JM109 [ATCC 53323、東洋紡株式会社製]、JM103 [ヌクイレック・アシズ・リサーチ、(Nucleic Acids Research), 9巻, 309(1981)]、K12・DH1 [プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 60巻, 160(1968)]、JA221 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー (Journal of Molecular Biology)], 120巻, 517(1978)]、HB101 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー, 41巻, 459(1969)]、C600 [ジェネティクス (Genetics), 39

50

巻, 440(1954)]などが挙げられる。

【0040】

バチルス属菌としては、例えば、バチルス・サブチルス (*Bacillus subtilis*) M I 1 14 [ジーン, 24巻, 255(1983)], 207-21 [ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (Journal of Biochemistry), 95巻, 87(1984)]などが挙げられる。

【0041】

酵母としては、例えば、サッカロマイセスセレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) A H 2 2, A H 2 2 R, N A 8 7 - 1 1 A, D K D - 5 D, 2 0 B - 1 2、シゾサッカロマイセスポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*) N C Y C 1 9 1 3, N C Y C 2 0 3 6、サッカロマイセスピキアパストリス (*Saccharomyces picijapastoris*)などが挙げられる。

10

【0042】

昆虫細胞としては、例えば、ウイルスが A c N P V の場合は、夜盗蛾の幼虫由来株化細胞 (*Spodoptera frugiperda* cell; S f 細胞)、*Trichoplusia ni* の中腸由来の M G 1 細胞、*Trichoplusia ni* の卵由来の High Five<sup>TM</sup> 細胞、*Mamestra brassicae* 由来の細胞または *Estigmene acrea* 由来の細胞などが挙げられる。ウイルスが B m N P V の場合は、蚕由来株化細胞 (*Bombyx mori* N 細胞; B m N 細胞)などが挙げられる。該 S f 細胞としては、例えば、S f 9 細胞 (ATCC CRL1711)、S f 2 1 細胞 (以上、Vaughn, J.L.ら、イン・ヴィトロ (in Vitro), 13, 213 217, (1977))などが挙げられる。

20

【0043】

昆虫としては、例えば、カイコの幼虫などが挙げられる [前田ら、ネイチャー (Nature), 315巻, 592(1985)]。

動物細胞としては、例えば、サル細胞 C O S - 7, Vero, チャイニーズハムスター細胞 C H O (以下、C H O 細胞と略記), d h f r 遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞 C H O [略語: C H O (d h f r) 細胞], マウス L 細胞, マウス A t T - 2 0, マウスミエローマ細胞, ラット G H 3, ヒト F L 細胞などが用いられる。

【0044】

形質転換体の製造

本発明の形質転換体は、前記組み換えベクターを前記宿主に保持させたものである。

30

【0045】

エシェリヒア属菌を形質転換するには、例えば、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Nat. Acad. Sci. U S A), 69巻, 2110(1972) やジーン (Gene), 17巻, 107(1982)などに記載の方法に従って行なうことができる。

【0046】

バチルス属菌を形質転換するには、例えば、モレキュラー・アンド・ジェネラル・ジェネティクス (Molecular & General Genetics), 168巻, 111(1979)などに記載の方法に従って行なうことができる。

【0047】

酵母を形質転換するには、例えば、メソッズ・イン・エンザイモロジー (Methods in Enzymology), 194巻, 182-187(1991)、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. U S A), 75巻, 1929(1978)などに記載の方法に従って行なうことができる。

40

【0048】

昆虫細胞または昆虫を形質転換するには、例えば、バイオテクノロジー (Bio/Technology), 6, 47 55(1988)などに記載の方法に従って行なうことができる。

動物細胞を形質転換するには、例えば、細胞工学別冊8新細胞工学実験プロトコール, 260-272(1994) (秀潤社発行)、ウイルス学 (Virology), 52巻, 45

50

6 ( 1 9 7 3 ) に記載の方法に従って行なうことができる。

【 0 0 4 9 】

形質転換体の培養

本発明の形質転換体の培養は以下の条件を考慮したタンパク質の生成に十分な条件下で、形質転換体を培養することができ、その結果、培地または形質転換体からタンパク質を回収することができる。

【 0 0 5 0 】

宿主がエシェリヒア属菌、バチルス属菌である形質転換体を培養する際、培養に使用される培地としては液体培地が適当であり、その中には該形質転換体の生育に必要な炭素源、窒素源、無機物その他が含有せしめられる。炭素源としては、例えば、グルコース、デキストリン、可溶性澱粉、ショ糖など、窒素源としては、例えば、アンモニウム塩類、硝酸塩類、コーンステープ・リカー、ペプトン、カゼイン、肉エキス、大豆粕、バレイショ抽出液などの無機または有機物質、無機物としては、例えば、塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウムなどが挙げられる。また、酵母、ビタミン類、生長促進因子などを添加してもよい。培地の pH は約 5 ~ 8 が望ましい。

【 0 0 5 1 】

エシェリヒア属菌を培養する際の培地としては、例えば、グルコース、カザミノ酸を含む M 9 培地〔ミラー ( Miller ) , エクスペリメンツ・イン・モレキュラー・ジェネティクス ( Experiments in Molecular Genetics ) , 4 3 1 - 4 3 5 , Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1 9 7 2 〕が好ましい。ここに必要によりプロモーターを効率よく働かせるために、例えば、3 - インドリルアクリル酸のような薬剤を加えることができる。宿主がエシェリヒア属菌の場合、培養は通常約 1 5 ~ 4 3 で約 3 ~ 2 4 時間行ない、必要により、通気や攪拌を加えることもできる。

【 0 0 5 2 】

宿主がバチルス属菌の場合、培養は通常約 3 0 ~ 4 0 で約 6 ~ 2 4 時間行ない、必要により通気や攪拌を加えることもできる。宿主が酵母である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、バークホルダー ( Burkholder ) 最小培地〔 Bostian, K. L.ら、「プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー ( Proc. Natl. Acad. Sci. U S A ) , 7 7 巻 , 4 5 0 4 ( 1 9 8 0 ) 〕や 0 . 5 % カザミノ酸を含有する S D 培地〔 Bitter, G. A. ら、「プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー ( Proc. Natl. Acad. Sci. U S A ) , 8 1 巻 , 5 3 3 0 ( 1 9 8 4 ) 〕が挙げられる。培地の pH は約 5 ~ 8 に調整するのが好ましい。培養は通常約 2 0 ~ 3 5 で約 2 4 ~ 7 2 時間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

【 0 0 5 3 】

宿主が昆虫細胞または昆虫である形質転換体を培養する際、培地としては、Grace's Insect Medium ( Grace, I. D. C., ネイチャー ( Nature ) , 195, 789 ( 1962 ) ) に非動化した 1 0 % ウシ血清等の添加物を適宜加えたものなどが用いられる。培地の pH は約 6 . 2 ~ 6 . 4 に調整するのが好ましい。培養は通常約 2 7 で約 3 ~ 5 日間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

【 0 0 5 4 】

宿主が動物細胞である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、約 5 ~ 2 0 % の胎児牛血清を含む M E M 培地〔サイエンス ( Science ) , 1 2 2 巻 , 5 0 4 ( 1 9 5 5 ) 〕 , D M E M 培地〔ウイルス学 ( Virology ) , 8 巻 , 3 9 7 ( 1 9 5 9 ) 〕 , R P M I 1 6 4 0 培地〔ジャーナル・オブ・ザ・アメリカン・メディカル・アソシエーション ( The Journal of the American Medical Association ) 1 9 9 巻 , 5 1 9 ( 1 9 6 7 ) 〕 , 1 9 9 培地〔プロシーディングズ・オブ・ザ・ソサイエティ・フォー・ジ・エクスぺリメンタル・バイオロジー・アンド・メディスン ( Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine ) , 7 3 巻 , 1 ( 1 9 5 0 ) 〕などが用いられる。pH は約 6 ~ 8 であるのが好ましい。培養は通常約 3 0 ~ 4 0 で約 1 5 ~ 6 0 時間行ない、必

要に応じて通気や攪拌を加える。以上のようにして、形質転換体の細胞内に本発明のタンパク質を生成せしめることができる。

【0055】

無細胞系によるタンパク質生成

上述した形質転換体を培養することによってタンパク質を生成させる以外に、インビトロテック社 (<http://www.invitrotech.co.jp/>)の高効率無細胞タンパク質合成システムや Roche社のインビトロトランスレーション・トランスクリプションシステムなどを用いた無細胞培養システムを用いることによって、当該タンパク質を生成させることも可能である。

【0056】

タンパク質の分離精製

上記培養物から本発明のタンパク質を分離精製するには、例えば、下記の方法により行うことができる。本発明のタンパク質を培養菌体あるいは細胞から抽出するに際しては、培養後、公知の方法で菌体あるいは細胞を集め、これを適当な緩衝液に懸濁し、超音波、リゾチームおよび/または凍結融解などによって菌体あるいは細胞を破壊したのち、遠心分離やろ過によりタンパク質の粗抽出液を得る方法などが適宜用いられる。緩衝液の中に尿素や塩酸グアニジンなどの蛋白質変性剤や、トリトンX-100（登録商標、Union Carbide社製）などの界面活性剤が含まれていてもよい。これらの公知の分離、精製法としては、塩析や溶媒沈澱法などの溶解度を利用する方法、透析法、限外ろ過法、ゲルろ過法、およびSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法などの主として分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィーなどの荷電の差を利用する方法、アフィニティークロマトグラフィーなどの特異的新和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィーなどの疎水性の差を利用する方法、等電点電気泳動法などの等電点の差を利用する方法などが用いられる。

【0057】

上記各方法で得られるタンパク質が遊離体で得られた場合には、公知の方法あるいはそれに準じる方法によって塩に変換することができ、逆に塩で得られた場合には公知の方法あるいはそれに準じる方法により、遊離体または他の塩に変換することができる。なお、組換え体が産生するタンパク質を、精製前または精製後に適当な蛋白修飾酵素を作用させることにより、任意に修飾を加えたり、ポリペプチドを部分的に除去することもできる。蛋白修飾酵素としては、例えば、トリプシン、キモトリプシン、アルギニルエンドペプチダーゼ、プロテインキナーゼ、グリコシダーゼなどが用いられる。かくして生成する本発明のタンパク質またはその塩の存在は、標識したリガンドとの結合実験および特異抗体を用いたエンザイムイムノアッセイなどにより測定することができる。

【0058】

ヒトホモログのクローニング

脂肪細胞分化誘導開始12時間以内に活性化されるポリヌクレオチドであって、前記に決定した配列番号1で示されるマウスの全長DNA配列をNCBI Genome Sequencing (Human Genome Database)でホモロジーサーチすることによって相同性の高い配列を見出して、ヒトホモログの全長を予測することができる。ヒトホモログのクローニングにはRT-PCR法などが適用できる。このようにして予測し、実際にRT-PCR法により配列決定を行ったヒトホモログの全長は、配列番号9で示される塩基配列である。また、配列番号9で示されるヒトホモログの全長の塩基配列から、該塩基配列は800アミノ酸からなるタンパク質をコードする遺伝子であり、該タンパク質のアミノ酸配列は、配列番号10であると予想される。

