

(19)日本国特許庁 ( J P )

(12) **公開特許公報** ( A ) (11)特許出願公開番号

**特開2003 - 235587**

(P2003 - 235587A)

(43)公開日 平成15年8月26日(2003.8.26)

(51) Int.Cl <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マ-ト* (参考)
C 1 2 N 15/09	ZNA	A 6 1 K 45/00	2 G 0 4 5
A 6 1 K 45/00		A 6 1 P 37/02	4 B 0 2 4
A 6 1 P 37/02		C 0 7 K 14/47	4 B 0 6 3
C 0 7 K 14/47		C 1 2 N 1/19	4 B 0 6 4
C 1 2 N 1/19		1/21	4 B 0 6 5

審査請求 未請求 請求項の数 27 O L (全 85数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2002 - 362849(P2002 - 362849)

(22)出願日 平成14年12月13日(2002.12.13)

(31)優先権主張番号 特願2001 - 380423(P2001 - 380423)

(32)優先日 平成13年12月13日(2001.12.13)

(33)優先権主張国 日本(JP)

(71)出願人 391012316

東京工業大学長

東京都目黒区大岡山2丁目12番1号

(71)出願人 000001029

協和醗酵工業株式会社

東京都千代田区大手町1丁目6番1号

(72)発明者 半田 宏

東京都世田谷区桜上水1 - 17 - 16

(72)発明者 岡崎 彰

東京都町田市旭町3丁目6番6号 協和醗酵工業株式会社東京研究所内

(74)代理人 100105647

弁理士 小栗 昌平 (外4名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 L K 6 - Aまたはその誘導体に結合する蛋白質の探索方法、該蛋白質および該蛋白質を用いた免疫抑制剤の探索方法

(57)【要約】

【課題】 LK6-Aまたはその誘導体に結合する蛋白質の探索方法、該蛋白質および該蛋白質を用いた自己免疫疾患治療剤または免疫抑制剤の探索方法を提供する。

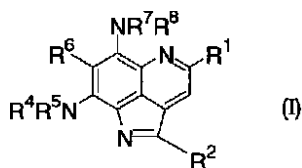
【解決手段】 LK6-Aまたはその誘導体の固定化担体と被検蛋白質試料を接触させ、被検蛋白質試料よりLK6-A誘導体に特異的に結合する蛋白質を選択することによりLK6-Aまたはその誘導体に結合する蛋白質を探索する。

1

【特許請求の範囲】

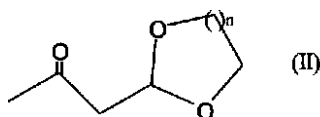
【請求項1】下記式(1)

【化1】



[式中、R<sup>1</sup>は置換もしくは非置換の低級アルキル、低級アルカノイル、カルボキシ、低級アルコキシカルボニル、下記式(II)

【化2】



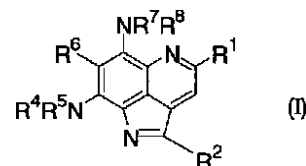
(式中、nは1または2を表す)で表される基またはC O C H = C H R<sup>9</sup> {式中、R<sup>9</sup>は置換もしくは非置換の低級アルコキシ、置換もしくは非置換のアリール、置換もしくは非置換のヘテロアリールまたはNR<sup>10</sup>R<sup>11</sup> (式中、R<sup>10</sup>およびR<sup>11</sup>は同一または異なって、水素、置換もしくは非置換の低級アルキル、置換もしくは非置換の低級アルケニル、置換もしくは非置換のアラルキル、置換もしくは非置換のアリール、置換もしくは非置換のヘテロアリール、置換もしくは非置換のヘテロアリール置換低級アルキル、置換もしくは非置換のテトラヒドロピラニルまたは置換もしくは非置換のテトラヒドロピラニルメチルを表すか、R<sup>10</sup>とR<sup>11</sup>が隣接するNと一緒に置換もしくは非置換の複素環基を形成する) } を表し、R<sup>2</sup>は水素、置換もしくは非置換の低級アルキル、置換もしくは非置換の低級アルケニル、置換もしくは非置換の低級アルキニル、置換もしくは非置換のアリール、置換もしくは非置換のヘテロアリール、置換もしくは非置換の低級アルカノイル、置換もしくは非置換の低級アルカノイルオキシ、ハロゲン、S R<sup>12</sup> (式中、R<sup>12</sup>は置換もしくは非置換の低級アルキル、置換もしくは非置換のアリール、置換もしくは非置換のヘテロアリール、置換もしくは非置換のアラルキル、置換もしくは非置換のヘテロアリール置換低級アルキル、置換もしくは非置換のテトラヒドロピラニルまたは置換もしくは非置換のテトラヒドロピラニルメチルを表す)、NR<sup>13</sup>R<sup>14</sup> (式中、R<sup>13</sup>およびR<sup>14</sup>はそれぞれ前記のR<sup>10</sup>およびR<sup>11</sup>と同義である) またはアジドを表し、R<sup>4</sup>およびR<sup>5</sup>は同一または異なって、水素、置換もしくは非置換の低級アルキル、置換もしくは非置換の低級アルカノイル、置換もしくは非置換の低級アルコキシカルボニル、置換もしくは非置換のアラルキルオキシカルボニルまたは置換もしくは非置換のヘテロアリール置換低級アルコキシカルボニルを表し、R<sup>6</sup>は水素またはハロゲンを表し、R<sup>7</sup>およびR<sup>8</sup>は

2

同一または異なって、水素、置換もしくは非置換の低級アルキルまたは置換もしくは非置換の低級アルカノイルを表す]で表される化合物(以下、LK6-Aまたはその誘導体と略す)を固定化した担体と被検蛋白質試料を接触させ、被検蛋白質試料より上記式(1)で表される化合物に特異的に結合する蛋白質を選択することを特徴とするLK6-Aまたはその誘導体に結合する蛋白質の探索方法。

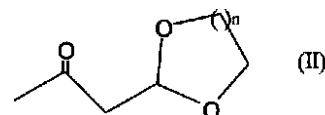
【請求項2】下記式(1)

【化3】



[式中、R<sup>1</sup>は置換もしくは非置換の低級アルキル、低級アルカノイル、カルボキシ、低級アルコキシカルボニル、下記式(II)

【化4】



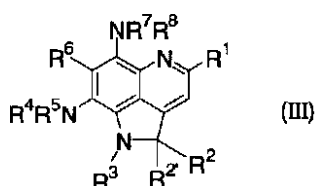
(式中、nは1または2を表す)で表される基またはC O C H = C H R<sup>9</sup> {式中、R<sup>9</sup>は置換もしくは非置換の低級アルコキシ、置換もしくは非置換のアリール、置換もしくは非置換のヘテロアリールまたはNR<sup>10</sup>R<sup>11</sup> (式中、R<sup>10</sup>およびR<sup>11</sup>は同一または異なって、水素、置換もしくは非置換の低級アルキル、置換もしくは非置換の低級アルケニル、置換もしくは非置換の低級アルキニル、置換もしくは非置換のアラルキル、置換もしくは非置換のアリール、置換もしくは非置換のヘテロアリール、置換もしくは非置換のヘテロアリール置換低級アルキル、置換もしくは非置換のテトラヒドロピラニルまたは置換もしくは非置換のテトラヒドロピラニルメチルを表すか、R<sup>10</sup>とR<sup>11</sup>が隣接するNと一緒に置換もしくは非置換の複素環基を形成する) } を表し、R<sup>2</sup>は水素、置換もしくは非置換の低級アルキル、置換もしくは非置換の低級アルケニル、置換もしくは非置換の低級アルキニル、置換もしくは非置換のアリール、置換もしくは非置換のヘテロアリール、置換もしくは非置換の低級アルカノイル、置換もしくは非置換の低級アルカノイルオキシ、ハロゲン、S R<sup>12</sup> (式中、R<sup>12</sup>は置換もしくは非置換の低級アルキル、置換もしくは非置換のアリール、置換もしくは非置換のヘテロアリール、置換もしくは非置換のアラルキル、置換もしくは非置換のヘテロアリール置換低級アルキル、置換もしくは非置換のテトラヒドロピラニルまたは置換もしくは非置換のテトラヒドロピラニルメチルを表す)、NR<sup>13</sup>R<sup>14</sup> (式中、R<sup>13</sup>およびR<sup>14</sup>はそれぞれ前記のR<sup>10</sup>およびR<sup>11</sup>と同義であ

3

4

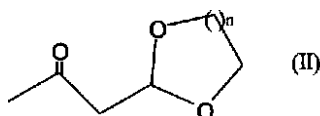
る) またはアジドを表し、 $R^4$ および $R^5$ は同一または異なって、水素、置換もしくは非置換の低級アルキル、置換もしくは非置換の低級アルカノイル、置換もしくは非置換の低級アルコキシカルボニル、置換もしくは非置換のアラルキルオキシカルボニルまたは置換もしくは非置換のヘテロアリアル置換低級アルコキシカルボニルを表し、 $R^6$ は水素またはハロゲンを表し、 $R^7$ および $R^8$ は同一または異なって、水素、置換もしくは非置換の低級アルキルまたは置換もしくは非置換の低級アルカノイルを表す] で表される化合物を固定化した担体と被検蛋白質試料を接触させたとき式(1)で表される化合物へ結合する蛋白質と、下記式(III)

【化5】



[式中、 $R^1$ は置換もしくは非置換の低級アルキル、低級アルカノイル、カルボキシ、低級アルコキシカルボニル、下記式(II)

【化6】



(式中、 $n$ は1または2を表す) で表される基または $COCH=CHR^9$  { 式中、 $R^9$ は置換もしくは非置換の低級アルコキシ、置換もしくは非置換のアリアル、置換もしくは非置換のヘテロアリアルまたは $NR^{10}R^{11}$  (式中、 $R^{10}$ および $R^{11}$ は同一または異なって、水素、置換もしくは非置換の低級アルキル、置換もしくは非置換の低級アルケニル、置換もしくは非置換のアラルキル、置換もしくは非置換のアリアル、置換もしくは非置換のヘテロアリアル、置換もしくは非置換のヘテロアリアル置換低級アルキル、置換もしくは非置換のテトラヒドロピラニルまたは置換もしくは非置換のテトラヒドロピラニルメチルを表すか、 $R^{10}$ と $R^{11}$ が隣接するNと一緒に置換もしくは非置換の複素環基を形成する) } を表し、 $R^2$ は水素、置換もしくは非置換の低級アルキル、置換もしくは非置換の低級アルケニル、置換もしくは非置換の低級アルキニル、置換もしくは非置換のアリアル、置換もしくは非置換のヘテロアリアル、置換もしくは非置換の低級アルカノイル、置換もしくは非置換の低級アルカノイルオキシ、ハロゲン、 $SR^{12}$  (式中、 $R^{12}$ は置換もしくは非置換の低級アルキル、置換もしくは非置換のアリアル、置換もしくは非置換のヘテロアリアル、置換もしくは非置換のアラルキル、置換もしくは非置換のヘテロア

リアル置換低級アルキル、置換もしくは非置換のテトラヒドロピラニルまたは置換もしくは非置換のテトラヒドロピラニルメチルを表す)、 $NR^{13}R^{14}$  (式中、 $R^{13}$ および $R^{14}$ はそれぞれ前記の $R^{10}$ および $R^{11}$ と同義である) またはアジドを表し、 $R^2$ は水素、または置換もしくは非置換の低級アルカノイルオキシを表し、 $R^3$ は置換もしくは非置換の低級アルカノイルを表し、 $R^4$ および $R^5$ は同一または異なって、水素、置換もしくは非置換の低級アルキル、置換もしくは非置換の低級アルカノイル、置換もしくは非置換の低級アルコキシカルボニル、置換もしくは非置換のアラルキルオキシカルボニルまたは置換もしくは非置換のヘテロアリアル置換低級アルコキシカルボニルを表し、 $R^6$ は水素またはハロゲンを表し、 $R^7$ および $R^8$ は同一または異なって、水素、置換もしくは非置換の低級アルキルまたは置換もしくは非置換の低級アルカノイルを表す] で表される化合物を固定化した担体と被検蛋白質試料を接触させたとき、式(III)で表される化合物へ結合する蛋白質とを比較し、被検蛋白質試料より式(1)で表される化合物に特異的に結合する蛋白質を選択することを特徴とするLK6-Aまたはその誘導体に結合する蛋白質の探索方法。

【請求項3】担体が、ラテックスビーズである請求項1または2記載の探索方法。

【請求項4】被検蛋白質試料が、真核生物由来の蛋白質試料である請求項1～3のいずれか1項に記載の探索方法。

【請求項5】LK6-Aまたはその誘導体を固定化した担体。

【請求項6】担体が、ラテックスビーズである請求項5記載の担体。

【請求項7】下記(i)～(v)から選ばれるいずれか1つの蛋白質。

(i) 請求項1～4のいずれか1項に記載の方法で得られるLK6-Aまたはその誘導体に結合する蛋白質

(ii) 配列番号1～5、43、45および46のいずれかで表されるアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつLK6-Aまたはその誘導体に結合する蛋白質

(iii) 配列番号1～5、43、45および46のいずれかで表されるアミノ酸配列と60～99%の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつLK6-Aまたはその誘導体に結合する蛋白質

(iv) 配列番号2で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質

(v) 配列番号49で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質

【請求項8】請求項7記載の蛋白質をコードするDNA。

【請求項9】請求項8記載のDNAをベクターDNAに連結して得られる組換え体DNA。

【請求項 10】請求項 9 記載の組換え体 DNA を含有する形質転換体。

【請求項 11】形質転換体が、細菌、酵母、昆虫細胞、植物細胞または動物細胞を宿主として得られる請求項 10 記載の形質転換体。

【請求項 12】請求項 10 または 11 記載の形質転換体を培地に培養し、培養物中に請求項 7 に記載の蛋白質を生成蓄積させ、該培養物から該蛋白質を採取することを特徴とする、請求項 7 記載の蛋白質の製造方法。

【請求項 13】被検物質存在下、LK6-A またはその誘導体と LK6-A またはその誘導体に結合する蛋白質とを接触させた場合の LK6-A またはその誘導体と該蛋白質との結合量を測定し、被検物質非存在下、LK6-A またはその誘導体と LK6-A またはその誘導体に結合する蛋白質とを接触させた場合の LK6-A またはその誘導体と該蛋白質との結合量を測定し、被検物質存在下と被検物質非存在下での該測定値を比較し、被検物質より LK6-A またはその誘導体と LK6-A またはその誘導体に結合する蛋白質の結合を阻害する物質を選択することを特徴とする LK6-A またはその誘導体に結合する蛋白質に結合する物質の探索方法。

【請求項 14】LK6-A またはその誘導体に結合する蛋白質と被検物質とを接触させた場合の該蛋白質の活性と、被検物質を接触させない場合での該蛋白質の活性を測定し、被検物質存在下と被検物質非存在下での該測定値を比較し、被検物質より該蛋白質の活性を変化させる物質を選択することを特徴とする LK6-A またはその誘導体に結合する蛋白質の活性を変化させる物質の探索方法。

【請求項 15】LK6-A またはその誘導体に結合する蛋白質を発現する形質転換体と被検物質とを接触させた場合の該形質転換体の細胞応答と、被検物質非存在下での該形質転換体の細胞応答を測定し、被検物質存在下と被検物質非存在下での該測定値を比較し、被検物質より該形質転換株の細胞応答を変化させる物質を選択することを特徴とする LK6-A またはその誘導体に結合する蛋白質の機能を変化させる物質の探索方法。

【請求項 16】LK6-A またはその誘導体に結合する蛋白質を発現する形質転換体と被検物質を接触させた場合の該形質転換体の該蛋白質をコードする DNA の発現量と、被検物質非存在下での該形質転換体の該蛋白質をコードする DNA の発現量を測定し、被検物質存在下と被検物質非存在下での該測定値を比較し、被検物質より該蛋白質をコードする DNA の発現量を変化させる物質を選択することを特徴とする LK6-A またはその誘導体に結合する蛋白質をコードする DNA の発現量を変化させる物質の探索方法。

【請求項 17】LK6-A またはその誘導体に結合する蛋白質を発現する形質転換体と被検物質を接触させた場合の該形質転換体の該蛋白質の発現量と、被検物質非存在下での該形質転換体の該蛋白質の発現量を測定し、被検物

質存在下と被検物質非存在下での該測定値を比較し、被検物質より該蛋白質の発現量を変化させる物質を選択することを特徴とする LK6-A またはその誘導体に結合する蛋白質の発現量を変化させる物質の探索方法。

【請求項 18】LK6-A またはその誘導体に結合する蛋白質が、下記 (i) ~ (v) から選ばれるいずれか 1 つの蛋白質である請求項 13 ~ 17 のいずれか 1 項に記載の探索方法。

(i) 配列番号 1 ~ 5、43、45、46 および 49 の

いずれかで表されるアミノ酸配列を有する蛋白質

(ii) 請求項 7 記載の蛋白質

(iii) 配列番号 1 ~ 5、43、45、46 および 49

のいずれかで表されるアミノ酸配列と 60% 以上の相同性を有し、かつ LK6-A またはその誘導体と結合する蛋白質

(iv) 配列番号 45 で表されるアミノ酸配列においてアミノ酸番号 353 ~ 408 で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質

(v) 配列番号 46 で表されるアミノ酸配列においてアミノ酸番号 64 ~ 121 で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質

【請求項 19】被検物質存在下、下記 (i) ~ (iii) から選ばれるいずれか 1 つの蛋白質の活性と、被検物質非存在下での該蛋白質の活性を測定し、被検物質存在下と被検物質非存在下での該測定値を比較し、被検物質より該蛋白質の活性を阻害する物質を選択することを特徴とする該蛋白質の活性を阻害する物質の探索方法。

(i) 配列番号 1 で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質

(ii) 配列番号 1 で表されるアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸残基が欠失、置換、挿入もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ配列番号 1 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質と実質的に同一の活性を有する蛋白質

(iii) 配列番号 1 で表されるアミノ酸配列と 60% 以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ配列番号 1 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質と実質的に同一の活性を有する蛋白質

【請求項 20】被検物質存在下、CD2 蛋白質またはその誘導体と下記 (i) ~ (iii) から選ばれるいずれか 1 つの蛋白質を接触させた場合の CD2 蛋白質またはその誘導体と該蛋白質の結合量と、被検物質非存在下、CD2 蛋白質またはその誘導体と該蛋白質とを接触させた場合での CD2 蛋白質またはその誘導体と該蛋白質との結合量を測定し、被検物質存在下と被検物質非存在下での該測定値を比較し、被検物質より該結合を阻害する物質を選択することを特徴とする CD2 蛋白質またはその誘導体と該蛋白質の結合を阻害する化合物の探索方法。

(i) 配列番号 1 または 2 で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質

(ii) 配列番号1または2で表されるアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつCD2蛋白質と結合する蛋白質

(iii) 配列番号1または2で表されるアミノ酸配列と60%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつCD2蛋白質と結合する蛋白質

【請求項21】CD2蛋白質の誘導体が、下記(i)~(ii)から選ばれるいずれか1つの蛋白質である請求項20記載の探索方法。

(i) 配列番号6で表されるアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ配列番号1または2で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質と結合する活性を有する蛋白質

(ii) 配列番号6で表されるアミノ酸配列と60%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ配列番号1または2で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質と結合する蛋白質

(iii) 配列番号6で表されるアミノ酸配列のアミノ酸番号281~310番目のアミノ酸配列を有する蛋白質

【請求項22】被検物質存在下、下記(i)~(iii)から選ばれるいずれか1つの蛋白質のグリコーゲンデブランチングエンザイム活性と、被検物質非存在下での該蛋白質の該活性を測定し、被検物質存在下と被検物質非存在下での該測定値を比較し、被検物質より該蛋白質の該活性を阻害する物質を選択することを特徴とする該蛋白質の活性を阻害する物質の探索方法。

(i) 配列番号3で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質

(ii) 配列番号3で表されるアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸残基が欠失、置換、挿入もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつグリコーゲンデブランチングエンザイム活性を有する蛋白質

(iii) 配列番号3で表されるアミノ酸配列と60%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつグリコーゲンデブランチングエンザイム活性を有する蛋白質

【請求項23】被検物質存在下、下記(i)~(iii)から選ばれるいずれか1つの蛋白質のペルオキシダーゼ活性と、被検物質非存在下での該蛋白質の該活性を測定し、被検物質存在下と被検物質非存在下での該測定値を比較し、被検物質より該蛋白質の該活性を阻害する物質を選択することを特徴とする該蛋白質の活性を阻害する物質の探索方法。

(i) 配列番号5で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質

(ii) 配列番号5で表されるアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸残基が欠失、置換、挿入もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつペルオキシダーゼ活性\*

\*を有する蛋白質

(iii) 配列番号5で表されるアミノ酸配列と60%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつペルオキシダーゼ活性を有する蛋白質

【請求項24】被検物質存在下、CD2BP2蛋白質またはその誘導体とLK6-Aまたはその誘導体を接触させたときのCD2BP2蛋白質またはその誘導体とLK6-Aまたはその誘導体の結合量と、被検物質非存在下、CD2蛋白質またはその誘導体とLK6-Aまたはその誘導体とを接触させたときのCD2BP2蛋白質またはその誘導体とLK6-Aまたはその誘導体の結合量を測定し、被検物質存在下と被検物質非存在下での該測定値を比較し、被検物質より該結合を阻害する物質を選択することを特徴とするCD2BP2蛋白質またはその誘導体とLK6-Aまたはその誘導体の結合を阻害する化合物の探索方法。

【請求項25】CD2BP2蛋白質の誘導体が、下記(i)~(iii)から選ばれるいずれか1つの蛋白質である請求項24記載の探索方法。

(i) 配列番号43で表されるアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ配列番号1または2で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質と結合する活性を有する蛋白質

(ii) 配列番号43で表されるアミノ酸配列と60%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ配列番号1または2で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質と結合する蛋白質

(iii) 配列番号43で表されるアミノ酸配列のアミノ酸番号282~341番目のアミノ酸配列を有する蛋白質

【請求項26】請求項13~25のいずれか1項に記載の探索方法で得られる物質または該物質の薬学的に許容される塩。

【請求項27】請求項26記載の物質または該物質の薬学的に許容される塩を含有する自己免疫疾患治療剤または免疫抑制剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明はLK6-Aまたはその誘導体に結合する蛋白質(以下、LK6-A結合蛋白質ともいう)の探索方法、該蛋白質および該蛋白質を用いた自己免疫疾患治療剤または免疫抑制剤の探索方法に関する。

【0002】

【従来の技術】LK6-Aおよびその誘導体(以下、LK6-Aおよびその誘導体を総称してLK6-A誘導体という)は、優れた免疫抑制作用を有する自己免疫疾患治療剤、および臓器移植時の拒絶反応を抑える免疫抑制剤として有用であることが報告されている[The Journal of Antibiotics, 50, 357 (1997)、The Journal of Antibiotics, 50, 543 (1997)、特開平9-151185、W000/02879]。免疫抑制

剤は臓器移植の際の拒絶反応を抑制するために用いられる薬剤である。また、臓器移植以外に、膠原病等のように免疫反応が病態に関与していると考えられる疾患にも免疫抑制剤が使用される。主な免疫抑制剤には、化学的免疫抑制剤、副腎皮質ステロイド剤、及びT細胞機能抑制剤がある。化学的免疫抑制剤は、アルキル化剤（シクロホスファミド等）、代謝拮抗剤（ミゾリピン、アザチオプリン、メトトレキセート等）等に分類される。

【0003】T細胞機能抑制剤には、シクロスポリンA（CsA）、FK506およびラパマイシン[N. Eng. J. Med., 10 321, 1725 (1989); Transplant. Proc., 23, 2977 (1991)]等がある。以上にあげた薬剤には、少なからぬ副作用がある。例えば、アザチオプリンは、骨髄抑制作用（白血球減少、血小板減少、貧血等）と肝臓障害を引き起こすことがある。ミゾリピンは、アザチオプリンと比べ、骨髄抑制作用と肝臓障害が少ないという利点を持つ反面、免疫抑制効果がそれほど高くない。副腎皮質ステロイド剤は、他の免疫抑制剤と比較して、幅広い作用を有するが、免疫抑制作用は一般に弱く、長期連続投与により有効性の減少や抵抗性の発現が見られることがある 20（今日の移植、11巻、1号、37頁、1998年）。CsA、FK506は、きわめて強力な免疫抑制活性を持ち、臓器移植の成績向上に貢献した薬剤である。しかしながら、これらには、重篤な中枢神経毒性、腎毒性等があることが明らかとなり、その使用に際しては、細心の注意が必要とされる（今日の移植、11巻、1号、37頁、1998年）。

【0004】分化抗原であるCD3、CD4、CD25、CD28、CD45等に対するモノクローナル抗体も新しいタイプの免疫抑制剤として注目されている。例えば、抗CD25モノクローナル抗体は、IL-2レセプターを発現したTリンパ球に 30 のみに働くので、特異性が高く副作用が少ない免疫抑制剤として開発された。しかし、免疫抑制モノクローナル抗体は、経口投与ができない、高価である等の問題点がある。臓器移植の際には、個々の免疫抑制剤の副作用を軽減するために、CsAまたはFK506のいずれかとアザチオプリンやミゾリピン[Transplant. Proc., 17, 1222 (1985)、Clin. Transplant., 4, 191 (1990)]のような免疫抑制剤とステロイド剤を併用した治療が広く用いられているが、必ずしも毒性の副作用を示すことなく十分な免疫抑制効果を発揮するには至っていないのが現状である 40。新規免疫抑制剤を探索するために、以下に記載するような臓器移植の拒絶反応のモデル系を用いることができる。

【0005】1. 混合リンパ球反応(MLR)は、本来、臓器移植の際のドナーおよびレシピエントの間の組織適合性を評価するために開発され、インビトロ免疫反応の最もよく確立されたモデル系の一つである[J. Immunol., 105, 984 (1970)]。種々の組み合わせのマウスやラットを用いたMLRが行われている。

2. 同種皮膚移植モデルは、主要組織適合抗原が非適合

の組み合わせである同種の動物をドナー及びレシピエントとして皮膚移植を行い移植片の生着日数を観察する系である[Transplant. Proc., 28, 1056 (1996)]。\_\_\_\_\_

3. 宿主片対宿主反応(GVHR)は、リンパ球を宿主に移植して宿主の組織抗原に対する移植免疫反応を見る系である[Transplantation, 10, 258 (1970)]。GVHRでは宿主の脾腫の程度やリンパ節の重量増加を指標として移植免疫反応の程度を測ることができる。

【0006】これらの系は、化合物の免疫抑制活性を評価するために使用することができる。しかし、いずれの系もラットやマウス等の動物を使用するので、時間と費用がかかり、免疫抑制剤の探索のための簡便な方法であるとは言えない。免疫抑制剤の探索のためのより簡便な方法は、免疫応答に関与する分子のアゴニストまたはアンタゴニストを見つけるという方法である。既知の免疫応答関与分子を用いた阻害剤探索系としては、シクロフィリン[J. Immunol., 150, 2591 (1993)]、FK506結合タンパク質[Biochem Biophys Res Commun., 202, 437 (1994)]、GYFドメイン(W000/34309)等に結合する化合物のスクリーニング系が知られているが、完全に確立された方法ではない。また一方で免疫応答に関与する分子を新たに見出すことも検討されている。

【0007】疾患に関与する分子を見出す方法のひとつとして、DNAアレイ、RT-PCR、ノーザンブロットィングなどの方法により、mRNAの細胞や組織での発現比較や発現分布を調べる方法等が知られている[実験医学, 18, 1581 (2000)]。例えば、抗原刺激したT細胞と無刺激のT細胞での遺伝子発現量をDNAアレイなどにより比較した時、抗原刺激したT細胞で有意に増加、或いは減少している遺伝子がコードするタンパク質は免疫反応に関与する分子である可能性が考えられ、免疫抑制剤探索の標的分子となる可能性がある。また、T細胞等免疫に関与する細胞に特異的に発現する遺伝子がコードするタンパク質は免疫反応に関与する分子である可能性が考えられ、免疫抑制剤探索の標的分子となる可能性がある。しかし、こうして選択されたmRNAの変動は、免疫反応の原因である場合と免疫反応の結果である場合があり、後者の変動mRNAがコードするタンパク質のアゴニスト、アンタゴニストを用いても免疫抑制にはつながらず、mRNAの細胞や組織での発現比較や発現分布から見出された分子を用いた免疫抑制剤の探索方法は、非効率である。

【0008】疾患に関与する分子を見出す別の方法として、疾患を治療する活性を持つ化合物や、上記の動物や細胞を用いた活性評価系では活性を示すが、作用メカニズムは解明されていない化合物に結合する分子を同定する方法も知られている。光アフィニティーラベル法では、蛍光色素などでラベルした活性化化合物に、更に光を当てると近接している分子と共有結合を形成する光反応性の官能基を導入し、活性評価に用いる細胞の抽出液と

混合後、光照射し、ラベル化された分子を同定できる[Biochemistry, 31, 3288 (1992)]. アフィニティー精製法では、活性化化合物を担体と呼ぶ不溶性の高分子に固定化して、活性評価に用いる細胞の抽出液と混合後、洗浄して、活性化化合物が固定化された担体に結合している分子を同定できる[Current Protocols in Protein Science (Chapter 9), John Wiley & Sons(2001)]. 活性化化合物が固定化された担体に結合している分子には、活性化化合物に特異的に結合している分子と担体などに非特異的に結合している分子が含まれる。そこで、前者を選択する必要がある。予め活性化化合物と細胞抽出液を混合後、活性化化合物が固定化された担体を添加し、洗浄後、活性化化合物が固定化された担体に結合している分子を同定し、予め活性化化合物を添加したときに消失する分子を活性化化合物に特異的に結合している分子と特定する方法が知られている[Nature Biotech., 18, 877 (2000)]. また、洗浄液に活性化化合物を加えた場合に特異的に溶出し

てくる分子を活性化化合物に特異的に結合している分子と特定する方法が知られている[Proc Natl Acad Sci U S A., 90, 11009 (1993)]. しかし、活性化化合物の水溶性が低い場合にはこれらの競合実験法を用いることは不可能で、解決策は報告されていない。  
【0009】担体としては、ビーズ状に成型したアガロース、セルロース、ポリアクリルアミド等の多孔質粒子や、ラテックスビーズ等が知られている。ラテックスビーズは、アガロースビーズより、非特異的なタンパク質の吸着が少ないので効率的なアフィニティー精製が可能であることが知られている[Methods in Enzymology, 254, 595 (1995)]. FK506を固定化したラテックスビーズを用いて、動物細胞の細胞抽出液の細胞質画分から一回の精製で高純度のFK506結合タンパク質が得られることが確認されている[Nature Biotech., 18, 877 (2000)]. また、ラテックスビーズを用いて抗炎症作用を持つE3330の結合タンパク質としてRef-1が精製・同定されている[特開平10-195099, Nature Biotech., 18, 877 (2000)].

【0010】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、LK6-A誘導体に結合する蛋白質の効率的な探索方法、該方法で得られる該蛋白質および該蛋白質を用いた新規な自己免疫疾患治療剤または免疫抑制剤の探索方法を提供することにある。

【0011】

【課題を解決するための手段】発明者らは鋭意検討の結果、LK6-A誘導体をラテックスビーズに固定化し、種々の免疫関連細胞から得られた、該誘導体へ結合する蛋白質を比較・同定するとにより、LK6-A誘導体に特異的に結合する蛋白質を効率よく選択することができることを見いだした。該蛋白質は、生体内におけるLK6-Aの標的分子であると考えられ、該標的分子を用いた新規な自己\*

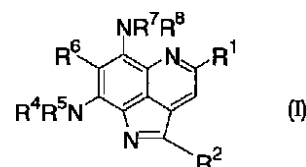
免疫疾患治療剤または免疫抑制剤の探索が可能となった。上記LK6-A結合蛋白質の探索方法では同時に複数のLK6-A結合蛋白質が取得できることから、LK6-A誘導体と各LK6-A結合蛋白質との結合性、あるいは各LK6-A結合蛋白質自体の活性を変化させる物質の中から、LK6-Aの好ましくない活性の発現に關与するLK6-A結合蛋白質とLK6-Aとの結合のみを阻害する物質、またはLK6-Aの好ましくない活性の発現に關与するLK6-A結合蛋白質の活性のみを阻害する物質を選択することにより、副作用の少ない自己免疫疾患治療剤または免疫抑制剤を簡便に探索することができることを見だし、本発明を完成した。

【0012】本発明は以下(1)~(27)に関する。

(1) 下記式(I)

【0013】

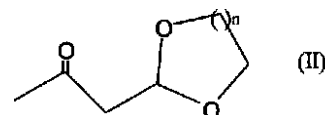
【化7】



【0014】[式中、R<sup>1</sup>は置換もしくは非置換の低級アルキル、低級アルカノイル、カルボキシ、低級アルコキシカルボニル、下記式(II)

【0015】

【化8】



【0016】(式中、nは1または2を表す)で表される基またはCOCH=CHR<sup>9</sup>{式中、R<sup>9</sup>は置換もしくは非置換の低級アルコキシ、置換もしくは非置換のアリール、置換もしくは非置換のヘテロアリールまたはNR<sup>10</sup>R<sup>11</sup>(式中、R<sup>10</sup>およびR<sup>11</sup>は同一または異なって、水素、置換もしくは非置換の低級アルキル、置換もしくは非置換の低級アルケニル、置換もしくは非置換の低級アルキニル、置換もしくは非置換のアラルキル、置換もしくは非置換のアリール、置換もしくは非置換のヘテロアリール、置換もしくは非置換のヘテロアリール置換低級アルキル、置換もしくは非置換のテトラヒドロピラニルまたは置換もしくは非置換のテトラヒドロピラニルメチルを表すか、R<sup>10</sup>とR<sup>11</sup>が隣接するNと一緒に置換もしくは非置換の複素環基を形成する)}を表し、

【0017】R<sup>2</sup>は水素、置換もしくは非置換の低級アルキル、置換もしくは非置換の低級アルケニル、置換もしくは非置換の低級アルキニル、置換もしくは非置換のアリール、置換もしくは非置換のヘテロアリール、置換もしくは非置換の低級アルカノイル、置換もしくは非置換の低級アルカノイルオキシ、ハロゲン、SR<sup>12</sup>(式中、R<sup>12</sup>は置換もしくは非置換の低級アルキル、置換も

しくは非置換のアリール、置換もしくは非置換のヘテロアリール、置換もしくは非置換のアラルキル、置換もしくは非置換のヘテロアリール置換低級アルキル、置換もしくは非置換のテトラヒドロピラニルまたは置換もしくは非置換のテトラヒドロピラニルメチルを表す)、 $\text{NR}^{13}\text{R}^{14}$  (式中、 $\text{R}^{13}$ および $\text{R}^{14}$ はそれぞれ前記の $\text{R}^{10}$ および $\text{R}^{11}$ と同義である) またはアジドを表し、

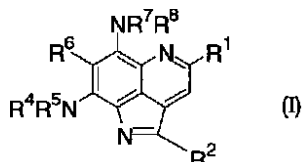
【0018】 $\text{R}^4$ および $\text{R}^5$ は同一または異なって、水素、置換もしくは非置換の低級アルキル、置換もしくは非置換の低級アルカノイル、置換もしくは非置換の低級アルコキシカルボニル、置換もしくは非置換のアラルキルオキシカルボニルまたは置換もしくは非置換のヘテロアリール置換低級アルコキシカルボニルを表し、 $\text{R}^6$ は水素またはハロゲンを表し、

【0019】 $\text{R}^7$ および $\text{R}^8$ は同一または異なって、水素、置換もしくは非置換の低級アルキルまたは置換もしくは非置換の低級アルカノイルを表す]で表される化合物(以下、LK6-Aまたはその誘導体と略す)を固定化した担体と被検蛋白質試料を接触させ、被検蛋白質試料より上記式(I)で表される化合物に特異的に結合する蛋白質を選択することを特徴とするLK6-Aまたはその誘導体に結合する蛋白質の探索方法。

【0020】(2)下記式(I)

【0021】

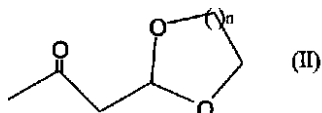
【化9】



【0022】[式中、 $\text{R}^1$ は置換もしくは非置換の低級アルキル、低級アルカノイル、カルボキシ、低級アルコキシカルボニル、下記式(II)

【0023】

【化10】



【0024】(式中、 $n$ は1または2を表す)で表される基または $\text{COCH}=\text{CHR}^9$ {式中、 $\text{R}^9$ は置換もしくは非置換の低級アルコキシ、置換もしくは非置換のアリール、置換もしくは非置換のヘテロアリールまたは $\text{NR}^{10}\text{R}^{11}$ (式中、 $\text{R}^{10}$ および $\text{R}^{11}$ は同一または異なって、水素、置換もしくは非置換の低級アルキル、置換もしくは非置換の低級アルケニル、置換もしくは非置換の低級アルキニル、置換もしくは非置換のアラルキル、置換もしくは非置換のアリール、置換もしくは非置換のヘテロアリール、置換もしくは非置換のヘテロアリール置換低級アルキル、置換もしくは非置換のテトラヒドロピラニ

ルまたは置換もしくは非置換のテトラヒドロピラニルメチルを表すか、 $\text{R}^{10}$ と $\text{R}^{11}$ が隣接するNと一緒に置換もしくは非置換の複素環系を形成する)}を表し、