【0059】

アンタゴニストおよびアゴニストの同定方法

本発明のタンパク質をアンタゴナイズまたはアゴナイズする化合物の同定方法は次の工程(a)(b)の工程を含む。

(a)本発明のタンパク質を発現している細胞または本発明のタンパク質に応答する細胞

10

20

30

40

50

に候補化合物を接触させる工程；

(b) 結合、または機能的応答の刺激もしくは阻害を観察する工程；あるいは候補化合物と接触した細胞の本発明のタンパク質の活性に関する能力を接触しなかった同種の細胞と比較する工程。

上記同定方法により、本発明のアンタゴニスト或いはアゴニストを同定することができる。

#### 【0060】

##### ポリヌクレオチドの検出方法；ポリヌクレオチドによる診断

診断対象者の本発明のタンパク質の活性化に関連した、診断対象者における疾病、またはかかる疾病に対する感受性の診断は次のように行うことができる。即ち、診断対象者のゲノム中の本発明のタンパク質をコードしている塩基配列中の変異の存在または不存在を決定すること；および/または該対象者由来の試料中の本発明のタンパク質の存在または量を分析することにより行う。

10

#### 【0061】

本発明のポリヌクレオチドを検出あるいは測定するには、本発明のポリヌクレオチドの塩基配列から連続する8塩基以上100塩基以下の配列を有するプライマーを合成し、細胞あるいは血液などからmRNAを抽出し、RT-PCR法によりmRNAをDNAに変換しながら増幅する、あるいはT7-based mRNA増幅法 (Van Gelder R.N. et al.; Proc.Natl.Acad.Sci.USA,87:1663 1667,1990) により、目的ポリヌクレオチドを増幅し、増幅されたポリヌクレオチドを種々の電気泳動で検出することが可能である。また、Cy3-dUTPあるいは、Cy5-dUTPをポリヌクレオチド増幅時に添加して、増幅ポリヌクレオチドを蛍光標識し、DNAマイクロアレイ等 (Brown, P.O.et al.:Nature Genet.,21 sup.:33 37,1999) により検出することも可能である。

20

#### 【0062】

また、抽出したmRNAの量を定量する方法としては、蛍光色素を用いた定量的PCR法が行われる (羊土社 non-R1実験の最新プロトコール 栗原ら編 1999 83-89)。この方法により、細胞中のmRNAがどの程度存在するかがわかる。この発現の程度によって、肥満の状況を把握することができる。

#### 【0063】

DNAマイクロアレイを用いて、複数のポリヌクレオチドを同時に検出、測定することも可能である。例えば、糖尿病、高血圧、肥満などの生活習慣病に関連する、本発明のポリヌクレオチドを含む複数のポリヌクレオチドを基盤上に結合させておき、上述したような方法で、検体から調製した標識ポリヌクレオチドを反応させてどのポリヌクレオチドが活性化しているのか、存在しているのかということを判定することが可能となる。この判定によって、生活習慣病の状況を把握し、治療に役立てることが可能になる。また、本発明のポリヌクレオチドを含む複数の肥満関連ポリヌクレオチドを基盤上に結合させておき、同様の手技により、肥満の状況、程度を把握することが可能となり、治療に役立てることが可能となる。

30

#### 【0064】

また、本発明のポリヌクレオチドを検出するにはアプライドバイオシステムズ社のABI PRISM 310あるいはPRISM 3100あるいはPRISM 3700などを利用したキャピラリー電気泳動による検出も可能である。

40

#### 【0065】

ポリヌクレオチド中の特定の核酸塩基が他の塩基と置換されていることにより、遺伝子産物としてのタンパク質の活性が変化する、本発明のタンパク質のその受容体への結合能が変化する、或いは該タンパク質の薬剤に対する反応性が変化する、或いは該タンパク質の安定性が変化する、或いは該タンパク質の合成が途中で停止してしまうなどの、遺伝子多型 (single nucleotide polymorphisms、以下SNPs) が、非常に重要であることがわかってきているが、本発明のポリヌクレオチドにおいても、このSNPsを検出する意義は非常に重要である。

50

## 【 0 0 6 6 】

本発明の脂肪細胞分化関連のポリヌクレオチドの高密度のSNP<sub>s</sub>マーカーの遺伝子地図がつくられれば、糖尿病の原因遺伝子を特定できるSNP<sub>s</sub>を用いて健康者と患者間の比較が容易にできる。高密度のSNP<sub>s</sub>マップを使えば家族と関連のない大規模なサンプルを用いて相関解析(Whole Genome Association Study)が可能となる。SNP<sub>s</sub>は、特に1塩基が置換することにより、対応するアミノ酸が変化し、この変化によって本来の蛋白質の物性の変化が生じる。例えば、酵素においては活性中心近傍のアミノ酸が変化することによる酵素活性の低下や亢進が挙げられ、受容体であれば受容中心近傍のアミノ酸が変化することによる結合力の低下や上昇が挙げられる。それぞれの人の遺伝子多型に応じて、薬剤の投与量を調整したり、異なる薬剤を選択することをテーラードメディスンなどと云われる。

10

## 【 0 0 6 7 】

本発明のポリヌクレオチドにおけるSNP<sub>s</sub>を検出する方法としては、例えば、アメリカNanogen社(<http://www.nanogen.com>)のnanochipを用いる方法(Gillesら、Nature biotechnology 17, 365-370, 1999)、ポリヌクレオチド配列を決定する方法(<http://www.pyrosequencing.com>における"Principle of Pyrosequencing")、DNAチップ又はDNAアレイを用いた方法、質量分析計を用いる方法(Leglerら、Transfusion, 36:426-431, 1996)、プライマーエクステンションを用いた方法、Luminox法(Iannoneら、Cytometry, 39:131-140, 2000)などが適用可能である。

## 【 0 0 6 8 】

上記各ポリヌクレオチドの検出のために構成される診断薬は、配列番号1で表される塩基配列の同一もしくは少なくとも80%の相同性を有する塩基配列を含むポリヌクレオチド或いは該ポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチドのうち、連続する少なくとも10個の塩基配列を有するポリヌクレオチドを含む診断薬が挙げられる。

20

## 【 0 0 6 9 】

また、配列番号1で表される塩基配列の番号100から2520にわたり同一もしくは少なくとも80%の相同性を有する塩基配列を含むポリヌクレオチドまたは該ポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチドのうち、連続する少なくとも10個の塩基配列を有するポリヌクレオチドを含む診断薬とすることができる。特に、ヒトのポリヌクレオチドの検出のために構成される診断薬は、配列番号9に表される塩基配列を含むポリヌクレオチドまたは該ポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチドのうち、連続する少なくとも10個の塩基配列を有するポリヌクレオチドを含む診断薬である。

30

## 【 0 0 7 0 】

さらに好ましいヒトのポリヌクレオチドの検出のために構成される診断薬は、配列番号9で表される塩基配列の番号26から2425の塩基配列を含むポリヌクレオチドまたは該ポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチドのうち、連続する少なくとも10個の塩基配列を有するポリヌクレオチドを含む診断薬である。

## 【 0 0 7 1 】

タンパク質またはペプチドの検出、およびタンパク質またはペプチドに対する抗体の検出、および診断への応用

40

本発明のタンパク質を検出するには、免疫測定法が一般的に用いられる。例えば、配列番号2または配列番号10で示されるタンパク質、あるいはそれらの各配列に含まれる3個以上の連続したアミノ酸配列からなるペプチドを、マウス、ラット、ウサギ、ヤギ、ブタ、ウシ、ヒツジ、ニワトリなどに免疫して抗体を産生させることができる。この免疫を行う際に、通常、アジュバントといわれる物質を加えるのが一般的である。アジュバントとしては、フロイントのコンプリートアジュバント、インコンプリートアジュバント、明礬など種々の公知のアジュバントを用いることができる。マウスを免疫した場合は、一定期間免疫を行った後、免疫したマウスの脾臓を取り出して、抗体産生細胞であるこの脾臓細胞とミエローム細胞と融合させて、クローニングを行って配列番号2のタンパク質を特異的に結合する抗体を産生するハイブリドーマを調製する。

50

## 【 0 0 7 2 】

ハイブリドーマを培養することによって、産生する抗体を種々の方法で精製し、得られた抗体を固相に結合させる。これとは別に、該抗体を酵素、蛍光色素、金属コロイド、ラテックス、DNA、RNAなどで標識して標識化抗体を得る。前記固相化抗体と該標識化抗体を、細胞、血液あるいはその分画フラクションを検体として反応させ、固相に結合した標識物の有無、あるいは量を測定することにより、検体中の本発明のタンパク質の量を測定することができる。

## 【 0 0 7 3 】

本発明のタンパク質は、脂肪細胞内に特異的に見出されるために、その量を測定することによって肥満の程度、状況を把握することが可能となる。

## 【 0 0 7 4 】

検体中に含まれる本発明のタンパク質の量を測定するには、該タンパク質あるいは該タンパク質の一部となるペプチドを抗原として、家兎、ネズミ、ヒツジ、ヤギなどに免疫して抗体を調製する（この場合、特定の認識部位に結合することが出来るモノクローナル抗体を調製することも含まれる。）。ここで得られた抗体を、ポリスチレン、ラテックス、ニトロセルロースなどの材質のものに物理的に吸着させる、あるいは、抗体にビオチンを予め導入しておき、固相に予め結合させておいたストレプトアビジンまたはアビジンなどと反応させて固相を調製する、あるいは、固相上に存在するカルボキシル基、アミノ基、スルフヒドリル基などを介して、抗体を共有結合させることにより、抗体結合固相を調製する。ここで得られた抗体結合固相と、細胞、血液あるいはその分画フラクションを検体として反応させ、検体中に含まれる抗原を固相に結合させ、次いで、抗体結合固相に結合した抗原に、上述した工程によって調製した抗体に、放射性同位元素、酵素、蛍光色素、核酸、ビオチンなどの標識を結合させた標識抗体を反応させる。なお、抗体結合固相と検体と標識抗体を反応させる工程は、同時に行うこともできる。こうして固相に結合した標識物を、測定することによって検体中に含まれる該タンパク質を測定することが出来る。

## 【 0 0 7 5 】

抗体を検出する方法は、これとは別に以下のような方法でも可能である。すなわち、本発明のタンパク質あるいは該タンパク質の一部となるペプチドを抗原として固相化して抗原固定化固相とし、次いで、該抗原固定化固相に対して、抗原に標識した物質と、細胞、血液あるいはその分画フラクションを検体として反応させ、結合した標識物を、定量することによって、検体中に含まれる抗体量を測定することができる。したがって、本発明のタンパク質に対して免疫学的に特異的な抗体を検出する診断薬を構築できる。

## 【 0 0 7 6 】

以上、いずれも抗原あるいは抗体を直接固相化した反応系を説明したが、米国特許第5,789,165のように、固相にオリゴヌクレオチドを結合させておき、このオリゴヌクレオチドに相補的なオリゴヌクレオチドを結合させた抗原あるいは抗体を結合させた反応系も適用可能である。さらに、特開平10-253632号公報、EP0905517A1の記載にあるように、異なる項目を同時に検出あるいは測定することも可能となる。例えば、糖尿病、高血圧、肥満などの生活習慣病に関連するマーカーを同時に検出することにより、どのタンパク質がどの程度検出されるかによって生活習慣病がどの程度のレベルであるのかを判断することも可能になると考えられる。また、肥満関連のタンパク質あるいはペプチドなどのマーカーを同時に検出、測定することによって、肥満の状況を把握し治療に役立てることも可能になると考えられる。

## 【 0 0 7 7 】

本発明のタンパク質、あるいは該タンパク質に対する抗体を免疫学的に検出するためには上述した方法以外に、免疫凝集法による方法（特開平6-3358号公報）、Biacore International AB（スウェーデン）社（<http://www.biacore.co.jp>）のBIAcoreなどによる表面プラズモン共鳴（Surface Plasmon Resonance = SPR）による方法、水晶発振子を用いた方法（特開平9-292397号公報）、などによる方法が挙げられる。

## 【 0 0 7 8 】

10

20

30

40

50

以上の本発明のタンパク質を検出するためのに構成される診断薬は、本発明のタンパク質またはその塩を含有している診断薬が挙げられる。また、好ましい態様の本発明の診断薬は、本発明のタンパク質またはその塩の連続する少なくとも5個のアミノ酸からなるタンパク質またはペプチドを含む診断薬が挙げられる。また、本発明のタンパク質を検出するための別の診断薬は、本発明のタンパク質に対する抗体を含有する診断薬が挙げられる。

#### 【0079】

##### 治療目的の使用

本発明は、過剰または不十分な量の本発明のタンパク質あるいは該タンパク質の一部を構成するペプチドの活性に関連する、肥満症、高血圧症、高脂血症、糖尿病、腎臓疾患、インスリン耐性、脂肪異常、CNS疾患、並びに動脈硬化による心臓病又は脳卒中、等の生活習慣病のごとき異常な状態の治療方法を提供する。本発明のタンパク質あるいは該タンパク質の一部を構成するペプチドの活性が過剰な場合、いくつかの方法を用いることができる。

10

#### 【0080】

1つの手段は、有効量の上記阻害剤化合物（アンタゴニスト）を医薬上許容される担体と調合してなる医薬を治療対象者に投与して、本発明のタンパク質あるいはペプチドへのリガンドの結合をブロックすることあるいは第2のシグナルを阻害することにより活性化を阻害し、そのことにより異常な状態を改善することを特徴とする。

#### 【0081】

他の手段は、本発明のポリヌクレオチドを活性化する治療上有効量の化合物（すなわち、アゴニスト）を医薬上許容される担体と調合してなる医薬を投与し、そのことにより異常な状態を改善することを特徴とする。

20

#### 【0082】

もう1つのアプローチにおいて、本発明のタンパク質あるいはペプチドと競争してリガンドに結合する能力を有している可溶性形態の本発明のタンパク質あるいはペプチドまたはそれらの塩を投与してもよい。かかる競争物質の典型的な具体例は本発明のタンパク質あるいは該タンパク質の一部を構成するペプチドを含む。即ち、本発明の医薬は該タンパク質或いはその塩、または該タンパク質或いはその塩の連続する少なくとも5個のアミノ酸からなるペプチドを含む医薬とすることができる。

30

#### 【0083】

さらにもう1つの方法において、発現ブロック法を用いて本発明のポリヌクレオチドまたは該ポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチドを投与して、遺伝子の活性化を阻害してもよい。

#### 【0084】

このような本発明の医薬は、配列番号1で表されるクローン24ポリヌクレオチドの塩基配列と同一もしくは少なくとも80%の相同性を有する塩基配列を含むポリヌクレオチド、または該ポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチドを含有する医薬である。好ましくは、配列番号1で表される塩基配列と同一もしくは少なくとも80%の相同性を有する塩基配列を含むポリヌクレオチドまたは該ポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチドのうち、連続する少なくとも10個の塩基配列を有するポリヌクレオチドを含む医薬であり、さらに好ましくは、配列番号1で表される100から2520番目にわたり同一もしくは少なくとも80%の相同性を有する塩基配列を含むポリヌクレオチドあるいは該ポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチドのうち、連続する少なくとも10個の塩基配列を有するポリヌクレオチドを含む医薬である。

40

#### 【0085】

特に、ヒトのクローン24ポリヌクレオチドについては、配列番号9で表される塩基配列を含むポリヌクレオチドまたは該ポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチドを含む。好ましくは、配列番号9で表される塩基配列を含むポリヌクレオチドまたは該ポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチドのうち、連続する少なくとも10個の塩基配列を有

50

するポリヌクレオチドを含む医薬であり、さらに好ましくは、配列番号 9 における、26 から 2425 番目の塩基配列を含むポリヌクレオチドあるいは該ポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチドのうち、連続する少なくとも 10 個の塩基配列を有するポリヌクレオチドを含む医薬である。

#### 【0086】

これらの医薬は、ATG の前後の配列のアンチセンスを治療薬に利用するものである。これらの医薬には公知の方法で、細胞内で生成した、あるいは別個に投与された、アンチセンス配列を用いることができる。例えば、Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression, CRC Press, Boca Raton, FL (1988) 中、Okano, J. Neurochem V ol.56, p560(1991)。別法として、遺伝子とともに三重らせんを形成するオリゴヌクレオチドを提供してもよい。例えば、Lee et al., Nucleic Acids Res (1979) 6:3073; Cooney et al., Science (1988) 241:456; Dervan et al., Science (1991) 251:1360。これらのオリゴマーはそれ自体投与することができ、あるいは関連オリゴマーをインビボで活性化させることもできる。

10

#### 【0087】

別法として、遺伝子治療を用いて、治療対象者中の細胞による本発明のポリヌクレオチドの細胞内での生成を有効ならしめてもよい。例えば、上記のごとく本発明のポリヌクレオチドを処理加工して複製欠損レトロウイルスベクターに入れて活性化するようにしてもよい。次いで、レトロウイルス発現構築物を単離し、本発明のタンパク質をコードしている RNA を含むレトロウイルスプラスミドベクターでトランスダクションしたパッケージング細胞中に導入して、次いでパッケージング細胞が目的のポリヌクレオチドを含む感染性ウイルス粒子を生成するようにしてもよい。これらのプロデューサー細胞を治療対象者に投与して細胞をインビボで処理加工して、インビボでタンパク質を活性化するようにしてもよい。遺伝子治療の方法には、Human Molecular Genetics, T. Strachan and A. P. Read, BIOS Scientific Publishers Ltd (1996) 中、第 20 章、Gene Therapy and other Molecular Genetic based Therapeutic Approaches (およびその中の引用文献) が適用可能である。

20

#### 【0088】

本発明のクローン 24 タンパク質、またはヒトのクローン 24 タンパク質あるいはそれらのタンパク質を構成するアミノ酸配列の一部からなるペプチドに対する抗体を含有させて医薬とすることができる。このような抗体を投与した場合には、脂肪細胞分化活性を減弱させることが期待できる。

30

#### 【0089】

##### 処方および投与

本発明のタンパク質の増強された活性化を必要とする治療対象者の治療方法においては、可溶性形態の配列番号 2 で表される本発明のタンパク質の全長にわたり同一もしくは少なくとも 80% の相同性を有するアミノ酸配列を含むタンパク質、または該タンパク質の一部を構成するペプチド、またはそれらの塩、ならびに該タンパク質または該タンパク質の一部を構成するペプチドに対する抗体、アゴニスト、アンタゴニストペプチド、またはそれらの小型分子の治療上有効量を医薬として治療対象者に投与してもよい。

40

#### 【0090】

かかる処方、治療上有効量の前記物質、またはそれらの塩、および医薬上許容される担体または賦形剤を含んでなる。かかる担体としては、セイライン、緩衝化セイライン、デキストロース、水、グリセロール、エタノール、およびそれらの混合物が挙げられるが、これらに限らない。処方は投与経路に適したものとすべきであり、当業者によく知られている。さらに本発明は、上記本発明成分の 1 種またはそれ以上を充填した、1 個またはそれ以上の容器を含んでなる医薬パックおよびキットにも関する。

#### 【0091】

本発明のタンパク質および他の化合物を単独で使用してもよく、あるいは治療化合物のごとき他の化合物と一緒に使用してもよい。医薬組成物の全身投与の好ましい形態は、注

50

射、典型的には静脈注射を包含する。皮下、筋肉内または腹腔内のごとき他の注射経路を用いることもできる。全身投与のための別の手段は、胆汁酸塩またはフシジン酸または他の界面活性剤のごとき浸透剤を用いる経粘膜または経皮投与を包含する。さらに、腸溶処方またはカプセル処方うまく処方されるならば、経口投与も可能である。これらの化合物の投与は局所的なものであってもよく、膏薬、パスタ、ゲル等の形態であってもよい。

#### 【0092】

必要な用量範囲は、ペプチド、投与経路、処方の性質、治療対象者の症状の性質、および担当医師の判断による。適当な用量は治療対象者の体重1kgあたり0.1ないし100μgの範囲である。しかしながら、種々の使用化合物および種々の投与経路のさまざまな有効性を考慮すれば、必要な用量は広範囲なものと思われる。例えば、経口投与には静脈注射よりも多い用量が必要であると考えられる。当該分野においてよく理解された最適化のための標準的な常套的実験を用いてこれらの用量の変更を行うことができる。

10

#### 【0093】

しばしば「遺伝子治療」と称される上記治療方法において、治療に使用する本発明のタンパク質を治療対象者中において生成させることもできる。よって、例えば、レトロウイルスプラスミドベクターを用いることにより、タンパク質をコードしているDNAまたはRNAのごときポリヌクレオチドを用いて治療対象者由来の細胞をエクスピボで処理加工してもよい。次いで、処理された細胞を治療対象者に導入する。

#### 【実施例1】

#### 【0094】

##### 脂肪細胞への分化の確認

脂肪細胞に分化することが可能なマウス3T3-L1細胞(ATCC No. CCL-92.1.)を、基本培地(DMEM, 40μg/ml KM, 10% Calf Serum)を用いて5% CO<sub>2</sub>、37°Cにおいてcollagen type I dish (FALCON社製)中で培養した。細胞がコンプレントに達してから2日間おき、細胞が休止期に入った後、培地を分化誘導培地(DMEM, 40μg/ml KM, 10% FBS, 0.5mM 1-メチル-3-イソブチルキサンチン(以下、Mixと呼ぶ)、10μg/ml インスリン、1μM Dexamethasone(以下、Dexと呼ぶ))に変えこの分化条件において48時間培養し、培地を分化促進培地(DMEM, 40μg/ml KM, 10% FBS, 5μg/ml insulin)に変えた。2日おきに分化促進培地で培地交換を行った。マウス3T3-L1細胞(ATCC No. CCL-92.1.)は、4日目頃から小さな脂肪滴を含み始め、一週間後には成熟した脂肪細胞へ分化することを確認した。