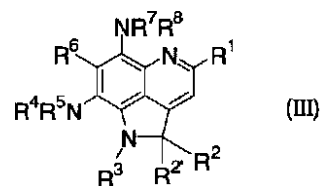
【0025】 $\text{R}^2$ は水素、置換もしくは非置換の低級アルキル、置換もしくは非置換の低級アルケニル、置換もしくは非置換の低級アルキニル、置換もしくは非置換のアリール、置換もしくは非置換のヘテロアリール、置換もしくは非置換の低級アルカノイル、置換もしくは非置換の低級アルカノイルオキシ、ハロゲン、 $\text{SR}^{12}$ (式中、 $\text{R}^{12}$ は置換もしくは非置換の低級アルキル、置換もしくは非置換のアリール、置換もしくは非置換のヘテロアリール、置換もしくは非置換のアラルキル、置換もしくは非置換のヘテロアリール置換低級アルキル、置換もしくは非置換のテトラヒドロピラニルまたは置換もしくは非置換のテトラヒドロピラニルメチルを表す)、 $\text{NR}^{13}\text{R}^{14}$ (式中、 $\text{R}^{13}$ および $\text{R}^{14}$ はそれぞれ前記の $\text{R}^{10}$ および $\text{R}^{11}$ と同義である) またはアジドを表し、

【0026】 $\text{R}^4$ および $\text{R}^5$ は同一または異なって、水素、置換もしくは非置換の低級アルキル、置換もしくは非置換の低級アルカノイル、置換もしくは非置換の低級アルコキシカルボニル、置換もしくは非置換のアラルキルオキシカルボニルまたは置換もしくは非置換のヘテロアリール置換低級アルコキシカルボニルを表し、 $\text{R}^6$ は水素またはハロゲンを表し、

【0027】 $\text{R}^7$ および $\text{R}^8$ は同一または異なって、水素、置換もしくは非置換の低級アルキルまたは置換もしくは非置換の低級アルカノイルを表す]で表される化合物を固定化した担体と被検蛋白質試料を接触させたとき式(I)で表される化合物へ結合する蛋白質と、下記式(III)

【0028】

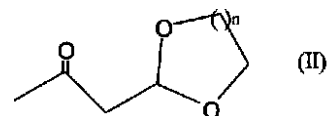
【化11】



【0029】[式中、 $\text{R}^1$ は置換もしくは非置換の低級アルキル、低級アルカノイル、カルボキシ、低級アルコキシカルボニル、下記式(II)

【0030】

【化12】



【0031】(式中、 $n$ は1または2を表す)で表される基または $\text{COCH}=\text{CHR}^9$ {式中、 $\text{R}^9$ は置換もしくは非置換の低級アルコキシ、置換もしくは非置換のアリ

ール、置換もしくは非置換のヘテロアリアルまたは $\text{NR}^{10}\text{R}^{11}$ （式中、 $\text{R}^{10}$ および $\text{R}^{11}$ は同一または異なって、水素、置換もしくは非置換の低級アルキル、置換もしくは非置換の低級アルケニル、置換もしくは非置換の低級アルキニル、置換もしくは非置換のアラルキル、置換もしくは非置換のアリアル、置換もしくは非置換のヘテロアリアル、置換もしくは非置換のヘテロアリアル置換低級アルキル、置換もしくは非置換のテトラヒドロピラニルまたは置換もしくは非置換のテトラヒドロピラニルメチルを表すか、 $\text{R}^{10}$ と $\text{R}^{11}$ が隣接するNと一緒に置換もしくは非置換の複素環基を形成する）}を表し、【0032】 $\text{R}^2$ は水素、置換もしくは非置換の低級アルキル、置換もしくは非置換の低級アルケニル、置換もしくは非置換の低級アルキニル、置換もしくは非置換のアリアル、置換もしくは非置換のヘテロアリアル、置換もしくは非置換の低級アルカノイル、置換もしくは非置換の低級アルカノイルオキシ、ハロゲン、 $\text{SR}^{12}$ （式中、 $\text{R}^{12}$ は置換もしくは非置換の低級アルキル、置換もしくは非置換のアリアル、置換もしくは非置換のヘテロアリアル、置換もしくは非置換のアラルキル、置換もしくは非置換のヘテロアリアル置換低級アルキル、置換もしくは非置換のテトラヒドロピラニルまたは置換もしくは非置換のテトラヒドロピラニルメチルを表す）、 $\text{NR}^{13}\text{R}^{14}$ （式中、 $\text{R}^{13}$ および $\text{R}^{14}$ はそれぞれ前記の $\text{R}^{10}$ および $\text{R}^{11}$ と同義である）またはアジドを表し、【0033】 $\text{R}^2$ は水素、または置換もしくは非置換の低級アルカノイルオキシを表し、 $\text{R}^3$ は置換もしくは非置換の低級アルカノイルを表し、 $\text{R}^4$ および $\text{R}^5$ は同一または異なって、水素、置換もしくは非置換の低級アルキル、置換もしくは非置換の低級アルカノイル、置換もしくは非置換の低級アルコキシカルボニル、置換もしくは非置換のアラルキルオキシカルボニルまたは置換もしくは非置換のヘテロアリアル置換低級アルコキシカルボニルを表し、 $\text{R}^6$ は水素またはハロゲンを表し、【0034】 $\text{R}^7$ および $\text{R}^8$ は同一または異なって、水素、置換もしくは非置換の低級アルキルまたは置換もしくは非置換の低級アルカノイルを表す]で表される化合物を固定化した担体と被検蛋白質試料を接触させたとき、式(III)で表される化合物へ結合する蛋白質とを比較し、被検蛋白質試料より式(I)で表される化合物に特異的に結合する蛋白質を選択することを特徴とするLK6-Aまたはその誘導体に結合する蛋白質の探索方法。【0035】(3)担体が、ラテックスビーズである上記(1)または(2)の探索方法。(4)被検蛋白質試料が、真核生物由来の蛋白質試料である上記(1)~(3)のいずれか1つに記載の探索方法。(5)LK6-Aまたはその誘導体を固定化した担体。(6)担体が、ラテックスビーズである上記(5)の担体。

【0036】(7)下記(i)~(v)から選ばれるいずれか1つの蛋白質。

(i)上記(1)~(4)のいずれか1つに記載の方法で得られるLK6-Aまたはその誘導体に結合する蛋白質

(ii)配列番号1~5、43、45および46のいずれかで表されるアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつLK6-Aまたはその誘導体に結合する蛋白質  
(iii)配列番号1~5、43、45および46のいずれかで表されるアミノ酸配列と60~99%の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつLK6-Aまたはその誘導体に結合する蛋白質

(iv)配列番号2で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質

(v)配列番号49で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質

【0037】(8)上記(7)の蛋白質をコードするDNA。

(9)上記(8)のDNAをベクターDNAに連結して得られる組換え体DNA。

(10)上記(9)の組換え体DNAを含有する形質転換体。

(11)形質転換体が、細菌、酵母、昆虫細胞、植物細胞または動物細胞を宿主として得られる上記(10)の形質転換体。

(12)上記(10)または(11)の形質転換体を培地に培養し、培養物中に上記(7)の蛋白質を生成蓄積させ、該培養物から該蛋白質を採取することを特徴とする、上記(7)の蛋白質の製造方法。

【0038】(13)被検物質存在下、LK6-Aまたはその誘導体とLK6-Aまたはその誘導体に結合する蛋白質とを接触させた場合のLK6-Aまたはその誘導体と該蛋白質との結合量を測定し、被検物質非存在下、LK6-Aまたはその誘導体とLK6-Aまたはその誘導体に結合する蛋白質とを接触させた場合のLK6-Aまたはその誘導体と該蛋白質との結合量を測定し、被検物質存在下と被検物質非存在下での該測定値を比較し、被検物質よりLK6-Aまたはその誘導体とLK6-Aまたはその誘導体に結合する蛋白質の結合を阻害する物質を選択することを特徴とするLK6-Aまたはその誘導体に結合する蛋白質に結合する物質の探索方法。

【0039】(14)LK6-Aまたはその誘導体に結合する蛋白質と被検物質とを接触させた場合の該蛋白質の活性と、被検物質を接触させない場合での該蛋白質の活性を測定し、被検物質存在下と被検物質非存在下での該測定値を比較し、被検物質より該蛋白質の活性を変化させる物質を選択することを特徴とするLK6-Aまたはその誘導体に結合する蛋白質の活性を変化させる物質の探索方法。

(15)LK6-Aまたはその誘導体に結合する蛋白質を発

現する形質転換体と被検物質とを接触させた場合の該形質転換体の細胞応答と、被検物質非存在下での該形質転換体の細胞応答を測定し、被検物質存在下と被検物質非存在下での該測定値を比較し、被検物質より該形質転換株の細胞応答を変化させる物質を選択することを特徴とするLK6-Aまたはその誘導体に結合する蛋白質の機能を変化させる物質の探索方法。

【0040】(16) LK6-Aまたはその誘導体に結合する蛋白質を発現する形質転換体と被検物質を接触させた場合の該形質転換体の該蛋白質をコードするDNAの発現量と、被検物質非存在下での該形質転換体の該蛋白質をコードするDNAの発現量を測定し、被検物質存在下と被検物質非存在下での該測定値を比較し、被検物質より該蛋白質をコードするDNAの発現量を変化させる物質を選択することを特徴とするLK6-Aまたはその誘導体に結合する蛋白質をコードするDNAの発現量を変化させる物質の探索方法。

(17) LK6-Aまたはその誘導体に結合する蛋白質を発現する形質転換体と被検物質を接触させた場合の該形質転換体の該蛋白質の発現量と、被検物質非存在下での該形質転換体の該蛋白質の発現量を測定し、被検物質存在下と被検物質非存在下での該測定値を比較し、被検物質より該蛋白質の発現量を変化させる物質を選択することを特徴とするLK6-Aまたはその誘導体に結合する蛋白質の発現量を変化させる物質の探索方法。

【0041】(18) LK6-Aまたはその誘導体に結合する蛋白質が、下記(i)~(v)から選ばれるいずれか1つの蛋白質である上記(13)~(17)のいずれか1つに記載の探索方法。

(i) 配列番号1~5、43、45、46および49のいずれかで表されるアミノ酸配列を有する蛋白質

(ii) 上記(7)の蛋白質

(iii) 配列番号1~5、43、45、46および49のいずれかで表されるアミノ酸配列と60%以上の相同性を有し、かつLK6-Aまたはその誘導体と結合する蛋白質

(iv) 配列番号45で表されるアミノ酸配列においてアミノ酸番号353~408で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質

(v) 配列番号46で表されるアミノ酸配列においてアミノ酸番号64~121で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質

【0042】(19) 被検物質存在下、下記(i)~(ii)から選ばれるいずれか1つの蛋白質の活性と、被検物質非存在下での該蛋白質の活性を測定し、被検物質存在下と被検物質非存在下での該測定値を比較し、被検物質より該蛋白質の活性を阻害する物質を選択することを特徴とする該蛋白質の活性を阻害する物質の探索方法。

(i) 配列番号1で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質

(ii) 配列番号1で表されるアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸残基が欠失、置換、挿入もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ配列番号1で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質と実質的に同一の活性を有する蛋白質

(iii) 配列番号1で表されるアミノ酸配列と60%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ配列番号1で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質と実質的に同一の活性を有する蛋白質

【0043】(20) 被検物質存在下、CD2蛋白質またはその誘導体と下記(i)~(iii)から選ばれるいずれか1つの蛋白質を接触させた場合のCD2蛋白質またはその誘導体と該蛋白質の結合量と、被検物質非存在下、CD2蛋白質またはその誘導体と該蛋白質とを接触させた場合でのCD2蛋白質またはその誘導体と該蛋白質との結合量を測定し、被検物質存在下と被検物質非存在下での該測定値を比較し、被検物質より該結合を阻害する物質を選択することを特徴とするCD2蛋白質またはその誘導体と該蛋白質の結合を阻害する化合物の探索方法。

(i) 配列番号1または2で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質

(ii) 配列番号1または2で表されるアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつCD2蛋白質と結合する蛋白質

(iii) 配列番号1または2で表されるアミノ酸配列と60%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつCD2蛋白質と結合する蛋白質

【0044】(21) CD2蛋白質の誘導体が、下記(i)~(iii)から選ばれるいずれか1つの蛋白質である上記(20)の探索方法。

(i) 配列番号6で表されるアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ配列番号1または2で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質と結合する活性を有する蛋白質

(ii) 配列番号6で表されるアミノ酸配列と60%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ配列番号1または2で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質と結合する蛋白質

(iii) 配列番号6で表されるアミノ酸配列のアミノ酸番号281~310番目のアミノ酸配列を有する蛋白質

【0045】(22) 被検物質存在下、下記(i)~(ii)から選ばれるいずれか1つの蛋白質のグリコーゲンデブランチング エンザイム活性と、被検物質非存在下での該蛋白質の該活性を測定し、被検物質存在下と被検物質非存在下での該測定値を比較し、被検物質より該蛋白質の該活性を阻害する物質を選択することを特徴とする該蛋白質の活性を阻害する物質の探索方法。

(i) 配列番号3で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質

質

(ii) 配列番号3で表されるアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸残基が欠失、置換、挿入もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつグリコーゲンデブランチング エンザイム活性を有する蛋白質

(iii) 配列番号3で表されるアミノ酸配列と60%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつグリコーゲン デブランチング エンザイム活性を有する蛋白質

【0046】(23) 被検物質存在下、下記(i)~(ii)から選ばれるいずれか1つの蛋白質のペルオキシダーゼ活性と、被検物質非存在下での該蛋白質の該活性を測定し、被検物質存在下と被検物質非存在下での該測定値を比較し、被検物質より該蛋白質の該活性を阻害する物質を選択することを特徴とする該蛋白質の活性を阻害する物質の探索方法。

(i) 配列番号5で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質

(ii) 配列番号5で表されるアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸残基が欠失、置換、挿入もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつペルオキシダーゼ活性を有する蛋白質

(iii) 配列番号5で表されるアミノ酸配列と60%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつペルオキシダーゼ活性を有する蛋白質

【0047】(24) 被検物質存在下、CD2BP2蛋白質またはその誘導体とLK6-Aまたはその誘導体を接触させたときのCD2BP2蛋白質またはその誘導体とLK6-Aまたはその誘導体の結合量と、被検物質非存在下、CD2蛋白質またはその誘導体とLK6-Aまたはその誘導体とを接触させたときのCD2BP2蛋白質またはその誘導体とLK6-Aまたはその誘導体の結合量を測定し、被検物質存在下と被検物質非存在下での該測定値を比較し、被検物質より該結合を阻害する物質を選択することを特徴とするCD2BP2蛋白質またはその誘導体とLK6-Aまたはその誘導体の結合を阻害する化合物の探索方法。

【0048】(25) CD2BP2蛋白質の誘導体が、下記(i)~(iii)から選ばれるいずれか1つの蛋白質である上記(24)の探索方法。

(i) 配列番号43で表されるアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ配列番号1または2で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質と結合する活性を有する蛋白質

(ii) 配列番号43で表されるアミノ酸配列と60%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ配列番号1または2で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質と結合する蛋白質

(iii) 配列番号43で表されるアミノ酸配列のアミノ酸番号282~341番目のアミノ酸配列を有する蛋白質

\*質

【0049】(26) 上記(13)~(25)のいずれか1つに記載の探索方法で得られる物質または該物質の薬学的に許容される塩。

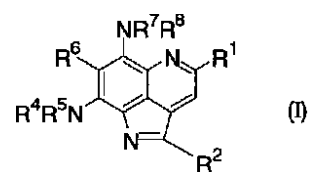
(27) 上記(26)の物質または該物質の薬学的に許容される塩を含有する自己免疫疾患治療剤または免疫抑制剤。

【0050】

【発明の実施の形態】以下、本発明について、詳細に説明する。本発明の探索方法に用いられるLK6-A誘導体とは、下記一般式(I)

【0051】

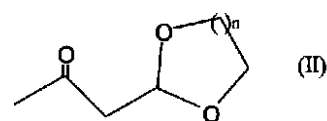
【化13】



【0052】[式中、R<sup>1</sup>は置換もしくは非置換の、置換もしくは非置換の低級アルカノイル、カルボキシ、低級アルコキシカルボニル、下記式(II)

【0053】

【化14】



【0054】(式中、nは1または2を表す)で表される基またはC O C H = C H R<sup>9</sup> { 式中、R<sup>9</sup>は置換もしくは非置換の低級アルコキシ、置換もしくは非置換のアリール、置換もしくは非置換のヘテロアリールまたはN R<sup>10</sup> R<sup>11</sup> (式中、R<sup>10</sup>およびR<sup>11</sup>は同一または異なって、水素、置換もしくは非置換の低級アルキル、置換もしくは非置換の低級アルケニル、置換もしくは非置換の低級アルキニル、置換もしくは非置換のアラルキル、置換もしくは非置換のアリール、置換もしくは非置換のヘテロアリール、置換もしくは非置換のヘテロアリール置換低級アルキル、置換もしくは非置換のテトラヒドロピラニルまたは置換もしくは非置換のテトラヒドロピラニルメチルを表すか、R<sup>10</sup>とR<sup>11</sup>が隣接するNと一緒に置換もしくは非置換の複素環基を形成する) } を表し、

【0055】R<sup>2</sup>は水素、置換もしくは非置換の低級アルキル、置換もしくは非置換の低級アルケニル、置換もしくは非置換の低級アルキニル、置換もしくは非置換のアリール、置換もしくは非置換のヘテロアリール、置換もしくは非置換の低級アルカノイル、置換もしくは非置換の低級アルカノイルオキシ、ハロゲン、S R<sup>12</sup> (式中、R<sup>12</sup>は置換もしくは非置換の低級アルキル、置換もしくは非置換のアリール、置換もしくは非置換のヘテロアリール、置換もしくは非置換のアラルキル、置換も

くは非置換のヘテロアリアル置換低級アルキル、置換もしくは非置換のテトラヒドロピラニルまたは置換もしくは非置換のテトラヒドロピラニルメチルを表す)、NR<sup>13</sup>R<sup>14</sup>(式中、R<sup>13</sup>およびR<sup>14</sup>はそれぞれ前記のR<sup>10</sup>およびR<sup>11</sup>と同義である)またはアジドを表し、

【0056】R<sup>4</sup>およびR<sup>5</sup>は同一または異なって、水素、置換もしくは非置換の低級アルキル、置換もしくは非置換の低級アルカノイル、置換もしくは非置換の低級アルコキシカルボニル、置換もしくは非置換のアラルキルオキシカルボニルまたは置換もしくは非置換のヘテロアリアル置換低級アルコキシカルボニルを表し、R<sup>6</sup>は水素またはハロゲンを表し、R<sup>7</sup>およびR<sup>8</sup>は同一または異なって、水素、置換もしくは非置換の低級アルキルまたは置換もしくは非置換の低級アルカノイルを表す]で表される化合物である。

【0057】本発明に用いられる、より好適なLK6-A誘導体としては上記式(1)において、R<sup>1</sup>が(E)-3-メトキシアクリロイルを表し、R<sup>2</sup>、R<sup>4</sup>、R<sup>5</sup>およびR<sup>6</sup>が水素を表し、R<sup>7</sup>が水素を表し、R<sup>8</sup>がアセチルであるLK6-Aをあげることができる。ここで、低級アルキル、低級アルコキシ、低級アルケニル、低級アルキニル、およびヘテロアリアル置換低級アルキルの低級アルキル部分における炭素数は、好ましくは炭素数1~6、さらに好ましくは炭素数1~4である。低級アルカノイル、低級アルカノイルオキシ、低級アルコキシカルボニル、およびヘテロアリアル置換低級アルコキシカルボニルの低級アルコキシカルボニル部分における炭素数は、好ましくは炭素数2~7、さらに好ましくは炭素数2~5である。

【0058】置換低級アルキル、置換低級アルカノイル、置換低級アルコキシ、置換アリアル、置換ヘテロアリアル、置換低級アルケニル、置換低級アルキニル、置換アラルキル、置換アリアル、置換ヘテロアリアル置換低級アルキルの置換ヘテロアリアル部分、置換テトラヒドロピラニル、置換テトラヒドロピラニルメチル、置換複素環基、置換低級アルカノイルオキシ、置換低級アルコキシカルボニル、置換アラルキルオキシカルボニル、および置換ヘテロアリアル置換低級アルコキシカルボニルの置換ヘテロアリアル部分における置換基の例としては、同一または異なって、1~置換可能な数の、好ましくは炭素数1~4個の低級アルキル、ヒドロキシ、好ましくは2~5個の低級アルコキシ、およびハロゲンがあげられる。ヘテロアリアル中のヘテロ原子の例としては、窒素原子、酸素原子、硫黄原子などがあげられる。ハロゲンとしては、フッ素原子、塩素原子、臭素原子、ヨウ素原子があげられる。R<sup>10</sup>とR<sup>11</sup>が隣接するNと一緒に形成する複素環基の例としては、5~8員環があげられ、R<sup>10</sup>とR<sup>11</sup>が隣接するN以外に、窒素原子、酸素原子、硫黄原子などのヘテロ原子をさらに含有してもよい。

### 【0059】(1)担体の調製方法

本発明で用いられる担体は、LK6-A誘導体が固定化できる担体であればいかなる担体も用いることができる。好ましくは、非特異的吸着の少ない担体が望ましく、より好ましくは、表面にエポキシ基を持つSGNEGDE粒子が望ましい。SGNEGDE粒子とは、表面がスチレン-グリシジルメタクリレートで覆われたスチレン-グリシジルメタクリレート重合体のマイクロスフィアをいう。該SGNEGDE粒子の大きさは適時選択することができるが、通常は約0.05~0.5μm、好ましくは約0.1~0.3μmである。該粒子は、Methods in Enzymology, 254, 595 (1995)、日本特許第3086427号、またはColloids and Surfaces B, 10, 41(1997)などにしたがって作製することができる。SGNEGDE粒子を1級または2級アミンを2つ以上持つ化合物と反応させることにより、表面にアミノ基を持つ粒子を作ることができる。この時の溶媒と反応条件は、上記の固定化反応が進む溶媒と反応条件の組み合わせであって、SGNEGDE粒子、1級または2級アミンを2つ以上持つ化合物が、上記の固定化反応以外の分解反応や縮合反応等を、本発明の目的を阻害するほど起こさない溶媒と反応条件の組み合わせであればいかなる溶媒と反応条件の組み合わせでも良い。より具体的には、SGNEGDE粒子を1μmol/l~50mol/lの1級または2級アミンを2つ以上持つ化合物、例えば1,2-ジアミノエタン、1,3-ジアミノプロパンまたはピペラジン等を含有する溶液に分散させ、静置して、あるいは、ローター、ミキサーなどで穏やかに攪拌しながら、0~100で1秒~1000時間反応させ、表面にアミノ基を持つ粒子を調製することができる。溶媒としては、例えば、水、DMF、DMSO、THF、ジオキサン、メタノール等があげられる。

【0060】反応終了後、未反応の1級または2級アミンを2つ以上持つ化合物を除くために、粒子を洗浄する。洗浄方法は、1級または2級アミンを2つ以上持つ化合物が固定化されたSGNEGDE粒子が安定で効率的に回収され、1級または2級アミンを2つ以上持つ化合物が効率的に除去できる方法であれば、公知のいかなる方法も用いることができる。例えば、反応終了後、遠心分離(15000rpm、5分間、室温)し、上清を除去後、溶媒に懸濁し、同様に遠心分離、上清除去を繰り返し、洗浄することができる。また、必要に応じて、同様の方法で、以降の反応に適した溶媒に置換することもできる。

【0061】このようにして得られた粒子上のアミノ基とLK6-A誘導体を反応させることによりLK6-A誘導体固定化粒子を作製することができる。具体的には、1級または2級アミンを2つ以上持つ化合物が固定化されたSGNEGDE粒子をLK6-A誘導体の溶液に分散し、粒子上のアミノ基とLK6-A誘導体を反応させることができる。この時の溶媒と反応条件は、上記の固定化反応が進む溶媒と反応条件の組み合わせであって、1級または2級アミンを2

つ以上持つ化合物が固定化されたSGNEGDE粒子、LK6-A誘導体が、上記の固定化反応以外の分解反応や縮合反応等を、本発明の目的を阻害するほど起こさない溶媒と反応条件の組み合わせであればいかなる溶媒と反応条件の組み合わせでも良い。より具体的には、ピペラジンが固定化されたSGNEGDE粒子を1  $\mu\text{mol/l}$  ~ 50  $\text{mol/l}$ のLK6-A誘導体を含む溶液に分散させ、静置して、または、ローテーター、ミキサーなどで穏やかに攪拌しながら、0 ~ 100 で1秒 ~ 1000時間反応させ、表面にLK6-A誘導体を固定化した粒子を調製することができる。溶媒としては、例えば、水、DMF、DMSO、THF、ジオキサン、メタノール等があげられる。

【0062】反応終了後、未反応のLK6-A誘導体を除くために、LK6-A誘導体が固定化された粒子を洗浄する。洗浄方法は、LK6-A誘導体が固定化された粒子が安定で効率的に回収され、LK6-A誘導体が効率的に除去できる方法であれば、公知のいかなる方法も用いることができる。例えば、反応終了後、遠心分離（15000 rpm、5分間、室温）し、上清を除去後、溶媒に懸濁し、同様に遠心分離、上清除去を繰り返し、洗浄することができる。また、必要に応じて、同様の方法で、以降の保存や細胞抽出液との混合に適した溶媒に置換することもできる。LK6-A誘導体固定化粒子上に未反応のアミノ基が残っている場合は、必要に応じて、未反応アミノ基をブロッキングすることができる。アミノ基と反応してかつ粒子に固定化されたLK6-A誘導体とは反応しない化合物ならばどのようなものでも、ブロッキングに用いることができる。例えば、無水コハク酸を用いて、LK6-A誘導体固定化粒子上の未反応のアミノ基をブロッキングすることができる。

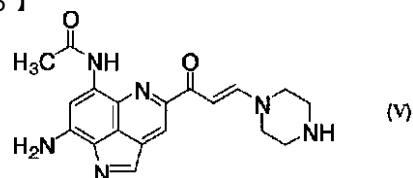
【0063】また、別のLK6-A誘導体固定化粒子の作製方法としては、LK6-A誘導体と1級または2級アミンを2つ以上持つ化合物を反応させ、LK6-A誘導体をSGNEGDE粒子上へ結合させるために必要な1級または2級アミンが導入された化合物を合成し、該化合物をSGNEGDE粒子に結合させる方法をあげることができる。1級または2級アミンが導入されたLK6-A誘導体は、WO 00/02879に記載の方法に準じて調製することができる。上記の1級または2級アミンを2つ以上持つ化合物としては、1,2-ジアミノエタン、1,3-ジアミノプロパンまたはピペラジン等をあげることができる。

【0064】SGNEGDE粒子と上記の方法を用いて調製した該化合物とを反応させることにより、LK6-A固定化粒子を調製することができる。この時の溶媒と反応条件は、上記の固定化反応が進む溶媒と反応条件の組み合わせであって、SGNEGDE粒子、該化合物が、上記の固定化反応以外の分解反応や縮合反応等を、本発明の目的を阻害するほど起こさない溶媒と反応条件の組み合わせであればいかなる溶媒と反応条件の組み合わせでも良い。より具体的には、SGNEGDE粒子を1  $\mu\text{mol/l}$  ~ 1  $\text{mol/l}$ の下記\*50

\*式(V)で表される化合物(以下、LK6D2と略す)を含む溶液に分散させ、静置して、あるいは、ローテーター、ミキサーなどで穏やかに攪拌しながら、0 ~ 100 で1秒 ~ 1000時間反応させ、LK6-A固定化粒子を調製することができる。

【0065】

【化15】

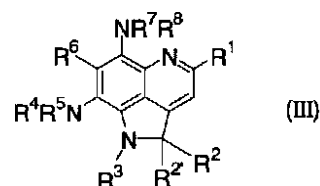


【0066】溶媒としては、例えば、水、N,N-ジメチルホルムアミド(DMF)、ジメチルスルホキシド(DMSO)、テトラヒドロフラン(THF)、ジオキサン、メタノール等が挙げられる。反応終了後、未反応のLK6D2を除くために、粒子を洗浄する。洗浄方法は、LK6-A固定化粒子が安定で効率的に回収され、LK6D2が効率的に除去できる方法であれば、公知のいかなる方法も用いることができる。例えば、反応終了後、遠心分離（15000 rpm、5分間、室温）し、上清を除去後、溶媒に懸濁し、同様に遠心分離、上清除去を繰り返し、洗浄することができる。また、必要に応じて、同様の方法で、以降の反応に適した溶媒に置換することもできる。

【0067】このようにして得られたLK6-A誘導体固定化粒子を溶媒に分散後、保存することができる。この時の溶媒と保存条件は、LK6-A誘導体固定化粒子が、本発明の目的を阻害しない範囲で、安定であれば、いかなる溶媒と保存条件の組み合わせでも良い。より具体的には、溶媒としては、例えば、水、DMF、DMSO、THF、ジオキサン、メタノール等があげられる。好ましくは、室温以下での保存が望ましく、より好ましくは遮光下、ヘリウムガス、アルゴンガス等の不活性ガス置換下が望ましい。上記と同様の方法で、LK6-A対照化合物を固定化した粒子(以下、LK6-A対照化合物固定化粒子という)を調製し、本発明のLK6-A誘導体に特異的に結合する蛋白質の探索方法に利用することができる。LK6-A対照化合物とは、下記式(III)

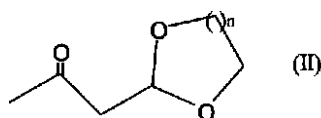
【0068】

【化16】



【0069】[式中、R<sup>1</sup>は置換もしくは非置換の低級アルキル、低級アルカノイル、カルボキシ、低級アルコキシカルボニル、下記式(II)

【0070】  
【化17】



【0071】(式中、nは1または2を表す)で表される基または $\text{COCH}=\text{CHR}^9$ {式中、 $\text{R}^9$ は置換もしくは非置換の低級アルコキシ、置換もしくは非置換のアリール、置換もしくは非置換のヘテロアリールまたは $\text{NR}^{10}\text{R}^{11}$ (式中、 $\text{R}^{10}$ および $\text{R}^{11}$ は同一または異なって、水素、置換もしくは非置換の低級アルキル、置換もしくは非置換の低級アルケニル、置換もしくは非置換の低級アルキニル、置換もしくは非置換のアラルキル、置換もしくは非置換のアリール、置換もしくは非置換のヘテロアリール、置換もしくは非置換のヘテロアリール置換低級アルキル、置換もしくは非置換のテトラヒドロピラニルまたは置換もしくは非置換のテトラヒドロピラニルメチルを表すか、 $\text{R}^{10}$ と $\text{R}^{11}$ が隣接するNと一緒に置換もしくは非置換の複素環基を形成する)}を表し、

【0072】 $\text{R}^2$ は水素、置換もしくは非置換の低級アルキル、置換もしくは非置換の低級アルケニル、置換もしくは非置換の低級アルキニル、置換もしくは非置換のアリール、置換もしくは非置換のヘテロアリール、置換もしくは非置換の低級アルカノイル、置換もしくは非置換の低級アルカノイルオキシ、ハロゲン、 $\text{SR}^{12}$ (式中、 $\text{R}^{12}$ は置換もしくは非置換の低級アルキル、置換もしくは非置換のアリール、置換もしくは非置換のヘテロアリール、置換もしくは非置換のアラルキル、置換もしくは非置換のヘテロアリール置換低級アルキル、置換もしくは非置換のテトラヒドロピラニルまたは置換もしくは非置換のテトラヒドロピラニルメチルを表す)、 $\text{NR}^{13}\text{R}^{14}$ (式中、 $\text{R}^{13}$ および $\text{R}^{14}$ はそれぞれ前記の $\text{R}^{10}$ および $\text{R}^{11}$ と同義である)またはアジドを表し、

【0073】 $\text{R}^2$ は水素、または置換もしくは非置換の低級アルカノイルオキシを表し、 $\text{R}^3$ は置換もしくは非置換の低級アルカノイルを表し、 $\text{R}^4$ および $\text{R}^5$ は同一または異なって、水素、置換もしくは非置換の低級アルキル、置換もしくは非置換の低級アルカノイル、置換もしくは非置換の低級アルコキシカルボニル、置換もしくは非置換のアラルキルオキシカルボニルまたは置換もしくは非置換のヘテロアリール置換低級アルコキシカルボニルを表し、 $\text{R}^6$ は水素またはハロゲンを表し、 $\text{R}^7$ および $\text{R}^8$ は同一または異なって、水素、置換もしくは非置換の低級アルキルまたは置換もしくは非置換の低級アルカノイルを表す]で表される化合物であり、免疫抑制活性がないか、あるいは上記LK6-A誘導体よりも著しくその免疫抑制活性が低い化合物である。

【0074】より具体的には、 $\text{R}^1$ が(E)-3-メトキシアクリロイルを表し、 $\text{R}^2$ 、 $\text{R}^5$ および $\text{R}^6$ が水素を表

し、 $\text{R}^2$ がアセトキシを表し、 $\text{R}^3$ と $\text{R}^4$ がアセチルを表し、 $\text{R}^7$ が水素を表し、 $\text{R}^8$ がアセチルを表すLK6D7をあげることができる。ここで、低級アルキル、低級アルコキシ、低級アルケニル、低級アルキニル、およびヘテロアリール置換低級アルキルの低級アルキル部分における炭素数は、好ましくは炭素数1~6、さらに好ましくは炭素数1~4である。低級アルカノイル、低級アルカノイルオキシ、低級アルコキシカルボニル、およびヘテロアリール置換低級アルコキシカルボニルの低級アルコキシカルボニル部分における炭素数は、好ましくは炭素数2~7、さらに好ましくは炭素数2~5である。

【0075】置換低級アルキル、置換低級アルカノイル、置換低級アルコキシ、置換アリール、置換ヘテロアリール、置換低級アルケニル、置換低級アルキニル、置換アラルキル、置換アリール、置換ヘテロアリール置換低級アルキルの置換ヘテロアリール部分、置換テトラヒドロピラニル、置換テトラヒドロピラニルメチル、置換複素環基、置換低級アルカノイルオキシ、置換低級アルコキシカルボニル、置換アラルキルオキシカルボニル、および置換ヘテロアリール置換低級アルコキシカルボニルの置換ヘテロアリール部分における置換基の例としては、同一または異なって、1~置換可能な数の、好ましくは炭素数1~4個の低級アルキル、ヒドロキシ、好ましくは2~5個の低級アルコキシ、およびハロゲンがあげられる。

【0076】ヘテロアリール中のヘテロ原子の例としては、窒素原子、酸素原子、硫黄原子などがあげられる。ハロゲンとしては、フッ素原子、塩素原子、臭素原子、ヨウ素原子があげられる。 $\text{R}^{10}$ と $\text{R}^{11}$ が隣接するNと一緒に形成する複素環基の例としては、5~8員環があげられ、 $\text{R}^{10}$ と $\text{R}^{11}$ が隣接するN以外に、窒素原子、酸素原子、硫黄原子などのヘテロ原子をさらに含有してもよい。

【0077】(2)細胞抽出液の調製方法

本発明のLK6-A結合蛋白質は、LK6-A誘導体と結合することができる条件下でLK6-A誘導体と特異的に結合する蛋白質であれば、その由来は限定されないが、好ましくは真核生物由来の蛋白質、より好ましくは動物由来の蛋白質、さらに好ましくは哺乳動物の器官、臓器、組織または細胞由来の蛋白質をあげることができる。本発明のLK6-A結合蛋白質の探索方法に供する蛋白質試料は、蛋白質試料であれば、特に限定されないが、好ましくは真核生物由来の蛋白質試料、より好ましくは動物由来の蛋白質試料、さらに好ましくは哺乳動物の器官、臓器、組織または細胞由来の蛋白質試料をあげることができる。

【0078】器官、臓器または組織としては、公知のいかなる組織でも良いが、脾臓、胸腺、リンパ節等の組織が好ましい。細胞としては、公知のいかなる細胞でも良いが、T細胞株、T細胞初代培養細胞等を用いることができる。具体的には、T細胞株としては、ヒト由来Jurk

at細胞、マウス由来CTLL-2細胞等の細胞があげられる。T細胞初代培養細胞としては、脾臓、胸腺、リンパ節等の組織から回収した細胞を短期間培養した細胞等をあげることができる。これらの細胞は、動物細胞培養法入門、学会出版センター(1993)等に記載の方法に従って培養することができる。

【0079】上記器官、臓器、組織または細胞から、蛋白質試料を調製する方法は、蛋白質を回収できる方法であれば、公知のいかなる方法を用いても良く、例えば、蛋白質・酵素の基礎実験法、改訂第2版(南江堂、1994)などに記載の方法を用いて調製することができる。器官、臓器、組織または細胞の破碎方法としては、公知のいかなる破碎方法でも良いが、ワーリング ブレンダー

(Waring blender)、ポリトロン(Polytron)、Dounce型ホモジナイザーや超音波破碎機等の装置を用いた機械的破碎、低張液を用いた物理的破碎、界面活性剤を用いた可溶化、遠心分離等の操作を組み合わせることによって、蛋白質試料を調製することができる。蛋白質試料は、冷蔵状態または凍結状態で保存することができる。

【0080】(3) LK6-A結合蛋白質の特定方法

(1)の方法で調製したLK6-A誘導体固定化粒子を用いて、(2)の方法で調製した蛋白質試料から、LK6-A誘導体固定化粒子には結合するが、LK6-A対照化合物固定化粒子には結合しないか、または結合量がLK6-A誘導体固定化粒子に比べて少ない蛋白質を取得する事によって、LK6-A結合蛋白質を特定することができる。両粒子への結合蛋白質の判定方法は、LK6-A結合蛋白質を判定できる方法であれば、公知のいかなる方法を用いても良く、例えば蛋白質・酵素の基礎実験法、改訂第2版(南江堂、1994)などに記載の方法を用いて、判定することができる。