20

30

#### 【実施例2】

#### 【0095】

##### mRNAの調製

脂肪細胞分化誘導前と分化誘導開始3時間後のマウス3T3-L1細胞(ATCC No. CCL-92.1.)からTRIzol(GIBCO BRL社製)を用いて、TRIzol(GIBCO BRL社製)に添付されている取扱説明書に従い、各々のマウス3T3-L1細胞起源の全量RNAを調製した。これらの各全量RNAからOligotex dT 30(第一化学薬品社製)を用いて、添付されている取扱説明書に従って、脂肪細胞分化誘導前のmRNAと、脂肪細胞分化誘導3時間後のmRNAを調製した。

40

#### 【実施例3】

#### 【0096】

##### PCR select cDNA Subtraction 法による脂肪細胞分化誘導後3時間目の活性化の測定

公知のPCR select cDNA subtraction kit (CLONTECH Laboratories社製)に従って以下のi) - vii)工程を行った。

#### 【0097】

##### i) テスターcDNA、ドライバーcDNAの合成

前記実施例2で調製したマウス3T3-L1細胞(ATCC No. CCL-92.1.)由来の脂肪細胞分化誘導前のmRNAをドライバーmRNAとし、前記実施例2で調製した脂肪細胞分化誘導3時間後のmRNAをテスターmRNAとした。これらのドライ

50

パー m R N A および テス ター m R N A から 1 本 鎖 c D N A を 合 成 し、 次 い で、 2 本 鎖 の ド ライバ ー c D N A、 テス ター c D N A を 合 成 し た。

【 0 0 9 8 】

ii) 制限酵素 RsaI による 2 本鎖 c D N A の切断

前記工程 i) で得られた 2 本鎖のドライバ ー c D N A と テス ター c D N A の 各 々 を 制 限 酵 素 RsaI で 切 断 し、 平 滑 末 端 ( b l u n t e n d ) の 断 片 を 作 っ た。

【 0 0 9 9 】

iii) アダプター の ライゲ ー シ ョ ン

前記工程 ii) で得られた切断された テス ター c D N A を 二 つ の グ ル ー プ に 分 け、 一 方 に アダプター 1 を ライゲ ー シ ョ ン し、 他 方 に アダプター 2 を ライゲ ー シ ョ ン し た。

10

【 0 1 0 0 】

iv) ファーストハイブリダイゼーション

前記工程 iii) で得られたアダプターを ライゲ ー シ ョ ン し た 2 種 類 の テス ター c D N A と 過 剰 量 の ド ライバ ー c D N A と の 間 で 別 々 に ハイブリダイゼーションを行 っ た。

【 0 1 0 1 】

v) セカンドハイブリダイゼーション

さらに過剰量のドライバ ー c D N A と、 前記 iv) 工 程 で 得 ら れ た ド ライバ ー c D N A を ハイブリダイズしてなる 2 種 類 の テス ター c D N A を 合 わ せ、 ハイブリダイゼーションを行 っ た。

【 0 1 0 2 】

vi) ファースト P C R

前記 iv) 工 程 で 得 ら れ た ハイブリダイズされた テス ター c D N A を 2 種 類 の アダプター 部 位 間 で 共 通 な プライマーを用いて P C R 法を行 っ て D N A を 増 幅 さ せ た。

20

【 0 1 0 3 】

vii) セカンド P C R

最後に 2 種 類 の アダプター 部 位 に 特 異 的 な 2 種 類 の プライマーを用いて P C R 法を行 っ て D N A を 増 幅 さ せ た。

【 0 1 0 4 】

ドライバ ー c D N A と ハイブリダイズしてなる テス ター c D N A は 増 幅 さ れ な か っ た。 一 方、 テス ター 特 異 的、 つ ま り 分 化 誘 導 3 時 間 後 に 活 性 化 が 増 加 し て い る ポリヌクレオチド ( 遺 伝 子 ) の み 増 幅 さ れ た。

30

【 実 施 例 4 】

【 0 1 0 5 】

P C R 産 物 の サ ブ ク ロ ー ニ ン グ 及 び ク ロ ー ン 2 4 の プ ラ ス ミ ド

図 1 に クロ ー ン 2 4 マウス c D N A の 略 図 を 示 す。 前 記 実 施 例 3 の サ ブ ト ラ ク シ ョ ン 法 で 得 ら れ た セカンド P C R 法を行 っ た 後 の 増 幅 さ れ た ポリヌクレオチドを 含 む 反 応 液 を フェノール抽出、 C I A A 抽 出 後、 E t O H 沈 殿 を 行 い、 D N A の ペ レ ッ ト を 滅 菌 水 17 μ l に 溶 解 し、 1 0 u n i t s の RsaI で 1 0 m M T r i s - H C l ( p H 7.5), 1 0 m M M g C l 2, 1 m M D T T 条 件 下、 3 7 ° C 一 晩 反 応 さ せ アダプターを切断した。 0 . 7 % アガロースゲルで電気泳動後、 D E 8 1 ( Whatman 社 製 ) を 用 い て 精 製 し て、 D N A 断 片 S u ( 図 1 参 照 ) を 得 た。

40

【 0 1 0 6 】

該 D N A 断 片 S u の 情 報 を 元 に プライマーを設計し、 5 ' - R A C E を 行 っ た 結 果、 約 2 K の バ ン ド が 得 ら れ た の で、 こ れ を 回 収 し て ヌ ク レ オ チ ド R - 5 ' と 呼 ば だ ( 図 1 参 照 )。 該 ヌ ク レ オ チ ド R - 5 ' を T ベ ク タ ー ( p B l u e s c r i p t K S + ) に サ ブ ク ロ ー ニ ン グ し て、 D S Q - 1 0 0 0 ( 島 津 製 作 所 社 製 ) に よ り、 塩 基 配 列 を 決 定 し た。 一 方、 クロ ー ン 2 4 の 3 ' 側 の 配 列 を 用 い て デ ー タ ベ ー ス に 対 し て 検 索 す る と 一 致 す る 塩 基 配 列 が E S T に 登 録 さ れ て お り、 こ の 塩 基 配 列 を 参 考 に プライマーを設計し R T - P C R を 行 っ た。 そ の 結 果、 約 7 0 0 b p の バ ン ド が 得 ら れ た の で、 こ れ を 回 収 し て ヌ ク レ オ チ ド R T と 呼 ば だ ( 図 1 参 照 )。 該、 ヌ ク レ オ チ ド R T を T ベ ク タ ー ( p B l u e s c r i p t K S + ) に サ ブ ク ロ ー ニ

50

ングして、DSQ-1000（島津製作所社製）により、塩基配列を決定した。このようにして、マウス3T3-L1細胞（ATCC No. CCL-92.1.）由来のクローン24のcDNA全長である2782bpのクローンポリヌクレオチドを得た。該ポリヌクレオチドをクローン24ポリヌクレオチドと呼ぶ。

#### 【0107】

翻訳開始コドンは100塩基目のATGを翻訳開始コドンと仮定した。その結果クローン24ポリヌクレオチドは807アミノ酸をコードする遺伝子であると予想された。決定したクローン24ポリヌクレオチドの塩基配列と、該塩基配列から予想したアミノ酸配列に対してデータベースを用いたホモロジー検索を<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>において検索したところ、機能が全く記載されていないチャイニーズハムスター由来のmRNAの配列が該当し、アクセッション番号がAF371372で、2794bpの長さで登録されていることが分かった。配列番号1で表される塩基配列と該チャイニーズハムスター由来のmRNAの塩基配列との相同性は88.12%であり、また、配列番号1で表される塩基配列における開始コドンから終始コドンまで（塩基配列の番号100から2520まで）と前記公知のチャイニーズハムスター由来のORFの配列の相同性は、91.72%であるから、クローン24ポリヌクレオチドは新規の遺伝子であると考えられる。

#### 【0108】

5'末端を脱リン酸化したpBluescript KS+/EcoRV ベクター50ngとDNA断片150ngをそれぞれライゲーション反応を行った。ライゲーション反応液1.2μlをコンピテントセルとして*Escherichia coli* JM109〔ATCC53323、東洋紡株式会社製〕にheat shock法によりトランスフォームして、サブクローニングされたクローン24のプラスミドを得た。本実施例4で製造された形質転換体は、国際寄託当局である独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターにFERM BP-7803として寄託されている。該形質転換体は、該国際寄託当局に2000年11月29日（原寄託日）にFERM P-18131号として原寄託され、そして、該原寄託より2001年11月16日にブダペスト条約に基づく寄託へ移管された。

#### 【実施例5】

#### 【0109】

##### 塩基配列およびアミノ酸配列の決定

クローン24ポリヌクレオチドの塩基配列の決定は、ABI PRISM 310（Perkin Elmer社製）およびDSQ 1000（島津製作所社製）を用いて行った。得られたクローン24ポリヌクレオチドの塩基配列を、配列番号1に示す。クローン24ポリヌクレオチドは2782塩基から構成されていることが分かった。また、クローン24ポリヌクレオチドのコード配列からアミノ酸配列を推定すると、該ポリヌクレオチドはアミノ酸が807個のクローン24タンパク質をコードすることが分かる。クローン24タンパク質のアミノ酸配列を配列番号2に示す。

#### 【実施例6】

#### 【0110】

##### 既存塩基配列、アミノ酸配列との比較

クローン24ポリヌクレオチドの塩基配列およびクローン24タンパク質のアミノ酸配列について、Genbank、EMBL、EST、Swiss Protの各々のデータベースでホモロジー検索を行った。FASTA およびBLASTNを行った結果、クローン24ポリヌクレオチドの塩基配列については登録されている機能が既知のポリヌクレオチドとは相同性が無く、前駆脂肪細胞が脂肪細胞に分化する際に特異的に活性化されるポリヌクレオチドとして新規の物質であることが分かった。

#### 【0111】

また、BLASTNP を行った結果、クローン24タンパク質のアミノ酸配列についても登録されている機能が既知のタンパク質とは相同性が無く、前駆脂肪細胞が脂肪細胞に分化する際に特異的に活性化されるタンパク質として新規の物質であることが分かった。

#### 【実施例7】

10

20

30

40

50

## 【 0 1 1 2 】

インサートの回収およびプローブの作成

前記実施例 4 で得られたサブクローニングされたクローン 2 4 のプラスミドを Molecular Cloning に記載の方法に従いアルカリ SDS 法により調製し、このプラスミドを制限酵素 XbaI, HindIII で切断後、1.0% アガロースゲルで電気泳動し、インサートに相当するバンドを DE 8 1 (Whatman 社製) を用いて回収した。50 ~ 100 ng の DNA 断片を BcaBEST™ Labeling kit (TaKaRa 社製) を用いて [<sup>32</sup>P] dCTP (Amersham Pharmacia Biotech 社製) で標識し、標識プローブを得た。得られた標識プローブを Sephadex G 50 (Amersham Pharmacia Biotech 社製) を用いたカラムに通し、<sup>32</sup>P 標識プローブを調製した。

10

## 【 実施例 8 】

## 【 0 1 1 3 】

ノザンプロット解析

脂肪細胞分化誘導開始前 (0 時間) と分化誘導開始 0.5、1、3、6、12、24 時間後の マウス 3T3-L1 細胞 (ATCC No. CCL-92.1) からそれぞれ調製した総 RNA 25 μg を 1% 変性ゲル (2% formaldehyde, 1× Mops, 1% アガロース) で電気泳動した。ゲルを 50 mM NaOH 25 分 (アルカリ変性)、200 mM NaOAc (pH 4.0)、40 分 (中和) 処理後、RNA を HybondN+ (Amersham Pharmacia Biotech 社製) に転写した。転写は 12 時間以上行い、バッファーは 20× SSC を用いた。転写したフィルターを 50 mM NaOH, 5 分間処理後、2× SSC で洗浄し、80℃、2 時間乾燥させた。その後、UV 照射を行い固定した。

20

## 【 0 1 1 4 】

ハイブリダイゼーションバッファー (5× SSPE, 50% formaldehyde, 5× Denhardt's, 0.1% SDS, 20 μg/ml salmon sperm DNA) で 42℃ 一晩、プレハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーションバッファーを新しく変えた後、熱変性したプローブを加え 42℃ 一晩、ハイブリダイゼーションを行った。その後、フィルターを一次洗浄液 (2× SSPE 0.1% SDS) を用いて室温で 10 分間、さらに一次洗浄液を用いて 55 ~ 65℃ で 15 分間、二次洗浄液 (1× SSPE 0.1% SDS) を用いて 65℃ で 15 分間、三次洗浄液 (0.5× SSPE 0.1% SDS) を用いて 65℃ で 10 分間の条件で洗浄し、オートラジオグラフィーを行った。得られた結果を、図 2 に示す。

30

## 【 0 1 1 5 】

図 2 のオートラジオグラムによれば、クローン 2 4 ポリヌクレオチドより調製した標識プローブは、脂肪細胞分化誘導開始前 (0 時間) の細胞から調製した mRNA とは反応しないが、分化誘導開始 6 時間目をピークとして、3 時間目から 12 時間目の細胞から調製した mRNA は反応することが分かった。このことから、クローン 2 4 ポリヌクレオチドにクローニングされている配列は、脂肪細胞分化に特異的に活性化されている配列であることが分かった。

## 【 実施例 9 】

## 【 0 1 1 6 】

mRNA の局在部位の特定

## i) プラスミドの構築

配列番号 1 で示されるクローン 2 4 のポリヌクレオチドの全長を RT-PCR により増幅し、回収精製後、GFP 発現ベクターである、pEGFP (Clontech 社製) にサブクローニングした。

40

## 【 0 1 1 7 】

## ii) プラスミドの精製

前記のサブクローニングしたプラスミドを、Triton lysis 法により、塩化セシウムを用いて 2 回超遠心分離を行い、スーパーコイルプラスミド DNA を精製した。

## 【 0 1 1 8 】

## iii) トランスフェクション

50

lipofectamine (GIBCO BRL社製) 法を用い、前記工程で得られたスーパーコイルプラスミドDNAを、脂肪細胞に分化する機能が失われたマウスNIH/3T3 clone 5611細胞(JCRB 0615)にトランスフェクションした。トランスフェクトされた細胞を2日後にPBS( )で3回洗浄した。次いで、径6cmのシャーレに收容されている4%パラホルムアルデヒドを含むPBS( - ) 3mlで30分間処理して細胞を固定した。次いで、細胞をPBSで二回洗浄し、洗浄後蛍光顕微鏡(BX 50、OLYMPUS社製)でGFPの発現を観察した。図3(c)は、上記工程により細胞内に発現したGFPを示す顕微鏡写真である。図3(a)は対照として細胞全体を写した顕微鏡写真である。図3(b)はDAPI法により細胞質内の核のみを染色した顕微鏡写真である。

#### 【0119】

図3(a)~(c)の写真と比較すると、クローン24タンパク質をコードするmRNAは核内のみが存在することが明らかである。クローン24ポリヌクレオチドから推定されるクローン24タンパク質のアミノ酸配列がロイシンジッパー構造を形成するかどうかについて、他のロイシンジッパー構造を持つタンパク質であるc-fos、C/EBP、CREB、Jun Bとを比較すると、何れのタンパク質も、その配列においてロイシンとロイシンの間隔が7個又は14個で共通するために、クローン24タンパク質もロイシンジッパー構造を持つと推定される。また、クローン24タンパク質をコードするmRNAが核内のみが存在することは、該ロイシンジッパー構造を介してダイマーを形成し、核内で転写因子として機能しているためと推定される。図4はクローン24ポリペプチドの模式図であり、該配列中において、ロイシンジッパー構造と考えられる配列部位を特に示す。

#### 【実施例10】

#### 【0120】

##### クローン24過剰発現NIH/3T3細胞株の作製

##### i) プラスミドの構築

クローン24の塩基配列87bpから2636bpを下記の配列番号11で表される塩基配列のオリゴヌクレオチドを上層プライマーとし、下記の配列番号12で表される塩基配列のオリゴヌクレオチドを下層プライマーとしてAmpli-Taq Gold(Perkin-Elmer社製)を用いてRT-PCRにより増幅した。0.8%アガロースで電気泳動し、DE81(Whatman社製)で回収精製後、Tベクター(pBlue-script SK+)にサブクロニングした。トランスフォームには大腸菌DH5を用いた。塩基配列をDSQ-1000(島津製作所社製)により確認後、制限酵素BamHI、XhoIで切断しフラグメントを回収精製し、pDON-AI(TAKARA社製)のBamHI、SalI部位にサブクロニングした。

#### 【0121】

##### 配列番号11

CGC AGG CCT AAG GAT GAA GGC G

##### 配列番号12

CAG GGT CTT CTG TGG CCC TGC TCC

#### 【0122】

##### ii) プラスミドの調製

CONCERT(GIBCO BRL社の登録商標) High purity Plasmid Midiprep Systems(GIBCO BRL社製)を用いてその取扱説明書に従って行った。

#### 【0123】

##### iii) PT67パッケージング細胞の培養

10% FBSを含む高グルコースダルベッコ変法イーグル培地(GIBCO BRL社製)中、5% CO<sub>2</sub>下、37℃で培養した。

#### 【0124】

##### iv) トランスフェクション及びウイルス液の回収

トランスフェクションを行う前日に、PT-67細胞を10cm plateあたり7

10

20

30

40

50

・  $0 \times 10^5$  個まいた。トランスフェクション当日にクローン 24 の全長配列を挿入した pDON - AI (Takara 社製) あるいはインサートを含まない pDON - AI 14  $\mu$ g をリン酸カルシウム法によってトランスフェクションした。トランスフェクション後 72 時間の細胞培養上清をウイルス液として回収した。

【0125】

v) 標的細胞 NIH / 3T3 の培養

10% calf serum を含むダルベッコ変法イーグル培地 (日水製薬株式会社製) 中、5% CO<sub>2</sub> 下、37 °C で培養した。

【0126】

vi) ウイルスの感染及び単一細胞株のクローニング

感染前日に標的細胞 NIH / 3T3 を 10 cm plate あたり  $5 \times 10^5$  個まいた。感染当日 8  $\mu$ g / ml ポリブレン (SIGMA 社製) と共に作製したウイルス液 5 ml を含む培養液を標的細胞 NIH / 3T3 に加えた。感染 24 時間後に細胞を 1 / 4、1 / 10、1 / 100、1 / 1000 へと段階希釈し、0.5 mg / ml の G418 (ナカライテスク社製) を含む培地中で 10 日間程度培養し、G418 耐性の細胞株、すなわち目的遺伝子が染色体中に組み込まれた細胞、即ち、クローン 24 過剰発現 NIH / 3T3 細胞株を得た。

【実施例 11】

【0127】

作製した細胞のクローン 24 発現の確認

i) 総 RNA の回収

前記実施例 10 で得られたクローン 24 過剰発現 NIH / 3T3 細胞、及び空ベクターをトランスフェクションしたコントロール NIH / 3T3 細胞の双方から TRIzol (GIBCO BRL 社製) に添付されている取扱説明書に従い総 RNA を回収した。

【0128】

ii) プローブの作製

pBluescript SK + クローン 24 を制限酵素、Pst I で切断し、0.8% アガロース電気泳動後、クローン 24 cDNA 断片に相当する 1.2 kbp のバンドを精製した。60 ng に相当する DNA 断片を BcaBEST (Takara 社の登録商標) Labeling kit (Takara 社製) を用いて [<sup>32</sup>P]dCTP (Amersham pharmacia biotech 社製) で標識しプローブを調製した。

【0129】

iii) ノザンプロット解析

回収した総 RNA 10  $\mu$ g を 1% 変性ゲル (2% formaldehyde、1x MOPS、1% アガロース) で電気泳動した。ゲルを 50 mM NaOH 25 分 (アルカリ変性)、200 mM NaOAc (pH 4.0) 40 分 (中和処理) した後に、RNA を Hybrid N+ (商品名、Amersham pharmacia biotech 社製) にトランスファーした。トランスファーは 12 時間以上行い、バッファーは 20x SSC を用いた。トランスファーしたフィルターを 50 mM NaOH で 5 分間処理後、2x SSC で洗浄し、80 °C 2 時間乾燥後、UV 照射を行い固定した。

【0130】

ハイブリダイゼーションバッファー (5x SSPE、50% formamide、5x Denhardt's、0.1% SDS、20  $\mu$ g / ml salmon sperm DNA) で 42 °C 一晩、プレハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーションバッファーを新しく替えた後、熱変性したプローブを加え 42 °C 一晩、ハイブリダイゼーションを行った。その後、フィルターを 1 次洗浄液 (2x SSPE、0.1% SDS) を用いた 42 °C 15 分間、更に洗浄液を替えて 65 °C 15 分間洗浄し、オートラジオグラフィを行った。得られたオートラジオグラムを図 5 に示す。

【0131】

この結果から、実施例 10 において調製したクローン 24 過剰発現 NIH / 3T3 細胞

10

20

30

40

50

株中で、実施例 10 i) において構築したプラスミドに由来するクローン 24 の mRNA が発現していることがわかった。

【実施例 12】

【0132】

クローン 24 過剰発現 NIH / 3 T 3 細胞の脂肪細胞分化

i) 分化誘導

前記実施例 10 で得られたクローン 24 過剰発現 NIH / 3 T 3 細胞を 10% calf serum を含むダルベッコ変法イーグル培地 ( 日水製薬株式会社製 ) 中、5% CO<sub>2</sub> 下、37 で collagen type I dish ( FALCON 社製 ) 中で培養した。細胞がコンフレントに達してから 2 日後に細胞が休止期に入った後、培地を分化誘導培地 [ DMEM、10% FBS、0.5 mM 1 - メチル - 3 - イソブチルキサンチン ( 以下、MIX と呼ぶ )、10 μg / ml インシュリン、1 μM Dexamethasone ( 以下、DEX と呼ぶ )、BRL 49653 ( Smithkline Beecham Pharmaceutica l 社製 ) ] に変え、この条件で 48 時間培養し、培地を分化促進培地 ( DMEM、10% FBS、5 μg / ml インシュリン、BRL 49653 ) に変えた。2 日おきに分化促進培地で培地交換を行い、8 日後まで培養を継続した。