【0081】具体的には、(1)の方法で調製したLK6-A誘導体またはLK6-A対照化合物固定化粒子を、(2)の方法で調製した細胞抽出液に分散させ、静置またはローテーター、ミキサーなどで穏やかに攪拌しながら、0~50 で1秒~1000時間反応させ、LK6-A誘導体またはLK6-A対照化合物固定化粒子に蛋白質を吸着させることができる。この結合反応後、LK6-A誘導体またはLK6-A対照化合物固定化粒子を洗浄することによりLK6-A誘導体またはLK6-A対照化合物固定化粒子に非特異的に吸着する蛋白質を除去できる。結合または洗浄に用いられる溶液は、本法に使える限りいかなる溶液でも良く、例えば、蛋白質・酵素の基礎実験法、改訂第2版(南江堂、1994)に記載の溶液をあげることができる。

【0082】LK6-A誘導体またはLK6-A対照化合物固定化粒子に吸着した蛋白質は、LK6-A誘導体またはLK6-A対照化合物との結合を弱める手段により、LK6-A或いはLK6-A対照化合物固定化粒子から溶出することができる。LK6-A或いはLK6-A対照化合物と結合蛋白質の結合を弱める手段は、本法に使える限り、いかなる手段でも良く、例え

ば、変性剤の添加、塩濃度の増加、加熱、界面活性剤の添加等の手段があげられる。変性剤としては、SDS、尿素、塩酸グアニジンなどが、塩としては、NaCl、KClなどが、界面活性剤としては、Nonidet P40、Triton、Tween、Digitoninなどがあげられる。また、加熱とは例えば、30~100 に温度をあげてをいう。こうして精製した蛋白質は、SDS-PAGE、2次元電気泳動、質量分析等の蛋白質分析手法により検出することができる。LK6-A固定化粒子、LK6-A対照化合物固定化粒子、またはブロッッキングのみを施した粒子への結合蛋白質を比較することにより、LK6-A誘導体に特異的に結合する蛋白質、すなわちLK6-A誘導体の標的蛋白質を特定することができる。

【0083】(4) LK6-A結合蛋白質の同定方法

LK6-A結合蛋白質は、SDS-PAGEによる分離とクマシーブリリアントブルー(CBB)染色の後、ゲルから切り出すことができる。ゲル中の蛋白質は、リジルエンドペプチダーゼやトリプシン等の特異的切断点を持つエンドプロテアーゼによる処理によりペプチド断片に分けることができる。得られたペプチド断片を逆相HPLC等により精製した後、気相プロテインシーケンサーまたは質量分析器を用いて、当該蛋白質の部分アミノ酸配列を調べることができる。これらの部分アミノ酸配列の情報を用いて、PIR、SwissProt等のアミノ酸配列データベースやGenBank等の塩基配列データベースについて相同性検索を行うことにより、当該蛋白質と公知の蛋白質との相同性を知ることができる。

【0084】上記の方法で同定されたLK6-A結合蛋白質としては、配列番号1で表されるアミノ酸配列を有するp150a、配列番号3で表されるアミノ酸配列を有するp150c、配列番号4で表されるアミノ酸配列を有するp85および配列番号5で表されるアミノ酸配列を有するp27をあげることができる。p150aは、<http://www.kazusa.or.jp/huge/>のデータベースに記載されているKIAA0642 (accession No. AB014542) で表される部分長ヒトcDNA、およびGenBank accession No. AK001739 で表されるヒトcDNAにコードされる蛋白質で、GYFドメインを有する。公的データベースに対する相同性検索において、GYFドメイン以外の領域は他のタンパク質と全く相同性を示さず、また、機能に関する報告も無い。GYFドメインは最初にCD2結合蛋白質CD2BP2に見出されたドメインで、CD2の細胞内領域のプロリンリッチ領域と結合すること、CD2BP2の遺伝子発現を抑制するとIL-2の産生が抑制され、発現を亢進するとIL-2の産生が亢進する事が知られている[Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 95, 14897 (1998)]。このプロリンリッチ領域とGYFドメインの結合を阻害する化合物を探索することによって、免疫抑制活性を有する化合物を探索する方法が知られている(WO 00/34309)。配列番号2で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質は、p150aにおけるGYFドメインを含む領域であ

り、該蛋白質をコードするDNAを配列番号9に示した。

【0085】p150cは、グリコーゲンの分解に関わる二つの異なる酵素活性[オリゴ-1,4 1,4-グルカントランスフェラーゼ(oligo-1,4 1,4-glucontransferase)およびアミロ-1,6-グルコシダーゼ(amylo-1,6-glucosidase)活性]を持つグリコーゲン デブランチング エンザイム(Glycogen debranching enzyme)として知られている蛋白質であり[J. Biol. Chem., 276, 28824 (2001)]、遺伝子欠損患者は、致命的である。しかし、グリコーゲン デブランチング エンザイムと、免疫抑制との関連に関する報告は無い。p85は、GenBankの accession No. AK025598で表されるヒトcDNAがコードする蛋白質であり、公的データベースに対する相同性検索において、他の蛋白質と全く相同性を示さず、また、機能に関する報告も無い。p85と、免疫抑制との関連に関する報告も無い。p27は、チオレドキシン、チオレドキシ還元酵素およびNADPHの存在下で過酸化水素を分解する活性(ペルオキシダーゼ活性)を有する酵素、MSP23である[Antioxidant and Redox Signaling, 1, 385 (1999)]。しかし、MSP23と免疫抑制との関連に関する報告は無い。

【0086】(5)本発明のLK6-A結合蛋白質  
本発明のLK6-A結合蛋白質としては、上記の方法で得られるLK6-A結合蛋白質のうち、公知の蛋白質を除いた蛋白質をあげることができる。具体例としては  
(i)配列番号1~5、43、45および46のいずれかで表されるアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつLK6-A誘導体に結合する蛋白質  
(ii)配列番号1~5、43、45および46のいずれかで表されるアミノ酸配列と60~99%の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつLK6-A誘導体に結合する蛋白質  
(iii)配列番号2で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質  
(iv)配列番号49で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質  
をあげることができる。

【0087】配列番号1~5、43、45および46のいずれかで表されるアミノ酸配列において1以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつLK6-A誘導体に結合する蛋白質は、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Third Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (2001) (以下、モレキュラー・クローニング第3版と略す)、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987-1997) (以下、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジーと略す)、Nucleic Acids Research, 10, 6487 (1982)、Proc. Natl. Acad.

Sci. USA, 79, 6409(1982)、Gene, 34, 315 (1985)、Nucleic Acids Research, 13, 4431 (1985)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 488 (1985)等に記載の部位特異的変異導入法を用いて、例えば配列番号1~5、43、45および46のいずれかで表されるアミノ酸配列からなる蛋白質をコードするDNAに部位特異的変異を導入することにより、取得することができる。

【0088】欠失、置換、挿入もしくは付加されるアミノ酸の数は特に限定されないが、上記の部位特異的変異法等の周知の方法により欠失、置換、挿入もしくは付加できる程度の数であり、1個から数十個、好ましくは1~20個、より好ましくは1~10個、さらに好ましくは1~5個である。配列番号1~5、43、45および46のいずれかで表されるアミノ酸配列において1以上のアミノ酸残基が欠失、置換、挿入もしくは付加されたとは、同一配列中の任意の位置において、1または複数のアミノ酸残基の欠失、置換、挿入もしくは付加があることを意味し、欠失、置換、挿入または付加が同時に生じてもよく、置換、挿入もしくは付加されるアミノ酸残基は天然型と非天然型とを問わない。天然型アミノ酸残基としては、L-アラニン、L-アスパラギン、L-アスパラギン酸、L-グルタミン、L-グルタミン酸、グリシン、L-ヒスチジン、L-イソロイシン、L-ロイシン、L-リジン、L-メチオニン、L-フェニルアラニン、L-プロリン、L-セリン、L-スレオニン、L-トリプトファン、L-チロシン、L-バリン、L-システインなどがあげられる。

【0089】以下に、相互に置換可能なアミノ酸残基の例を示す。同一群に含まれるアミノ酸残基は相互に置換可能である。

A群：ロイシン、イソロイシン、ノルロイシン、バリン、ノルバリン、アラニン、2-アミノブタン酸、メチオニン、O-メチルセリン、t-ブチルグリシン、t-ブチルアラニン、シクロヘキシルアラニン  
B群：アスパラギン酸、グルタミン酸、イソアスパラギン酸、イソグルタミン酸、2-アミノアジピン酸、2-アミノスベリン酸  
C群：アスパラギン、グルタミン  
D群：リジン、アルギニン、オルニチン、2,4-ジアミノブタン酸、2,3-ジアミノプロピオン酸  
E群：プロリン、3-ヒドロキシプロリン、4-ヒドロキシプロリン  
F群：セリン、スレオニン、ホモセリン  
G群：フェニルアラニン、チロシン

【0090】また、配列番号1~5、43、45および46のいずれかで表されるアミノ酸配列において1以上のアミノ酸残基が欠失、置換、挿入もしくは付加された蛋白質がLK6-A誘導体に結合する蛋白質であるためには、配列番号1~5のいずれかで表されるアミノ酸配列と、60%以上、通常は80%以上、特に95%以上の相同性を有していることが好ましい。アミノ酸配列や塩

基配列の相同性は、Karlin and AltschulによるアルゴリズムBLAST[Pro. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 5873(1993)]やFASTA[Methods Enzymol., 183, 63 (1990)]を用いて決定することができる。このアルゴリズムBLASTに基づいて、BLASTNやBLASTXとよばれるプログラムが開発されている[J. Mol. Biol., 215, 403(1990)]。BLASTに基づいてBLASTNによって塩基配列を解析する場合には、パラメーターは例えばScore=100、wordlength=12とする。また、BLASTに基づいてBLASTXによってアミノ酸配列を解析する場合には、パラメーターは例えばscore=50、wordlength=3とする。BLASTとGapped BLASTプログラムを用いる場合には、各プログラムのデフォルトパラメーターを用いる。これらの解析方法の具体的な手法は公知である (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)。

【0091】(6)本発明で用いられるLK6-A結合蛋白質の調製(1)

本発明で用いられるLK6-A結合蛋白質としては、上記(1)~(4)の方法で取得、同定されるLK6-A結合蛋白質、および上記(5)の本発明のLK6-A結合蛋白質をあげることができる。本発明で用いられるLK6-A結合蛋白質は、本発明の方法に使える限り、公知のいかなる方法を用いて調製しても良く、例えば蛋白質・酵素の基礎実験法改訂第2版(南江堂、1994)などに記載の方法を用いて、調製することができる。

【0092】LK6-A結合蛋白質は、真核生物の器官、臓器、組織または細胞を破碎し、未精製画分、部分精製画分、精製画分として調製することができる。真核生物としては、公知のいかなる生物でも良いが、哺乳類が好ましい。器官、臓器または組織としては、公知のいかなる器官、臓器または組織でも良いが、脾臓、胸腺、リンパ節等をあげることができる。細胞としては、公知のいかなる細胞でも良いが、Jurkat細胞、CTLL-2細胞等の細胞をあげることができる。器官、臓器、組織または細胞の破碎方法としては、公知のいかなる破碎方法でも良いが、ワーリングブレンダー(Waring blender)、ポリトロン(Polytron)、Dounce型ホモジナイザーや超音波破碎機等の装置を用いた機械的破碎、低張液を用いた物理的破碎、界面活性剤を用いた可溶化、遠心分離等の操作を組み合わせることで、LK6-A結合蛋白質を含有する蛋白質画分を調製することができる。

【0093】該蛋白質画分は、冷蔵状態または凍結状態で保存することができる。該蛋白質画分からLK6-A結合蛋白質を精製する方法としては、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、ゲルろ過、LK6-A誘導体を固定化した担体を用いたアフィニティー精製等の方法を単独あるいは組み合わせることによりLK6-A結合蛋白質を分画する方法があげられる。分画した画分に含まれるLK6-A結合蛋白質の量は、LK6-A結合蛋白質に反応する抗体を用いた免疫プロット法等によって測定することができる。分画した画分に含まれる蛋白質がLK6-A

誘導体に結合する蛋白質であるか否か、およびその結合活性の程度は、(1)の方法で調製したLK6-A固定化粒子との結合活性を指標に検出できる。また、LK6-A結合蛋白質が、その他の結合活性や酵素活性等の生物活性が知られている蛋白質であれば、それらの結合活性や酵素活性等を用いて評価することができる[Current Protocols in Protein Science, John Wiley & Sons (2001)]。LK6-A結合蛋白質が多く含まれ、LK6-A結合蛋白質の活性が高い画分をまとめて、部分精製されたLK6-A結合蛋白質とすることができる。1ないし6種類程度の異なるカラムを用いて以上の操作を繰り返すことによって、高度に精製されたLK6-A結合蛋白質を調製することができる。

【0094】上記で調製した蛋白質画分からLK6-A結合蛋白質を精製する方法の別法としては、LK6-A結合蛋白質に反応する抗体を用いたアフィニティークロマトグラフィーによって精製する方法がある。すなわち、LK6-A結合蛋白質に反応するモノクローナル抗体やポリクローナル抗体等を取得した後、Harlow, E. and Lane, D. Using antibodies: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA (1999)等に記載の方法等を用いて該抗体をクロマトグラフィー担体と架橋し、アフィニティークラムを調製し、このカラムを用いて、蛋白質画分やLK6-A結合蛋白質の部分精製画分からLK6-A結合蛋白質を精製することができる。

【0095】(7)本発明に用いられるLK6-A結合蛋白質の調製(2)

本発明に用いられるLK6-A結合蛋白質は、LK6-A結合蛋白質をコードするDNAを用いて調製することができる。LK6-A結合蛋白質をコードするDNAとしては、(i)上記(1)~(4)の方法により取得または同定されるLK6-A結合蛋白質をコードするDNA、(ii)上記(5)の本発明のLK6-A結合蛋白質をコードするDNA、(iii)配列番号8~12のいずれかで表される塩基配列を有するDNA、(iv)上記(ii)または(iii)のDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつLK6-A誘導体と結合する蛋白質をコードするDNAをあげることができる。

【0096】ストリンジェントな条件下でハイブリダイズ可能なDNAとは、例えば、配列番号8~12のいずれかで表される塩基配列を有するDNAをプローブとして、コロニー・ハイブリダイゼーション法、ブランク・ハイブリダイゼーション法あるいはサザンプロットハイブリダイゼーション法等を用いることにより得られるDNAを意味し、具体的には、コロニーあるいはブランク由来のDNAを固定化したフィルターを用いて、0.7~1.0 mol/lの塩化ナトリウム存在下、65℃でハイブリダイゼーションを行った後、0.1~2倍濃度のSSC溶液(1倍濃度のSSC溶液の組成は、150 mmol

1)塩化ナトリウム、1.5 mmol/lクエン酸ナトリウムよりなる)を用い、65 条件下でフィルターを洗浄することにより同定できるDNAをあげることができる。ハイブリダイゼーションは、モレキュラー・クローニング第3版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、DNA Cloning 1: Core Techniques, A Practical Approach, Second Edition, Oxford University (1995)等に記載されている方法に準じて行うことができる。ハイブリダイズ可能なDNAとして具体的には、上記したBLASTやFASTA等を用いて上記したパラメータ等も用いて計算したときに、配列番号8~12のいずれかで表される塩基配列と少なくとも60%以上の相同性を有するDNA、好ましくは80%以上の相同性を有するDNA、さらに好ましくは95%以上の相同性を有するDNAをあげることができる。

【0097】LK6-A結合蛋白質は、モレキュラー・クローニング第3版やカレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー等に記載された方法等を用い、例えば以下の方法により、LK6-A結合蛋白質をコードするDNAを宿主細胞中で発現させて、製造することができる。全長cDNAをもとにして、必要に応じて、該蛋白質をコードする部分を含む適当な長さのDNA断片を調製する。また、必要に応じて、LK6-A結合蛋白質をコードする部分の塩基配列を、宿主細胞の発現に最適なコドンとなるように塩基を置換したDNAを調製する。該DNAはLK6-A結合蛋白質の効率的製造に有用である。該DNA断片、または全長cDNAを適当な発現ベクターのプロモーターの下流に挿入することにより、組換えベクターを作製する。該組換えベクターを、該発現ベクターに適合した宿主細胞に導入する。宿主細胞としては、細菌、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞等、目的とする遺伝子を発現できるものであればいずれも用いることができる。

【0098】発現ベクターとしては、上記宿主細胞において自立複製可能ないは染色体中への組込が可能で、本発明のポリペプチドをコードするDNAを転写できる位置にプロモーターを含有しているものが用いられる。細菌等の原核生物を宿主細胞として用いる場合は、LK6-A結合蛋白質をコードするDNAを含有してなる組換えベクターは原核生物中で自立複製可能であると同時に、プロモーター、リボソーム結合配列、本発明のDNA、転写終結配列、より構成されたベクターであることが好ましい。プロモーターを制御する遺伝子が含まれていてもよい。

【0099】発現ベクターとしては、例えば、pBTrp2、pBTac1、pBTac2 (いずれもベーリンガーマンハイム社より市販)、pKK233-2 (Pharmacia社製)、pSE280 (Invitrogen社製)、pGEMEX-1 (Promega社製)、pQE-8 (QIAGEN社製)、pKYP10 (特開昭58-110600)、pKYP200 [Agric. Biol. Chem., 48, 669 (1984)]、pLSA1 [Agric. Bi

ol. Chem., 53, 277 (1989)]、pGEL1 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 4306 (1985)]、pBluescript II SK (-) (Stratagene社製)、pTrs30 [Escherichiacoli JM109/pTrs30 (FERM BP-5407)より調製]、pTrs32 [Escherichia coli JM109/pTrs32 (FERM BP-5408)より調製]、pGHA2 [Escherichia coli IGHA2 (FERM B-400)より調製、特開昭60-221091]、pGKA2 [Escherichia coli IGKA2 (FERM BP-6798)より調製、特開昭60-221091]、pTerm2 (US4686191、US4939094、US5160735)、pSupex、pUB110、pTP5、pC194、pEG400 [J. Bacteriol., 172, 2392 (1990)]、pGEX (Pharmacia社製)、pETシステム (Novagen社製)等をあげることができる。

【0100】プロモーターとしては、宿主細胞中で機能するものであればいかなるものでもよい。例えば、trpプロモーター ( $P_{trp}$ )、lacプロモーター、 $P_L$ プロモーター、 $P_R$ プロモーター、T7プロモーター等の、大腸菌やファージ等に由来するプロモーターをあげることができる。また、 $P_{trp}$ を2つ直列させたプロモーター ( $P_{trp} \times 2$ )、tacプロモーター、lacT7プロモーター、let1プロモーターのように人為的に設計改変されたプロモーター等も用いることができる。リボソーム結合配列であるシャイン-ダルガノ (Shine-Dalgarno) 配列と開始コドンとの間を適当な距離 (例えば6~18塩基) に調節したプラスミドを用いることが好ましい。本発明の組換えベクターにおいては、本発明のDNAの発現には転写終結配列は必ずしも必要ではないが、構造遺伝子の直下に転写終結配列を配置することが好ましい。

【0101】宿主細胞としては、エシェリヒア属、セラチア属、バチルス属、ブレヴィバクテリウム属、コリネバクテリウム属、マイクロバクテリウム属、シュードモナス属等に属する微生物、例えば、Escherichia coli XL1-Blue、Escherichia coli XL2-Blue、Escherichia coli DH1、Escherichia coli MC1000、Escherichia coli KY3276、Escherichia coli W1485、Escherichia coli JM109、Escherichia coli HB101、Escherichia coli No.49、Escherichia coli W3110、Escherichia coli NY49、Escherichia coli G1698、Escherichia coli TB1、Serratia ficaria、Serratia fonticola、Serratia liquefaciens、Serratia marcescens、Bacillus subtilis、Bacillus amyloliquefacines、Brevibacterium ammoniagenes、Brevibacterium immariophilum ATCC14068、Brevibacterium saccharolyticum ATCC14066、Brevibacterium flavum ATCC14067、Brevibacterium lactofermentum ATCC13869、Corynebacterium glutamicum ATCC13032、Corynebacterium glutamicum ATCC13869、Corynebacterium acetoacidophilum ATCC13870、Microbacterium ammoniophilum ATCC15354、Pseudomonas putida、Pseudomonas sp. D-0110等をあげることができる。

【0102】組換えベクターの導入方法としては、上記宿主細胞へDNAを導入する方法であればいずれもよい

ることができ、例えば、カルシウムイオンを用いる方法〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 2110 (1972)〕、プロトプラスト法(特開昭63-248394)、またはGene, 17, 107 (1982)やMolecular & General Genetics, 168, 111 (1979)に記載の方法等をあげることができる。酵母を宿主細胞として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、YEP13(ATCC37115)、YEp24(ATCC37051)、YCp50(ATCC37419)、pHS19、pHS15等をあげることができる。プロモーターとしては、酵母菌株中で機能するものであればいずれのものを用いてもよく、例えば、ヘキソースキナーゼ等の解糖系の遺伝子のプロモーター、PHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーター、gal 1プロモーター、gal 10プロモーター、ヒートショックポリペプチドプロモーター、MF 1プロモーター、CUP 1プロモーター等をあげることができる。

【0103】宿主細胞としては、*Saccharomyces*属、*Schizosaccharomyces*属、*Kluyveromyces*属、*Trichosporon*属、*Schwanniomyces*属、*Pichia*属、*Candida*属等に属する微生物、例えば、*Saccharomyces cerevisiae*、*Schizosaccharomyces pombe*、*Kluyveromyces lactis*、*Trichosporon pullulans*、*Schwanniomyces alluvius*、*Candida utilis*等をあげることができる。組換えベクターの導入方法としては、酵母にDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法〔Methods Enzymol., 194, 182 (1990)〕、スフェロプラスト法〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 1929 (1978)〕、酢酸リチウム法〔J. Bacteriology, 153, 163 (1983)〕、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 1929 (1978)記載の方法等をあげることができる。動物細胞を宿主として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、pcDNA1、pCDM8(Invitrogen社製)、pAGE107〔特開平3-22979、Cytotechnology, 3, 133 (1990)〕、pAS3-3(特開平2-227075)、pcDNA1/Amp(Invitrogen社製)、pREP4(Invitrogen社製)、pAGE103〔J. Biochem., 101, 1307 (1987)〕、pAGE210等をあげることができる。

【0104】プロモーターとしては、動物細胞中で機能するものであればいずれも用いることができ、例えば、サイトメガロウイルス(CMV)のIE(immediate early)遺伝子のプロモーター、SV40の初期プロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒートショックプロモーター、SRプロモーター等をあげることができる。また、ヒトCMVのIE遺伝子のエンハンサーをプロモーターと共に用いてもよい。宿主細胞としては、ヒトの細胞であるナマルバ(Namalwa)細胞、サル細胞であるCOS細胞、チャイニーズ・ハムスターの細胞であるCHO細胞、HBT5637(特開昭63-299)等をあげることができる。

【0105】動物細胞への組換えベクターの導入方法と

しては、動物細胞にDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法〔Cytotechnology, 3, 133 (1990)〕、リン酸カルシウム法(特開平2-227075)、リポフェクション法〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413 (1987)〕、Virology, 52, 456(1973)等をあげることができる。昆虫細胞を宿主として用いる場合には、例えばカレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual, W. H. Freeman and Company, New York (1992)、Bio/Technology, 6, 47 (1988)等に記載された方法によって、ポリペプチドを発現することができる。

【0106】即ち、組換え遺伝子導入ベクターおよびバキュロウイルスを昆虫細胞に共導入して昆虫細胞培養上清中に組換えウイルスを得た後、さらに該組換えウイルスを昆虫細胞に感染させ、ポリペプチドを発現させることができる。該方法において用いられる遺伝子導入ベクターとしては、例えば、pVL1392、pVL1393、pBlueBac11(ともにInvitrogen社製)等をあげることができる。バキュロウイルスとしては、例えば、夜盗蛾科昆虫に感染するウイルスであるアウトグラフィ・カリフォルニカ・ヌクレアー・ポリヘドロシス・ウイルス(*Autographa californica nuclear polyhedrosis virus*)等を用いることができる。昆虫細胞としては、*Spodoptera frugiperda*の卵巣細胞であるSf9、Sf21〔Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual, W. H. Freeman and Company, New York (1992)〕、*Trichoplusia ni*の卵巣細胞であるHigh 5(Invitrogen社製)等を用いることができる。

【0107】組換えウイルスを調製するための、昆虫細胞への上記組換え遺伝子導入ベクターと上記バキュロウイルスの共導入方法としては、例えば、リン酸カルシウム法(特開平2-227075)、リポフェクション法〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413 (1987)〕等をあげることができる。植物細胞を宿主細胞として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、Tiプラスミド、タバコモザイクウイルスベクター等をあげることができる。プロモーターとしては、植物細胞中で機能するものであればいずれのものを用いてもよく、例えば、カリフラワーモザイクウイルス(CaMV)の35Sプロモーター、イネアクチン1プロモーター等をあげることができる。宿主細胞としては、タバコ、ジャガイモ、トマト、ニンジン、ダイズ、アブラナ、アルファルファ、イネ、コムギ、オオムギ等の植物細胞等をあげることができる。組換えベクターの導入方法としては、植物細胞にDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、アグロバクテリウム(*Agrobacterium*)(特開昭59-140885、特開昭60-70080、W094/00977)、エレクトロポレーション法(特開昭60-251887)、パーティクルガン(遺伝子銃)を用いる方法(日本特許第2606856、日本

特許第2517813)等をあげることができる。

【0108】以上のようにして得られる形質転換体を培地に培養し、培養物中にLK6-A結合蛋白質を生成蓄積させ、該培養物から採取することにより、LK6-A結合蛋白質を製造することができる。該形質転換体を培地に培養する方法は、宿主の培養に用いられる通常の方法に従って行うことができる。該形質転換体が大腸菌等の原核生物あるいは酵母等の真核生物を宿主として得られた形質転換体である場合、該形質転換体を培養する培地として、該形質転換体が資化し得る炭素源、窒素源、無機塩類等を含むし、該形質転換体の培養を効率的に行える培地であれば天然培地、合成培地のいずれを用いてもよい。

【0109】炭素源としては、該形質転換体が資化し得るものであればよく、グルコース、フラクトース、スクロース、これらを含む糖蜜、デンプンあるいはデンプン加水分解物等の炭水化物、酢酸、プロピオン酸等の有機酸、エタノール、プロパノールなどのアルコール類等を用いることができる。窒素源としては、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等の無機酸もしくは有機酸のアンモニウム塩、その他の含窒素化合物、ならびに、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーンステープリカー、カゼイン加水分解物、大豆粕および大豆粕加水分解物、各種発酵菌体およびその消化物等を用いることができる。無機塩としては、リン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸銅、炭酸カルシウム等を用いることができる。培養は、振盪培養または深部通気攪拌培養などの好気的条件下で行う。培養温度は15~40℃がよく、培養時間は、通常16時間~7日間である。培養中のpHは3.0~9.0に保持することが好ましい。pHの調整は、無機または有機の酸、アルカリ溶液、尿素、炭酸カルシウム、アンモニアなどを用いて行う。

【0110】また、培養中必要に応じて、アンピシリンやテトラサイクリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。プロモーターとして誘導性のプロモーターを用いた組換えベクターで形質転換した微生物を培養するときには、必要に応じてインデューサーを培地に添加してもよい。例えば、*lac*プロモーターを用いた組換えベクターで形質転換した微生物を培養するときにはイソプロピル-D-チオガラクトピラノシド等を、*trp*プロモーターを用いた組換えベクターで形質転換した微生物を培養するときにはインドールアクリル酸等を培地に添加してもよい。

【0111】動物細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているRPMI1640培地〔The Journal of the American Medical Association, 199, 519 (1967)〕、EagleのMEM培地〔Science, 50

122, 501 (1952)〕、ダルベッコ改変MEM培地〔Virology, 8, 396 (1959)〕、199培地〔Proceeding of the Society for the Biological Medicine, 73, 1 (1950)〕またはこれら培地に牛胎児血清等を添加した培地等を用いることができる。培養は、通常pH6~8、30~40℃、5%CO<sub>2</sub>存在下の条件下で1~7日間行う。また、培養中必要に応じて、カナマイシン、ペニシリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。昆虫細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているTNM-FH培地(Pharmingen社製)、Sf-900 II SFM培地(Life Technologies社製)、ExCell400、ExCell405(いずれもJRH Biosciences社製)、Grace's Insect Medium〔Nature, 195, 788 (1962)〕等を用いることができる。

【0112】培養は、通常pH6~7、25~30℃等の条件下で、1~5日間行う。また、培養中必要に応じて、ゲンタマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。植物細胞を宿主として得られた形質転換体は、細胞として、または植物の細胞や器官に分化させて培養することができる。該形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているムラシゲ・アンド・スクーグ(MS)培地、ホワイト(White)培地、またはこれら培地にオーキシン、サイトカイニン等、植物ホルモンを添加した培地等を用いることができる。培養は、通常pH5~9、20~40℃の条件下で3~60日間行う。

【0113】また、培養中必要に応じて、カナマイシン、ハイグロマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。上記のとおり、LK6-A結合蛋白質をコードするDNAを組み込んだ組換え体ベクターを保有する微生物、動物細胞、昆虫細胞あるいは植物細胞由来の形質転換体を、通常の培養方法に従って培養し、LK6-A結合蛋白質を生成蓄積させ、該培養物よりLK6-A結合蛋白質を採取することにより、LK6-A結合蛋白質を製造することができる。酵母、動物細胞、昆虫細胞または植物細胞により発現させた場合には、糖あるいは糖鎖が付加された蛋白質を得ることができる。LK6-A結合蛋白質を生産させる形態としては、LK6-A結合蛋白質をそのままの構造で生産させる以外に、モレキュラー・クローニング第3版に記載されている方法等に準じて、マーカーペプチドを連結させた融合蛋白質として、またはシグナル配列を連結させた分泌蛋白質としてとして生産することができる。

【0114】融合させるマーカーペプチドとしては、mycポリペプチド、-ガラクトシダーゼ、プロテインA、プロテインAのIgG結合領域、クロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼ、ポリ(Arg)、ポリ(Glu)、プロテインG、マルトース結合タンパク質、グルタチオンS-トランスフェラーゼ、ポリヒスチジン鎖(His-tag)、Sペプチド、DNA結合タンパク質ドメイン、Tac抗原、チオレドキシニン、グリーン・フルオレッセント・プロテイン、FLAGペプチド、

および任意の抗体のエピトープなどがあげられる。シグナル配列としては、任意の分泌蛋白質のシグナル配列をあげることができる〔山川彰夫, 実験医学, 13, 469-474 (1995)〕。LK6-A結合蛋白質の生産方法としては、宿主細胞内に生産させる方法、宿主細胞外に分泌させる方法、あるいは宿主細胞外膜上に生産させる方法があり、使用する宿主細胞や、生産させるポリペプチドの構造を変えることにより、該方法を選択することができる。LK6-A結合蛋白質が宿主細胞内あるいは宿主細胞外膜上に生産される場合、ポールソンらの方法〔J. Biol. Chem., 264, 17619 (1989)〕、ロウらの方法〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 8227 (1989)、Genes Develop., 4, 1288 (1990)〕、または特開平5-336963、W094/23021等に記載の方法を準用することにより、LK6-A結合蛋白質を宿主細胞外に積極的に分泌させることができる。

【0115】すなわち、遺伝子組換えの手法を用いて、本発明のポリペプチドの活性部位を含むポリペプチドの手前にシグナルペプチドを付加した形で発現させることにより、本発明のポリペプチドを宿主細胞外に積極的に分泌させることができる。また、特開平2-227075に記載されている方法に準じて、ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子等を用いた遺伝子増幅系を利用して生産量を上昇させることもできる。さらに、遺伝子導入した動物または植物の細胞を再分化させることにより、遺伝子が導入された動物個体(トランスジェニック非ヒト動物)または植物個体(トランスジェニック植物)を造成し、これらの個体を用いてLK6-A結合蛋白質を製造することもできる。形質転換体が動物個体または植物個体の場合は、通常の方法に従って、飼育または栽培し、該ポリペプチドを生成蓄積させ、該動物個体または植物個体より該蛋白質を採取することにより、LK6-A結合蛋白質を製造することができる。

【0116】動物個体を用いてLK6-A結合蛋白質を製造する方法としては、例えば公知の方法〔American Journal of Clinical Nutrition, 63, 639S (1996)、American Journal of Clinical Nutrition, 63, 627S (1996)、Bio/Technology, 9, 830 (1991)〕に準じて遺伝子を導入して造成した動物中にLK6-A結合蛋白質を生産する方法があげられる。動物個体の場合は、例えば、LK6-A結合蛋白質をコードするDNAを導入したトランスジェニック非ヒト動物を飼育し、該ポリペプチドを該動物中に生成・蓄積させ、該動物中より該ポリペプチドを採取することにより、LK6-A結合蛋白質を製造することができる。該動物中の生成・蓄積場所としては、例えば、該動物のミルク(特開昭63-309192)、卵等をあげることができる。この際に用いられるプロモーターとしては、動物で発現できるものであればいずれも用いることができるが、例えば、乳腺細胞特異的なプロモーターであるカゼインプロモーター、カゼインプロモーター、ラクトグロブリンプロモーター、ホエー酸性プロテインプ

ロモーター等が好適に用いられる。

【0117】植物個体を用いてLK6-A結合蛋白質を製造する方法としては、例えばLK6-A結合蛋白質をコードするDNAを導入したトランスジェニック植物を公知の方法〔組織培養, 20 (1994)、組織培養, 21 (1995)、Trends in Biotechnology, 15, 45(1997)〕に準じて栽培し、LK6-A結合蛋白質を該植物中に生成・蓄積させ、該植物中よりLK6-A結合蛋白質を採取することにより、LK6-A結合蛋白質を生産する方法があげられる。上記形質転換体により製造されたLK6-A結合蛋白質を単離精製するためには、通常酵素の単離精製法を用いることができる。例えばLK6-A結合蛋白質が、細胞内に溶解状態で発現した場合には、培養終了後、細胞を遠心分離により回収し、水系緩衝液にけん濁後、超音波破砕機、フレンチプレス、マントンガウリンホモゲナイザー、ダイノミル等により細胞を破砕し、無細胞抽出液を得る。該無細胞抽出液を遠心分離することにより得られる上清から、通常酵素の単離精製法、即ち、溶媒抽出法、硫酸等による塩析法、脱塩法、有機溶媒による沈殿法、ジエチルアミノエチル(DEAE)-セファロース、DIAION HPA-75(三菱化学社製)等のレジンを用いた陰イオン交換クロマトグラフィー法、S-Sepharose FF(Pharmacia社製)等のレジンを用いた陽イオン交換クロマトグラフィー法、ブチルセファロース、フェニルセファロース等のレジンを用いた疎水性クロマトグラフィー法、分子篩を用いたゲルろ過法、アフィニティークロマトグラフィー法、クロマトフォーカシング法、等電電気泳動等の電気泳動法等の手法を単独あるいは組み合わせて用い、精製標品を得ることができる。

【0118】また、LK6-A結合蛋白質が細胞内に不溶体を形成して発現した場合は、同様に細胞を回収後、破砕し、遠心分離を行うことにより、沈殿画分としてLK6-A結合蛋白質の不溶体を回収する。回収したLK6-A結合蛋白質の不溶体を蛋白質変性剤で可溶化する。該可溶化液を希釈または透析し、該可溶化液中の蛋白質変性剤の濃度を下げることにより、LK6-A結合蛋白質を正常な立体構造に戻す。該操作の後、上記と同様の単離精製法によりLK6-A結合蛋白質の精製標品を得ることができる。LK6-A結合蛋白質、あるいはLK6-A結合蛋白質に糖鎖の付加された該蛋白質等の誘導体が細胞外に分泌された場合には、培養上清に該蛋白質あるいは該蛋白質の誘導体を回収することができる。即ち、該培養物を上記と同様の遠心分離等の手法により処理することにより培養上清を取得し、該培養上清から、上記と同様の単離精製法を用いることにより、精製標品を得ることができる。このようにして取得されるLK6-A結合蛋白質として、例えば、配列番号1、3、4または5で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドをあげることができる。

【0119】また、LK6-A結合蛋白質は、Fmoc法(フルオレニルメチルオキシカルボニル法)、tBoc

法 ( t - ブチルオキシカルボニル法 ) 等の化学合成法によっても製造することができる。また、Advanced ChemTech社、パーキン・エルマー社、Pharmacia社、Protein Technology Instrument社、Synthecell-Vega社、PerSeptive社、島津製作所等のペプチド合成機を利用して化学合成することもできる。さらに、LK6-A結合蛋白質は、LK6-A結合蛋白質をコードするDNAをin vitro転写・翻訳系を用いて製造することもできる。in vitro転写・翻訳系としては、公知の方法 [ Kigawa T.ら, J. Biomol. NMR, 6, 129 (1998)、Spirin A.S.ら, Science, 242, 1162 (1988)、Kigawa T. & Yokoyama S., J. Biochem., 110, 166 (1991) ] に準じて、in vitro転写・翻訳系を用いることができる。すなわち、LK6-A結合蛋白質をコードするDNAをSP6、T7、T3等のプロモーターの下流につなげ、それぞれのプロモーター特異的なRNAポリメラーゼを反応させることにより大量のLK6-A結合蛋白質RNAをインピトロで合成した後、無細胞系の翻訳系例えばウサギ網状赤血球ライセート、コムギ胚芽抽出液や大腸菌抽出液等を用いた翻訳系を利用して、LK6-A結合蛋白質を生産することができる。

【0120】(8) LK6-A結合蛋白質を認識する抗体の調製

LK6-A結合蛋白質を認識する抗体は、LK6-A結合蛋白質または該蛋白質の部分断片ポリペプチドの精製標品を用いて、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体等として作製することができる。

(8-1) ポリクローナル抗体の作製

LK6-A結合蛋白質または該蛋白質の部分断片ポリペプチドの精製標品を抗原として用い、動物に投与することによりポリクローナル抗体を作製することができる。投与する動物として、ウサギ、ヤギ、ラット、マウス、ハムスター等を用いることができる。該抗原の投与量は動物1匹当たり50~100μgが好ましい。低分子ペプチドを用いる場合は、ペプチドをスカシガイヘモシアニン (keyhole limpet haemocyanin) や牛チログロブリンなどのキャリア蛋白に共有結合させたものを抗原とするのが望ましい。抗原とするペプチドは、ペプチド合成機で合成することができる。

【0121】該抗原の投与は、1回目の投与の後1~2週間おきに3~10回行う。各投与後、3~7日目に眼底静脈叢より採血し、該血清が免疫に用いた抗原と反応することを酵素免疫測定法 (酵素免疫測定法 (ELISA法)) : 医学書院刊 (1976年)、Antibodies-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1988) 等で確認する。

【0122】免疫に用いた抗原に対し、その血清が十分な抗体価を示した非ヒト哺乳動物より血清を取得し、該血清を分離、精製することによりポリクローナル抗体を取得することができる。分離、精製する方法としては、遠心分離、40~50%飽和硫酸アンモニウムによる塩

析、カプリル酸沈殿 [Antibodies, A Laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory, (1988)]、またはDEAE-セファロースカラム、陰イオン交換カラム、プロテインAまたはG-カラムあるいはゲル濾過カラム等を用いるクロマトグラフィー等を、単独または組み合わせて処理する方法があげられる。

【0123】(8-2) モノクローナル抗体の作製

(a) 抗体産生細胞の調製

免疫に用いたLK6-A結合蛋白質の部分断片ポリペプチドに対し、その血清が十分な抗体価を示したラットを抗体産生細胞の供給源として供する。該抗体価を示したラットに抗原物質を最終投与した後3~7日目に、脾臓を摘出する。該脾臓をMEM培地 (日水製薬社製) 中で細断し、ピンセットでほぐし、1,200rpmで5分間遠心分離した後、上清を捨てる。得られた沈殿画分の脾細胞をトリス-塩化アンモニウム緩衝液 (pH7.65) で1~2分間処理し赤血球を除去した後、MEM培地で3回洗浄し、得られた脾細胞を抗体産生細胞として用いる。

20 【0124】(b) 骨髄腫細胞の調製

骨髄腫細胞としては、マウスまたはラットから取得した株化細胞を使用する。例えば、8-アザグアニン耐性マウス (BALB/c由来) 骨髄腫細胞株P3-X63Ag8-U1 (以下、P3-U1と略す) [Curr. Topics. Microbiol. Immunol., 81, 1 (1978)、Europ. J. Immunol., 6, 511 (1976)]、SP2/0-Ag14(SP-2) [Nature, 276, 269 (1978)]、P3-X63-Ag8653(653) [J. Immunol., 123, 1548 (1979)]、P3-X63-Ag8(X63) [Nature, 256, 495 (1975)] 等を用いることができる。これらの細胞株は、8-アザグアニン培地 [RPMI-1640培地にグルタミン (1.5mmol/l)、2-メルカプトエタノール (5×10<sup>-5</sup>mol/l)、ジエンタマイシン (10μg/ml) および牛胎児血清 (FCS) (CSL社製、10%) を加えた培地 (以下、正常培地という) に、さらに8-アザグアニン (15μg/ml) を加えた培地] で継代するが、細胞融合の3~4日前に正常培地で培養し、融合には該細胞を2×10<sup>7</sup>個以上用いる。

【0125】(c) ハイブリドーマの作製

(a) で取得した抗体産生細胞と(b) で取得した骨髄腫細胞をMEM培地またはPBS (リン酸二ナトリウム1.83g、リン酸一カリウム0.21g、食塩7.65g、蒸留水1リットル、pH7.2) でよく洗浄し、細胞数が、抗体産生細胞:骨髄腫細胞=5~10:1になるよう混合し、1,200rpmで5分間遠心分離した後、上清を捨てる。得られた沈殿画分の細胞群をよくほぐし、該細胞群に、攪拌しながら、37℃で、10<sup>8</sup>抗体産生細胞あたり、ポリエチレングライコール-1000 (PEG-1000) 2g、MEM 2mlおよびジメチルスルホキシド (DMSO) 0.7mlを混合した溶液を0.2~1ml添加し、さらに1~2分間毎にMEM

培地 1 ~ 2 ml を数回添加する。

【0126】添加後、MEM培地を加えて全量が50 ml になるように調製する。該調製液を900 rpmで5分間遠心分離後、上清を捨てる。得られた沈殿画分の細胞を、ゆるやかにほぐした後、メスピペットによる吸込み、吹出しでゆるやかにHAT培地〔正常培地にヒポキサンチン ( $10^{-4}$  mol/l)、チミジン ( $1.5 \times 10^{-5}$  mol/l) およびアミノプテリン ( $4 \times 10^{-7}$  mol/l) を加えた培地〕100 ml中に懸濁する。該懸濁液を96穴培養用プレートに100  $\mu$ l / 穴ずつ分注し、5% CO<sub>2</sub> インキュベーター中、37 °Cで7 ~ 14日間培養する。培養後、培養上清の一部をとりアンチボディズ〔Antibodies, A Laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Chapter 14 (1988)〕等に述べられている酵素免疫測定法により、本発明のポリペプチドの部分断片ポリペプチドに特異的に反応するハイブリドーマを選択する。酵素免疫測定法の具体例として、以下の方法をあげることができる。

【0127】免疫の際、抗原に用いた本発明のポリペプチドの部分断片ポリペプチドを適当なプレートにコートし、ハイブリドーマ培養上清もしくは後述の(d)で得られる精製抗体を第一抗体として反応させ、さらに第二抗体としてビオチン、酵素、化学発光物質あるいは放射線化合物等で標識した抗ラットまたは抗マウスIgGグロブリン抗体を反応させた後に標識物質に応じた反応を行い、本発明のポリペプチドに特異的に反応するものを本発明のモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマとして選択する。該ハイブリドーマを用いて、限界希釈法によりクローニングを2回繰り返し〔1回目は、HAT培地 (HAT培地からアミノプテリンを除いた培地)、2回目は、正常培地を使用する〕、安定して強い抗体価の認められたものを本発明のモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマ株として選択する。

【0128】(d)モノクローナル抗体の調製  
プリスタン処理〔2, 6, 10, 14-テトラメチルペンタデカン (Pristane) 0.5 mlを腹腔内投与し、2週間飼育する〕した8 ~ 10週令のマウスまたはヌードマウスに、(c)で取得した本発明のポリペプチドモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ細胞  $5 \sim 20 \times 10^6$  細胞/匹を腹腔内に注射する。10 ~ 21日間でハイブリドーマは腹水癌化する。該腹水癌化したマウスから腹水を採取し、3,000 rpmで5分間遠心分離して固形分を除去する。得られた上清より、ポリクローナルで用いた方法と同様の方法でモノクローナル抗体を精製、取得することができる。抗体のサブクラスの決定は、マウスモノクローナル抗体タイピングキットまたはラットモノクローナル抗体タイピングキットを用いて行う。ポリペプチド量は、ローリー法あるいは280 nmでの吸光度より算出する。

【0129】(9) LK6-A結合蛋白質に結合する化合物

の探索系の構築

LK6-A結合蛋白質に結合する化合物の探索方法としては、

LK6-A結合蛋白質とLK6-A誘導体との結合を阻害する化合物を探索する方法

LK6-A結合蛋白質であるp150aとCD2またはそのCD2BP2結合領域との結合を抑制する化合物を探索する方法、および

LK6-A結合蛋白質である後述するp150c或いはp27の酵素活性を阻害する化合物を探索する方法があげられる。

【0130】 ~ のいずれかが方法から選ばれる2つ以上の方法を組み合わせることによってLK6-A結合蛋白質に結合する化合物の中から、自己免疫疾患治療剤または免疫抑制剤として好ましい二つ以上の活性を併せ持つ化合物を絞り込むこともできる。また逆にLK6-A誘導体が有する免疫抑制剤として好ましくない活性が低い化合物を絞り込むこともできる。更に、必要に応じて、従来の技術に記載した公知の方法で、自己免疫疾患治療剤または免疫抑制剤としてより好ましい活性を有する化合物を絞り込むことができる。免疫抑制剤として好ましい活性を有する化合物とは、例えば免疫抑制剤として好ましくない活性が低い化合物のことをいい、例えば、体重減少、骨髄抑制、肝臓障害、腎毒性、神経毒性などが軽減された化合物をあげることができる。

【0131】以下に、 ~ の方法を詳述する。

LK6-A結合蛋白質とLK6-A誘導体との結合を阻害する物質を探索する方法では、LK6-A結合蛋白質とLK6-A誘導体を調製し、両者の結合を検出する系に、被検物質を加え、被検物質による該結合の抑制を指標に、LK6-A結合蛋白質とLK6-A誘導体との結合を阻害する化合物を選択する。ここで、具体的には、被検物質存在下、下記(i) ~ (vi)から選ばれるいずれか1つの蛋白質と、被検物質非存在下でのLK6-A誘導体との結合量を測定し、被検物質存在下と被検物質非存在下での該蛋白質とLK6-A誘導体との結合量を比較し、被検物質より該蛋白質とLK6-A誘導体との結合を阻害する化合物を選択することを特徴とするLK6-A結合蛋白質とLK6-A誘導体との結合を阻害する化合物の探索方法があげられる。

【0132】(i) 配列番号1 ~ 5、43、45、46および49のいずれかで表されるアミノ酸配列を有する蛋白質

(ii) 配列番号1 ~ 5、43、45、46および49のいずれかで表されるアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸残基が欠失、置換、挿入もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつLK6-A誘導体に結合する蛋白質  
(iii) 配列番号1 ~ 5、43、45、46および49のいずれかで表されるアミノ酸配列と60%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつLK6-A誘導体に結合する蛋白質

(iv) 配列番号45で表されるアミノ酸配列においてア

ミノ酸番号353~408で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質

(v) 配列番号46で表されるアミノ酸配列においてアミノ酸番号64~121で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質

(vi) 上記(1)~(4)の方法で取得、同定されるLK6-A結合蛋白質

ここで、1以上のアミノ酸残基が欠失、置換、挿入もしくは付加されたアミノ酸配列とは、上記定義と同様なアミノ酸配列を意味する。また、配列番号45および46で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質は、いずれもヒト由来のGYFドメインを有する蛋白質であり、配列番号49で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチドは、p150aのGYFドメインを含有するポリペプチドである。配列番号45で表されるアミノ酸配列においてアミノ酸番号353~408で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質、および配列番号46で表されるアミノ酸配列においてアミノ酸番号64~121で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質は、いずれもGYFドメインを含有する蛋白質である。

【0133】のLK6-A結合蛋白質であるp150aとCD2またはそのCD2BP2結合領域との結合を阻害する物質を探索する方法では、p150aとCD2またはそのCD2BP2結合領域ポリペプチドを調製し、両者の結合を検出する系に、被検物質を加え、被検物質による該結合の阻害を指標に、p150aとCD2またはそのCD2BP2結合領域の結合を阻害する物質を選択する。ここで、具体的には、被検物質存在下、CD2蛋白質またはその誘導体と下記(i)~(iii)から選ばれるいずれか1つの蛋白質を接触させたときのCD2蛋白質またはその誘導体と該蛋白質の結合量と、被検物質非存在下、CD2蛋白質またはその誘導体と該蛋白質を接触させたときのCD2蛋白質またはその誘導体と該蛋白質の結合量を測定し、被検物質存在下と被検物質非存在下での該蛋白質の該測定値を比較し、被検物質より該結合を阻害する活性を有する化合物を選択することを特徴とするCD2蛋白質と該蛋白質の結合を阻害する化合物の探索方法があげられる。

【0134】(i) 配列番号1または2で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質

(ii) 配列番号1または2で表されるアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつCD2蛋白質と結合する蛋白質

(iii) 配列番号1または2で表されるアミノ酸配列と60%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつCD2蛋白質と結合する蛋白質

ここで、1以上のアミノ酸残基が欠失、置換、挿入もしくは付加されたアミノ酸配列とは、上記定義と同様なアミノ酸配列を意味する。上記探索方法に記載のCD2蛋白質の誘導体としては、下記(i)~(iii)から選ばれる

いずれか1つの蛋白質を用いることができる。

【0135】(i) 配列番号6で表されるアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ配列番号1または2で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質と結合する活性を有する蛋白質

(ii) 配列番号6で表されるアミノ酸配列と60%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ配列番号1または2で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質と結合する蛋白質

(iii) 配列番号6で表されるアミノ酸配列のアミノ酸番号281~310番目のアミノ酸配列を有する蛋白質

【0136】ここで、1以上のアミノ酸残基が欠失、置換、挿入もしくは付加されたアミノ酸配列とは、上記定義と同様なアミノ酸配列を意味する。LK6-A結合蛋白質とLK6-A誘導体、またはp150aとCD2或いはそのCD2BP2結合領域ポリペプチドとの反応方法、結合量の検出方法は、両者の結合を検出できる既知の方法であれば、いかなる方法でも良い。例えば、の方法の場合、LK6-A結合蛋白質とLK6-A誘導体のいずれか一方の分子をマルチウエルプレートやクロマト担体やラテックス等のビーズ、表面プラズモン共鳴測定用のチップ、質量測定用のターゲット等の固相に、物理的吸着、共有結合や、LK6-A結合蛋白質に反応する抗体等や、タグペプチド、マーカーペプチド、またはシグナルペプチドより選ばれるペプチドを特異的に認識する分子を介した結合により固定化し、必要に応じて非特異吸着を抑制するブロッキングなどの処理を施した後、他方の分子を添加し、更に未吸着な他方の分子を洗浄除去後、他方の分子であるLK6-A結合蛋白質またはLK6-A誘導体の活性、結合特性、表面プラズモン共鳴の発生、質量分析の信号強度等により結合した他方の分子を検出することにより、LK6-A結合蛋白質とLK6-A誘導体との結合量を検出することができる。

【0137】また、の方法においては、LK6-A結合蛋白質を他の蛋白質との融合タンパク質として生産し、融合させた蛋白質に親和性をもつ物質を用いてタグペプチド、マーカーペプチド、またはシグナルペプチドより選ばれるペプチドを特異的に検出することにより、LK6-A誘導体とLK6-A結合蛋白質の結合を測定することもできる。-ガラクトシダーゼ、クロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼ、グルタチオンS-トランスフェラーゼ、チオレドキシシン等は、その酵素活性を指標に、グリーン・フルオロセセント・プロテイン(GFP)等は、その蛍光を指標に、プロテインA、プロテインAのIgG結合領域、ポリ(Arg)、ポリ(Glu)、プロテインG、マルトース結合ポリペプチド、ポリヒスチジン鎖(His-tag)、DNA結合ポリペプチドドメイン等は、その特異的結合分子との結合を指標に、mycポリペプチド、Sペプチド、Tac抗原、FLA

Gペプチド、任意の抗体のエピトープ等は、その特異的抗体との結合を指標に、検出できる。

【0138】 -ガラクトシダーゼ、クロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼ、グルタチオンS-トランスフェラーゼ、チオレドキシン、グリーン・フルオロッセント・プロテイン(GFP)、プロテインA、プロテインAのIgG結合領域、ポリ(Arg)、ポリ(Glu)、プロテインG、マルトース結合ポリペプチド、ポリヒスチジン鎖(His-tag)、DNA結合ポリペプチドドメイン等もそれらの特異的抗体との結合を指標に検出することもできる。また、LK6-A結合蛋白質とLK6-A誘導体のいずれか一方あるいは双方をピオチン等の結合に特異性を有する分子や蛍光試薬、RI標識試薬等により修飾後、上記の反応系に用いることによって、ピオチン等の結合特異性を生かして固相に結合させたり、ピオチン等の結合特異性や蛍光、放射性等を指標に相互作用を検出することもできる。

【0139】さらに、 の場合とも、蛋白質およびポリペプチドを適切な蛍光色素でラベル化し、蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)により、LK6-A結合蛋白質とLK6-A誘導体の結合、またはp150aとCD2あるいはそのCD2BP2結合領域ポリペプチドとが結合しているときのみ発する蛍光を利用して、溶液系でLK6-A結合蛋白質とLK6-A誘導体またはp150aとCD2あるいはそのCD2BP2結合領域ポリペプチドの相互作用を検出することができる。

【0140】 のLK6-A結合蛋白質であるp150cまたはp27誘導体の酵素活性を阻害する化合物を探索する方法では、これらの酵素活性を測定できる既知の方法であれば、いかなる方法でもよい。例えば、p150cの基質となりうる6-0-a-D-グルコシルシクロマルトヘプタノース(glucosyl cyclomaltoheptanose)や6-0-a-マルトペンタオシルシクロマルトヘプタノース(maltopentaosyl cyclomaltoheptanose)等のグルコースの重合体を用いて、p150cによる基質の分解速度または生成物の生成速度を高速液体クロマトグラフィー等でモニターすることにより、p150cの酵素活性を測ることができる。また、チオレドキシンまたはジチオスレイトール等の電子供与体の存在下におけるp27による過酸化酸素を分解を、電子供与体の減少あるいは過酸化酸素の減少を測定することにより、p27の酵素活性を測ることができる。このような方法で測定される酵素活性を阻害する化合物の探索により免疫抑制活性を持つ化合物を見出すことができる。

【0141】ここで、具体的には、被検物質存在下、下記(i)~(iii)から選ばれるいずれか1つの蛋白質のグリコーゲンデブランチングエンザイム活性と、被検物質非存在下での該蛋白質の該活性を測定し、被検物質存在下と被検物質非存在下での該測定値を比較し、被検物質より該蛋白質の該活性を阻害する物質を選択することを特徴とする該蛋白質の活性を阻害する物質の探索

方法をあげることができる。

(i) 配列番号3で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質

(ii) 配列番号3で表されるアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸残基が欠失、置換、挿入もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつグリコーゲンデブランチングエンザイム活性を有する蛋白質

(iii) 配列番号3で表されるアミノ酸配列と60%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつグリコーゲンデブランチングエンザイム活性を有する蛋白質

ここで、1以上のアミノ酸残基が欠失、置換、挿入もしくは付加されたアミノ酸配列とは、上記定義と同様なアミノ酸配列を意味する。

【0142】また、具体的には、被検物質存在下、下記(i)~(iii)から選ばれるいずれか1つの蛋白質のペルオキシダーゼ活性と、被検物質非存在下での該蛋白質の該活性を測定し、被検物質存在下と被検物質非存在下での該測定値を比較し、被検物質より該蛋白質の該活性を阻害する物質を選択することを特徴とする該蛋白質の活性を阻害する物質の探索方法もあげることができる。

(i) 配列番号5で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質

(ii) 配列番号5で表されるアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸残基が欠失、置換、挿入もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつペルオキシダーゼ活性を有する蛋白質

(iii) 配列番号5で表されるアミノ酸配列と60%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつペルオキシダーゼ活性を有する蛋白質

ここで、1以上のアミノ酸残基が欠失、置換、挿入もしくは付加されたアミノ酸配列とは、上記定義と同様なアミノ酸配列を意味する。

【0143】(10) LK6-A結合蛋白質をコードするDNAの発現を変化させる物質の探索系の構築  
被検物質存在下、LK6-A結合蛋白質を発現する形質転換体の該蛋白質をコードするDNAの発現量と、被検物質非存在下、該形質転換体の該蛋白質をコードするDNAの発現量を測定し、被検物質存在下と被検物質非存在下での該測定値を比較し、被検物質より該蛋白質をコードするDNAの発現量を変化させる物質を選択することによって、LK6-A結合蛋白質の発現量を変化させる物質を取得することができる。形質転換体の宿主としては、上記したLK6-A結合蛋白質をコードするDNAを発現することができるのであれば、いずれでもよいが、好ましくは真核生物の細胞、より好ましくは動物細胞、さらに好ましくはヒト培養細胞をあげることができる。

【0144】具体的な方法としては、被検物質と接触および非接触のLK6-A結合蛋白質を発現する形質転換細胞の各々から常法に従い全RNAまたはポリ(A)<sup>+</sup>RN

Aを調製し、LK6-A結合蛋白質をコードするDNAから調製されるプライマードNAを用いた、RT-PCR [PCR Protocols, Academic Press (1990)] により、LK6-A結合蛋白質をコードするDNAの発現量を測定し、各々の発現量を比較することにより、LK6-A結合蛋白質に結合する物質を取得する方法をあげることができる。

【0145】(11) LK6-A結合蛋白質の発現を変化させる物質の探索系の構築

被検物質存在下、LK6-A結合蛋白質を発現する形質転換体の該蛋白質の発現量と、被検物質非存在下、該形質転換体の該蛋白質の発現量を測定し、被検物質存在下と被検物質非存在下での該測定値を比較し、被検物質より該蛋白質の発現量を変化させる物質を選択することにより、LK6-A結合蛋白質の発現量を変化させる物質を取得することができる。LK6-A結合蛋白質の発現量を測定する方法としては、免疫学的定量法をあげることができる。免疫学的定量法としては、例えば液相中でLK6-A結合蛋白質と反応する抗体のうちエピトープが異なる2種類のモノクローナル抗体を用いたサンドイッチELISA法、<sup>125</sup>I等の放射性同位体で標識したLK6-A結合蛋白質と該蛋白質を認識する抗体を用いるラジオイムノアッセイ法等があげられる。

【0146】(12) LK6-A結合蛋白質の機能および発現量を調節する化合物の探索系の構築

被検物質存在下、LK6-A結合蛋白質を発現する形質転換体の細胞応答と、被検物質非存在下、該形質転換体の細胞応答を測定し、被検物質存在下と被検物質非存在下での該測定値を比較し、被検物質より該形質転換株の細胞応答を変化させる化合物を選択することにより、LK6-A結合蛋白質の機能または発現量を変化させる物質を取得することができる。該形質転換株の細胞応答を検出する方法としては、例えば、細胞内情報伝達、遺伝子の転写、糖の取り込み、増殖などの変化を検出する公知の方法が挙げられる。細胞の応答としては、例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca<sup>2+</sup>遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fos活性化、pHの低下、メラニン色素の凝集または拡散などをあげることができる。

【0147】(13) LK6-A誘導体とCD2BP2の結合を阻害する物質の探索系の構築

CD2BP2は、そのGYFドメインを介してCD2と結合することが知られている。LK6-A結合蛋白質であるp150aもまたGYFドメインを有する蛋白質であることから、LK6-AはCD2BP2と結合し、その作用を発揮している可能性が考えられる。よって、LK6-AとCD2BP2の結合を阻害する物質は、さらに各々のLK6-A結合蛋白質への作用を比較、検討することにより、自己免疫疾患治療剤または免疫抑制剤として有用な物質であるかを判断することができる。被検物質存在下、CD2BP2蛋白質またはその誘導体とLK6-A誘

導体を接触させたときのCD2BP2蛋白質またはその誘導体とLK6-A誘導体の結合量と、被検物質非存在下、CD2蛋白質またはその誘導体とLK6-A誘導体とを接触させたときのCD2BP2蛋白質またはその誘導体とLK6-A誘導体の結合量を測定し、被検物質存在下と被検物質非存在下での該測定値を比較し、被検物質よりCD2BP2蛋白質またはその誘導体とLK6-A誘導体の結合する物質を選択することができる。CD2BP2蛋白質の誘導体としては、下記(i)~(iii)から選ばれるいずれか1つの蛋白質を用いることができる。

【0148】(i) 配列番号43で表されるアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ配列番号1または2で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質と結合する活性を有する蛋白質

(ii) 配列番号43で表されるアミノ酸配列と60%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ配列番号1または2で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質と結合する蛋白質

(iii) 配列番号43で表されるアミノ酸配列のアミノ酸番号282~341番目のアミノ酸配列を有する蛋白質

ここで、1以上のアミノ酸残基が欠失、置換、挿入もしくは付加されたアミノ酸配列とは、上記定義と同様なアミノ酸配列を意味する。

【0149】(14) 混合リンパ球反応(MLR)活性評価

Ivan Lefkovits, Benvenuto Peris編集、右田俊介・田中渥監訳;免疫実験法:西村書店 p.289-294 (1985)等に記載されている方法によりMLRを行い、化合物の免疫抑制効果を測定することができる。マウスの細胞を用いたMLRの場合には、H-2ハプロタイプまたはMls抗原(minor lymphocyte stimulating antigen)が異なる2種類のマウスから胸腺、リンパ節、または脾臓の細胞を取り出して混合する。2日から6日後に細胞増殖の程度をトリチウムでラベルしたチミジンの取り込み等の方法で検出することができる。

【0150】(15) 本発明の方法で選択される物質を含有する医薬

本発明の方法で選択される物質を有効成分として含有する医薬は、該有効成分を単独で投与することも可能ではあるが、通常は該有効成分を薬理的に許容される一つあるいはそれ以上の担体と一緒に混合し、製剤学の技術分野においてよく知られる任意の方法により製造した医薬製剤として提供するのが望ましい。好ましくは水、あるいは食塩、グリシン、グルコース、ヒトアルブミン等の水溶液等の水性担体に溶解した無菌的な溶液が用いられる。また、製剤溶液を生理的条件下に近づけるための緩衝化剤や等張化剤のような、薬理的に許容される添加剤、例えば、酢酸ナトリウム、塩化ナトリウム、乳酸ナ

51

トリウム、塩化カリウム、クエン酸ナトリウム等を添加することもできる。また、凍結乾燥して貯蔵し、使用時に適当な溶媒に溶解させて用いることもできる。

【0151】投与経路は、治療に際し最も効果的なものを使用するのが望ましく、経口投与、あるいは口腔内、気道内、直腸内、皮下、筋肉内および静脈内等の非経口投与をあげることができる。投与形態としては、噴霧剤、カプセル剤、錠剤、顆粒剤、シロップ剤、乳剤、座剤、注射剤、軟膏、テープ剤等があげられる。経口投与に適当な製剤としては、乳剤、シロップ剤、カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤等があげられる。例えば乳剤およびシロップ剤のような液体調製物は、水、ショ糖、ソルビトール、果糖等の糖類、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール等のグリコール類、ごま油、オリーブ油、大豆油などの油類、p-ヒドロキシ安息香酸エステル類等の防腐剤、ストロベリーフレーバー、ペパーミント等のフレーバー類等を添加剤として用いて製造できる。カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤等は、乳糖、ブドウ糖、ショ糖、マンニトール等の賦形剤、デンプン、アルギン酸ナトリウム等の崩壊剤、ステアリン酸マグネシウム、タルク等の滑沢剤、ポリビニルアルコール、ヒドロキシプロピルセルロース、ゼラチン等の結合剤、脂肪酸エステル等の界面活性剤、グリセリン等の可塑剤等を添加剤として用いて製造できる。

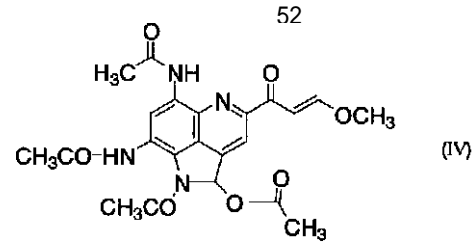
【0152】非経口投与に適当な製剤としては、注射剤、座剤、噴霧剤等があげられる。例えば、注射剤は、塩溶液、ブドウ糖溶液、あるいは両者の混合物からなる担体等を用いて調製する。座剤はカカオ脂、水素化脂肪またはカルボン酸等の担体を用いて調製される。また、噴霧剤は該物質そのもの、ないしは受容者の口腔および気道粘膜を刺激せず、かつ該物質を微細な粒子として分散させ吸収を容易にさせる担体等を用いて調製する。担体として具体的には乳糖、グリセリン等が例示される。該物質および用いる担体の性質により、エアロゾル、ドライパウダー等の製剤が可能である。また、これらの非経口剤においても経口剤で添加剤として例示した成分を添加することもできる。投与量または投回数、目的とする治療効果、投与方法、治療期間、年齢、体重等により異なるが、通常成人1日当たり10 $\mu$ g/kg~80mg/kgである。以下、本発明を実施例、試験例に基づき説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

【0153】

【実施例】実施例1 LK6-A固定化SGNEGDE粒子及びLK6D7固定化SGNEGDE粒子の作製  
LK6-Aの対照化合物として、下記式(IV)で表されるLK6D7を選択して以下の実験に用いた。

【0154】

【化18】



【0155】SGNEGDE粒子は、Colloids and Surfaces B, 10, 41 (1997)に記載の方法にしたがって作製した。SGNEGDE上のエポキシ基の量はアンモニアでエポキシ基を開環した後、伝導度滴定でアミンの量を測定することにより求めた(J. Appl. Poly. Sci., 26, 2015 (1981))。エポキシ基の量が約400 nmol/mg粒子のSGNEGDE粒子を以下の実験で使用した。10 mgのSGNEGDE粒子をピペラジンの溶液に分散させた。この時の溶媒は水、体積は1 ml、ピペラジンの濃度は0.3 mol/lである。ローターで穏やかに攪拌しながら、37 $^{\circ}$ Cで16時間反応させた。反応終了後、粒子を遠心分離(15000 rpm、5分間、室温)して上清を取り除いた。未反応のピペラジンを除くために、400 $\mu$ lの水を加えて粒子を分散させた後、粒子を遠心分離(15000 rpm、5分間、室温)して上清を取り除く洗浄操作を3回繰り返した。以下、このようにして得られた粒子をピペラジン粒子と呼ぶ。

【0156】10 mgのピペラジン粒子のペレットに400 $\mu$ lのDMSOを加えて粒子を分散させた後、粒子を遠心分離(15000 rpm、10分間、25 $^{\circ}$ C)して上清を取り除いた。この操作を3回繰り返した。溶媒をDMSOに交換した10 mgのピペラジン粒子のペレットに、LK6-AまたはLK6D7の溶液を加えてピペラジン粒子を分散させた。この時の溶媒はDMSO、体積は500 $\mu$ l、LK6-AまたはLK6D7の濃度は2 mmol/lである。スターラーバーを加えて、遮光条件下で37 $^{\circ}$ Cで24時間攪拌した。反応終了後、粒子を遠心分離(15000 rpm、10分間、25 $^{\circ}$ C)して上清を取り除いた。未反応のLK6-Aを除くために、400 $\mu$ lのDMSOを加えて粒子を分散させた後、粒子を遠心分離(15000 rpm、10分間、25 $^{\circ}$ C)して上清を取り除く操作を3回繰り返した。このようにして得られたLK6-A固定化粒子またはLK6D7固定化粒子を、20mg粒子/mlとなるようにDMSOに分散させた後、遮光条件下、室温で保存した。

【0157】実施例2 細胞抽出液の調製

マウスT細胞株CTLL-2(ATCC TIB-214)の培養は、RPMI 1640培地(500 ml)に、FBS(50 ml)と7.5% NaHCO<sub>3</sub>(12.5 ml)と200 mmol/l L-グルタミン(15 ml)と50 mmol/l  $\beta$ -メルカプトエタノール(0.5 ml)とPenicillin-Streptomycin(それぞれ10000 units/mlと10 mg/ml; 1.25 ml)と10~100 unit/mlのマウスIL-2を加えた培地中で行った。ヒトT細胞株Jurkat(ATCC番号 TIB-152)の培養は、RPMI 1640培地(500 ml)に、FBS(50 ml)と7.5% NaHCO<sub>3</sub>(12.5 ml)と200 mmol/l L-グルタミン(15 ml)とPenicillin-Streptomycin(それぞれ10000 units/mlと10 mg/ml; 1.25 ml)を加えた培地中で行

った。CTLL-2およびJurkatの培養は培地量300 ml以下のスケールの場合、フラスコを用いて5 % CO<sub>2</sub>を含む37 °Cのインキュベーター中で静置培養により行った。培地量500 mlを超える場合には、スピナーフラスコを用いて攪拌子回転速度80 rpmで培地を攪拌しながら37 °Cで培養を行った。

【0158】CTLL-2またはJurkatを細胞濃度が $2 \times 10^7$  cells/mlとなるように緩衝液A (20 mmol/l HEPES (pH 7.4)、2 mmol/l EDTA、150 mmol/l NaCl、1 % NP-40、5 mmol/l DTT、1 mmol/l フェニルメタンスルホニルフルオリド (PMSF)、1 µg/ml アプロチニン) に懸濁し、4 °Cで30分間、ローテーターで穏やかに攪拌した。その後、遠心分離 (15000 rpm、15分間、4 °C) により不溶性画分を沈殿させて上清を細胞抽出液とした。この方法でタンパク質濃度約2 mg/mlの細胞抽出液が得られた。細胞抽出液は、液体窒素で急冷した後、-80 °Cで保存した。

【0159】実施例3 LK6-A固定化SGNEGDE粒子およびLK6D7固定化SGNEGDE粒子によるLK6-Aに特異的に結合する蛋白質の単離、精製

凍結保存したCTLL-2またはJurkatの細胞抽出液を溶解し、遠心分離 (15000 rpm、4 °C、10分間) して上清を取った。得られた上清をもう一度遠心分離 (15000rpm、4 °C、10分間) して上清を取り、後の精製に用いた。DMSO 50 µlに分散しているLK6-A 固定化SGNEGDE粒子、LK6D7固定化SGNEGDE粒子1 mgに800 µlの緩衝液Aを加えて懸濁後、遠心分離 (15000 rpm、3分間、4 °C) を行った。上清を取り除き、200 µlの緩衝液Aを加えてLK6-A固定化SGNEGDE粒子、LK6D7固定化SGNEGDE粒子を完全に分散させた。精製の対照として用いた未固定のSGNEGDE粒子を以下のようにして調製した。水に分散しているSGNEGDE粒子1 mgに800 µlの緩衝液Aを加えて懸濁後、遠心分離 (15000 rpm、5分間、4 °C) を行った。上清を取り除き、200 µlの緩衝液Aを加えてSGNEGDE粒子を完全に分散させた。

【0160】LK6-A固定化SGNEGDE粒子またはLK6D7固定化SGNEGDE粒子または未固定SGNEGDE粒子への蛋白質の吸着は以下のようにして行った。200 µlの緩衝液Aに分散したLK6-A固定化SGNEGDE粒子またはLK6D7固定化SGNEGDE粒子または未固定SGNEGDE粒子に1mlの細胞抽出液を加えて、ローテーターで4 °Cで穏やかに攪拌した。2時間後に遠心分離 (15000 rpm、2分間、4 °C) して上清を取り除いた。LK6-A固定化SGNEGDE粒子、LK6D7固定化SGNEGDE粒子または未固定SGNEGDE粒子に400 µlの緩衝液Aを加えて、分散させた。遠心分離 (15000 rpm、2分間、4 °C) して上清を取り除き、400 µlの緩衝液B (緩衝液A 14 mlに695 mgのNaClを加えたもの。NaClの濃度が約1mol/lとなる) を加えてLK6-A固定化SGNEGDE粒子、LK6D7固定化SGNEGDE粒子または未固定SGNEGDE粒子を分散させた。遠心分離 (15000 rpm、2分間、4 °C) して上清を取り除き、再び400 µlの緩衝液Bを加えてLK6-A固定化SGNEGDE

粒子、LK6D7固定化SGNEGDE粒子または未固定SGNEGDE粒子を分散させた。遠心分離 (15000 rpm、2分間、4 °C) して上清を取り除いた。

【0161】LK6-A固定化SGNEGDE粒子、LK6D7固定化SGNEGDE粒子または未固定SGNEGDE粒子に吸着した蛋白質の溶出を以下のようにして行った。30 µlの緩衝液Aを加えてLK6-A固定化SGNEGDE粒子、LK6D7固定化SGNEGDE粒子または未固定SGNEGDE粒子を完全に分散させた。次に、10 µlの×4 sample buffer [0.5 mol/l Tris-HCl (pH6.8)、0.08 g/ml SDS、40 % (vol/vol) グリセロール、0.04 mg/ml ブロムフェノールブルー、4% (vol/vol) 2-メルカプトエタノール] を加えて混合した。次に、98 °Cで4分間加熱して遠心分離 (15000 rpm、10分間、室温) を行い上清 (溶出液) を取得した。溶出液のSDS-PAGEはレディーゲルJ (日本バイオ・ラッド ラボラトリーズ株式会社製) を用いて行った。ゲルの1レーンに溶出液10 µlをロードした。アクリルアミド濃度が7.5%のゲル (カタログ番号161-J311) および15%のゲル (カタログ番号161-J341) に同じサンプルをロードした。蛋白質の検出は銀染色により行った。

【0162】図1に示したように、p150c、p27およびp85はLK6-A固定化SGNEGDE粒子で精製されるがLK6D7固定化SGNEGDE粒子や未固定SGNEGDE粒子では精製されない。また、p150aもLK6-A固定化SGNEGDE粒子で精製される。p150aの場合、同じ位置のバンドがLK6D7固定化SGNEGDE粒子からも精製されるがそれらのバンドの強度は低い。また、p150aは未固定のSGNEGDE粒子では精製されない。これらの結果から、p150a、p150c、p27およびp85はLK6-A特異的結合蛋白質であると考えられた。