10

【0133】

ii) Oil - Red - O 染色

分化誘導後 8 日目の細胞の培養液を除かずに氷冷した 4% paraformaldehyde / PBS ( - ) 5 ml を加え、室温で 20 分間放置した。培地を除き氷冷した 4% paraformaldehyde / PBS ( - ) 5 ml を加え、室温で 1 時間放置した。蒸留水で 3 回洗浄し、Oil - Red - O 染色液 ( 0.5% Oil - Red - O、60% 2 - プロパノール ) を 5 ml 加え室温に 1 時間放置した。蒸留水で 3 回洗浄後、風乾した。染色したプレートを図 7 に示す。顕微鏡で観察したところコントロール細胞では脂肪滴は確認されなかったがクローン 24 過剰発現 NIH / 3 T 3 細胞では脂肪滴の蓄積が確認された。すなわち、脂肪細胞に分化したことが確認された。

20

【実施例 13】

【0134】

ヒトホモログのクローニング

i) NCBI Genome Sequencing ( Human Genome Database ) を用いたヒトホモログの配列の予想

30

前記実施例 7 で決定したクローン 24 マウスポリヌクレオチドの全長配列を NCBI Genome Sequencing の BLAST the Human genome ( <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/seq/> ) でホモロジーサーチすることによって相同性の高い配列を 10 番染色体上に見出した。ファーストメチオニンを含むエキソンを第 1 エキソンとしたとき、該配列は計 21 個のエキソンにより構成されていた。全てのエキソン、イントロン間には gt ag ルールが保存されていたことからヒトホモログの全長配列を予想することが出来た。

【0135】

ii) HeLa 細胞の培養

ヒトホモログのクローニングは RT PCR により行った。テンプレートには HeLa 細胞を用いた。HeLa 細胞の培養には MEM ( 商品名、日水製薬株式会社製 )、10% FBS ( 商品名、大日本製薬株式会社製 ) を用いた。

40

【0136】

iii) 総 RNA の回収

コンフレントに培養した HeLa 細胞から TRIzol ( GIBCO BRL 社製 ) を用いて、その取扱説明書に従い、総 RNA を回収した。

【0137】

iv) Reverse Transcriptase Coupled Polymerase Chain Reaction ( RT PCR ) によるヒトホモログのクローニング

前記工程 i) で予想された全長配列をもとに下記の配列番号 3 ~ 8 で表される塩基配列

50

のオリゴヌクレオチドをプライマーとして組み合わせて用い、下記組成の R T - P C R 反応組成で R T - P C R を行った。c D N A テンプレートには前記工程 ii ) 及び iii) で作製した Hela 細胞の総 R N A から ReverTra Dash ( TOYOBO 社製 ) を用いてその取扱説明書に従って作製した。

【 0 1 3 8 】

配列番号 3 (upper layer ) : 5' GCC GGC ATT CAT TTA AGG CC 3'

配列番号 4 (lower layer ) : 5' CTT CGC ATG AAC AGG CTC AC 3'

配列番号 5 (upper layer ) : 5' CAG ATC CCA AGC TTT CGC 3'

配列番号 6 (lower layer ) : 5' AGC AAA CTT GGC AAG ACC 3'

配列番号 7 (upper layer ) : 5' AAG AAG GCC CAG AGG TCA 3'

配列番号 8 (lower layer ) : 5' GTC CAC TGA CTT CAT TCC 3'

【 0 1 3 9 】

R T - P C R 反応組成 :

2  $\mu$ l 10  $\times$  PCR buffer for KOD Plus

2  $\mu$ l 2 mM d N T P s

0.8  $\mu$ l 25 mM M g S O<sub>4</sub>

2  $\mu$ l c D N A テンプレート

1.2  $\mu$ l 上層及び下層プライマー ( 各 10 mM )

11.6  $\mu$ l sterile H<sub>2</sub>O

0.4  $\mu$ l KOD Plus DNA Polymerase ( 1 . 0 U /  $\mu$ l )

【 0 1 4 0 】

上記プライマーの組み合わせは、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 とし、R T - P C R の反応条件は、1 cycle : 94 2 分、30 cycles : 94 15 秒、60 30 秒、68 2 分とした。

【 0 1 4 1 】

v ) R T - P C R 断片の精製及び塩基配列の決定

P C R の反応生成物を 0 . 7 % アガロースゲル電気泳動により分離後、DE81 ( Whatman 社製 ) を用いて回収精製した。DNA 断片を pBluescript KS+ にサブクローニングし、DSQ 1000 ( 島津製作所社製 ) により、塩基配列を決定した。また、配列番号 3 / 配列番号 4 より得られた反応性生物はサブクローニングせずに Gene Rapid ( Amersham pharmacia biotech 社製 ) により、塩基配列を決定した。

【 0 1 4 2 】

vi ) クローン 2 4 ヒトホモログの全長配列の決定

図 6 にクローン 2 4 ヒトホモログ c D N A の略図を示す。配列番号 3 / 配列番号 4 の組み合わせにより R T - P C R を行い、検出した 394 bp のバンドについて配列を決定し、該バンドを R T - 1 と称した。この領域における配列は前記工程 i ) により予想した配列と 100 % 同一であることが明らかとなった。

【 0 1 4 3 】

配列番号 5 / 配列番号 6 の組み合わせにより R T - P C R を行い、検出した 1554 bp のバンドについて配列を決定し、該バンドを R T - 2 と称した。予想した配列との一致率は、1553 / 1554 で、99 . 94 % であった。

【 0 1 4 4 】

配列番号 7 / 配列番号 8 の組み合わせにより R T - P C R を行い、検出した 907 bp のバンドについて配列を決定し、該バンドを R T - 3 と称した。この領域における配列は前記工程 i ) により予想した配列と 100 % 同一であることが明らかとなった。

【 0 1 4 5 】

上記のようにしてクローニングされたクローン 2 4 ヒトホモログポリヌクレオチドの全長の核酸配列は、配列番号 9 に示される。

また、配列番号 2 に示したマウスのクローン 2 4 ポリヌクレオチドと配列番号 9 に示したヒトホモログとの一致率は、2089 / 2444 = 85 . 47 % であった。

## 【 0 1 4 6 】

クローン 2 4 ヒトホモログポリヌクレオチドにおいて、マウスクローン 2 4 において ファーストメチオニン と定めたアミノ酸に対応する 2 6 塩基目の A T G を翻訳開始コドンと仮定した。その結果、クローン 2 4 ヒトホモログポリヌクレオチドは 8 0 0 アミノ酸からなるタンパク質をコードする遺伝子であると予想され、該タンパク質のアミノ酸配列は、配列番号 1 0 であると予想される。

## 【 実施例 1 4 】

## 【 0 1 4 7 】

## クローン 2 4 に対する抗体の確認

## i) マレイミド基導入 K L H の調製

Key hole limpet hemocyanin (商品名、Calbiochem社製、以下、K L H と称す。) 5 m g を含む 0 . 1 M リン酸ナトリウム緩衝液 p H 7 . 0 と E M C S (商品名、同仁化学社製) 1 m g を 3 7 ° C 1 時間反応させた後、0 . 1 M リン酸緩衝液 p H 6 . 0 で平衡化した P D 1 0 (商品名、アマシャムファルマシアバイオテク社製) で未反応の E M C S を除去し、マレイミド基導入 K L H を得た。

10

## 【 0 1 4 8 】

## ii) P E P T I D E 4 導入 K L H の調製

前記工程 i) で得られたマレイミド基導入 K L H 2 m g と、配列番号 2 のマウスのクローン 2 4 タンパク質における、2 6 6 番目から 2 8 2 番目までの 1 7 個のアミノ酸からなる配列である、Lys Asp Ile Thr Pro Ser Tyr Lys Ile Arg Pro Leu Thr Glu Ala Glu Lys (配列番号 1 3、以下、P E P T I D E 4 と称す。) なる配列の末端に、Cys を導入した、Cys Lys Asp Ile Thr Pro Ser Tyr Lys Ile Arg Pro Leu Thr Glu Ala Glu Lys (配列番号 1 4) 1 m g とを、3 7 ° C 1 時間反応させた後、未反応のペプチドを透析により除去し、P E P T I D E 4 導入 K L H を得た。

20

## 【 0 1 4 9 】

## iii) P E P T I D E 8 導入 K L H の調製

マレイミド基導入 K L H 2 m g と、配列番号 2 のマウスのクローン 2 4 タンパク質における、4 2 6 番目から 4 4 6 番目までの 2 1 個のアミノ酸からなる配列である、Leu Arg Ile Lys Glu Val Glu Val Lys Lys Asp Thr Glu Asp Ile Asn Lys Pro Lys Arg Phe (配列番号 1 5、以下、P E P T I D E 8 と称す。) なる配列の末端に、Cys を導入した、Cys Leu Arg Ile Lys Glu Val Glu Val Lys Lys Asp Thr Glu Asp Ile Asn Lys Pro Lys Arg Phe (配列番号 1 6) 1 m g とを、3 7 ° C 1 時間反応させた後、未反応のペプチドを透析により除去し、P E P T I D E 8 導入 K L H を得た。

30

## 【 0 1 5 0 】

## iv) P E P T I D E 1 0 導入 K L H の調製

マレイミド基導入 K L H 2 m g と、配列番号 2 のマウスのクローン 2 4 タンパク質における、7 5 0 番目から 7 6 5 番目までの 1 6 個のアミノ酸からなる配列である、Glu Ser Ser His Ser Lys Arg Lys Asp Lys Phe Leu Pro Gly Asp Ser (配列番号 1 7、以下 P E P T I D E 1 0 と称す。) なる配列の末端に、Cys を導入した、Cys Glu Ser Ser His Ser Lys Arg Lys Asp Lys Phe Leu Pro Gly Asp Ser (配列番号 1 8) 1 m g とを、3 7 ° C 1 時間反応させた後、未反応のペプチドを透析により除去し、P E P T I D E 1 0 導入 K L H を得た。

40

## 【 0 1 5 1 】

## v) 家兎に対する免疫

前記工程 ii)、iii)、iv) により調製した、P E P T I D E 4 導入 K L H、P E P T I D E 8 導入 K L H、P E P T I D E 1 0 導入 K L H、それぞれ 5 0 μ g をフロイント・コンプリート・アジュバントと混合してエマルジョンを作製し、これをそれぞれ家兎背部皮下に免疫した。さらに、この免疫 1 ヶ月後に同エマルジョンを用いて追加免疫を行い、この 1 週間後に各々の家兎について採血を行った。

## 【 0 1 5 2 】

50

v i ) ブロッキング済みペプチド固相化モジュールの調製

前記クローン 24 タンパク質由来の P E P T I D E 4 , P E P E I D E 8 および P E P T I D E 10、並びに、クローン 24 タンパク質由来ではない、マウス由来の 14 個のアミノ酸からなる P E P T I D E 2 (配列番号 19) および 13 個のアミノ酸からなる P E P T I D E 5 (配列番号 20) をそれぞれ P B S (日水製薬社製) で希釈して、10 μg / ml になるように各ペプチド溶液を調製した。各ペプチド溶液を、それぞれ、96 穴マイクロプレートモジュール (Nalge Nunc International 社製) に 50 μl ずつ分注し、37 1 時間インキュベートして、それぞれのペプチドを固相化した。この後、モジュールを P B S で洗浄後、0.5% の牛血清アルブミンを含む P B S を 200 μl ずつ分注し、37 1 時間インキュベートして、ブロッキングを行った。

10

【0153】

v i i ) 前記工程 v ) で調製した各家兔抗ペプチド血清を P B S で 1000 倍希釈したものを、前記工程 v i ) で調製した、ブロッキング済みペプチド固相化モジュールに、それぞれ 50 μl 分注し、37 1 時間反応させた。モジュールを P B S で洗浄後、ペルオキシダーゼ標識ヤギ抗家兔イムノグロブリン (Biosource International 社製) を P B S で 1500 倍希釈したものを 50 μl 分注し、37 1 時間反応させた。モジュールを洗浄後、ABTS peroxidase substrate (KPL 社製) を加え、室温 10 分間反応後、ABTS peroxidase stop solution (KPL 社製) を加え、405 nm における吸光度を測定した。この成績を図 8 に示した。この成績から、P E P T I D E 4 導入 K L H を免疫した抗体は P E P T I D E 4 を固定したモジュールに、P E P T I D E 8 導入 K L H を免疫した抗体は P E P T I D E 8 を固相化したモジュールに、P E P T I D E 10 導入 K L H を免疫した抗体は P E P T I D E 10 を固相化したモジュールに反応し、他のペプチドを固相化したモジュールには反応しないことがわかった。

20

【0154】

本実施例の結果から、本発明のマウスのクローン 24 タンパク質のタンパク質の一部を家兔に免疫することによって、抗体が得られることが確認できた。この抗体を用いると、免疫した抗原あるいは免疫した抗原から構成されるタンパク質を測定する免疫検出系を構築可能であることが分かる。

【産業上の利用可能性】

【0155】

本発明のポリヌクレオチド及びタンパク質は、脂肪細胞分化誘導開始後 12 時間以内、特に 6 時間前後の細胞から抽出されるポリヌクレオチド並びにタンパク質であり、脂肪細胞分化誘導開始後 12 時間以内に活性化されるポリヌクレオチド及びタンパク質としては新規なものである。これらのポリヌクレオチドおよびタンパク質は、肥満のメカニズムを解明し、さらに肥満の進行状況を適切に把握し、肥満の予防あるいは治療に役立たせる上で極めて有用な物質である。

30

【0156】

本発明のポリヌクレオチド、並びにポリヌクレオチドから推定されるタンパク質またはペプチド、およびこれらのペプチドに対する、抗体、アンタゴニストまたはアゴニストは、肥満を含む糖尿病・高血圧・動脈硬化などの生活習慣病の治療、および診断に有用である。

40

【図面の簡単な説明】

【0157】

【図 1】クローン 24 マウス c D N A の略図、及びサブトラクション法で得られた D N A 断片 S u の情報を元にした、クローン 24 の塩基配列の決定のサブクローニングを示す。

【図 2】クローン 24 より調製した標識プローブは、分化誘導開始 6 時間目をピークとして、3 時間目から 12 時間目の細胞から調製した m R N A は反応することを示すオートラジオグラムである。

【図 3】図 3 ( c ) は、細胞内に発現したクローン 24 の G F P を示す顕微鏡写真である。図 3 ( a ) は対照として細胞全体を写した顕微鏡写真である。図 3 ( b ) は D A P I 法

50

により細胞質内の核のみを染色した顕微鏡写真である。

【図4】クローン24ポリペプチドの模式図であり、該配列中において、ロイシンジッパー構造と考えられる配列部位を特に示す。

【図5】クローン24過剰発現NIH/3T3細胞のオートラジオグラフィーを示す。

【図6】クローン24ヒトホモログcDNAの略図を示す。

【図7】分化誘導後8日目のクローン24過剰発現NIH/3T3細胞及びコントロール細胞のOil-Red-O染色の結果を示す。

【図8】クローン24に対する抗体を確認するために、クローン24タンパク質を構成する一部のペプチドであるPEPTIDE 4、PEPTIDE 8、PEPTIDE 8を各々免疫して得た各抗体は、各ペプチドを固相化したモジュールに反応することを示すグラフである。

10

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】変更

【補正の内容】

【配列表】

200304835800001.app

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/12747

|  |   |                                  |
|--|---|----------------------------------|
| <b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>   |   |                                  |
| Int.Cl. <sup>7</sup> C12N15/09, 1/15, 1/19, 1/21, 5/10, A61K31/7088, 38/00, 39/395, 45/00, 48/00, A61P3/04, 3/06, 3/10, 9/10, 9/12, C07K14/47, 16/18, C12P21/02, C12Q1/02, 1/68, G01N33/15,<br>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)<br>Int.Cl. <sup>7</sup> C12N15/09, 1/15, 1/19, 1/21, 5/10, A61K31/7088, 38/00, 39/395, 45/00, 48/00, A61P3/04, 3/06, 3/10, 9/10, 9/12, C07K14/47, 16/18, C12P21/02, C12Q1/02, 1/68, G01N33/15,         |   |                                  |
| 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)<br>PubMed, SwissProt/PIR/GeneSeq, GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq   |   |                                  |
| <b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>  |   |                                  |
| Category*  | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No.            |
| A  | Zhao L. et al., Transient induction of ENC-1, a Kelch-related actin-binding protein, is required for adipocyte differentiation. J.Biol.Chem., 02 June, 2000 (02.06.00), Vol.275, No.22, pages 16845 to 16850  | 1-10, 13-25, 30-38, 41-56, 61-65 |
| A  | Albrektsen T. et al., Identification of a novel integral plasma membrane protein induced during adipocyte differentiation. Biochem. J., 15 October, 2001 (15.10.01), Vol.359, No.(Pt 2), pages 393 to 402   | 1-10, 13-25, 30-38, 41-56, 61-65 |
| A  | Moldes M. et al., Molecular cloning of a major mRNA species in murine 3T3 adipocyte lineage. differentiation-dependent expression, regulation, and identification as semicarbazide-sensitive amine oxidase. J.Biol.Chem., 02 April, 1999 (02.04.99), Vol.274, No.14, pages 9515 to 9523 | 1-10, 13-25, 30-38, 41-56, 61-65 |
| <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.   |   |                                  |
| * Special categories of cited documents:   | "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   |                                  |
| "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance   | "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  |                                  |
| "E" earlier document but published on or after the international filing date   | "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  |                                  |
| "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)  | "&" document member of the same patent family   |                                  |
| "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   |   |                                  |
| Date of the actual completion of the international search<br>14 March, 2003 (14.03.03)   | Date of mailing of the international search report<br>01 April, 2003 (01.04.03)   |                                  |
| Name and mailing address of the ISA/<br>Japanese Patent Office   | Authorized officer  |                                  |
| Facsimile No.  | Telephone No.   |                                  |

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/12747

| C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT |   |  |
|---|---|--|
| Category*   | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No.                  |
| A   | Albrektsen T. et al., The transcription factor Fos-related antigen 1 is induced by thiazolidinediones during differentiation of 3T3-L1 cells. Mol.Pharmacol., 2001 Mar., Vol.59, No.3, pages 567 to 575 | 1-10, 13-25,<br>30-38, 41-56,<br>61-65 |

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/12747

**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 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:  
(See extra sheet.)
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 3 of first sheet)**

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

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.:

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

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/12747

Continuation of A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
(International Patent Classification (IPC))Int.Cl<sup>7</sup> 33/50, 33/53, 37/00

(According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC)

Continuation of B. FIELDS SEARCHED

Minimum Documentation Searched (International Patent Classification (IPC))

Int.Cl<sup>7</sup> 33/50, 33/53, 37/00

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

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

Claims 1 and 5

The "polynucleotide" as set forth in claim 1 involves any polynucleotides encoding proteins having the properties as described in claim 1. However, only part of the polynucleotides involved in the invention as set forth in claim 1 are supported by the description in the meaning as defined in PCT Article 6 and disclosed therein in the meaning as defined in PCT Article 5. Therefore, the search was made exclusively on the polynucleotides supported and disclosed by the description, i.e., the polynucleotides comprising the base sequences represented by SEQ ID NOS:1 and 9. The same applies to claim 5.


Claims 11, 12, 26 to 29, 39, 40 and 57 to 60

Concerning the "agonist" and the "antagonist" as set forth in the above claims, it is completely unknown what specific substances are involved in the scopes thereof and what are not, even though the statement of the description is taken into consideration. Thus, these claims are described in an extremely unclear manner. Such being the case, no meaningful international search can be made on the above claims.

Claims 4, 9, 10, 13, 20 to 25, 30 to 33 and 61 to 64

The inventions as set forth in the above claims involve any of the inventions as set forth in claims 1, 5, 11, 12, 26 to 29, 39, 40 and 57 to 60 in the constitution thereof and, from this viewpoint, involve some parts on which no meaningful international search can be made for the above-described reasons.