【0163】実施例4 p150aの同定  
CTLL-2の細胞抽出液約100 mlから100 mgのLK6-A固定化SGNEGDE粒子を用いてp150aを精製した。精製の方法は以下に述べる点を除いて実施例3と同様にして行った。実施例3に記載の蛋白質の溶出時に、LK6-A固定化SGNEGDE粒子を緩衝液A中ではなく、緩衝液C (20 mmol/l HEPES (pH 7.4)、2 mmol/l EDTA、150 mmol/l NaCl) 中で分散させた。溶出液をセントリコン-100 (Amicon, Beverly, MA 01915, USA Cat.No. 4211) を用いて濃縮した。得られた蛋白質を7.5%のSDS-PAGEで分離し、分子量約150kDaのバンドを切り出し、ゲル中でLysyl Endopeptidase from *Achromobacter lyticus* M497-1 (EC3.4.21.50) (WAKO社製) により消化した。得られたペプチドはµRPC C2/C18逆相HPLCカラム (LC PACKINGS社製、カタログNo.MIC-15-03-MRP) を用いて0.065%トリフルオロ酢酸を含む水/アセトニトリル直線勾配によって分離した。そこで得たペプチドはさらにアプライドバイオシステムズ社Precise 492cLCプロテインシーケンサーを用いて自動エドマン分解法によりアミノ酸配列を決定した。

【0164】得られたp150aの部分アミノ酸配列 (配列番号15~19) を用いてデータベースの検索を行っ

た。p150aはマウス細胞株CTLL-2から精製したが、マウスのアミノ酸配列のデータベースにはp150aに該当するものはなかった。しかし、p150aは、かずさDNA研究所のデータベース (<http://www.kazusa.or.jp/huge/>) に記載の部分長ヒトcDNAであるKIAA0642 (GenBank accession No. AB014542) およびGenBank accession No. AK001739で表されるヒトcDNAのコードする蛋白質と相同性を有していた。p150aは、KIAA0642にコードされる蛋白質のマウスのカウンターパートであると考えられた。GenBank accession No. AK001739で表されるcDNAにコードされる蛋白質のアミノ酸配列を配列番号1に、cDNAの塩基配列を配列番号8に記載した。

#### 【0165】実施例5 p150cの同定

CTLL-2の細胞抽出液約200 mlから200 mgのLK6-A固定化SGNEGDE粒子を用いてp150cを精製した。精製の方法は以下に述べる点を除いて実施例3と同様にして行った。実施例3に記載の蛋白質の溶出時に、LK6-A固定化SGNEGDE粒子を緩衝液A中ではなく、緩衝液C (20 mmol/l HEPES (pH 7.4)、2 mmol/l EDTA、150 mmol/l NaCl) 中で分散させた。溶出液の2倍の体積のアセトンを溶出液に加え、混合して-30℃に30分間おいた後、遠心分離 (15000 rpm、10分間、4℃) により蛋白質をペレットとして回収した。このペレットに約30 µlの×1 sample buffer (10 µlの×4 sample bufferと300 µlの水を混合したものを加えて溶解した。

【0166】得られた蛋白質を7.5%のSDS-PAGEで分離し、分子量約150kDaのバンドを切り出し、ゲル中でLysyl Endopeptidase from *Achromobacter lyticus* M497-1 (EC3.4.21.50) (WAKO社製) により消化した。得られたペプチドはµRPC C2/C18逆相HPLCカラム (LC PACKINGS社製、カタログNo.MIC-15-03-MRP) を用いて0.065%トリフルオロ酢酸を含む水/アセトニトリル直線勾配によって分離した。そこで得たペプチドはさらにアプライドバイオシステムズ社Procise 492cLCプロテインシーケンサーを用いて自動エドマン分解法によりアミノ酸配列を決定した。得られたp150cの部分アミノ酸配列 (配列番号20~24) を用いてデータベースの検索を行った。p150cはマウス細胞株CTLL-2から精製したがマウスのアミノ酸配列のデータベースにはp150cに該当するものはなかった。しかし、p150cはヒトのグリコーゲンデブランチングエンザイム [glycogen debranching enzyme (GDE)、GenBank accession No. P35573] と相同性を有していた。p150cは、glycogen debranching enzymeのマウスのカウンターパートであると考えられた。P35573で表されるアミノ酸配列を配列番号3に、該アミノ酸配列からなる蛋白質をコードするDNAを配列番号10に記載した。

#### 【0167】実施例6 p27の同定

CTLL-2の細胞抽出液約200 mlから200 mgのLK6-A固定化SGNEGDE粒子を用いてp27を精製した。精製の方法は以下

に述べる点を除いて実施例3と同様にして行った。実施例3に記載の蛋白質の溶出時に、LK6-A固定化SGNEGDE粒子を緩衝液A中ではなく、緩衝液C (20 mmol/l HEPES (pH 7.4)、2 mmol/l EDTA、150 mmol/l NaCl) 中で分散させた。溶出液の2倍の体積のアセトンを溶出液に加えて混合して-30℃に30分間おいた後、遠心分離 (15000 rpm、10分間、4℃) により蛋白質をペレットとして回収した。このペレットに約30 µlの×1 sampleを加えて溶解した。

【0168】得られた蛋白質を15%のSDS-PAGEで分離し、分子量約25kDaのバンドを切り出し、ゲル中でLysyl Endopeptidase from *Achromobacter lyticus* M497-1 (EC3.4.21.50) (WAKO社製) により消化した。得られたペプチドはµRPC C2/C18逆相HPLCカラム (LC PACKINGS社製、カタログNo.MIC-15-03-MRP) を用いて0.065%トリフルオロ酢酸を含む水/アセトニトリル直線勾配によって分離した。そこで得たペプチドはさらにアプライドバイオシステムズ社Procise 492cLCプロテインシーケンサーを用いて自動エドマン分解法によりアミノ酸配列を決定した。得られたp27の部分アミノ酸配列 (配列番号25~27) を用いてデータベースの検索を行った。p27の部分1次配列はMSP23 (macrophage 23-kDa stress protein) というマウスの蛋白質 (GenBank accession No. D16142) と一致した。MSP23のアミノ酸配列を配列番号5に、MSP23をコードするDNAの塩基配列を配列番号12に記載した。

#### 【0169】実施例7 p85の同定

Jurkatの細胞抽出液約32 mlから46 mgのLK6-A固定化SGNEGDE粒子を用いてp85を精製した。精製の方法は以下に述べる点を除いて実施例3と同様にして行った。2.2 mgのLK6-A固定化SGNEGDE粒子あたり1.5 mlの細胞抽出液を加えた。実施例3(6)に記載の蛋白質の溶出時に、LK6-A固定化SGNEGDE粒子を緩衝液A中ではなく、緩衝液C [20 mmol/l HEPES (pH 7.4)、2 mmol/l EDTA、150 mmol/l NaCl] 中で分散させた。溶出液の2倍の体積のアセトンを溶出液に加えて混合して-30℃に30分間おいた後、遠心分離 (15000 rpm、10分間、4℃) により蛋白質をペレットとして回収した。このペレットに約30 µlの×1 sampleを加えて溶解し、アミノ酸内部配列解析に供した。

【0170】得られた蛋白質を7.5%のSDS-PAGEで分離し、分子量約80kDaのバンドを切り出し、ゲル中でLysyl Endopeptidase from *Achromobacter lyticus* M497-1 (EC3.4.21.50) (WAKO社製) により消化した。得られたペプチドはµRPC C2/C18逆相HPLCカラム (LC PACKINGS社製、カタログNo.MIC-15-03-MRP) を用いて0.065%トリフルオロ酢酸を含む水/アセトニトリル直線勾配によって分離した。そこで得たペプチドはさらにアプライドバイオシステムズ社Procise 492cLCプロテインシーケンサーを用いて自動エドマン分解法によりアミノ酸配列を決定した。得られたp85の部分アミノ酸配列 (配列番号28

~ 31) を用いてデータベースの検索を行った。p85の部分1次配列はGenBank accession No. AK025598で表されるcDNAと一致した。GenBank accession No. AK025598で表される塩基配列を配列番号4に、該塩基配列を有するDNAにコードされる蛋白質のアミノ酸配列を配列番号11に記載した。

【0171】実施例8 p150aの遺伝子のクローニングと組換え蛋白質の発現

p150aの遺伝子は、インサイト・ジェノミクス社の販売するESTクローン2つ (IMAGE clone ID number : 27840 10 6 および2188561、以下それぞれEST1およびEST2と記す) とJurkat細胞から抽出したmRNAをテンプレートとしてRT-PCRにより得られたp150aの部分断片のクローニングを用いて作製した。まず、制限酵素XhoI切断部位を持つプライマー (配列番号32) と制限酵素EcoRI切断部位を持つプライマー (配列番号33) を用いてEST1をテンプレートとしてPCRを行い、PCR産物をpBluescriptII SK (-) (Stratagene社製) のXhoIとEcoRIのサイトに組み込んだ。次にこのベクターを制限酵素BstEIIとNotIで切断して、EST2を制限酵素BstEIIとNotIで切断することにより得られるp150aの断片を組み込んだ (このようにして得られたベクターをベクター1と記す)。一方、Jurkat細胞から抽出したmRNAをテンプレートとしてXhoI切断部位を持つプライマー (配列番号34) およびXbaI切断部位を持つプライマー (配列番号35) を用いてPCRを行い、PCR産物をpBluescriptII SK(-) のXhoIとXbaIのサイトに組み込んだ。このベクターを制限酵素Van91IとNotIで切断することにより得られるp150aの断片を、ベクター1を制限酵素Van91IとNotIで切断したものに組み込んだ。このようにしてpBluescriptII SK(-) にp150aを組み込んだベクターが得られた (このようにして得られたベクターをベクター2と記す)。ベクター2中のp150a遺伝子の配列が、かずさDNA研究所のデータベースに記載の部分長ヒトcDNAであるK1AA0642 (GenBank accession No. AB014542) およびGenBank accession No. AK001739で表されるヒトcDNAと一致することを、DNAシーケンサー (アプライドバイオシステムズ社ABI PRISM310 Genetic Analyzer) で確認した。これら一連の操作は、モレキュラー・クローニング第3版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー, Supplement 1~38等に記載の方法に準じて実施することができる。

【0172】ベクター2をXhoIとNotIで切断することにより得られたp150aを、アマシャム・ファルマシア・バイオテック社製のpGEX-5x-3 (Cat.No. 27-4586-01) のSalIとNotIのサイトに組み込んだ。このベクターを用いてp150aのGST融合タンパク質 (以下、GST-p150aという) を、ヒトチオレドキシンを共発現する大腸菌BL21 [実験医学、13、2051 (1995)] を宿主として用いて、発現した。培養は25で行い、OD=0.6の時に0.1 mmol/lのIPTG 50

を加えた後12時間の培養を行った。菌体を4000×g、4、10分間の遠心分離で回収し、-80で保存した。保存した菌体を溶解後、2.4 mlの破碎緩衝液 (50 mmol/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、300 mmol/l NaCl、10 mmol/l イミダゾール、1% NP-40、1 mmol/l PMSF、1 μg/ml アプロチニン、pH 8.0) を加えて、超音波破碎を行った。超音波破碎は、先端径3 mmのテーパー型マイクロチップ (TAITEC社製、分類番号MCN-0418) を用いて氷冷しながら断続的に3分間行った。その後、遠心分離 (48000×g、20分間、4) を行い上清を取り、GSTapFF (アマシャム・ファルマシア・バイオテック Code. No. 17-5130-01) にロードした。1 mmol/l DTTを含むPBS (8.00 g/l NaCl、0.20 g/l KCl、1.15 g/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、0.20 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) でカラムを洗浄した後、溶出用緩衝液 (10 mmol/l 還元グルタチオン、1 mmol/l DTT、50 mmol/l Tris-HCl、pH 7.7) を用いてGST-p85を溶出した。溶出したGST-p85を緩衝液C (50 mmol/l HEPES-NaOH、150 mmol/l NaCl、1 mmol/l EDTA、1 mmol/l DTT) に対して透析した。このようにして得られたGST-p150aの溶液の3分の1の体積の×4 sample buffer [0.5 M Tris-HCl (pH 6.8)、0.08 g/ml SDS、40% (vol/vol) グリセロール、0.04 mg/ml ブロムフェノールブルー、4% (vol/vol) 2-メルカプトエタノール] をGST-p150aの溶液に加えて98で3分間加熱することにより、SDS-PAGEのためのサンプルを調製した。20 μlをロードした。結果を図2に示した。

【0173】実施例9 p150cの遺伝子のクローニングと組換え蛋白質の発現

配列番号36で表される塩基配列中の61~4704番目からなるDNAをNovagen社製のpET14b (Cat.No. 69660-3) のNdeIとXhoIサイトの間に連結し、配列番号36で表される塩基配列からなるDNAにコードされるアミノ酸配列を有するN末Hisタグ融合p150c (以下、His-p150cという) を発現するベクターを構築した。培養は5 mlの培地を用いて25で行い、OD=0.5の時に0.02 mmol/lのIPTGを加えた後さらに13時間の培養を行った。菌体を2380×g、4、30分間の遠心分離で回収し、-80で保存した。保存した菌体を溶解後、1 mlの破碎緩衝液 (50 mmol/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、300 mmol/l NaCl、10 mmol/l imidazole、1% NP-40、1 mmol/l PMSF、1 μg/ml aprotinin、pH 8.0) を加えて、超音波破碎を行った。超音波破碎は、先端径3 mmのテーパー型マイクロチップ (TAITEC社製、分類番号MCN-0418) を用いて氷冷しながら断続的に2分間行った。その後、遠心分離 (20000×g、20分間、4) を行い上清を取得した。その上清に60 μlのNi-NTA agarose (QIAGEN社、Cat. No. 30210) を加えて4で17時間穏やかに混合した。遠心分離 (4000×g、1分間、4) して上清 (透過液) を取り除いた。沈殿したNi-NTA agaroseに1.2 mlの洗い緩衝液 (50 mmol/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、300 mmol/l NaCl、20 mmol/l イミダゾール、1 mmol/l PMSF、1 μg/ml アプロチニン、pH 8.0) を加えてNi-

NTA agaroseの洗浄を行った。同様に、1.2 mlの洗い緩衝液による洗浄をさらに2回行った後、60  $\mu$ lの溶出液 (50 mmol/l  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 、300 mmol/l NaCl、250 mmol/l イミダゾール、1 mmol/l PMSF、1  $\mu$ g/ml アプロチニン、pH 8.0) でHis-p150cを溶出した。このようにして得られたHis-p150cの溶液の3分の1の体積の $\times 4$  sample buffer [0.5 M Tris-HCl (pH 6.8)、0.08 g/ml SDS、40% (vol/vol)グリセロール、0.04 mg/ml プロムフェノールブルー、4% (vol/vol) 2-メルカプトエタノール]をHis-p150cの溶液に加えて98  $^{\circ}$ Cで3分間加熱することにより、SDS-PAGEのためのサンプルを調製した。20  $\mu$ lをロードした。結果を図2に示した。

#### 【0174】実施例10 p85の遺伝子のクローニングと組換え蛋白質の発現

Genbank accession No. AK025598に記載の配列番号4で表される塩基配列を有するp85の遺伝子は、戦略的ヒトcDNAゲノム応用技術開発において、東大医科学研究所で取得され保有されているクローン (HEPクローンNo. HEP04702) であり、東京大学医科学研究所 ゲノム構造解析分野 菅野純夫助教授より供与されたものを用いた。制限酵素XhoI切断部位を持つプライマー (配列番号37) とNcoI切断部位を持つプライマー (配列番号38) を用いてHEP04702をテンプレートとして用いてPCRを行い、PCR産物をNcoIとXhoIで切断した (このようにして得られた断片を断片1とする)。HEP04702をNcoIとPstIで切断した (このようにして得られたp85の断片を断片1とする)。pBluescriptII SK(-) をXhoIとPstIで切断して、断片1と断片2を組み込むことにより、pBluescriptII SK(-) にp85全長が組み込まれたベクターを得た (このベクターをベクター3と記す)。PCRにより増幅した部分の配列が配列番号11で表される塩基配列の対応する部分の配列と一致することを、DNAシーケンサー (アプライドバイオシステムズ社ABI PRISM 310 Genetic Analyzer) で確認した。

【0175】ベクター3をXhoIとNotIで切断して切り出したp150aをアマシャム・ファルマシア・バイオテク社製のpGEX-5x-3 (Cat.No. 27-4586-01) のSalIとNotIのサイトに組み込んだ。このベクターを用いてp150aのGST融合タンパク質 (以下、GST-p85という) を、ヒトチオレドキシンを共発現する大腸菌BL21 [実験医学、13、20 51 (1995)] を宿主として用いて、発現した。培養は25  $^{\circ}$ Cで行い、OD=0.6の時に0.1 mmol/lのIPTGを加えた後、12時間の培養を行った。菌体を4000  $\times$ g、4、10分間の遠心分離で回収し、-80  $^{\circ}$ Cで保存した。保存した菌体を溶解後、2.4 mlの破碎緩衝液 (50 mmol/l  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 、300 mmol/l NaCl、10 mmol/l イミダゾール、1% NP-40、1 mmol/l PMSF、1  $\mu$ g/ml アプロチニン、pH 8.0) を加えて、超音波破碎を行った。超音波破碎は、先端径3 mmのテーパー型マイクロチップ (TAITEC社製、分類番号MCN-0418) を用いて氷冷しながら断続的に3分間行った。そ

の後、遠心分離 (48000  $\times$ g、20分間、4) を行い上清を取り、GSTapFF (アマシャム・ファルマシア・バイオテク Code. No. 17-5130-01) にロードした。1 mmol/l DTTを含むPBS (8.00 g/l NaCl、0.20 g/l KCl、1.15 g/l  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 、0.20 g/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) でカラムを洗浄した後、溶出用緩衝液 (10 mmol/l 還元グルタチオン、1 mmol/l DTT、50 mmol/l Tris-HCl、pH 7.7) を用いてGST-p85を溶出した。溶出したGST-p85を緩衝液C (50 mmol/l HEPES-NaOH、150 mmol/l NaCl、1 mmol/l EDTA、1 mmol/l DTT) に対して透析した。このようにして得られたGST-p85の溶液の3分の1の体積の $\times 4$  sample buffer [0.5 M Tris-HCl (pH 6.8)、0.08 g/ml SDS、40% (vol/vol) グリセロール、0.04 mg/ml プロムフェノールブルー、4% (vol/vol) 2-メルカプトエタノール]をGST-p85の溶液に加えて98  $^{\circ}$ Cで3分間加熱することにより、SDS-PAGEのためのサンプルを調製した。20  $\mu$ lをロードした。結果を図2に示した。

#### 【0176】実施例11 p27の遺伝子のクローニングと組換え蛋白質の発現

制限酵素XhoI切断部位を持つプライマー (配列番号39) と制限酵素BamHI切断部位を持つプライマー (配列番号40) を用いて、マウスマクロファージ由来細胞株であるRAW(J774) 細胞から抽出したmRNAをテンプレートとして、RT-PCRを行った。PCR産物をpET14b (Novagen社 Cat.No. 69660-3) のXhoIとBamHIのサイトに組み込んだ (このようにして得られたベクターをベクター4と記す)。ベクター4中のMSP23遺伝子の配列が、配列番号12で表される塩基配列と一致することを、DNAシーケンサー (アプライドバイオシステムズ社ABI PRISM 310 Genetic Analyzer) で確認した。これら一連の操作は、モレキュラークローニング第3版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、Supplement 1~38等に記載の方法に準じて実施することができる。

【0177】ベクター4で形質転換した大腸菌BL21(DE3) を宿主として用いて、MSP23をN末Hisタグ融合タンパク質 (以下、His-MSP23という) として発現させた。培養は250 mlのLB培地を用いて30  $^{\circ}$ Cで行い、OD=0.5の時に1 mmol/lのIPTGを加えた後さらに2時間の培養を行った。菌体を4000  $\times$ g、4、10分間の遠心分離で回収し、-80  $^{\circ}$ Cで保存した。保存した菌体を溶解後、2.5 mlの破碎緩衝液 (50 mmol/l  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 、300 mmol/l NaCl、10 mmol/l イミダゾール、1% NP-40、1 mmol/l PMSF、1  $\mu$ g/ml アプロチニン、pH 8.0) を加えて、超音波破碎を行った。超音波破碎は、先端径3 mmのテーパー型マイクロチップ (TAITEC社製、分類番号MCN-0418) を用いて氷冷しながら断続的に2分間行った。その後、遠心分離 (48000  $\times$ g、20分間、4) を行い上清を取った。その上清に1.5 mlのNi-NTA agarose (QIAGEN社、Cat. No.30 210) を加えて4  $^{\circ}$ Cで1時間穏やかに混合し、空のカラム

にロードした。16 mlの洗い緩衝液 (50 mmol/l  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 、300 mmol/l NaCl、20 mmol/l イミダゾール、1 mmol/l PMSF、1  $\mu\text{g/ml}$  アプロチニン、pH 8.0) でカラムを洗浄後、1 mlの溶出液 (50 mmol/l  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 、300 mmol/l NaCl、250 mmol/l イミダゾール、1 mmol/l PMSF、1  $\mu\text{g/ml}$  アプロチニン、pH 8.0) でHis-MSP23を溶出した。HiTrap Desalting (アマシャム・ファルマシア・バイオテク社、Code No.17-1408-01) を用いて、溶出液の緩衝液を、50 mmol/l HEPES、150 mmol/l NaCl (pH 7.0) に交換した。このようにして得られたHis-MSP23の溶液の3分の1の体積の×4 sample buffer [0.5 M Tris-HCl (pH 6.8)、0.08 g/mL SDS、40% (vol/vol) グリセロール、0.04 mg/ml ブロムフェノールブルー、4% (vol/vol) 2-メルカプトエタノール] をHis-MSP23の溶液に加えて98 で3分間加熱することにより、SDS-PAGEのためのサンプルを調製した。5  $\mu\text{l}$  をロードした。結果を図2に示した。

【0178】実施例12 CD2のCD2BP2結合領域ポリペプチドの遺伝子のクローニングと組換え蛋白質の発現制限酵素XhoI切断部位を持つプライマー (配列番号41) と制限酵素BamHI切断部位を持つプライマー (配列番号42) を用いて、Jurkat細胞から抽出したmRNAをテンプレートとして、RT-PCRを行った。PCR産物をpET14b (Novagen社 Cat.No. 69660-3) のXhoIとBamHIのサイトに組み込んだ (このようにして得られたベクターをベクター5と記す)。ベクター5中の遺伝子の配列が、GenBank accession No. M16445の配列と一致することを、DNAシーケンサー (アプライドバイオシステムズ社ABI PRISM 310 Genetic Analyzer) で確認した。これら一連の操作は、モレキュラー・クローニング第3版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、Supplement 1~38等に記載の方法に準じて実施することができる。なお、ベクター5中のCD2のCD2BP2結合領域の塩基配列を配列番号14に示した。また、配列番号14で表される塩基配列を有するDNAがコードするアミノ酸配列を配列番号7に示した。

【0179】ベクター5で形質転換した大腸菌BL21(DE3) を宿主として用いて、CD2のCD2BP2結合領域ポリペプチドをN末Hisタグ融合タンパク質 (以下、His-CD2という) として発現した。培養は250 mlのLB培地を用いて30で行い、OD=0.5の時に1 mmol/lのIPTGを加えた後さらに3時間の培養を行った。菌体を4000×g、4、10分間の遠心分離で回収し、-80 で保存した。保存した菌体を溶解後、2.5 mlの破砕緩衝液 (50 mmol/l  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 、300 mmol/l NaCl、10 mmol/l イミダゾール、1 mM NP-40、1 mmol/l PMSF、1  $\mu\text{g/ml}$  アプロチニン、pH 8.0) を加えて、超音波破碎を行った。超音波破碎は、先端径3 mmのテーパ型マイクロチップ (TAITEC社製、分類番号MCN-0418) を用いて氷冷しながら断続的に2分間行った。その後、遠心分離 (48000×g、20分間、4 ) を行い上

清を取った。その上清に1.5 mlのNi-NTA agarose (QIAGEN社、Cat. No.30210) を加えて4 で1時間穏やかに混合し、空のカラムにロードした。16 mlの洗い緩衝液 (50 mmol/l  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 、300 mmol/l NaCl、20 mmol/l イミダゾール、1 mmol/l PMSF、1  $\mu\text{g/ml}$  アプロチニン、pH 8.0) でカラムを洗浄後、1 mlの溶出液 (50 mmol/l  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 、300 mmol/l NaCl、250 mmol/l イミダゾール、1 mmol/l PMSF、1  $\mu\text{g/ml}$  アプロチニン、pH 8.0) でHis-CD2を溶出した。通常の透析操作により、溶出液の緩衝液を、50 mmol/l HEPES-NaOH (pH 6.5) に交換した。このようにして得られたHis-CD2の溶液の3分の1の体積の×4 sample buffer [0.5 M Tris-HCl (pH 6.8)、0.08 g/mL SDS、40% (vol/vol) グリセロール、0.04 mg/ml ブロムフェノールブルー、4% (vol/vol) 2-メルカプトエタノール] をHis-CD2の溶液に加えて98 で3分間加熱することにより、SDS-PAGEのためのサンプルを調製した。10  $\mu\text{l}$  をロードした。結果を図2に示した。

【0180】実施例13 細胞抽出液とLK6-A固定化粒子を用いた自己免疫疾患治療剤または免疫抑制剤の探索実施例2で作製したJurkatまたはCTLL-2の細胞抽出液1 mlに100  $\mu\text{mol/l}$ の被検物質を加えて、4 で1時間穏やかに攪拌する。対照として被検物質を加えていないJurkatまたはCTLL-2の細胞抽出液1 mlを4 で1時間穏やかに攪拌する。このようにして被検物質で処理した細胞抽出液中と被検物質で処理していない細胞抽出液の蛋白質を、実施例3で示したのと同様の方法で、LK6-A固定化SGNEGDE粒子に吸着させる。その後、実施例3で示したのと同様の方法で、LK6-A固定化SGNEGDE粒子の洗浄、蛋白質の溶出、SDS-PAGEを行う。被検物質を加えた細胞抽出液からのLK6-A固定化SGNEGDE粒子による精製で、p150a、p150c、p85またはp27が見出せるかどうかを調べることにより、被検物質によるLK6-Aのp150a、p150c、p85またはp27への結合阻害を検出することができる。上記探索方法で選択される物質は、さらに各々のLK6-A結合蛋白質への作用を比較、検討することにより、自己免疫疾患治療剤または免疫抑制剤として有用な物質であるかを判断することができる。

【0181】実施例14 LK6-A結合蛋白質を用いた自己免疫疾患治療剤または免疫抑制剤の探索 (1) 実施例8、9、10または11で調製したLK6-A結合蛋白質であるHis-p27、His-p150c、GST-p85またはGST-p150a蛋白質10  $\mu\text{g}$  を含むPBS 100  $\mu\text{l}$  を96穴ELISAプレートの各穴に添加し、4、一晩静置して吸着させ、1%BSA/PBS 300  $\mu\text{l}$  を各穴に加え、4、1時間静置してブロッキング後、100  $\mu\text{mol/l}$ の被検物質の存在下または非存在下、5  $\mu\text{mol/l}$ のフロオレセインイソチオシアネート (FITC) ラベル化LK6-A溶液100  $\mu\text{l}$  と接触させ、上清除去後、0.05%Tween20を含むPBSで洗浄し、残存するFITCラベル化LK6-Aを蛍光プレートリーダーで測定することにより、LK6-A結合蛋白質へのLK6-Aの結合量、被検物質に

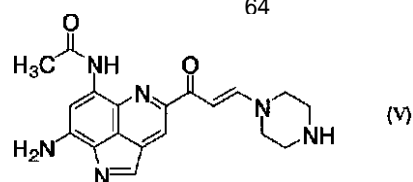
よるLK6-Aの結合阻害を検出できる。上記探索方法で選択される物質は、さらに各々のLK6-A結合蛋白質への作用を比較、検討することにより、自己免疫疾患治療剤または免疫抑制剤として有用な物質であるかを判断することができる。

【0182】実施例15 LK6-A結合蛋白質を用いた自己免疫疾患治療剤または免疫抑制剤の探索(2)  
実施例8、9、10または11で調製したLK6-A結合蛋白質であるHis-p27、His-p150c、GST-p85またはGST-p150a蛋白質100 $\mu$ gを発現している遺伝子組換え大腸菌破砕液上清をZn<sup>2+</sup>イオンキレートセファロース、またはグルタチオンセファロース10 $\mu$ lと混ぜ、該蛋白質を結合させ、PBSで洗浄し、親和性ビーズとする。該親和性ビーズを500 $\mu$ mol/lの被検物質の存在下または非存在下、1 $\mu$ mol/lのFITCラベル化LK6-Aを含む溶液1mlと混合し、上清除去、洗浄後、残存するFITCラベル化LK6-Aを1%SDS水溶液100 $\mu$ lで抽出し、抽出液の蛍光強度を分光光度系で測定する事により、LK6-A結合蛋白質へのLK6-Aの結合量、被検物質によるLK6-A結合阻害を検出できる。上記探索方法で選択される物質は、さらに各々のLK6-A結合蛋白質への作用を比較、検討することにより、自己免疫疾患治療剤または免疫抑制剤として有用な物質であるかを判断することができる。

【0183】実施例16 LK6-A結合蛋白質を用いた免疫抑制剤の探索(3)  
10 $\mu$ mol/lのLK6D2溶液[20mmol/l HEPES $\cdot$ NaOH、200mmol/l NaCl(pH 7.2)]をBIACORE装置(BIACORE社製)用のセンサーチップCA上に流して固定化後、実施例8、9、10または11で調製したLK6-A結合蛋白質であるHis-p27、His-p150c、GST-p85、またはGST-p150a蛋白質を200nmol/l含む20mmol/l HEPES $\cdot$ NaOH、200mmol/l NaCl(pH 7.2)溶液をセンサーチップ上に流し、センサーグラムを観察することによって、LK6-A結合蛋白質とセンサーチップに固定化されたLK6D2との結合を検出できる。センサーチップ上に流すLK6-A結合蛋白質を含む溶液に予め、500 $\mu$ mol/lの被検物質を混合し、センサーグラムを観察することによって、被検物質によるLK6-A結合蛋白質とセンサーチップに固定化されたLK6D2との結合の阻害を検出できる。上記探索方法で選択される物質は、さらに各々のLK6-A結合蛋白質への作用を比較、検討することにより、自己免疫疾患治療剤または免疫抑制剤として有用な物質であるかを判断することができる。上記で用いたLK6D2は、下記式(V)

【0184】

【化19】



【0185】で表される化合物であり、W000/02879に記載の方法を用いて調製することができる。

【0186】実施例17 LK6-A結合蛋白質を用いた自己免疫疾患治療剤または免疫抑制剤の探索(4)  
実施例12で作製した10 $\mu$ mol/lのCD2のCD2BP2結合領域ポリペプチドHis-CD2の溶液[20mmol/l HEPES $\cdot$ NaOH、200mmol/l NaCl(pH 7.2)]をBIACORE装置(BIACORE社製)用のセンサーチップCA上に流して固定化後、実施例9で調製したLK6-A結合蛋白質であるGST-p150a蛋白質を200nmol/l含む20mmol/l HEPES $\cdot$ NaOH、200mmol/l NaCl(pH 7.2)溶液をセンサーチップ上に流し、センサーグラムを観察することによって、GST-p150a蛋白質とセンサーチップに固定化されたCD2のCD2BP2結合領域ポリペプチドとの結合を検出できる。センサーチップ上に流すLK6-A結合蛋白質を含む溶液に予め、500 $\mu$ mol/lの被検物質を混合し、センサーグラムを観察することによって、被検物質によるLK6-A結合蛋白質とセンサーチップに固定化されたCD2のCD2BP2結合領域ポリペプチドとの結合の阻害を検出できる。上記探索方法で選択される物質は、さらに各々のLK6-A結合蛋白質への作用を比較、検討することにより、自己免疫疾患治療剤または免疫抑制剤として有用な物質であるかを判断することができる。

【0187】実施例18 LK6-A結合蛋白質を用いた自己免疫疾患治療剤または免疫抑制剤の探索(5)  
実施例11で調製したLK6-A結合蛋白質であるHis-p27タンパク質を、500nmol/l、NADPHを0.2mmol/l、チオレドキシ還元酵素を50nmol/l、チオレドキシンを5 $\mu$ mol/l含む20mmol/l HEPES $\cdot$ NaOH、200mmol/l NaCl(pH 7.2)からなる溶液に、過酸化水素0.5mmol/lを加えて37 $^{\circ}$ Cでインキュベートして、過酸化水素の分解に伴うNADPHの減少を340nmの吸光度の測定で検出する。この系に被検物質を加えることにより、His-p27のペルオキシダーゼ活性の被検物質による阻害を検出できる。上記探索方法で選択される物質は、さらに各々のLK6-A結合蛋白質への作用を比較、検討することにより、自己免疫疾患治療剤または免疫抑制剤として有用な物質であるかを判断することができる。

【0188】実施例19 LK6-A結合蛋白質を用いた薬剤の探索(6)

実施例9で調製したLK6-A結合蛋白質であるHis-p150c蛋白質2 $\mu$ mol/lを含む50mmol/lのリン酸緩衝液(pH 6.5)溶液に、p150cの基質である6-O-a-D-glucosylcyclomaltoheptaoseまたは6-O-a-maltopentaosyl cyclomaltoheptaoseを加えて37 $^{\circ}$ Cでインキュベートして、p150cによる

基質の分解をHPLCで検出する [ J. Biol. Chem., 276, 28824 (2001) ]。この系に被検物質を加えることにより、His-p150cの酵素活性の被検物質による阻害を検出できる。上記探索方法で選択される物質は、さらに各々のLK6-A結合蛋白質への作用を比較、検討することにより、自己免疫疾患治療剤または免疫抑制剤として有用な物質であるかを判断することができる。

【0189】実施例20 CD2BP2蛋白質またはその誘導体を用いた薬剤の探索

CD2BP2蛋白質は、Nature Structure Biology, 6, 656 (1999) に記載の方法に準じて、配列番号43で表されるアミノ酸配列のアミノ酸番号282~341番目のアミノ酸配列からなる蛋白質のN末端にHisタグをつけた蛋白質として発現させることができる。該蛋白質を公知の方法で精製後、該蛋白質10 $\mu$ gを含むPBS 100 $\mu$ lを96穴ELISAプレートの各穴に添加し、4、一晩静置して吸着させ、1%BSA/PBS300 $\mu$ lを各穴に加え、4、1時間静置してブロッキング後、100 $\mu$ mol/lの被検物質の存在下または非存在下、5 $\mu$ mol/lのフロオレセインイソチオシアネート (FITC) ラベル化LK6-A溶液100 $\mu$ lと接触させ、上

清除後、0.05%Tween20を含むPBSで洗浄し、残存するFITCラベル化LK6-Aを蛍光プレートリーダーで測定することにより、CD2BP2蛋白質誘導体へのLK6-Aの結合量、被

検物質によるLK6-Aの結合阻害を検出できる。上記探索方法で選択される物質は、さらに各々のLK6-A結合蛋白質への作用を比較、検討することにより、自己免疫疾患治療剤または免疫抑制剤として有用な物質であるかを判断することができる。

【0190】実施例21 p150aのGYFドメインを含む領域のクローニングと組み換え蛋白質の発現

p150aのGYFドメインを含む領域を、実施例8で作製したベクター2を鋳型として、BamHI切断部位を持つプライマーDNA (配列番号47で表される塩基配列からなるDNA) およびNotI切断部位を持つプライマーDNA (配列番号48で表される塩基配列からなるDNA) を用いてPCRを行い、増幅DNA断片をpGEX-6p-1 (アマシャム・ファルマシア・バイオテック社製、Cat.No. 27-4597-01)のBamHIとNotIのサイトに組み込み、組換え体DNAを作製した。該組換え体DNAを用いて、配列番号49で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチド (p150aのGYFドメインを含む領域) とGSTとの融合蛋白質 (以下、GST-p150a-GYFという) を、大腸菌BL21 (RP) (STRATAGENE社製、Cat.No. 230255) を宿主として発現させた。培養は25で行い、OD=0.6の時に0.1 mmol/LのIPTGを加えた後6時間培養した。培養終了後、8000 $\times$ g、4、10分間遠心分離することで菌体を回収し、-80で保存した。保存した菌体を溶解後、10 mLの破碎緩衝液を加えて、超音波破碎を行った。超音波破碎は、先端径3 mmのテーパー型マイクロチップ (TAITEC社製、分類番号MCN-0418) を用いて氷冷しながら断続的に2分間

行った。その後、遠心分離 (48000 $\times$ g、20分間、4) を行い上清を分取し、Glutathione Sepharose 4B (アマシャム・ファルマシア・バイオテック社製、Code. No. 17-0756-01) にロードした。破碎緩衝液でカラムを洗浄した後、溶出用緩衝液 (10 mmol/L 還元グルタチオンを含有するPBS溶液) を用いてGST-p150a-GYFを溶出した。溶出したGST-p150a-GYFをPBSに対して透析し、GST-p150a-GYFを取得した。

【0191】実施例22 ピオチン化LK6-Aの合成

122.2mg (0.5mmol) のピオチンを2mLのDMSOに溶解し、27.6mg (0.6mmol) のHBTU [2-(1H-ベンゾトリアゾール-1-イル)-1,1,3,3-テトラメチルウロニウム・ヘキサフルオロホスフェート]、91.9mg (0.6mmol) のHOBt $\cdot$ H<sub>2</sub>O [N-ヒドロキシベンゾトリアゾール $\cdot$ 1水和物] および31.9 $\mu$ l (1.2mmol) のN-メチルモルフォリンを加えて室温において1時間攪拌した。この溶液を、あらかじめ4mLのDMSO中に溶解しておいた430.7mg (5mmol) のピペラジンに対して、20分間かけて徐々に添加し、添加終了後さらに30分間室温で攪拌した。反応液に水100mLとエーテル100mLを加えて振とう後、水相を回収し凍結乾燥した。残渣に100mLの0.1mol/l炭酸水素ナトリウム水溶液を加えて、逆相カートリッジDispo SPE (1g樹脂充填、YMC社製) に通塔した。水5mLでカートリッジを洗浄した後、20%メタノールを含む水で溶出される画分を回収した。凍結乾燥により30.9mgのピオチン化ピペラジンを取得した。9.2mg (29.6 $\mu$ mol) のLK6-Aを9.2mLのDMSOに溶解し、上記で取得した13.9mg (44.4 $\mu$ mol) のピオチン化ピペラジンを添加して、室温で23時間攪拌した。反応混合物を逆相カラムInertsil ODS-3 (20mmID $\times$ 250mm、ジーエルサイエンス社製) を装着したHPLCシステム (LC-8A、島津製作所製) を用いて、水とメタノールの混合溶媒により精製し、目的物を含む溶出液を回収した。溶離液を凍結乾燥して、ピオチン化LK6-Aを11.3mg取得した。

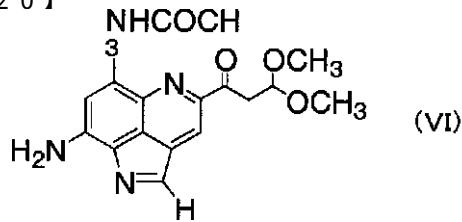
【0192】実施例23 GST-p150a-GYFを用いた自己免疫疾患治療剤または免疫抑制剤の探索

あらかじめグルタチオンをコートした96穴ELISAプレート (PIERCE社製、Cat.No. 23-0151-40)の各穴に0.1% BSA (bovine serum albumin) [牛血清アルブミン (F-V) ; ナカライテスク社製] 及び0.05% Tween-20を含むブロッキングバッファー200 $\mu$ lを添加し、室温で1時間静置してブロッキングした。実施例22で調製したピオチン化LK6-A及び被検物質をジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解し、10mmol/Lの濃度のDMSO溶液を調製した。ブロッキングバッファー2 mLに実施例21で調製した5 $\mu$ gのGST-p150a-GYFと2 $\mu$ lのピオチン化LK6-AのDMSO溶液を添加し、この溶液をチューブに100 $\mu$ lずつ分注した。被検物質のDMSO溶液をあらかじめDMSOで1/100、1/10および1/1に希釈した後、1 $\mu$ lずつ添加し、被検物質の終濃度が1、10および100 $\mu$ mol/Lとなるようにした。被

検物質には、LK6-A、LK6D2、LK6D7および下式(VI) ~ (VII) で表される化合物1~3を用いた。

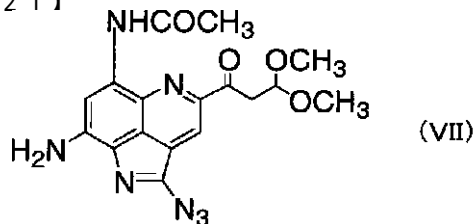
【0193】

【化20】



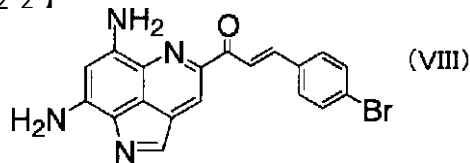
【0194】

【化21】



【0195】

【化22】



被検物質の GST-p150a-GYF/LK6-A 結合に対する阻害率 (%)

化合物	0 μmol/l	1 μmol/l	10 μmol/l	100 μmol/l
LK6-A	0	36	91	100
LK6D2	0	18	73	100
LK6D7	0	0	12	0
化合物1	0	0	57	100
化合物2	0	0	2	2
化合物3	0	0	0	9

【0199】試験例1 MLR活性評価

B10BR/SgSnマウス(日本SLC、雌、4~6週令)からリンパ節を、AKR/Nマウス(日本SLC、雌、4~6週令)から脾臓を取り出し、ホモジェナイザーで組織を破碎した後、ナイロンプランクトンネット(Mesh Opening = 250 μm)で濾過を行い、細胞を調製した。AKR/Nマウスの脾臓の細胞は、0.5 mg/mlのマイトマイシンCで処理した。B10BR/SgSnマウスのリンパ節の細胞1.5 × 10<sup>5</sup>個とAKR/Nマウスの脾臓の細胞5 × 10<sup>5</sup>個を混合して200 μl/wellとなるように96穴プレートに分注した。培養は、1640培地(500 ml)に、FBS(50 ml)と7.5% NaHCO<sub>3</sub>(12.5 ml)と200 mmol/l L-グルタミン(5 ml)とPenicillin-Streptomycin(それぞれ10000 units/mlと10 mg/ml; 2.5 ml)とNCTC109(GIBCO, Code 21340-039; 2 50

\*【0196】このGST-p150a-GYF、ビオチン化LK6-A及び被検物質を含む溶液を、上述の通りブロッキングした96穴プレートの各穴に添加し、4で一晩静置した。反応終了後、上清を除去し0.05%Tween-20を含むPBSで洗浄した。1mLのブロッキングバッファーに1μLのHRP(Horse radish Peroxidase)結合ストレプトアビジン溶液(ナカライ社製、Cat.No. 02517-61)を加え、50μLずつプレートの各穴に添加し、室温で1時間静置した。上清を除去後、0.05%Tween20を含むPBSで洗浄し、TMB(3, 3', 5, 5'-tetramethyl-benzidine; SIGMA社製、Code. No. T-0440)溶液を50μL添加し、室温で1時間反応させた後、50μlの0.1mol/l HCl溶液を添加し反応を停止した。96穴プレートリーダーで波長450 nmでの吸光度を測定することにより、プレートに固定化されたGST-p150a-GYFへのビオチン化LK6-Aの結合と、被検物質によるビオチン化LK6-Aの結合阻害を検出した。化合物無添加時の吸光度を結合阻害率0%、100μmol/L LK6-A添加時の吸光度を結合阻害率100%として、各濃度の被検物質によるGST-p150a-GYF/ビオチン化LK6-A結合阻害率を算出した。

\*20

【0197】その結果、表1に示すように、LK6-A、LK6D2、及び化合物2がGST-p150a-GYFとビオチン化LK6-Aとの結合を濃度依存的に阻害することを確認した。

【0198】

【表1】

5 ml)と1mol/l HEPES buffer(5 ml)と50mmol/l -メルカプトエタノール(0.5ml)を加えた培地を用いて行った。被検物質を加える場合は、DMSOに溶解した該物質を、2種の細胞を混合した後に、DMSOの最終濃度が0.1%となるように96穴プレートに加えた。細胞を72時間37で5%の二酸化炭素存在下で培養し、トリチウムでラベルしたチミジンを加えて、さらに16時間培養を続けた。その後細胞をグラスフィルターに吸着させて、細胞中に取り込まれたトリチウムの量をシンチレーションカウンターで測定し、得られたトリチウムカウント数を細胞増殖の指標とできる。

【0200】試験例2 MLR活性評価

試験例1及び特開2000-802879に記載の方法に従い、LK6-A誘導体のMLR活性を調べた。表2に結果を示す。

【0201】

【表2】

化合物のMLR阻害活性

化合物	IC <sub>50</sub> (μmol/l)
LK6-A	0.009
LK6D2	0.072
LK6D7	>10
化合物1	0.032
化合物2	>10
化合物3	>10

【0202】

【発明の効果】本発明により、LK6-A結合蛋白質の効率的な探索方法が提供される。該探索方法により新規な自己免疫疾患治療剤または免疫抑制剤の探索に有用なLK6-A結合蛋白質が取得され、LK6-A結合蛋白質を用いた新規な自己免疫疾患治療剤または免疫抑制剤の探索方法が提

<110> KYOWA HAKKO KOGYO, CO., LTD.

TOKYO INSTITUTE OF TECHNOLOGY

<120> Method for screening of a LK6-A-derivative binding protein, a LK6-A-derivative binding protein and method for screening of an immunosuppressive drug.

<130> H13-2191A4

<140>

<141>

<160> 49

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1299

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Ala Ala Glu Thr Gln Thr Leu Asn Phe  
Gly Pro Glu Trp Leu Arg

1 5 10 15

Ala Leu Ser Ser Gly Gly Ser Ile Thr Ser  
Pro Pro Leu Ser Pro Ala

20 25 30

Leu Pro Lys Tyr Lys Leu Ala Asp Tyr Arg  
Tyr Gly Arg Glu Glu Met

35 40 45

Leu Ala Leu Phe Leu Lys Asp Asn Lys Ile  
Pro Ser Asp Leu Leu Asp

50 55 60

Lys Glu Phe Leu Pro Ile Leu Gln Glu Glu  
Pro Leu Pro Pro Leu Ala

供される。

【0203】

【配列フリーテキスト】

配列番号32 - 人工配列の説明：合成DNA

配列番号33 - 人工配列の説明：合成DNA

配列番号34 - 人工配列の説明：合成DNA

配列番号35 - 人工配列の説明：合成DNA

配列番号36 - 人工配列の説明：合成DNA

配列番号37 - 人工配列の説明：合成DNA

10 配列番号38 - 人工配列の説明：合成DNA

配列番号39 - 人工配列の説明：合成DNA

配列番号40 - 人工配列の説明：合成DNA

配列番号41 - 人工配列の説明：合成DNA

配列番号42 - 人工配列の説明：合成DNA

配列番号47 - 人工配列の説明：合成DNA

配列番号48 - 人工配列の説明：合成DNA

【0204】

【配列表】

	115		120		125	
Gly Arg Gly Glu Cys Gly Phe Tyr Gln Arg						
Ser Phe Asp Glu Val Glu						
	130		135		140	
Gly Val Phe Gly Arg Gly Gly Gly Arg Glu						
Met His Arg Ser Gln Ser						
145		150		155		1
60						
Trp Glu Glu Arg Gly Asp Arg Arg Phe Glu						
Lys Pro Gly Arg Lys Asp						
		165		170		175
Val Gly Arg Pro Asn Phe Glu Glu Gly Gly						
Pro Thr Ser Val Gly Arg						
		180		185		190
Lys His Glu Phe Ile Arg Ser Glu Ser Glu						
Asn Trp Arg Ile Phe Arg						
	195		200		205	
Glu Glu Gln Asn Gly Glu Asp Glu Asp Gly						
Gly Trp Arg Leu Ala Gly						
	210		215		220	
Ser Arg Arg Asp Gly Glu Arg Trp Arg Pro						
His Ser Pro Asp Gly Pro						
225		230		235		2
40						
Arg Ser Ala Gly Trp Arg Glu His Met Glu						
Arg Arg Arg Arg Phe Glu						
		245		250		255
Phe Asp Phe Arg Asp Arg Asp Asp Glu Arg						
Gly Tyr Arg Arg Val Arg						
	260		265		270	
Ser Gly Ser Gly Ser Ile Asp Asp Asp Arg						
Asp Ser Leu Pro Glu Trp						
	275		280		285	
Cys Leu Glu Asp Ala Glu Glu Glu Met Gly						
Thr Phe Asp Ser Ser Gly						
	290		295		300	
Ala Phe Leu Ser Leu Lys Lys Val Gln Lys						
Glu Pro Ile Pro Glu Glu						
305		310		315		3
20						
Gln Glu Met Asp Phe Arg Pro Val Asp Glu						
Gly Glu Glu Cys Ser Asp						
		325		330		335
Ser Glu Gly Ser His Asn Glu Glu Ala Lys						
Glu Pro Asp Lys Thr Asn						
	340		345		350	
Lys Lys Glu Gly Glu Lys Thr Asp Arg Val						
Gly Val Glu Ala Ser Glu						
	355		360		365	
Glu Thr Pro Gln Thr Ser Ser Ser Ser Ala						
Arg Pro Gly Thr Pro Ser						
	370		375		380	

	500		505		510
Ala Ser Lys Leu Gln Glu His Arg Ala Lys					
Gly Val Ser Ile Pro Leu					
	515		520		525
Met His Glu Ala Met Gln Lys Trp Tyr Tyr					
Lys Asp Pro Gln Gly Glu					
	530		535		540
Ile Gln Gly Pro Phe Asn Asn Gln Glu Met					
Ala Glu Trp Phe Gln Ala					
545		550		555	5
60					
Gly Tyr Phe Thr Met Ser Leu Leu Val Lys					
Arg Ala Cys Asp Glu Ser					
	565		570		575
Phe Gln Pro Leu Gly Asp Ile Met Lys Met					
Trp Gly Arg Val Pro Phe					
	580		585		590
Ser Pro Gly Pro Ala Pro Pro Pro His Met					
Gly Glu Leu Asp Gln Glu					
	595		600		605
Arg Leu Thr Arg Gln Gln Glu Leu Thr Ala					
Leu Tyr Gln Met Gln His					
	610		615		620
Leu Gln Tyr Gln Gln Phe Leu Ile Gln Gln					
Gln Tyr Ala Gln Val Leu					
625		630		635	6
40					
Ala Gln Gln Gln Lys Ala Ala Leu Ser Ser					
Gln Gln Gln Gln Gln Leu					
	645		650		655
Ala Leu Leu Leu Gln Gln Phe Gln Thr Leu					
Lys Met Arg Ile Ser Asp					
	660		665		670
Gln Asn Ile Ile Pro Ser Val Thr Arg Ser					
Val Ser Val Pro Asp Thr					
	675		680		685
Gly Ser Ile Trp Glu Leu Gln Pro Thr Ala					
Ser Gln Pro Thr Val Trp					
	690		695		700
Glu Gly Gly Ser Val Trp Asp Leu Pro Leu					
Asp Thr Thr Thr Pro Gly					
705		710		715	7
20					
Pro Ala Leu Glu Gln Leu Gln Gln Leu Glu					
Lys Ala Lys Ala Ala Lys					
	725		730		735
Leu Glu Gln Glu Arg Arg Glu Ala Glu Met					
Arg Ala Lys Arg Glu Glu					
	740		745		750
Glu Glu Arg Lys Arg Gln Glu Glu Leu Arg					
Arg Gln Gln Glu Glu Ile					
	755		760		765

885 890 895  
 Arg Gln Arg Gln Gln Gln Glu Ala Leu  
 Arg Arg Leu Gln Gln Gln  
 900 905 910  
 Gln Gln Gln Gln Gln Leu Ala Gln Met Lys  
 Leu Pro Ser Ser Ser Thr  
 915 920 925  
 Trp Gly Gln Gln Ser Asn Thr Thr Ala Cys  
 Gln Ser Gln Ala Thr Leu  
 930 935 940  
 Ser Leu Ala Glu Ile Gln Lys Leu Glu Glu  
 Glu Arg Glu Arg Gln Leu  
 945 950 955 9  
 60  
 Arg Glu Glu Gln Arg Arg Gln Gln Arg Glu  
 Leu Met Lys Ala Leu Gln  
 965 970 975  
 Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Lys Leu  
 Ser Gly Trp Gly Asn Val  
 980 985 990  
 Ser Lys Pro Ser Gly Thr Thr Lys Ser Leu  
 Leu Glu Ile Gln Gln Glu  
 995 1000 1005  
 Glu Ala Arg Gln Met Gln Lys Gln Gln Gln  
 Gln Gln Gln Gln His Gln  
 1010 1015 1020  
 Gln Pro Asn Arg Ala Arg Asn Asn Thr His  
 Ser Asn Leu His Thr Ser  
 1025 1030 1035  
 1040  
 Ile Gly Asn Ser Val Trp Gly Ser Ile Asn  
 Thr Gly Pro Pro Asn Gln  
 1045 1050 1055  
 Trp Ala Ser Asp Leu Val Ser Ser Ile Trp  
 Ser Asn Ala Asp Thr Lys  
 1060 1065 1070  
 Asn Ser Asn Met Gly Phe Trp Asp Asp Ala  
 Val Lys Glu Val Gly Pro  
 1075 1080 1085  
 Arg Asn Ser Thr Asn Lys Asn Lys Asn Asn  
 Ala Ser Leu Ser Lys Ser  
 1090 1095 1100  
 Val Gly Val Ser Asn Arg Gln Asn Lys Lys  
 Val Glu Glu Glu Glu Lys  
 1105 1110 1115  
 1120  
 Leu Leu Lys Leu Phe Gln Gly Val Asn Lys  
 Ala Gln Asp Gly Phe Thr  
 1125 1130 1135  
 Gln Trp Cys Glu Gln Met Leu His Ala Leu  
 Asn Thr Ala Asn Asn Leu

Val Asn Ala Ser Ser Glu Arg Leu Asn Met  
 Gly Glu Ile Glu Thr Leu  
 1285 1290 1295

Asp Asp Tyr  
 <210> 2  
 <211> 60  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 2

Glu Ala Met Gln Lys Trp Tyr Tyr Lys Asp  
 Pro Gln Gly Glu Ile Gln  
 1 5 10 15  
 Gly Pro Phe Asn Asn Gln Glu Met Ala Glu  
 Trp Phe Gln Ala Gly Tyr  
 20 25 30  
 Phe Thr Met Ser Leu Leu Val Lys Arg Ala  
 Cys Asp Glu Ser Phe Gln  
 35 40 45  
 Pro Leu Gly Asp Ile Met Lys Met Trp Gly  
 Arg Val  
 50 55

<210> 3  
 <211> 1532  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 3

Met Gly His Ser Lys Gln Ile Arg Ile Leu  
 Leu Leu Asn Glu Met Glu  
 1 5 10 15  
 Lys Leu Glu Lys Thr Leu Phe Arg Leu Glu  
 Gln Gly Tyr Glu Leu Gln  
 20 25 30

Phe Arg Leu Gly Pro Thr Leu Gln Gly Lys  
 Ala Val Thr Val Tyr Thr  
 35 40 45  
 Asn Tyr Pro Phe Pro Gly Glu Thr Phe Asn  
 Arg Glu Lys Phe Arg Ser  
 50 55 60  
 Leu Asp Trp Glu Asn Pro Thr Glu Arg Glu  
 Asp Asp Ser Asp Lys Tyr  
 65 70 75 80

Cys Lys Leu Asn Leu Gln Gln Ser Gly Ser  
 Phe Gln Tyr Tyr Phe Leu  
 85 90 95  
 Gln Gly Asn Glu Lys Ser Gly Gly Gly Tyr  
 Ile Val Val Asp Pro Ile  
 100 105 110  
 Leu Arg Val Gly Ala Asp Asn His Val Leu  
 Pro Leu Asp Cys Val Thr  
 115 120 125



Leu Arg Pro Leu Met Pro Ala Ile Ala His  
 Ala Leu Phe Met Asp Ile  
 610 615 620  
 Thr His Asp Asn Glu Cys Pro Ile Val His  
 Arg Ser Ala Tyr Asp Ala  
 625 630 635 6  
 40  
 Leu Pro Ser Thr Thr Ile Val Ser Met Ala  
 Cys Cys Ala Ser Gly Ser  
 645 650 655  
  
 Thr Arg Gly Tyr Asp Glu Leu Val Pro His  
 Gln Ile Ser Val Val Ser  
 660 665 670  
 Glu Glu Arg Phe Tyr Thr Lys Trp Asn Pro  
 Glu Ala Leu Pro Ser Asn  
 675 680 685  
 Thr Gly Glu Val Asn Phe Gln Ser Gly Ile  
 Ile Ala Ala Arg Cys Ala  
 690 695 700  
 Ile Ser Lys Leu His Gln Glu Leu Gly Ala  
 Lys Gly Phe Ile Gln Val  
 705 710 715 7  
 20  
 Tyr Val Asp Gln Val Asp Glu Asp Ile Val  
 Ala Val Thr Arg His Ser  
 725 730 735  
 Pro Ser Ile His Gln Ser Val Val Ala Val  
 Ser Arg Thr Ala Phe Arg  
 740 745 750  
 Asn Pro Lys Thr Ser Phe Tyr Ser Lys Glu  
 Val Pro Gln Met Cys Ile  
 755 760 765  
 Pro Gly Lys Ile Glu Glu Val Val Leu Glu  
 Ala Arg Thr Ile Glu Arg  
 770 775 780  
 Asn Thr Lys Pro Tyr Arg Lys Asp Glu Asn  
 Ser Ile Asn Gly Thr Pro  
 785 790 795 8  
 00  
 Asp Ile Thr Val Glu Ile Arg Glu His Ile  
 Gln Leu Asn Glu Ser Lys  
 805 810 815  
 Ile Val Lys Gln Ala Gly Val Ala Thr Lys  
 Gly Pro Asn Glu Tyr Ile  
 820 825 830  
 Gln Glu Ile Glu Phe Glu Asn Leu Ser Pro  
 Gly Ser Val Ile Ile Phe  
 835 840 845  
 Arg Val Ser Leu Asp Pro His Ala Gln Val  
 Ala Val Gly Ile Leu Arg  
 850 855 860  
 Asn His Leu Thr Gln Phe Ser Pro His Phe

Phe Tyr Leu Lys Gln Ile Pro Arg Tyr Leu  
 Ile Pro Cys Tyr Phe Asp  
 995 1000 1005  
 Ala Ile Leu Ile Gly Ala Tyr Thr Thr Leu  
 Leu Asp Thr Ala Trp Lys  
 1010 1015 1020  
 Gln Met Ser Ser Phe Val Gln Asn Gly Ser  
 Thr Phe Val Lys His Leu  
 1025 1030 1035  
 1040  
 Ser Leu Gly Ser Val Gln Leu Cys Gly Val  
 Gly Lys Phe Pro Ser Leu  
 1045 1050 1055  
  
 Pro Ile Leu Ser Pro Ala Leu Met Asp Val  
 Pro Tyr Arg Leu Asn Glu  
 1060 1065 1070  
 Ile Thr Lys Glu Lys Glu Gln Cys Cys Val  
 Ser Leu Ala Ala Gly Leu  
 1075 1080 1085  
 Pro His Phe Ser Ser Gly Ile Phe Arg Cys  
 Trp Gly Arg Asp Thr Phe  
 1090 1095 1100  
 Ile Ala Leu Arg Gly Ile Leu Leu Ile Thr  
 Arg Arg Tyr Val Glu Ala  
 1105 1110 1115  
 1120  
  
 Arg Asn Ile Ile Leu Ala Phe Ala Gly Thr  
 Leu Arg His Gly Leu Ile  
 1125 1130 1135  
  
 Pro Asn Leu Leu Gly Glu Gly Ile Tyr Ala  
 Arg Tyr Asn Cys Arg Asp  
 1140 1145 1150  
 Ala Val Trp Trp Trp Leu Gln Cys Ile Gln  
 Asp Tyr Cys Lys Met Val  
 1155 1160 1165  
 Pro Asn Gly Leu Asp Ile Leu Lys Cys Pro  
 Val Ser Arg Met Tyr Pro  
 1170 1175 1180  
 Thr Asp Asp Ser Ala Pro Leu Pro Ala Gly  
 Thr Leu Asp Gln Pro Leu  
 1185 1190 1195  
 1200  
 Phe Glu Val Ile Gln Glu Ala Met Gln Lys  
 His Met Gln Gly Ile Gln  
 1205 1210 1215  
  
 Phe Arg Glu Arg Asn Ala Gly Pro Gln Ile  
 Asp Arg Asn Met Lys Asp  
 1220 1225 1230  
 Glu Gly Phe Asn Ile Thr Ala Gly Val Asp

1380 1385 1390  
 Thr Thr Glu Lys Ala Trp Lys Ala Leu Glu  
 Ile Ala Glu Lys Lys Leu  
 1395 1400 1405  
 Leu Gly Pro Leu Gly Met Lys Thr Leu Asp  
 Pro Asp Asp Met Val Tyr  
 1410 1415 1420  
  
 Cys Gly Ile Tyr Asp Asn Ala Leu Asp Asn  
 Asp Asn Tyr Asn Leu Ala  
 1425 1430 1435  
 1440  
 Lys Gly Phe Asn Tyr His Gln Gly Pro Glu  
 Trp Leu Trp Pro Ile Gly  
 1445 1450 1455  
  
 Tyr Phe Leu Arg Ala Lys Leu Tyr Phe Ser  
 Arg Leu Met Gly Pro Glu  
 1460 1465 1470  
 Thr Thr Ala Lys Thr Ile Val Leu Val Lys  
 Asn Val Leu Ser Arg His  
 1475 1480 1485  
 Tyr Val His Leu Glu Arg Ser Pro Trp Lys  
 Gly Leu Pro Glu Leu Thr  
 1490 1495 1500  
 Asn Glu Asn Ala Gln Tyr Cys Pro Phe Ser  
 Cys Glu Thr Gln Ala Trp  
 1505 1510 1515  
 1520  
 Ser Ile Ala Thr Ile Leu Glu Thr Leu Tyr  
 Asp Leu  
 1525 1530  
  
 <210> 4  
 <211> 721  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 4  
 Met Glu Leu Gly Lys Gly Lys Leu Leu Arg  
 Thr Gly Leu Asn Ala Leu  
 1 5 10 15  
 His Gln Ala Val His Pro Ile His Gly Leu  
 Ala Trp Thr Asp Gly Asn  
 20 25 30  
 Gln Val Val Leu Thr Asp Leu Arg Leu His  
 Ser Gly Glu Val Lys Phe  
 35 40 45  
 Gly Asp Ser Lys Val Ile Gly Gln Phe Glu  
 Cys Ala Cys Trp Leu Ser Asp Gly Leu Arg  
 Leu Val Val Ala Val Gly 55 60  
 Trp Ala Pro Pro Val Ala Asp Asp Thr 70 75  
 Ser Ser Leu Ala Ser Tyr Ile Trp Asp Ser  
 80 85 90  
 Ala Gln Lys Thr Leu

180 185 190  
 Arg Cys Ser Ser Cys Leu Val Phe Asp Val  
 Asp Ser His Val Cys Ser  
 195 200 205  
 Ile Thr Ala Thr Val Asp Ser Gln Val Ala  
 Ile Ala Thr Glu Leu Pro  
 210 215 220  
 Leu Asp Lys Ile Cys Gly Leu Asn Ala Ser  
 Glu Thr Phe Asn Ile Pro  
 225 230 235 2  
 40  
 Pro Asn Ser Lys Asp Met Thr Pro Tyr Ala  
 Leu Pro Val Ile Gly Glu  
 245 250 255  
 Val Arg Ser Met Asp Lys Glu Ala Thr Asp  
 Ser Glu Thr Asn Ser Glu  
 260 265 270  
 Val Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Glu Pro  
 Leu Asp Leu Thr His Ile  
 275 280 285  
 Leu Val Phe Lys Lys Ala Thr Met  
 His Arg Asp Val His Lys Ser Glu Gly Asn  
 Ser Leu Ile Cys Arg 330 335  
 Pro Ile Leu Val Pro Leu Ile Ala 300  
 Phe Asp Asp Lys Ala His Gly Thr Gly Gln  
 Asp Ser Ser Leu Val 345 350  
 365 Val Ala Val Ala Asn Thr Cys Asn 315 3  
 20e Ile Leu Ile Tyr Ser  
 355 360 365  
 Val Ile Pro Ser Ser Val Pro Asn Ile Gln  
 Gln Ile Arg Leu Glu Asn  
 370 375 380  
 Thr Glu Arg Pro Lys Gly Ile Cys Phe Leu  
 Thr Asp Gln Leu Leu Leu  
 385 390 395 4  
 00  
 Ile Leu Val Gly Lys Gln Lys Leu Thr Asp  
 Thr Thr Phe Leu Pro Ser  
 405 410 415  
 Ser Lys Ser Asp Gln Tyr Ala Ile Ser Leu  
 Ile Val Arg Glu Ile Met  
 420 425 430  
 Leu Glu Glu Glu Pro Ser Ile Thr Ser Gly  
 Glu Ser Gln Thr Thr Tyr  
 435 440 445  
 Ser Thr Phe Ser Ala Pro Leu Asn Lys Ala  
 Asn Arg Lys Lys Leu Ile  
 450 455 460  
 Glu Ser Leu Ser Pro Asp Phe Cys His Gln  
 Asn Lys Gly Leu Leu Leu  
 465 470 475 4  
 80  
 Thr Val Asn Thr Ser Ser Gln Asn Gly Arg  
 Pro Gly Arg Thr Leu Ile

565 570 575  
 Glu Leu Thr Asn Arg Leu His Asn Gly Lys  
 Lys Ser Ser Ser Val Tyr  
 580 585 590  
 Pro Leu Ser Gln Asp Leu Pro Tyr Val His  
 Ile Ile Tyr Gln Lys Pro  
 595 600 605  
 Tyr Tyr Leu Gly Pro Val Val Glu Lys Arg  
 Ala Val Leu Leu Cys Asp  
 610 615 620  
  
 Gly Lys Leu Arg Leu Ser Thr Val Gln Gln  
 Thr Phe Gly Leu Ser Leu  
 625 630 635 6  
 40  
 Ile Glu Met Leu His Asp Ser His Trp Ile  
 Leu Leu Ser Ala Asp Ser  
 645 650 655  
 Glu Gly Phe Ile Pro Leu Thr Phe Thr Ala  
 Thr Gln Glu Ile Ile Ile  
 660 665 670  
 Arg Asp Gly Ser Leu Ser Arg Ser Asp Val  
 Phe Arg Asp Ser Phe Ser  
 675 680 685  
 His Ser Pro Gly Ala Val Ser Ser Leu Lys  
 Val Phe Thr Gly Leu Ala  
 690 695 700  
 Ala Pro Ser Leu Asp Thr Thr Gly Cys Cys  
 Asn His Val Asp Gly Met  
 705 710 715 7  
 20  
 Ala  
 <210> 5  
 <211> 199  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 <400> 5  
 Met Ser Ser Gly Asn Ala Lys Ile Gly Tyr  
 Pro Ala Pro Asn Phe Lys  
 1 5 10 15  
  
 Ala Thr Ala Val Met Pro Asp Gly Gln Phe  
 Lys Asp Ile Ser Leu Ser  
 20 25 30  
 Glu Tyr Lys Gly Lys Tyr Val Val Phe Phe  
 Phe Tyr Pro Leu Asp Phe  
 35 40 45  
 Thr Phe Val Cys Pro Thr Glu Ile Ile Ala  
 Phe Ser Asp Arg Ala Asp  
 50 55 60  
 Glu Phe Lys Lys Leu Asn Cys Gln Val Ile  
 Gly Ala Ser Val Asp Ser  
 65 70 75 80

180 185 190  
 Glu Tyr Phe Ser Lys Gln Lys  
 195  
 <210> 6  
 <211> 351  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 6  
 Met Ser Phe Pro Cys Lys Phe Val Ala Ser  
 Phe Leu Leu Ile Phe Asn  
 1 5 10 15  
 Val Ser Ser Lys Gly Ala Val Ser Lys Glu  
 Ile Thr Asn Ala Leu Glu  
 20 25 30  
 Thr Trp Gly Ala Leu Gly Gln Asp Ile Asn  
 Leu Asp Ile Pro Ser Phe  
 35 40 45  
 Gln Met Ser Asp Asp Ile Asp Asp Ile Lys  
 Trp Glu Lys Thr Ser Asp  
 50 55 60  
 Lys Lys Lys Ile Ala Gln Phe Arg Lys Glu  
 Lys Glu Thr Phe Lys Glu  
 65 70 75 80  
  
 Lys Asp Thr Tyr Lys Leu Phe Lys Asn Gly  
 Thr Leu Lys Ile Lys His  
 85 90 95  
 Leu Lys Thr Asp Asp Gln Asp Ile Tyr Lys  
 Val Ser Ile Tyr Asp Thr  
 100 105 110  
 Lys Gly Lys Asn Val Leu Glu Lys Ile Phe  
 Asp Leu Lys Ile Gln Glu  
 115 120 125  
 Arg Val Ser Lys Pro Lys Ile Ser Trp Thr  
 Cys Ile Asn Thr Thr Leu  
 130 135 140  
 Thr Cys Glu Val Met Asn Gly Thr Asp Pro  
 Glu Leu Asn Leu Tyr Gln  
 145 150 155 1  
 60  
 Asp Gly Lys His Leu Lys Leu Ser Gln Arg  
 Val Ile Thr His Lys Trp  
 165 170 175  
 Thr Thr Ser Leu Ser Ala Lys Phe Lys Cys  
 Thr Ala Gly Asn Lys Val  
 180 185 190  
 Ser Lys Glu Ser Ser Val Glu Pro Val Ser  
 Cys Pro Glu Lys Gly Leu  
 195 200 205  
 Asp Ile Tyr Leu Ile Ile Gly Ile Cys Gly  
 Gly Gly Ser Leu Leu Met  
 210 215 220

325 330 335  
 Pro Pro His Gly Ala Ala Glu Asn Ser Leu  
 Ser Pro Ser Ser Asn  
 340 345 350  
 <210> 7  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 7  
 Asn Asp Glu Glu Leu Glu Thr Arg Ala His  
 Arg Val Ala Thr Glu Glu  
 1 5 10 15  
 Arg Gly Arg Lys Pro Gln Gln Ile Pro Ala  
 Ser Thr Pro Gln Asn Pro  
 20 25 30  
 Ala Thr Ser Gln His Pro Pro Pro Pro Pro  
 Gly His Arg Ser Gln Ala  
 35 40 45  
 Pro Ser His Arg Pro Pro Pro Pro Gly His  
 Arg Val Gln His Gln Pro  
 50 55 60  
 Gln Lys Arg Pro Pro Ala Pro Ser Gly Thr  
 Gln Val His Gln Gln Lys  
 65 70 75 80  
  
 Gly Pro Pro Leu Pro Arg Pro Arg Val Gln  
 Pro Lys Pro Pro His Gly  
 85 90 95  
 Ala Ala Glu Asn Ser Leu Ser Pro Ser Ser  
 Asn  
 100 105  
 <210> 8  
 <211> 3897  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 8  
 atg gca gcg gaa acg cag aca ctg aac ttt  
 ggg cct gaa tgg ctc cga 48  
 Met Ala Ala Glu Thr Gln Thr Leu Asn Phe  
 Gly Pro Glu Trp Leu Arg  
 1 5 10 15  
 gct ctg tcc agt ggt ggg agt att aca tcc  
 cct cct ctt tct cca gca 96  
 Ala Leu Ser Ser Gly Gly Ser Ile Thr Ser  
 Pro Pro Leu Ser Pro Ala  
 20 25 30  
 ttg ccg aag tat aaa tta gca gat tat cgt  
 tac ggc aga gaa gaa atg 144  
 Leu Pro Lys Tyr Lys Leu Ala Asp Tyr Arg  
 Tyr Gly Arg Glu Glu Met  
 35 40 45  
 tta gca ctt ttc ctt aaa gac aac aag ata

Val Val Gly Ala Pro Arg Gly Arg Ser Ser  
 Ser Arg Gly Arg Gly Arg  
 115 120 125  
 ggc aga ggt gaa tgt ggt ttc tac caa aga  
 agt ttt gat gaa gta gag 432  
 Gly Arg Gly Glu Cys Gly Phe Tyr Gln Arg  
 Ser Phe Asp Glu Val Glu  
 130 135 140  
 ggt gtt ttt ggt cga gga ggt ggc aga gaa  
 atg cat aga tcg cag agc 480  
 Gly Val Phe Gly Arg Gly Gly Gly Arg Glu  
 Met His Arg Ser Gln Ser  
 145 150 155 1  
 60  
 tgg gag gaa agg ggt gac aga cgt ttt gaa  
 aaa cca gga cga aaa gat 528  
 Trp Glu Glu Arg Gly Asp Arg Arg Phe Glu  
 Lys Pro Gly Arg Lys Asp  
 165 170 175  
 gta ggg aga cca aat ttt gag gaa ggt gga  
 cca aca tca gta ggg aga 576  
 Val Gly Arg Pro Asn Phe Glu Glu Gly Gly  
 Pro Thr Ser Val Gly Arg  
 180 185 190  
 aag cat gaa ttt ata cgc tca gaa agt gaa  
 aat tgg cgc atc ttt aga 624  
 Lys His Glu Phe Ile Arg Ser Glu Ser Glu  
 Asn Trp Arg Ile Phe Arg  
 195 200 205  
 gag gaa caa aat gga gaa gat gaa gat gga  
 ggt tgg cga cta gct gga 672  
 Glu Glu Gln Asn Gly Glu Asp Glu Asp Gly  
 Gly Trp Arg Leu Ala Gly  
 210 215 220  
 tca agg agg gat gga gag agg tgg cga cct  
 cac agt cct gat ggc cct 720  
 Ser Arg Arg Asp Gly Glu Arg Trp Arg Pro  
 His Ser Pro Asp Gly Pro  
 225 230 235 2  
 40  
 cgt tct gca ggc tgg cgg gaa cac atg gaa  
 cga cgt cgg agg ttt gag 768  
 Arg Ser Ala Gly Trp Arg Glu His Met Glu  
 Arg Arg Arg Arg Phe Glu  
 245 250 255  
 ttt gat ttt cga gat aga gat gat gaa cgg  
 ggg aaa gga ggg gag gga aca 816  
 Gln Asp Gln Arg Asp Arg Asp 1040  
 Gly Lys Arg Arg Val Lys Thr Asp Arg Val  
 Gly Val Glu 260 Ser Glu 265 270  
 tct ggc 855 ggg agc ata gat 960 gac agg 365  
 gaa agc ctc cag gaa tgg tca 864  
 Gln Gln Ggt Gln Ser tca Asp 1520 Asp Arg