Thus, the search was made exclusively on other parts of the above claims.

| 国際調査報告  |  | 国際出願番号 PCT/JPO2/12747   |                 |                                   |                  |   |  |  |   |  |  |
|---|--|---|-----------------|-----------------------------------|------------------|---|--|--|---|--|--|
| <p>A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))<br/>         Int. Cl<sup>7</sup> C12N 15/09, 1/15, 1/19, 1/21, 5/10, A61K 31/7088, 38/00, 39/395, 45/00, 48/00, A61P 3/04, 3/06, 3/10, 9/10, 9/12, C07K 14/47, 16/18, C12P 21/02, C12Q 1/02, 1/68, G01N 33/15, 33/50, 33/53, 37/00</p>   |  |   |                 |                                   |                  |   |  |  |   |  |  |
| <p>B. 調査を行った分野<br/>         調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))<br/>         Int. Cl<sup>7</sup> C12N 15/09, 1/15, 1/19, 1/21, 5/10, A61K 31/7088, 38/00, 39/395, 45/00, 48/00, A61P 3/04, 3/06, 3/10, 9/10, 9/12, C07K 14/47, 16/18, C12P 21/02, C12Q 1/02, 1/68, G01N 33/15, 33/50, 33/53, 37/00</p>   |  |   |                 |                                   |                  |   |  |  |   |  |  |
| <p>最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの</p>   |  |   |                 |                                   |                  |   |  |  |   |  |  |
| <p>国際調査で使った電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)<br/>         PubMed, SwissProt/PIR/GeneSeq, GenBank/EMBL/DBJ/GeneSeq</p>  |  |   |                 |                                   |                  |   |  |  |   |  |  |
| <p>C. 関連すると認められる文献</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 10%;">引用文献の<br/>カテゴリー*</th> <th style="width: 70%;">引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示</th> <th style="width: 20%;">関連する<br/>請求の範囲の番号</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center;">A</td> <td>Zhao L, et al., Transient induction of ENC-1, a Kelch-related actin-binding protein, is required for adipocyte differentiation. J Biol Chem., 2000 Jun 2, vol. 275, no. 22, p. 16845-16850</td> <td style="text-align: center;">1-10, 13-25,<br/>30-38, 41-56,<br/>61-65</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">A</td> <td>Albrektsen T, et al., Identification of a novel integral plasma membrane protein induced during adipocyte differentiation. Biochem J., 2001 Oct 15, vol. 359, no. (Pt 2), p. 393-402</td> <td style="text-align: center;">1-10, 13-25,<br/>30-38, 41-56,<br/>61-65</td> </tr> </tbody> </table> |  |   | 引用文献の<br>カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する<br>請求の範囲の番号 | A | Zhao L, et al., Transient induction of ENC-1, a Kelch-related actin-binding protein, is required for adipocyte differentiation. J Biol Chem., 2000 Jun 2, vol. 275, no. 22, p. 16845-16850 | 1-10, 13-25,<br>30-38, 41-56,<br>61-65 | A | Albrektsen T, et al., Identification of a novel integral plasma membrane protein induced during adipocyte differentiation. Biochem J., 2001 Oct 15, vol. 359, no. (Pt 2), p. 393-402 | 1-10, 13-25,<br>30-38, 41-56,<br>61-65 |
| 引用文献の<br>カテゴリー*   | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示  | 関連する<br>請求の範囲の番号  |                 |                                   |                  |   |  |  |   |  |  |
| A   | Zhao L, et al., Transient induction of ENC-1, a Kelch-related actin-binding protein, is required for adipocyte differentiation. J Biol Chem., 2000 Jun 2, vol. 275, no. 22, p. 16845-16850 | 1-10, 13-25,<br>30-38, 41-56,<br>61-65  |                 |                                   |                  |   |  |  |   |  |  |
| A   | Albrektsen T, et al., Identification of a novel integral plasma membrane protein induced during adipocyte differentiation. Biochem J., 2001 Oct 15, vol. 359, no. (Pt 2), p. 393-402       | 1-10, 13-25,<br>30-38, 41-56,<br>61-65  |                 |                                   |                  |   |  |  |   |  |  |
| <p><input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <span style="margin-left: 100px;"><input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。</span></p>   |  |   |                 |                                   |                  |   |  |  |   |  |  |
| <p>* 引用文献のカテゴリー<br/>         「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの<br/>         「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの<br/>         「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)<br/>         「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献<br/>         「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願<br/> <span style="float: right;">の日に後に公表された文献<br/>         「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの<br/>         「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの<br/>         「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの<br/>         「&amp;」 同一パテントファミリー文献</span></p>   |  |   |                 |                                   |                  |   |  |  |   |  |  |
| <p>国際調査を完了した日<br/>         14.03.03</p>   |  | <p>国際調査報告の発送日<br/>         01.04.03</p>   |                 |                                   |                  |   |  |  |   |  |  |
| <p>国際調査機関の名称及びあて先<br/>         日本国特許庁 (ISA/JIP)<br/>         郵便番号 100-8915<br/>         東京都千代田区霞が関三丁目4番3号</p>   |  | <p>特許庁審査官 (権限のある職員)<br/>         小暮 道明 <br/>         電話番号 03-3581-1101 内線 3448</p> |                 |                                   |                  |   |  |  |   |  |  |

| 国際調査報告              |   | 国際出願番号 PCT/JP02/12747                  |
|---------------------|---|--|
| C (続き) 関連すると認められる文献 |   |  |
| 引用文献の<br>カテゴリー*     | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示   | 関連する<br>請求の範囲の番号                       |
| A                   | Moldes M, et al., Molecular cloning of a major mRNA species in murine 3T3 adipocyte lineage. differentiation-dependent expression, regulation, and identification as semicarbazide-sensitive amine oxidase. J Biol Chem., 1999 Apr 2, vol.274, no.14, p.9515-9523 | 1-10, 13-25,<br>30-38, 41-56,<br>61-65 |
| A                   | Albrektsen T, et al., The transcription factor Fos-related antigen 1 is induced by thiazolidinediones during differentiation of 3T3-L1 cells. Mol Pharmacol., 2001 Mar, vol.59, no.3, p.567-575   | 1-10, 13-25,<br>30-38, 41-56,<br>61-65 |

様式 PCT/ISA/210 (第2ページの続き) (1998年7月)

|  |                       |
|--|-----------------------|
| 国際調査報告   | 国際出願番号 PCT/JPO2/12747 |
| <p>第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)</p> <p>法第8条第3項 (PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。</p> <p>1. <input type="checkbox"/> 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、</p> <p>2. <input checked="" type="checkbox"/> 請求の範囲 <u>(特別ページ参照)</u> は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、<br/>(特別ページ参照)</p> <p>3. <input type="checkbox"/> 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。</p>  |                       |
| <p>第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)</p> <p>次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。</p> <p>1. <input type="checkbox"/> 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。</p> <p>2. <input type="checkbox"/> 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。</p> <p>3. <input type="checkbox"/> 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。</p> <p>4. <input type="checkbox"/> 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。</p> <p>追加調査手数料の異議の申立てに関する注意</p> <p><input type="checkbox"/> 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。</p> <p><input type="checkbox"/> 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。</p> |                       |

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JPO2/12747

## 第 I 欄 2. の続き

## ・請求の範囲 1、5

請求の範囲 1 に記載された「ポリヌクレオチド」には、請求の範囲 1 に記載された性質を有するタンパク質をコードするあらゆるポリヌクレオチドを包含するものである。しかし、PCT 6 条の意味において明細書に裏付けられ、また、PCT 5 条の意味において開示されているのは、請求の範囲 1 に記載された発明に包含されるポリヌクレオチドのごくわずかなものに過ぎない。よって、調査は、明細書に裏付けられかつ開示されている部分、すなわち、配列番号 1 及び 9 で表される塩基配列からなるポリヌクレオチドに関連するものについてのみ行った。請求の範囲 5 についても同様である。

## ・請求の範囲 11、12、26-29、39、40、57-60

上記請求の範囲に記載の「アゴニスト」及び「アンタゴニスト」について、明細書の記載を参酌しても、具体的にはどのようなものが包含され、どのようなものが包含されないのかが全く不明であるから、前記請求の範囲の記載は著しく不明確である。したがって、前記請求の範囲については、有意義な国際調査をすることができない。

## ・請求の範囲 4、9、10、13、20-25、30-33、61-64

上記請求の範囲に記載された発明には、請求の範囲 1、5、11、12、26-29、39、40、57-60 に記載された発明の何れかをその構成に含むものであり、その点において上述したり理由により有意義な国際調査をすることができない部分を包含している。

よって、上記請求の範囲についての調査はその余の部分についてのみ行った。

## フロントページの続き

| (51)Int.Cl. <sup>7</sup> | F I            |       |
|--------------------------|----------------|-------|
| A 6 1 K 48/00            | A 6 1 K 48/00  |       |
| A 6 1 P 3/04             | A 6 1 P 3/04   |       |
| A 6 1 P 3/06             | A 6 1 P 3/06   |       |
| A 6 1 P 3/10             | A 6 1 P 3/10   |       |
| A 6 1 P 9/00             | A 6 1 P 9/00   |       |
| A 6 1 P 9/10             | A 6 1 P 9/10   | 1 0 1 |
| A 6 1 P 9/12             | A 6 1 P 9/12   |       |
| C 0 7 K 14/47            | C 0 7 K 14/47  |       |
| C 0 7 K 16/18            | C 0 7 K 16/18  |       |
| C 1 2 N 1/15             | C 1 2 N 1/15   |       |
| C 1 2 N 1/19             | C 1 2 N 1/19   |       |
| C 1 2 N 1/21             | C 1 2 N 1/21   |       |
| C 1 2 N 5/10             | C 1 2 P 21/02  | C     |
| C 1 2 P 21/02            | C 1 2 Q 1/02   |       |
| C 1 2 Q 1/02             | C 1 2 Q 1/68   | A     |
| C 1 2 Q 1/68             | G 0 1 N 33/15  | Z     |
| G 0 1 N 33/15            | G 0 1 N 33/50  | Z     |
| G 0 1 N 33/50            | G 0 1 N 33/53  | D     |
| G 0 1 N 33/53            | G 0 1 N 33/53  | M     |
| G 0 1 N 33/566           | G 0 1 N 33/566 |       |
|                          | C 1 2 N 5/00   | A     |
|                          | A 6 1 K 37/02  |       |

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

|             |  |         |            |
|-------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译)     | 脂肪细胞分化相关基因和蛋白质   |         |            |
| 公开(公告)号     | <a href="#">JPWO2003048358A5</a>   | 公开(公告)日 | 2005-12-22 |
| 申请号         | JP2003549536   | 申请日     | 2002-12-05 |
| 申请(专利权)人(译) | 日水制药有限公司   |         |            |
| [标]发明人      | 今川正良<br>奥裕一  |         |            |
| 发明人         | 今川 正良<br>奥 裕一  |         |            |
| IPC分类号      | C12N15/09 A61K31/7088 A61K38/00 A61K39/395 A61K45/00 A61K48/00 A61P3/04 A61P3/06 A61P3/10 A61P9/00 A61P9/10 A61P9/12 C07K14/47 C07K16/18 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12P21/02 C12Q1/02 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/566  |         |            |
| CPC分类号      | C07K14/47 A61K38/00  |         |            |
| FI分类号       | C12N15/00.ZNA.A A61K31/7088 A61K39/395.D A61K39/395.N A61K45/00 A61K48/00 A61P3/04 A61P3/06 A61P3/10 A61P9/00 A61P9/10.101 A61P9/12 C07K14/47 C07K16/18 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02.C C12Q1/02 C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566 C12N5/00.A A61K37/02 |         |            |
| 优先权         | 2001374785 2001-12-07 JP   |         |            |
| 其他公开文献      | JPWO2003048358A1<br>JP4504682B2  |         |            |

#### 摘要(译)

由脂肪细胞分化诱导开始12小时内由前脂肪细胞产生的多核苷酸，其包含与SEQ ID NO：1相同或至少93%同源的碱基序列或与SEQ ID NO：9相同的碱基序列或互补的多核苷酸包括与SEQ ID NO：2所示蛋白质相同或至少96%同源的氨基酸序列或包含SEQ ID NO：10所示氨基酸序列的蛋白质。