Glu Thr Pro Gln Thr Ser Ser Ser Ser Ala  
 Arg Pro Gly Thr Pro Ser  
 370 375 380  
 gac cat cag tct cag gaa gca tca cag ttt  
 gag agg aaa gat gaa cca 1200  
 Asp His Gln Ser Gln Glu Ala Ser Gln Phe  
 Glu Arg Lys Asp Glu Pro  
 385 390 395 4  
 00  
 aaa act gag caa acg gaa aaa gct gaa gag  
 gag act cgg atg gaa aat 1248  
 Lys Thr Glu Gln Thr Glu Lys Ala Glu Glu  
 Glu Thr Arg Met Glu Asn  
 405 410 415  
 agt cta cca gcc aaa gtg ccc agc aga ggg  
 gat gaa atg gtt gct gat 1296  
 Ser Leu Pro Ala Lys Val Pro Ser Arg Gly  
 Asp Glu Met Val Ala Asp  
 420 425 430  
 gtc cag cag ccc ctg tcg cag att cct tca  
 gat aca gcc tct cct ctt 1344  
 Val Gln Gln Pro Leu Ser Gln Ile Pro Ser  
 Asp Thr Ala Ser Pro Leu  
 435 440 445  
 ctc ata ctt cca cct cct gtt ccc aat cct  
 agt cct act ctc cgg cca 1392  
 Leu Ile Leu Pro Pro Pro Val Pro Asn Pro  
 Ser Pro Thr Leu Arg Pro  
 450 455 460  
  
 gtt gaa aca cca gtt gta ggt gct cct ggt  
 atg ggc agt gtt tcc aca 1440  
 Val Glu Thr Pro Val Val Gly Ala Pro Gly  
 Met Gly Ser Val Ser Thr  
 465 470 475 4  
 80  
 gaa cct gat gat gaa gaa ggt ctc aaa cat  
 ttg gag cag caa gct gag 1488  
 Glu Pro Asp Asp Glu Glu Gly Leu Lys His  
 Leu Glu Gln Gln Ala Glu  
 485 490 495  
 aaa atg gtg gct tat ctc caa gac agt gca  
 cta gat gat gaa aga ttg 1536  
 Lys Met Val Ala Tyr Leu Gln Asp Ser Ala  
 Leu Asp Asp Glu Arg Leu  
 500 505 510  
 gca tca aaa ctg caa gag cac aga gct aaa  
 gga gtg tcg att cca ttg 1584  
 Ala Ser Lys Leu Gln Glu His Arg Ala Lys  
 Gly Val Ser Ile Pro Leu  
 515 520 525  
 atg cat gaa gca atg cag aag tgg tat tac  
 aaa gat cct cag gga gaa 1632



cgc cag agg cag cag cag caa gag gct ctc  
 cgg agg ttg cag cag cag 2736  
 Arg Gln Arg Gln Gln Gln Gln Glu Ala Leu  
 Arg Arg Leu Gln Gln Gln  
 900 905 910  
 cag cag caa caa cag ctg gcg cag atg aag  
 ctt cct tct tct tca acg 2784  
 Gln Gln Gln Gln Gln Leu Ala Gln Met Lys  
 Leu Pro Ser Ser Ser Thr  
 915 920 925  
 tgg ggc cag cag tcc aat aca aca gca tgt  
 cag tcc cag gcc acg ctg 2832  
 Trp Gly Gln Gln Ser Asn Thr Thr Ala Cys  
 Gln Ser Gln Ala Thr Leu  
 930 935 940  
 tcg ttg gct gaa atc caa aaa cta gag gaa  
 gaa cga gaa cgg cag ctt 2880  
 Ser Leu Ala Glu Ile Gln Lys Leu Glu Glu  
 Glu Arg Glu Arg Gln Leu  
 945 950 955 9  
 60  
 cga gaa gag caa agg cgc cag cag agg gag  
 ttg atg aaa gct ctt cag 2928  
 Arg Glu Glu Gln Arg Arg Gln Gln Arg Glu  
 Leu Met Lys Ala Leu Gln  
 965 970 975  
 cag cag cag caa cag caa cag cag aaa ctc  
 tca ggt tgg ggg aat gtc 2976  
 Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Lys Leu  
 Ser Gly Trp Gly Asn Val  
 980 985 990  
 agc aaa cct tca ggt acc acg aaa tct ctt  
 ctg gag atc cag cag gaa 3024  
 Ser Lys Pro Ser Gly Thr Thr Lys Ser Leu  
 Leu Glu Ile Gln Gln Glu  
 995 1000 1005  
 gag gcc agg caa atg caa aag cag cag cag  
 cag cag cag caa cac cag 3072  
 Glu Ala Arg Gln Met Gln Lys Gln Gln Gln  
 Gln Gln Gln Gln His Gln  
 1010 1015 1020  
 caa cca aac aga gct cgt aac aat acg cat  
 tcc aac ctg cac acc agc 3120  
 Gln Pro Asn Arg Ala Arg Asn Asn Thr His  
 Ser Asn Leu His Thr Ser  
 1025 1030 1035  
 1040  
 att ggg aat tct gtt tgg ggc tct ata aat  
 act ggt cct cct aac cag 3168  
 Ile Gly Asn Ser Val Trp Gly Ser Ile Asn  
 Thr Gly Pro Pro Asn Gln

gat gtt ccc aca ttt gtt tct ttc ctg aaa  
gaa gta gaa tct cct tat 3504  
Asp Val Pro Thr Phe Val Ser Phe Leu Lys  
Glu Val Glu Ser Pro Tyr  
1155 1160 1165  
gag gtc cat gat tat atc agg gcc tat tta  
gga gat act tct gag gcc 3552  
Glu Val His Asp Tyr Ile Arg Ala Tyr Leu  
Gly Asp Thr Ser Glu Ala  
1170 1175 1180  
aag gag ttt gcc aag cag ttc ctt gag cgc  
cgt gcc aaa cag aaa gcc 3600  
Lys Glu Phe Ala Lys Gln Phe Leu Glu Arg  
Arg Ala Lys Gln Lys Ala  
1185 1190 1195  
1200  
aac cag cag cgt cag cag cag cag ctg cca  
cag cag cag cag cag cag 3648  
Asn Gln Gln Arg Gln Gln Gln Gln Leu Pro  
Gln Gln Gln Gln Gln Gln  
1205 1210 121  
5  
ccg cca cag cag ccg cca cag cag cca caa  
cag cag gac tct gtg tgg 3696  
Pro Pro Gln Gln Pro Pro Gln Gln Pro Gln  
Gln Gln Asp Ser Val Trp  
1220 1225 1230  
ggg atg aac cac agt aca ctc cat tca gta  
ttt cag acc aat caa agc 3744  
Gly Met Asn His Ser Thr Leu His Ser Val  
Phe Gln Thr Asn Gln Ser  
1235 1240 1245  
aac aac caa caa tcc aat ttt gag gct gtg  
cag agt ggc aag aag aag 3792  
Asn Asn Gln Gln Ser Asn Phe Glu Ala Val  
Gln Ser Gly Lys Lys Lys  
1250 1255 1260  
aaa aag cag aag atg gtc cga gca gat ccc  
agt tta tta gga ttt tca 3840  
Lys Lys Gln Lys Met Val Arg Ala Asp Pro  
Ser Leu Leu Gly Phe Ser  
1265 1270 1275  
1280  
gtc aat gca tca tcg gag cga ctc aac atg  
ggt gaa atc gag acg ttg 3888  
Val Asn Ala Ser Ser Glu Arg Leu Asn Met  
Gly Glu Ile Glu Thr Leu  
1285 1290 129  
5  
gat gac tac  
3897  
Asp Asp Tyr  
<210> 9

<400> 10  
 atg gga cac agt aaa cag att cga att tta  
 ctt ctg aac gaa atg gag 48  
 Met Gly His Ser Lys Gln Ile Arg Ile Leu  
 Leu Leu Asn Glu Met Glu  
 1 5 10 15  
 aaa ctg gaa aag acc ctc ttc aga ctt gaa  
 caa ggg tat gag cta cag 96  
 Lys Leu Glu Lys Thr Leu Phe Arg Leu Glu  
 Gln Gly Tyr Glu Leu Gln  
 20 25 30  
 ttc cga tta ggc cca act tta cag gga aaa  
 gca gtt acc gtg tat aca 144  
 Phe Arg Leu Gly Pro Thr Leu Gln Gly Lys  
 Ala Val Thr Val Tyr Thr  
 35 40 45  
 aat tac cca ttt cct gga gaa aca ttt aat  
 aga gaa aaa ttc cgt tct 192  
 Asn Tyr Pro Phe Pro Gly Glu Thr Phe Asn  
 Arg Glu Lys Phe Arg Ser  
 50 55 60  
 ctg gat tgg gaa aat cca aca gaa aga gaa  
 gat gat tct gat aaa tac 240  
 Leu Asp Trp Glu Asn Pro Thr Glu Arg Glu  
 Asp Asp Ser Asp Lys Tyr  
 65 70 75 80  
  
 tgt aaa ctt aat ctg caa caa tct ggt tca  
 ttt cag tat tat ttc ctt 288  
 Cys Lys Leu Asn Leu Gln Gln Ser Gly Ser  
 Phe Gln Tyr Tyr Phe Leu  
 85 90 95  
 caa gga aat gag aaa agt ggt gga ggt tac  
 ata gtt gtg gac ccc att 336  
 Gln Gly Asn Glu Lys Ser Gly Gly Gly Tyr  
 Ile Val Val Asp Pro Ile  
 100 105 110  
 tta cgt gtt ggt gct gat aat cat gtg cta  
 ccc ttg gac tgt gtt act 384  
 Leu Arg Val Gly Ala Asp Asn His Val Leu  
 Pro Leu Asp Cys Val Thr  
 115 120 125  
 ctt cag aca ttt tta gct aag tgt ttg gga  
 cct ttt gat gaa tgg gaa 432  
 Leu Gln Thr Phe Leu Ala Lys Cys Leu Gly  
 Pro Phe Asp Glu Trp Glu  
 130 135 140  
 agc aga ctt agg gtt gca aaa gaa tca ggc  
 tac aac atg att cat ttt 480  
 Ser Arg Leu Arg Val Ala Lys Glu Ser Gly  
 Tyr Asn Met Ile His Phe  
 145 150 155 1

245 250 255  
 ttc tcc tgt gat gtt gca gaa ggg aaa tac  
 aaa gaa aag gga ata cct 816  
 Phe Ser Cys Asp Val Ala Glu Gly Lys Tyr  
 Lys Glu Lys Gly Ile Pro  
 260 265 270  
 gct ttg att gaa aat gat cac cat atg aat  
 tcc atc cga aaa ata att 864  
 Ala Leu Ile Glu Asn Asp His His Met Asn  
 Ser Ile Arg Lys Ile Ile  
 275 280 285  
 tgg gag gat att ttt cca aag ctt aaa ctc  
 tgg gaa ttt ttc caa gta 912  
 Trp Glu Asp Ile Phe Pro Lys Leu Lys Leu  
 Trp Glu Phe Phe Gln Val  
 290 295 300  
 gat gtc aac aaa gcg gtt gag caa ttt aga  
 aga ctt ctt aca caa gaa 960  
 Asp Val Asn Lys Ala Val Glu Gln Phe Arg  
 Arg Leu Leu Thr Gln Glu  
 305 310 315 3  
 20  
 aat agg cga gta acc aag tct gat cca aac  
 caa cac ctt acg att att 1008  
 Asn Arg Arg Val Thr Lys Ser Asp Pro Asn  
 Gln His Leu Thr Ile Ile  
 325 330 335  
 caa gat cct gaa tac aga cgg ttt ggc tgt  
 act gta gat atg aac att 1056  
 Gln Asp Pro Glu Tyr Arg Arg Phe Gly Cys  
 Thr Val Asp Met Asn Ile  
 340 345 350  
 gca cta acg act ttc ata cca cat gac aag  
 ggg cca gca gca att gaa 1104  
 Ala Leu Thr Thr Phe Ile Pro His Asp Lys  
 Gly Pro Ala Ala Ile Glu  
 355 360 365  
 gaa tgc tgt aat tgg ttt cat aaa aga atg  
 gag gaa tta aat tca gag 1152  
 Glu Cys Cys Asn Trp Phe His Lys Arg Met  
 Glu Glu Leu Asn Ser Glu  
 370 375 380  
 aag cat cga ctc att aac tat cat cag gaa  
 cag gca gtt aat tgc ctt 1200  
 Lys His Arg Leu Ile Asn Tyr His Gln Glu  
 Gln Ala Val Asn Cys Leu  
 385 390 395 4  
 00  
 ttg gga aat gtg ttt tat gaa cga ctg gct  
 ggc cat ggt cca aaa cta 1248  
 Leu Gly Asn Val Phe Tyr Glu Arg Leu Ala  
 Gly His Gly Pro Lys Leu  
 405 410 415

Thr Glu Ile Thr Ala Thr Tyr Phe Gln Gly  
 Val Arg Leu Asp Asn Cys  
 515 520 525  
 cac tca aca cct ctt cac gta gct gag tac  
 atg ttg gat gct gct agg 1632  
 His Ser Thr Pro Leu His Val Ala Glu Tyr  
 Met Leu Asp Ala Ala Arg  
 530 535 540  
  
 aat ttg caa ccc aat tta tat gta gta gct  
 gaa ctg ttc aca gga agt 1680  
 Asn Leu Gln Pro Asn Leu Tyr Val Val Ala  
 Glu Leu Phe Thr Gly Ser  
 545 550 555 5  
 60  
 gaa gat ctg gac aat gtc ttt gtt act aga  
 ctg ggc att agt tcc tta 1728  
 Glu Asp Leu Asp Asn Val Phe Val Thr Arg  
 Leu Gly Ile Ser Ser Leu  
 565 570 575  
 ata aga gag gca atg agt gca tat aat agt  
 cat gaa gag ggc aga tta 1776  
 Ile Arg Glu Ala Met Ser Ala Tyr Asn Ser  
 His Glu Glu Gly Arg Leu  
 580 585 590  
 gtt tac cga tat gga gga gaa cct gtt gga  
 tcc ttt gtt cag ccc tgt 1824  
 Val Tyr Arg Tyr Gly Gly Glu Pro Val Gly  
 Ser Phe Val Gln Pro Cys  
 595 600 605  
 ttg agg cct tta atg cca gct att gca cat  
 gcc ctg ttt atg gat att 1872  
 Leu Arg Pro Leu Met Pro Ala Ile Ala His  
 Ala Leu Phe Met Asp Ile  
 610 615 620  
 acg cat gat aat gag tgt cct att gtg cat  
 aga tca gcg tat gat gct 1920  
 Thr His Asp Asn Glu Cys Pro Ile Val His  
 Arg Ser Ala Tyr Asp Ala  
 625 630 635 6  
 40  
 ctt cca agt act aca att gtt tct atg gca  
 tgt tgt gct agt gga agt 1968  
 Leu Pro Ser Thr Thr Ile Val Ser Met Ala  
 Cys Cys Ala Ser Gly Ser  
 645 650 655  
  
 aca aga ggc tat gat gaa tta gtg cct cat  
 cag att tca gtg gtt tct 2016  
 Thr Arg Gly Tyr Asp Glu Leu Val Pro His  
 Gln Ile Ser Val Val Ser  
 660 665 670  
 gaa gaa cgg ttt tac act aag tgg aat cct

Pro Gly Lys Ile Glu Glu Val Val Leu Glu  
 Ala Arg Thr Ile Glu Arg  
 770 775 780  
 aac acg aaa cct tat agg aag gat gag aat  
 tca atc aat gga aca cca 2400  
 Asn Thr Lys Pro Tyr Arg Lys Asp Glu Asn  
 Ser Ile Asn Gly Thr Pro  
 785 790 795 8  
 00  
 gat atc aca gta gaa att aga gaa cat att  
 cag ctt aat gaa agt aaa 2448  
 Asp Ile Thr Val Glu Ile Arg Glu His Ile  
 Gln Leu Asn Glu Ser Lys  
 805 810 815  
 att gtt aaa caa gct gga gtt gcc aca aaa  
 ggg ccc aat gaa tat att 2496  
 Ile Val Lys Gln Ala Gly Val Ala Thr Lys  
 Gly Pro Asn Glu Tyr Ile  
 820 825 830  
 caa gaa ata gaa ttt gaa aac ttg tct cca  
 gga agt gtt att ata ttc 2544  
 Gln Glu Ile Glu Phe Glu Asn Leu Ser Pro  
 Gly Ser Val Ile Ile Phe  
 835 840 845  
 aga gtt agt ctt gat cca cat gca caa gtc  
 gct gtt gga att ctt cga 2592  
 Arg Val Ser Leu Asp Pro His Ala Gln Val  
 Ala Val Gly Ile Leu Arg  
 850 855 860  
 aat cat ctg aca caa ttc agt cct cac ttt  
 aaa tct ggc agc cta gct 2640  
 Asn His Leu Thr Gln Phe Ser Pro His Phe  
 Lys Ser Gly Ser Leu Ala  
 865 870 875 8  
 80  
 gtt gac aat gca gat cct ata tta aaa att  
 cct ttt gct tct ctt gcc 2688  
 Val Asp Asn Ala Asp Pro Ile Leu Lys Ile  
 Pro Phe Ala Ser Leu Ala  
 885 890 895  
 tcc aga tta act ttg gct gag cta aat cag  
 atc ctt tac cga tgt gaa 2736  
 Ser Arg Leu Thr Leu Ala Glu Leu Asn Gln  
 Ile Leu Tyr Arg Cys Glu  
 900 905 910  
 tca gaa gaa aag gaa gat ggt gga ggg tgc  
 tat gac ata cca aac tgg 2784  
 Ser Glu Glu Lys Glu Asp Gly Gly Gly Cys  
 Tyr Asp Ile Pro Asn Trp  
 915 920 925  
 tca gcc ctt aaa tat gca ggt ctt caa ggt  
 tta atg tct gta ttg gca 2832  
 Ser Ala Leu Lys Tyr Ala Gly Leu Gln Gly

1025                      1030                      1035  
 1040  
 tca ttg ggt tca gtt caa ctg tgt gga gta  
 gga aaa ttc cct tcc ctg 3168  
 Ser Leu Gly Ser Val Gln Leu Cys Gly Val  
 Gly Lys Phe Pro Ser Leu  
                                  1045                      1050                      105  
 5  
 cca att ctt tca cct gcc cta atg gat gta  
 cct tat agg tta aat gag 3216  
 Pro Ile Leu Ser Pro Ala Leu Met Asp Val  
 Pro Tyr Arg Leu Asn Glu  
                                  1060                      1065                      1070  
 atc aca aaa gaa aag gag caa tgt tgt gtt  
 tct cta gct gca ggc tta 3264  
 Ile Thr Lys Glu Lys Glu Gln Cys Cys Val  
 Ser Leu Ala Ala Gly Leu  
                                  1075                      1080                      1085  
 cct cat ttt tct tct ggt att ttc cgc tgc  
 tgg gga agg gat act ttt 3312  
 Pro His Phe Ser Ser Gly Ile Phe Arg Cys  
 Trp Gly Arg Asp Thr Phe  
                                  1090                      1095                      1100  
 att gca ctt aga ggt ata ctg ctg att act  
 aga cgc tat gta gaa gcc 3360  
 Ile Ala Leu Arg Gly Ile Leu Leu Ile Thr  
 Arg Arg Tyr Val Glu Ala  
 1105                      1110                      1115  
 1120  
 agg aat att att tta gca ttt gcg ggt acc  
 ctg agg cat ggt ctc att 3408  
 Arg Asn Ile Ile Leu Ala Phe Ala Gly Thr  
 Leu Arg His Gly Leu Ile  
                                  1125                      1130                      113  
 5  
 cct aat cta ctg ggt gaa gga att tat gcc  
 aga tac aat tgt cgg gat 3456  
 Pro Asn Leu Leu Gly Glu Gly Ile Tyr Ala  
 Arg Tyr Asn Cys Arg Asp  
                                  1140                      1145                      1150  
 gct gtg tgg tgg tgg ctg cag tgt atc cag  
 gat tac tgt aaa atg gtt 3504  
 Ala Val Trp Trp Trp Leu Gln Cys Ile Gln  
 Asp Tyr Cys Lys Met Val  
                                  1155                      1160                      1165  
 cca aat ggt cta gac att ctc aag tgc cca  
 gtt tcc aga atg tat cct 3552  
 Pro Asn Gly Leu Asp Ile Leu Lys Cys Pro  
 Val Ser Arg Met Tyr Pro  
                                  1170                      1175                      1180  
 aca gat gat tct gct cct ttg cct gct gcc  
 aca ctg gat cag cca ttg 3600

ttg ctg gaa tta tcc aaa aaa aat att ttc  
 cct tat cat gaa gtc cca 3936  
 Leu Leu Glu Leu Ser Lys Lys Asn Ile Phe  
 Pro Tyr His Glu Val Pro  
 1300 1305 1310  
 gta aaa aga cat gga aag gct ata aag gtc  
 tca tat gat gag tgg acc 3984  
 Val Lys Arg His Gly Lys Ala Ile Lys Val  
 Ser Tyr Asp Glu Trp Thr  
 1315 1320 1325  
 aga aaa ata caa gac aac ttt gaa aag cta  
 ttt cat gtt tcc gaa gac 4032  
 Arg Lys Ile Gln Asp Asn Phe Glu Lys Leu  
 Phe His Val Ser Glu Asp  
 1330 1335 1340  
 cct tca gat tta aat gaa aag cat cca aat  
 ctg gtt cac aaa cgt ggc 4080  
 Pro Ser Asp Leu Asn Glu Lys His Pro Asn  
 Leu Val His Lys Arg Gly  
 1345 1350 1355  
 1360  
 ata tac aaa gat agt tat gga gct tca agt  
 cct tgg tgt gac tat cag 4128  
 Ile Tyr Lys Asp Ser Tyr Gly Ala Ser Ser  
 Pro Trp Cys Asp Tyr Gln  
 1365 1370 137  
 5  
 ctc agg cct aat ttt acc ata gca atg gtt  
 gtg gcc cct gag ctc ttt 4176  
 Leu Arg Pro Asn Phe Thr Ile Ala Met Val  
 Val Ala Pro Glu Leu Phe  
 1380 1385 1390  
 act aca gaa aaa gca tgg aaa gct ttg gag  
 att gca gaa aaa aaa ttg 4224  
 Thr Thr Glu Lys Ala Trp Lys Ala Leu Glu  
 Ile Ala Glu Lys Lys Leu  
 1395 1400 1405  
 ctt ggt ccc ctt ggc atg aaa act tta gat  
 cca gat gat atg gtt tac 4272  
 Leu Gly Pro Leu Gly Met Lys Thr Leu Asp  
 Pro Asp Asp Met Val Tyr  
 1410 1415 1420  
 tgt gga att tat gac aat gca tta gac aat  
 gac aac tac aat ctt gct 4320  
 Cys Gly Ile Tyr Asp Asn Ala Leu Asp Asn  
 Asp Asn Tyr Asn Leu Ala  
 1425 1430 1435  
 1440  
 aaa ggt ttc aat tat cac caa gga cct gag  
 tgg ctg tgg cct att ggg 4368  
 Lys Gly Phe Asn Tyr His Gln Gly Pro Glu  
 Trp Leu Trp Pro Ile Gly  
 1445 1450 145

<400> 11  
 atg gag ttg gga aaa gga aaa cta ctc agg  
 act gga ctg aat gcg ttg 48  
 Met Glu Leu Gly Lys Gly Lys Leu Leu Arg  
 Thr Gly Leu Asn Ala Leu  
 1 5 10 15  
 cat caa gca gtg cat ccg atc cat ggc ctt  
 gcc tgg acc gat ggg aat 96  
 His Gln Ala Val His Pro Ile His Gly Leu  
 Ala Trp Thr Asp Gly Asn  
 20 25 30  
 caa gtt gtc cta act gat ttg cgg ctt cac  
 agt gga gag gtc aag ttt 144  
 Gln Val Val Leu Thr Asp Leu Arg Leu His  
 Ser Gly Glu Val Lys Phe  
 35 40 45  
 ggg gac tcc aaa gtc att gga cag ttt gaa  
 tgt gtc tgt ggg ttg tcc 192  
 Gly Asp Ser Lys Val Ile Gly Gln Phe Glu  
 Cys Val Cys Gly Leu Ser  
 50 55 60  
 tgg gcc cca cct gtt gca gat gat aca cct  
 gtt cta ctc gct gtc cag 240  
 Trp Ala Pro Pro Val Ala Asp Asp Thr Pro  
 Val Leu Leu Ala Val Gln  
 65 70 75 80  
 cat gag aag cat gtc act gtg tgg cag ctg  
 tgt ccc agc cct atg gag 288  
 His Glu Lys His Val Thr Val Trp Gln Leu  
 Cys Pro Ser Pro Met Glu  
 85 90 95  
 tca agc aaa tgg ctg acg tct cag act tgt  
 gag att aga gga tca cta 336  
 Ser Ser Lys Trp Leu Thr Ser Gln Thr Cys  
 Glu Ile Arg Gly Ser Leu  
 100 105 110  
 cct atc ctt ccc cag ggc tgt gtg tgg cac  
 cca aaa tgt gct att ctg 384  
 Pro Ile Leu Pro Gln Gly Cys Val Trp His  
 Pro Lys Cys Ala Ile Leu  
 115 120 125  
 act gtg ttg act gct cag gat gtc tcc att  
 ttc cct aat gtt cac tct 432  
 Thr Val Leu Thr Ala Gln Asp Val Ser Ile  
 Phe Pro Asn Val His Ser  
 130 135 140  
 gat gat tcc cag gta aag gca gac atc aac  
 acc cag ggc cgc att cac 480  
 Asp Asp Ser Gln Val Lys Ala Asp Ile Asn  
 Thr Gln Gly Arg Ile His  
 145 150 155 1  
 60

gta cgc tct atg gat aaa gag gca act gat  
 tct gaa aca aat tct gaa 816  
 Val Arg Ser Met Asp Lys Glu Ala Thr Asp  
 Ser Glu Thr Asn Ser Glu  
 260 265 270  
 gta tca gtt tct tct tcc tat tta gaa cct  
 ctg gat cta act cac ata 864  
 Val Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Glu Pro  
 Leu Asp Leu Thr His Ile  
 275 280 285  
 cat ttc aat caa cat aag tct gag ggt aat  
 tct ctt att tgt cta aga 912  
 His Phe Asn Gln His Lys Ser Glu Gly Asn  
 Ser Leu Ile Cys Leu Arg  
 290 295 300  
 aaa aag gac tac ttg aca gga act ggc caa  
 gat tct tca cat ttg gtc 960  
 Lys Lys Asp Tyr Leu Thr Gly Thr Gly Gln  
 Asp Ser Ser His Leu Val  
 305 310 315 3  
 20  
 ctt gtg acc ttt aag aag gca gtt acc atg  
 acg aga aaa gtc act att 1008  
 Leu Val Thr Phe Lys Lys Ala Val Thr Met  
 Thr Arg Lys Val Thr Ile  
 325 330 335  
 cca ggc att ctg gtt cct gat ctg ata gca  
 ttt aat ctt aaa gcc cac 1056  
 Pro Gly Ile Leu Val Pro Asp Leu Ile Ala  
 Phe Asn Leu Lys Ala His  
 340 345 350  
 gta gtg gca gtg gct tcc aac act tgt aat  
 ata att ttg atc tac tct 1104  
 Val Val Ala Val Ala Ser Asn Thr Cys Asn  
 Ile Ile Leu Ile Tyr Ser  
 355 360 365  
 gtc att cca tct tca gtc cca aac atc cag  
 caa att cga tta gag aac 1152  
 Val Ile Pro Ser Ser Val Pro Asn Ile Gln  
 Gln Ile Arg Leu Glu Asn  
 370 375 380  
 act gaa aga cca aaa ggg ata tgt ttc ttg  
 aca gac caa cta tta cta 1200  
 Thr Glu Arg Pro Lys Gly Ile Cys Phe Leu  
 Thr Asp Gln Leu Leu Leu  
 385 390 395 4  
 00  
 att ttg gta gga aaa caa aaa ctc act gat  
 aca aca ttt ctt cct tct 1248  
 Ile Leu Val Gly Lys Gln Lys Leu Thr Asp  
 Thr Thr Phe Leu Pro Ser  
 405 410 415

Leu Asp Ala Glu Pro Val Thr Gln Pro Ala  
 Ser Leu Pro Arg His Ser  
           515                          520                          525  
 agc aca cca gac cac acc agc aca ctg gag  
 cct cct cgt ttg cct caa 1632  
 Ser Thr Pro Asp His Thr Ser Thr Leu Glu  
 Pro Pro Arg Leu Pro Gln  
           530                          535                          540  
 aga aag aac tta caa agt gaa aag gaa act  
 tat cag ctg tct aag gag 1680  
 Arg Lys Asn Leu Gln Ser Glu Lys Glu Thr  
 Tyr Gln Leu Ser Lys Glu  
 545                          550                          555                          5  
 60  
 gtg gaa att tta tct agg aac ctg gtt gaa  
 atg caa cgg tgt ctt tct 1728  
 Val Glu Ile Leu Ser Arg Asn Leu Val Glu  
 Met Gln Arg Cys Leu Ser  
   565                          570                          575  
 gaa ctt aca aac cgt ctg cat aat ggg aag  
 aaa tcc tct tca gtg tat 1776  
 Glu Leu Thr Asn Arg Leu His Asn Gly Lys  
 Lys Ser Ser Ser Val Tyr  
   580                          585                          590  
 cca ctc tct caa gat ctt cct tat gtt cac  
 atc att tac cag aaa cct 1824  
 Pro Leu Ser Gln Asp Leu Pro Tyr Val His  
 Ile Ile Tyr Gln Lys Pro  
   595                          600                          605  
 tat tat cta ggt cct gtt gtt gaa aaa aga  
 gcg gtg ctt ctc tgt gat 1872  
 Tyr Tyr Leu Gly Pro Val Val Glu Lys Arg  
 Ala Val Leu Leu Cys Asp  
           610                          615                          620  
 ggt aaa cta agg ctc agt aca gtt cag cag  
 act ttt ggc ctt tct ctc 1920  
 Gly Lys Leu Arg Leu Ser Thr Val Gln Gln  
 Thr Phe Gly Leu Ser Leu  
 625                          630                          635                          6  
 40  
 att gaa atg cta cat gat tcc cac tgg att  
 ctt ctc tct gct gac agt 1968  
 Ile Glu Met Leu His Asp Ser His Trp Ile  
 Leu Leu Ser Ala Asp Ser  
   645                          650                          655  
 gag ggc ttt atc ccg tta acc ttc aca gcc  
 aca cag gaa ata atc ata 2016  
 Glu Gly Phe Ile Pro Leu Thr Phe Thr Ala  
 Thr Gln Glu Ile Ile Ile  
   660                          665                          670  
 aga gat ggc agc ctg tcc agg tca gat gtc  
 ttc aga gac tct ttt tct 2064  
 Arg Asp Gly Ser Leu Ser Arg Ser Asp Val

Ala Thr Ala Val Met Pro Asp Gly Gln Phe  
Lys Asp Ile Ser Leu Ser  
20 25 30  
gaa tac aaa gga aaa tat gtt gtg ttc ttc  
ttt tac cct ctt gac ttt 144  
Glu Tyr Lys Gly Lys Tyr Val Val Phe Phe  
Phe Tyr Pro Leu Asp Phe  
35 40 45  
act ttt gtg tgt ccc acg gag atc att gct  
ttc agt gat aga gcc gat 192  
Thr Phe Val Cys Pro Thr Glu Ile Ile Ala  
Phe Ser Asp Arg Ala Asp  
50 55 60  
gaa ttt aag aaa ctc aac tgc caa gtg att  
ggc gct tct gtg gat tct 240  
Glu Phe Lys Lys Leu Asn Cys Gln Val Ile  
Gly Ala Ser Val Asp Ser  
65 70 75 80  
cac ttc tgt cat ctg gca tgg att aac aca  
ccc aag aaa caa gga gga 288  
His Phe Cys His Leu Ala Trp Ile Asn Thr  
Pro Lys Lys Gln Gly Gly  
85 90 95  
ttg gga ccc atg aac att ccc tta ata tca  
gat ccc aag cgc acc att 336  
Leu Gly Pro Met Asn Ile Pro Leu Ile Ser  
Asp Pro Lys Arg Thr Ile  
100 105 110  
gct cag gat tat gga gtc tta aag gct gat  
gaa ggt atc tct ttc agg 384  
Ala Gln Asp Tyr Gly Val Leu Lys Ala Asp  
Glu Gly Ile Ser Phe Arg  
115 120 125  
ggc ctt ttt att att gat gat aaa ggt atc  
ctt cga cag ata aca ata 432  
Gly Leu Phe Ile Ile Asp Asp Lys Gly Ile  
Leu Arg Gln Ile Thr Ile  
130 135 140  
aac gat ctt ccc gtt ggc cgc tct gtg gat  
gag att ata cga cta gtc 480  
Asn Asp Leu Pro Val Gly Arg Ser Val Asp  
Glu Ile Ile Arg Leu Val  
145 150 155 1  
60  
cag gcc ttc cag ttc act gac aaa cat ggt  
gaa gtg tgt cca gct ggc 528  
Gln Ala Phe Gln Phe Thr Asp Lys His Gly  
Glu Val Cys Pro Ala Gly  
165 170 175  
tgg aaa cct ggc agt gat acc atc aag cct  
gat gtc aat aag agc aaa 576  
Trp Lys Pro Gly Ser Asp Thr Ile Lys Pro

caa atg agt gat gat att gac gat ata aaa  
 tgg gaa aaa act tca gac 192  
 Gln Met Ser Asp Asp Ile Asp Asp Ile Lys  
 Trp Glu Lys Thr Ser Asp  
 50 55 60  
 aag aaa aag att gca caa ttc aga aaa gag  
 aaa gag act ttc aag gaa 240  
 Lys Lys Lys Ile Ala Gln Phe Arg Lys Glu  
 Lys Glu Thr Phe Lys Glu  
 65 70 75 80  
 aaa gat aca tat aag cta ttt aaa aat gga  
 act ctg aaa att aag cat 288  
 Lys Asp Thr Tyr Lys Leu Phe Lys Asn Gly  
 Thr Leu Lys Ile Lys His  
 85 90 95  
 ctg aag acc gat gat cag gat atc tac aag  
 gta tca ata tat gat aca 336  
 Leu Lys Thr Asp Asp Gln Asp Ile Tyr Lys  
 Val Ser Ile Tyr Asp Thr  
 100 105 110  
 aaa gga aaa aat gtg ttg gaa aaa ata ttt  
 gat ttg aag att caa gag 384  
 Lys Gly Lys Asn Val Leu Glu Lys Ile Phe  
 Asp Leu Lys Ile Gln Glu  
 115 120 125  
 agg gtc tca aaa cca aag atc tcc tgg act  
 tgt atc aac acc ctg 432 185 190  
 Agg Met Gln Lys Arg Lys Arg Ser Trp Arg  
 Cys Cys Arg Ala Thr Cys 624  
 Ser 190 Glu Ser Ser Val 235 Pro Val Ser 140  
 Arg Arg Arg Lys Arg Ser gga act gac ccc  
 gaa tta 405 ctg tat caa 48000 205  
 Thr Arg Ser Val Val Met Asn Gly Ala Arg Arg  
 Arg Arg Arg Arg Tyr Arg 672  
 Asp Ile Tyr Leu Ile 150 Gly Ile Cys Gly 155 1  
 Gly Gly Ser Leu Leu Met  
 gat 200 aaa cat cta aaa 215 tct cag agg 220  
 gtc atc gcg gaa aag cgg gtc 235 tct tat atc  
 Asp Arg Arg Ala Ala Arg Leu 20er Gln Arg  
 Val Phe Val Ala Lys Leu Val Phe Tyr Ile  
 Thr Lys Arg Lys 195 Gln 170 175  
 225 acc agc ctg agt 200 aaa ttc aag tgc 235 2  
 40a gca ggg aac aaa gtc 576  
 Arg Arg Arg Arg Ser Arg Arg Arg Arg  
 Arg Arg Arg Arg Arg Arg 768  
 Arg Ser Arg Arg Asn Asp Glu Glu Leu Glu  
 Thr Arg Ala His Arg Val  
 245 250 255  
 gct act gaa gaa agg ggc cgg aag ccc caa  
 caa att cca gct tca acc 816  
 Ala Thr Glu Glu Arg Gly Arg Lys Pro Gln  
 Gln Ile Pro Ala Ser Thr

cag cac cag cct cag aag agg cct cct gct  
 ccg tcg ggc aca caa gtt 960  
 Gln His Gln Pro Gln Lys Arg Pro Pro Ala  
 Pro Ser Gly Thr Gln Val  
 305 310 315 3  
 20  
 cac cag cag aaa ggc ccg ccc ctc ccc aga  
 cct cga gtt cag cca aaa 1008  
 His Gln Gln Lys Gly Pro Pro Leu Pro Arg  
 Pro Arg Val Gln Pro Lys  
 325 330 335  
 cct ccc cat ggg gca gca gaa aac tca ttg  
 tcc cct tcc tct aat 1053  
 Pro Pro His Gly Ala Ala Glu Asn Ser Leu  
 Ser Pro Ser Ser Asn  
 340 345 350  
 <210> 14  
 <211> 321  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 14  
 aat gat gag gag ctg gag aca aga gcc cac  
 aga gta gct act gaa gaa 48  
 Asn Asp Glu Glu Leu Glu Thr Arg Ala His  
 Arg Val Ala Thr Glu Glu  
 1 5 10 15  
 agg ggc cgg aag ccc caa caa att cca gct  
 tca acc cct cag aat cca 96  
 Arg Gly Arg Lys Pro Gln Gln Ile Pro Ala  
 Ser Thr Pro Gln Asn Pro  
 20 25 30  
 gca act tcc caa cat cct cct cca cca cct  
 ggt cat cgt tcc cag gca 144  
 Ala Thr Ser Gln His Pro Pro Pro Pro Pro  
 Gly His Arg Ser Gln Ala  
 35 40 45  
 cct agt cat cgt ccc ccg cct cct gga cac  
 cgt gtt cag cac cag cct 192  
 Pro Ser His Arg Pro Pro Pro Pro Gly His  
 Arg Val Gln His Gln Pro  
 50 55 60  
 cag aag agg cct cct gct ccg tcg ggc aca  
 caa gtt cac cag cag aaa 240  
 Gln Lys Arg Pro Pro Ala Pro Ser Gly Thr  
 Gln Val His Gln Gln Lys  
 65 70 75 80  
 ggc ccg ccc ctc ccc aga cct cga gtt cag  
 cca aaa cct ccc cat ggg 288  
 Gly Pro Pro Leu Pro Arg Pro Arg Val Gln  
 Pro Lys Pro Pro His Gly  
 85 90 95  
 gca gca gaa aac tca ttg tcc cct tcc tct

1	5	10	15
---	---	----	----

Gln Glu  
 <210> 16  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 <220>  
 <221> unsure  
 <222> (1)  
 <223> Xaa is unsure  
 <220>  
 <221> unsure  
 <222> (3)  
 <223> Xaa is unsure  
 <220>  
 <221> unsure  
 <222> (10)  
 <223> Xaa is unsure  
 <220>  
 <221> unsure  
 <222> (11)  
 <223> Xaa is unsure  
 <220>  
 <221> unsure  
 <222> (12)  
 <223> Xaa is unsure  
 <400> 16  
 Xaa Val Xaa Arg Pro Asn Phe Glu Glu Xaa  
 Xaa Xaa Thr

1	5	10
---	---	----

<210> 17  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 <220>  
 <221> unsure  
 <222> (1)  
 <223> Xaa is unsure  
 <220>  
 <221> unsure  
 <222> (8)  
 <223> Xaa is unsure  
 <220>  
 <221> unsure  
 <222> (9)  
 <223> Xaa is unsure  
 <220>  
 <221> unsure  
 <222> (14)  
 <223> Xaa is unsure

<400> 17  
 Xaa Leu Leu Glu Ile Gln Gln Xaa Xaa Ala  
 Arg Gln Met Xaa Lys  
           1                  5                  10                  15  
 <210> 18  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 <220>  
 <221> unsure  
 <222> (1)  
 <223> Xaa is unsure  
  
 <220>  
 <221> unsure  
 <222> (8)  
 <223> Xaa is unsure  
 <400> 18  
 Xaa Val Ala Tyr Leu Gln Asp Xaa Ala Leu  
           1                  5                  10  
 <210> 19  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 <220>  
 <221> unsure  
 <222> (1)  
 <223> Xaa is unsure  
 <400> 19  
 Xaa Pro Ser Asp Leu Leu Glu Lys  
           1                  5  
 <210> 20  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
  
 <400> 20  
 Ile Glu Asn Asn Phe Glu Lys  
           1                  5  
 <210> 21  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 <400> 21  
 Ala Val Glu Gln Phe Arg Arg Leu Leu Thr  
 Gln Glu Asn Arg Arg Val  
           1                  5                  10                  15  
 Thr Lys  
 <210> 22  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<220>  
 <221> unsure  
 <222> (6)  
 <223> Xaa is unsure  
 <400> 22  
 Ile Pro Phe Ala Ser Xaa Ala Ser Arg  
   1                  5  
 <210> 23  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 <220>  
 <221> unsure  
 <222> (5)  
 <223> Xaa is unsure  
 <220>  
 <221> unsure  
 <222> (7)  
 <223> Xaa is unsure  
 <400> 23  
 Phe Pro Ser Leu Xaa Ile Xaa Ser Pro  
   1                  5  
 <210> 24  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 <400> 24  
 Ala Val Thr Val Tyr Thr Asp Tyr Pro Leu  
 Pro Gly Glu Ala Phe Asp  
   1                  5                  10                  15  
 Arg Glu Lys  
 <210> 25  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 <220>  
 <221> unsure  
 <222> (4)  
 <223> Xaa is unsure  
 <220>  
 <221> unsure  
 <222> (9)  
 <223> Xaa is unsure  
 <400> 25  
 His Gly Glu Val Xaa Pro Ala Gly Xaa Lys  
   1                  5                  10  
 <210> 26  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 <400> 26

Asp Ile Ser Leu Ser Glu Tyr

1 5

<210> 27

<211> 16

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> unsure

<222> (13)

<223> Xaa is unsure

<400> 27

Glu Gly Gly Leu Gly Pro Met Asn Ieu Pro

Leu Ile Xaa Asp Pro Lys

1 5 10 15

<210> 28

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 28

Glu Thr Tyr Gln Lys Ser Lys

1 5

<210> 29

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 29

Pro Tyr Tyr Leu Gly Pro Val Val Glu Lys

1 5 10

<210> 30

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> unsure

<222> (4)

<223> Xaa is unsure

<400> 30

Leu Ile Glu Xaa Leu Ser

1 5

<210> 31

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> unsure

<222> (4)

<223> Xaa is unsure

<220>

<221> unsure

<222> (12)

<223> Xaa is unsure



aaa ttc cgt tct ctg gat tgg gaa aat cca  
 aca gaa aga gaa gat gat 336  
 Lys Phe Arg Ser Leu Asp Trp Glu Asn Pro  
 Thr Glu Arg Glu Asp Asp  
 100 105 110  
 tct gat aaa tac tgt aaa ctt aat ctg caa  
 caa tct ggt tca ttt cag 384  
 Ser Asp Lys Tyr Cys Lys Leu Asn Leu Gln  
 Gln Ser Gly Ser Phe Gln  
 115 120 125  
 tat tat ttc ctt caa gga aat gag aaa agt  
 ggt gga ggt tac ata gtt 432  
 Tyr Tyr Phe Leu Gln Gly Asn Glu Lys Ser  
 Gly Gly Gly Tyr Ile Val  
 130 135 140  
 gtg gac ccc att tta cgt gtt ggt gct gat  
 aat cat gtg cta ccc ttg 480  
 Val Asp Pro Ile Leu Arg Val Gly Ala Asp  
 Asn His Val Leu Pro Leu  
 145 150 155 1  
 60  
 gac tgt gtt act ctt cag aca ttt tta gct  
 aag tgt ttg gga cct ttt 528  
 Asp Cys Val Thr Leu Gln Thr Phe Leu Ala  
 Lys Cys Leu Gly Pro Phe  
 165 170 175  
 gat gaa tgg gaa agc aga ctt agg gtt gca  
 aaa gaa tca ggc tac aac 576  
 Asp Glu Trp Glu Ser Arg Leu Arg Val Ala  
 Lys Glu Ser Gly Tyr Asn  
 180 185 190  
 atg att cat ttt acc cca ttg cag act ctt  
 gga cta tct agg tca tgc 624  
 Met Ile His Phe Thr Pro Leu Gln Thr Leu  
 Gly Leu Ser Arg Ser Cys  
 195 200 205  
 tac tcc ctt gcc aat cag tta gaa tta aat  
 cct gac ttt tca aga cct 672  
 Tyr Ser Leu Ala Asn Gln Leu Glu Leu Asn  
 Pro Asp Phe Ser Arg Pro  
 210 215 220  
 aat aga aag tat acc tgg aat gat gtt gga  
 cag cta gtg gaa aaa tta 720  
 Asn Arg Lys Tyr Thr Trp Asn Asp Val Gly  
 Gln Leu Val Glu Lys Leu  
 225 230 235 2  
 40  
 aaa aag gaa tgg aat gtt att tgt att act  
 gat gtt gtc tac aat cat 768  
 Lys Lys Glu Trp Asn Val Ile Cys Ile Thr  
 Asp Val Val Tyr Asn His  
 245 250 255

Leu Thr Gln Glu Asn Arg Arg Val Thr Lys  
 Ser Asp Pro Asn Gln His  
 355 360 365  
 ctt acg att att caa gat cct gaa tac aga  
 cgg ttt ggc tgt act gta 1152  
 Leu Thr Ile Ile Gln Asp Pro Glu Tyr Arg  
 Arg Phe Gly Cys Thr Val  
 370 375 380  
 gat atg aac att gca cta acg act ttc ata  
 cca cat gac aag ggg cca 1200  
 Asp Met Asn Ile Ala Leu Thr Thr Phe Ile  
 Pro His Asp Lys Gly Pro  
 385 390 395 4  
 00  
 gca gca att gaa gaa tgc tgt aat tgg ttt  
 cat aaa ~~aga~~ atg gag gaa 1248  
 Ala Ala Ile Glu Glu Cys Cys Asn Trp Phe  
 His Lys ~~Asp~~ Met Glu Glu 440 445  
 ggt cca aaa cta ~~gga~~ cct gtc act aga ~~440~~ 415  
~~caa aat tca gag aag agg cga~~ ~~302~~ att aac  
~~Gly Phe Cys Gaa Gag Gca~~ Val ~~1206~~ Arg Lys  
~~His Asp Ser Gln Tyr His~~ Arg Leu Ile Asn  
 Tyr ~~450~~ Gln Glu Gln Ala 455 460  
 tat ttt act ~~420~~ cca ttt gaa gag ~~425~~ gac 430  
~~gtc aac agc gaa gag gga~~ aa ~~1400~~ ttt tat  
~~Gaa Phe Thr Gln Gln Gln~~ Glu ~~1304~~ Ile Asp  
~~Phe Ser Asp Ser Ser Ser~~ Asn Val Phe Tyr  
~~465~~ Arg Leu Ala Gly ~~470~~ 475 4  
 80  
 atg att cat ctg cca aat aaa gct tgt ttt  
 ctg atg gca cac aat gga 1488  
 Met Ile His Leu Pro Asn Lys Ala Cys Phe  
 Leu Met Ala His Asn Gly  
 485 490 495  
 tgg gta atg gga gat gat cct ctt cga aac  
 ttt gct gaa ccg ggt tca 1536  
 Trp Val Met Gly Asp Asp Pro Leu Arg Asn  
 Phe Ala Glu Pro Gly Ser  
 500 505 510  
 gaa gtt tac cta agg aga gaa ctt att tgc  
 tgg gga gac agt gtt aaa 1584  
 Glu Val Tyr Leu Arg Arg Glu Leu Ile Cys  
 Trp Gly Asp Ser Val Lys  
 515 520 525  
 tta cgc tat ggg aat aaa cca gag gac tgt  
 cct tat ctc tgg gca cac 1632  
 Leu Arg Tyr Gly Asn Lys Pro Glu Asp Cys  
 Pro Tyr Leu Trp Ala His  
 530 535 540  
 atg aaa aaa tac act gaa ata act gca act  
 tat ttc cag gga gta cgt 1680  
 Met Lys Lys Tyr Thr Glu Ile Thr Ala Thr  
 Tyr Phe Gln Gly Val Arg

Ile Ser Ser Leu Ile Arg Glu Ala Met Ser  
 Ala Tyr Asn Ser His Glu  
 610 615 620  
 gag ggc aga tta gtt tac cga tat gga gga  
 gaa cct gtt gga tcc ttt 1920  
 Glu Gly Arg Leu Val Tyr Arg Tyr Gly Gly  
 Glu Pro Val Gly Ser Phe  
 625 630 635 6  
 40  
 gtt cag ccc tgt ttg agg cct tta atg cca  
 gct att gca cat gcc ctg 1968  
 Val Gln Pro Cys Leu Arg Pro Leu Met Pro  
 Ala Ile Ala His Ala Leu  
 645 650 655  
 ttt atg gat att acg cat gat aat gag tgt  
 cct att gtg cat aga tca 2016  
 Phe Met Asp Ile Thr His Asp Asn Glu Cys  
 Pro Ile Val His Arg Ser  
 660 665 670  
  
 gcg tat gat gct ctt cca agt act aca att  
 gtt tct atg gca tgt tgt 2064  
 Ala Tyr Asp Ala Leu Pro Ser Thr Thr Ile  
 Val Ser Met Ala Cys Cys  
 675 680 685  
 gct agt gga agt aca aga ggc tat gat gaa  
 tta gtg cct cat cag att 2112  
 Ala Ser Gly Ser Thr Arg Gly Tyr Asp Glu  
 Leu Val Pro His Gln Ile  
 690 695 700  
 tca gtg gtt tct gaa gaa cgg ttt tac act  
 aag tgg aat cct gaa gca 2160  
 Ser Val Val Ser Glu Glu Arg Phe Tyr Thr  
 Lys Trp Asn Pro Glu Ala  
 705 710 715 7  
 20  
 ttg cct tca aac aca ggt gaa gtt aat ttc  
 caa agc ggc att att gca 2208  
 Leu Pro Ser Asn Thr Gly Glu Val Asn Phe  
 Gln Ser Gly Ile Ile Ala  
 725 730 735  
 gcc agg tgt gct atc agt aaa ctt cat cag  
 gag ctt gga gcc aag ggt 2256  
 Ala Arg Cys Ala Ile Ser Lys Leu His Gln  
 Glu Leu Gly Ala Lys Gly  
 740 745 750  
 ttt att cag gtg tat gtg gat caa gtt gat  
 gaa gac ata gtg gca gta 2304  
 Phe Ile Gln Val Tyr Val Asp Gln Val Asp  
 Glu Asp Ile Val Ala Val  
 755 760 765  
 aca aga cac tca cct agc atc cat cag tct  
 gtt gtg gct gta tct aga 2352



agg gat act ttt att gca ctt aga ggt ata  
ctg ctg att act aga cgc 3456  
Arg Asp Thr Phe Ile Ala Leu Arg Gly Ile  
Leu Leu Ile Thr Arg Arg  
1140 1145 1150

tat gta gaa gcc agg aat att att tta gca  
ttt gcg ggt acc ctg agg 3504  
Tyr Val Glu Ala Arg Asn Ile Ile Leu Ala  
Phe Ala Gly Thr Leu Arg  
1155 1160 1165

cat ggt ctc att cct aat cta ctg ggt gaa  
gga att tat gcc aga tac 3552  
His Gly Leu Ile Pro Asn Leu Leu Gly Glu  
Gly Ile Tyr Ala Arg Tyr  
1170 1175 1180

aat tgt cgg gat gct gtg tgg tgg tgg ctg  
cag tgt atc cag gat tac 3600  
Asn Cys Arg Asp Ala Val Trp Trp Trp Leu  
Gln Cys Ile Gln Asp Tyr  
1185 1190 1195

1200

tgt aaa ~~atg~~ gtt cca aat ggt cta gac att  
ctc aag tgc cca gtt tcc 3648  
Gly Gln Met Val Phe Asn Gly Arg Asp Ala  
Gly Phe Cys Phe Val Ser  
1250 1205 1255 1210 1260 121

aac atg aag gac gaa ggt ttt aat ata act  
gga ggg gat gat gaa gaa gaa 3840  
Asn Met Gln Asp Ala Gly Phe Ile Thr  
Arg Val Asp Thr Asp Asp Ser Ala Pro  
1205 Pro Ala Gly Thr 1270 1275

1280 1220 1225 1230

gaa ggg cca gtg tat gga gga aaa cgg gaa  
gaa agg gga aaa cgg atg 3888  
Asp Gly Phe Val Phe Gly Val Asn Arg Phe  
Asn Asp Gly Thr His Met  
1235 1285 1240 1290 1245 129

bag ggc ata cag ttc cga gaa agg aat gct  
ggt aaa aag gga gaa aga ga 780  
aac aga gga atc cca gcc 3936  
Asp Lys Met Gly Glu Ser Asp Arg Ala Arg  
Asn Arg Gly Ile Pro Ala  
1300 1305 1310

aca cca aga gat ggg tct gct gtg gaa att  
gtg ggc ctg agt aaa tct 3984  
Thr Pro Arg Asp Gly Ser Ala Val Glu Ile  
Val Gly Leu Ser Lys Ser  
1315 1320 1325

gct gtt cgc tgg ttg ctg gaa tta tcc aaa  
aaa aat att ttc cct tat 4032  
Ala Val Arg Trp Leu Leu Glu Leu Ser Lys  
Lys Asn Ile Phe Pro Tyr

cac aaa cgt ggc ata tac aaa gat agt tat  
gga gct tca agt cct tgg 4224  
His Lys Arg Gly Ile Tyr Lys Asp Ser Tyr  
Gly Ala Ser Ser Pro Trp  
1395 1400 1405  
tgt gac tat cag ctc agg cct aat ttt acc  
ata gca atg gtt gtg gcc 4272  
Cys Asp Tyr Gln Leu Arg Pro Asn Phe Thr  
Ile Ala Met Val Val Ala  
1410 1415 1420  
cct gag ctc ttt act aca gaa aaa gca tgg  
aaa gct ttg gag att gca 4320  
Pro Glu Leu Phe Thr Thr Glu Lys Ala Trp  
Lys Ala Leu Glu Ile Ala  
1425 1430 1435  
1440  
gaa aaa aaa ttg ctt ggt ccc ctt ggc atg  
aaa act tta gat cca gat 4368  
Glu Lys Lys Leu Leu Gly Pro Leu Gly Met  
Lys Thr Leu Asp Pro Asp  
1445 1450 1455  
5  
gat atg gtt tac tgt gga att tat gac aat  
gca tta gac aat gac aac 4416  
Asp Met Val Tyr Cys Gly Ile Tyr Asp Asn  
Ala Leu Asp Asn Asp Asn  
1460 1465 1470  
tac aat ctt gct aaa ggt ttc aat tat cac  
caa gga cct gag tgg ctg 4464  
Tyr Asn Leu Ala Lys Gly Phe Asn Tyr His  
Gln Gly Pro Glu Trp Leu  
1475 1480 1485  
  
tgg cct att ggg tat ttt ctt cgt gca aaa  
tta tat ttt tcc aga ttg 4512  
Trp Pro Ile Gly Tyr Phe Leu Arg Ala Lys  
Leu Tyr Phe Ser Arg Leu  
1490 1495 1500  
atg ggc ccg gag act act gca aag act ata  
gtt ttg gtt aaa aat gtt 4560  
Met Gly Pro Glu Thr Thr Ala Lys Thr Ile  
Val Leu Val Lys Asn Val  
1505 1510 1515  
1520  
ctt tcc cga cat tat gtt cat ctt gag aga  
tcc cct tgg aaa gga ctt 4608  
Leu Ser Arg His Tyr Val His Leu Glu Arg  
Ser Pro Trp Lys Gly Leu  
1525 1530 1535  
5  
cca gaa ctg acc aat gag aat gcc cag tac  
tgt cct ttc agc tgt gaa 4656  
Pro Glu Leu Thr Asn Glu Asn Ala Gln Tyr

<212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <400> 39  
 gactctcgag atgtcttcag gaaatgcaaa aatt  
 34

<210> 40  
 <211> 32  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <400> 40  
 gatcggatcc tgggccagtg ctacttctg ct  
 32

<210> 41  
 <211> 33  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <400> 41  
 gatcctcgag aatgatgagg agctggagac aag  
 33

<210> 42  
 <211> 35  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <400> 42  
 gatcggatcc ttaattagag gaaggggaca ataa  
 g 35

<210> 43  
 <211> 341  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 43  
 Met Pro Lys Arg Lys Val Thr Phe Gln Gly  
 Val Gly Asp Glu Glu Asp  
 1 5 10 15  
 Glu Asp Glu Ile Ile Val Pro Lys Lys Lys  
 Leu Val Asp Pro Val Ala  
 20 25 30  
 Gly Ser Gly Gly Pro Gly Ser Arg Phe Lys  
 Gly Lys His Ser Leu Asp  
 35 40 45  
 Ser Asp Glu Glu Glu Asp Asp Asp Asp Gly  
 Gly Ser Ser Lys Tyr Asp  
 50 55 60  
 Ile Leu Ala Ser Glu Asp Val Glu Gly Gln  
 Glu Ala Ala Thr Leu Pro  
 65 70 75 80  
 Ser Glu Gly Gly Val Arg Ile Thr Pro Phe  
 Asn Leu Gln Glu Glu Met  
 85 90 95  
 Glu Glu Gly His Phe Asp Ala Asp Gly Asn  
 Tyr Phe Leu Asn Arg Asp

Arg Leu Gly Ala Arg Gly Gly Gly Lys Gly  
 Arg Lys Gly Pro Gly Gln  
 180 185 190

Pro Ser Ser Pro Gln Arg Leu Asp Arg Leu  
 Ser Gly Leu Ala Asp Gln  
 195 200 205

Met Val Ala Arg Gly Asn Leu Gly Val Tyr  
 Gln Glu Thr Arg Glu Arg  
 210 215 220

Leu Ala Met Arg Leu Lys Gly Leu Gly Cys  
 Gln Thr Leu Gly Pro His  
 225 230 235 2

40  
 Asn Pro Thr Pro Pro Pro Ser Leu Asp Met  
 Phe Ala Glu Glu Leu Ala  
 245 250 255

Glu Glu Glu Leu Glu Thr Pro Thr Pro Thr  
 Gln Arg Gly Glu Ala Glu  
 260 265 270

Ser Arg Gly Asp Gly Leu Val Asp Val Met  
 Trp Glu Tyr Lys Trp Glu  
 275 280 285

Asn Thr Gly Asp Ala Glu Leu Tyr Gly Pro  
 Phe Thr Ser Ala Gln Met  
 290 295 300

Gln Thr Trp Val Ser Glu Gly Tyr Phe Pro  
 Asp Gly Val Tyr Cys Arg  
 305 310 315 3

20  
 Lys Leu Asp Pro Pro Gly Gly Gln Phe Tyr  
 Asn Ser Lys Arg Ile Asp  
 325 330 335

Phe Asp Leu Tyr Thr  
 340

<210> 44  
 <211> 1023  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 44

atg cca aag agg aaa gtg acc ttc caa ggc  
 gtg gga gat gag gag gat 48  
 Met Pro Lys Arg Lys Val Thr Phe Gln Gly  
 Val Gly Asp Glu Glu Asp  
 1 5 10 15

gag gat gaa atc att gtc ccc aag aag aag  
 ctg gtg gac cct gtg gct 96  
 Glu Asp Glu Ile Ile Val Pro Lys Lys Lys  
 Leu Val Asp Pro Val Ala  
 20 25 30

ggg tca ggg ggt cct ggg agc cgc ttt aaa  
 ggc aaa cac tct ttg gat 144  
 Gly Ser Gly Gly Pro Gly Ser Arg Phe Lys

gct cag atc cga gac agc tgg ctg gac aac  
 att gac tgg gtg aag atc 384  
 Ala Gln Ile Arg Asp Ser Trp Leu Asp Asn  
 Ile Asp Trp Val Lys Ile  
 115 120 125  
 cgg gag cgg cca cct ggc cag cgc cag gcc  
 tca gac tcg gag gag gag 432  
 Arg Glu Arg Pro Pro Gly Gln Arg Gln Ala  
 Ser Asp Ser Glu Glu Glu  
 130 135 140  
 gac agc ttg ggc cag acc tca atg agt gcc  
 caa gcc ctc ttg gag gga 480  
 Asp Ser Leu Gly Gln Thr Ser Met Ser Ala  
 Gln Ala Leu Leu Glu Gly  
 145 150 155 1  
 60  
 ctt ttg gag ctc cta ttg cct aga gag aca  
 gtg gct ggg gca ctg agg 528  
 Leu Leu Glu Leu Leu Leu Pro Arg Glu Thr  
 Val Ala Gly Ala Leu Arg  
 165 170 175  
 cgt ctg ggg gcc cga gga gga ggc aaa ggg  
 aga aag ggg cct ggg caa 576  
 Arg Leu Gly Ala Arg Gly Gly Gly Lys Gly  
 Arg Lys Gly Pro Gly Gln  
 180 185 190  
 ccc agt tcc cct cag cgc ctg gac cgg ctc  
 tcc ggg ttg gcc gac cag 624  
 Pro Ser Ser Pro Gln Arg Leu Asp Arg Leu  
 Ser Gly Leu Ala Asp Gln  
 195 200 205  
 atg gtg gcc cgg ggc aac ctt ggt gtg tac  
 cag gaa aca agg gaa cgg 672  
 Met Val Ala Arg Gly Asn Leu Gly Val Tyr  
 Gln Glu Thr Arg Glu Arg  
 210 215 220  
 ttg gct atg cgt ctg aag ggt ttg ggg tgt  
 cag acc cta gga ccc cac 720  
 Leu Ala Met Arg Leu Lys Gly Leu Gly Cys  
 Gln Thr Leu Gly Pro His  
 225 230 235 2  
 40  
 aat ccc aca ccc cca ccc tcc ctg gac atg  
 ttc gct gag gag ttg gcg 768  
 Asn Pro Thr Pro Pro Pro Ser Leu Asp Met  
 Phe Ala Glu Glu Leu Ala  
 245 250 255  
 gag gag gaa ctg gag acc cca acc cct acc  
 cag aga gga gaa gca gag 816  
 Glu Glu Glu Leu Glu Thr Pro Thr Pro Thr  
 Gln Arg Gly Glu Ala Glu  
 260 265 270  
 tcg cgg gga gat ggt ctg gtg gat gtg atg

Met Gly Glu Arg Lys Cys Trp Leu Ser Thr  
 Ser Arg Arg Thr Arg Trp  
 1 5 10 15  
 Val Pro Glu Glu Leu Gln Asp Lys Glu Phe  
 Ala Ala Val Leu Gln Asp  
 20 25 30  
 Glu Pro Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Pro  
 Leu Thr Glu Glu Glu Gln  
 35 40 45  
 Ala Ala Ala Val Val Thr Ala Ala Phe Thr  
 Lys Glu Ala Ser Lys Lys  
 50 55 60  
 Ala Met Gly Pro Leu Asp Glu Ala Pro Gly  
 Lys Ser Ser Ala Ala Arg  
 65 70 75 80  
 Ala Gly Met Thr Ala Arg Cys Gly Phe Glu  
 Glu Gly Gly Ala Gly Pro  
 85 90 95  
 Arg Lys Glu His Ala Arg Ser Asp Ser Glu  
 Asn Trp Arg Ser Leu Arg  
 100 105 110  
 Glu Glu Gln Glu Glu Glu Glu Glu Gly Ser  
 Trp Arg Leu Gly Ala Gly  
 115 120 125  
 Pro Arg Arg Asp Gly Asp Arg Trp Arg Ser  
 Ala Ser Pro Asp Gly Gly  
 130 135 140  
 Pro Arg Ser Ala Gly Trp Arg Glu His Gly  
 Glu Arg Arg Arg Lys Phe  
 145 150 155 1  
 60  
 Glu Phe Asp Leu Arg Gly Asp Arg Gly Gly  
 Cys Gly Glu Glu Gly  
 165 170 175  
 Arg Gly Gly Gly Gly Ser Ser His Leu Arg  
 Arg Cys Arg Ala Pro Glu  
 180 185 190  
 Gly Phe Glu Glu Asp Lys Asp Gly Leu Pro  
 Glu Trp Cys Leu Asp Asp  
 195 200 205  
 Glu Asp Glu Glu Met Gly Thr Phe Asp Ala  
 Ser Gly Ala Phe Leu Pro  
 210 215 220  
 Leu Lys Leu Phe Ser Ala Pro His Pro Gly  
 Pro Met Gln Lys Gly Pro  
 225 230 235 2  
 40  
 Lys Glu Pro Ile Pro Glu Glu Gln Glu Leu  
 Asp Phe Gln Gly Leu Glu  
 245 250 255  
 Glu Glu Glu Glu Pro Ser Glu Gly Leu Glu

Ser Leu Leu Val Lys Arg Gly Cys Asp Glu  
 Gly Phe Gln Pro Leu Gly  
 385 390 395 4  
 00  
 Glu Val Ile Lys Met Trp Gly Arg Val Pro  
 Phe Ala Pro Gly Pro Ser  
 405 410 415  
 Pro Pro Pro Leu Leu Gly Asn Met Asp Gln  
 Glu Arg Leu Lys Lys Gln  
 420 425 430  
 Gln Glu Leu Ala Ala Ala Ala Leu Tyr Gln  
 Gln Leu Gln His Gln Gln  
 435 440 445  
 Phe Leu Gln Leu Val Ser Ser Arg Gln Leu  
 Pro Gln Cys Ala Leu Arg  
 450 455 460  
 Glu Lys Ala Ala Leu Gly Asp Leu Thr Pro  
 Pro Pro Pro Pro Pro Pro  
 465 470 475 4  
 80  
 Gln Gln Gln Gln Gln Gln Leu Thr Ala Phe  
 Leu Gln Gln Leu Gln Ala  
 485 490 495  
 Leu Lys Pro Pro Ser Ser Arg Ser Ala Glu  
 Lys Trp Ser Ser Gly Arg  
 500 505 510  
 Ser Gly Arg Lys Arg Asn Ala Ser Val Glu  
 Arg Arg Ser Ala Ala Ser  
 515 520 525  
 Ser Ser Arg Arg Ser Arg Ser Gly Gly Arg  
 Arg Arg Lys Ser Cys Phe  
 530 535 540  
 Gly Ala Ser Thr Trp Gly Leu Ser Met Lys  
 Thr Leu Leu Glu Leu Gln  
 545 550 555 5  
 60  
 Leu Glu Gly Glu Arg Gln Leu His Lys Gln  
 Pro Pro Pro Arg Glu Pro  
 565 570 575  
 Ala Arg Ala Gln Ala Pro Asn His Arg Val  
 Gln Leu Gly Gly Leu Gly  
 580 585 590  
 Thr Ala Pro Leu Asn Gln Trp Val Ser Glu  
 Ala Gly Pro Leu Trp Gly  
 595 600 605  
 Gly Pro Asp Lys Ser Gly Gly Gly Ser Ser  
 Gly Leu Gly Leu Trp Glu  
 610 615 620  
 Asp Thr Pro Lys Ser Gly Gly Ser Leu Val  
 Arg Gly Leu Gly Leu Lys  
 625 630 635 6  
 40  
 Asn Ser Arg Ser Ser Pro Ser Leu Ser Asp

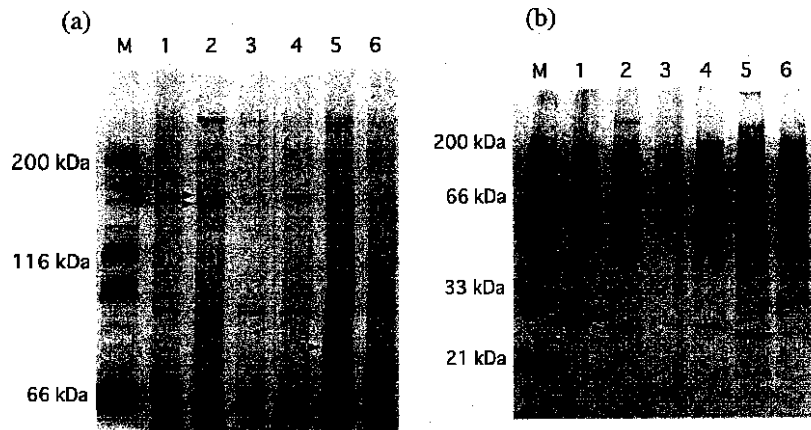


Met Val Ala Tyr Leu Gln Asp Ser Ala Leu  
 Asp Asp Glu Arg Leu Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Lys Leu Gln Glu His Arg Ala Lys Gly  
 Val Ser Ile Pro Leu Met  
 20 25 30  
 His Glu Ala Met Gln Lys Trp Tyr Tyr Lys  
 Asp Pro Gln Gly Glu Ile  
 35 40 45  
 Gln Gly Pro Phe Asn Asn Gln Glu Met Ala  
 Glu Trp Phe Gln Ala Gly  
 50 55 60  
 Tyr Phe Thr Met Ser Leu Leu Val Lys Arg  
 Ala Cys Asp Glu Ser Phe  
 65 70 75 80  
 Gln Pro Leu Gly Asp Ile Met Lys Met Trp  
 Gly Arg Val Pro Phe Ser  
 85 90 95  
 Pro Gly Phe Ala Pro Pro Pro His Met Gly 78

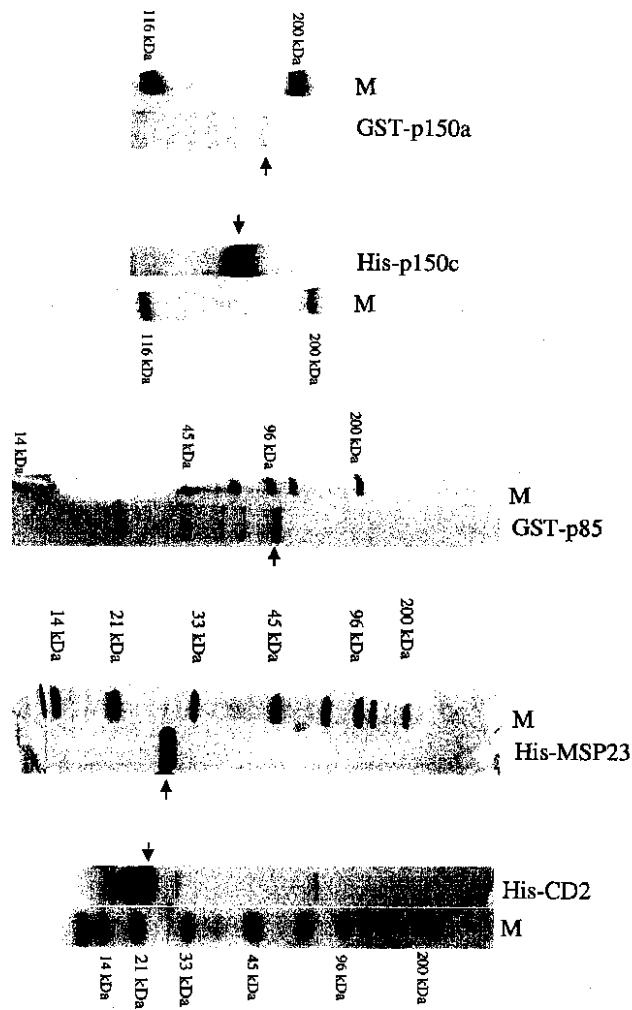
【図面の簡単な説明】  
 【図1】CTLL-2およびJurkatの細胞抽出液からの蛋白質105の精製を示す図である。図1(a)は、SGNEGDE粒子によるSDS-PAGE、(b)はL6固定化粒子によるSDS-PAGEを示す。(a)のlane2の上の矢印はp150d20、(a)のlane2の下、(b)のlane5の下の矢印はp150c、(b)のlane2の矢印はp27を示している。  
 【図2】組換えGST-p150d20、組換えHis-p150c、組換えGST-p85、組換えHis-p27、組換えHis-CD2のSDS-PAGEの結果を示す図である。  
 【符号の説明】  
 1 SGNEGDE粒子によるCTLL-2細胞抽出液から精製され

た蛋白質  
 2 LK6-A固定化粒子によるCTLL-2細胞抽出液から精製された蛋白質  
 3 LK6D7固定化粒子によるCTLL-2細胞抽出液から精製された蛋白質25  
 4 SGNEGDE粒子によるJurkat細胞抽出液から精製された蛋白質  
 5 LK6-A固定化粒子によるJurkat細胞抽出液から精製された蛋白質  
 6 LK6D7固定化粒子によるJurkat細胞抽出液から精製された蛋白質  
 M 分子量マーカー

【図1】



【図2】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マ-コ-ト (参考)
C 1 2 N 1/21		C 1 2 P 21/02	C 4 C 0 8 4
5/10		C 1 2 Q 1/68	A 4 C 0 8 6
C 1 2 P 21/02		G 0 1 N 33/15	Z 4 H 0 4 5
C 1 2 Q 1/68		33/50	Z
G 0 1 N 33/15		33/53	D
33/50		33/566	
33/53		A 6 1 K 31/4745	
33/566		C 1 2 N 15/00	Z N A A
// A 6 1 K 31/4745		5/00	B
			C

(72)発明者 岡崎 彰  
 東京都町田市旭町3丁目6番6号 協和醗  
 酵工業株式会社東京研究所内

(72)発明者 杉本 整治  
 東京都千代田区大手町1丁目6番1号 協  
 和醗酵工業株式会社本社内

(72)発明者 小根山 千歳  
東京都町田市旭町3丁目6番6号 協和醗  
酵工業株式会社東京研究所内

Fターム(参考) 2G045 AA34 AA35 BB01 BB07 BB10  
BB20 BB24 BB50 BB51 DA13  
DA36 FB02  
4B024 AA11 BA80 CA04 DA06 EA04  
GA11 HA12  
4B063 QA18 QQ08 QQ13 QQ42 QR59  
QR77 QR80 QS12 QS24 QS28  
4B064 AG01 CA02 CA19 CC24 DA13  
4B065 AA26X AA93Y AB01 AC14  
CA24 CA46  
4C084 AA17 MA01 NA14 ZB072  
4C086 AA01 AA02 CB05 MA01 MA04  
NA14 ZB07  
4H045 AA10 AA20 AA30 BA10 CA40  
DA76 DA86 EA50 FA74

专利名称(译)	用于搜索与LK6-A或其衍生物结合的蛋白质的方法，使用该蛋白质和蛋白质搜索免疫抑制剂的方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP2003235587A</a>	公开(公告)日	2003-08-26
申请号	JP2002362849	申请日	2002-12-13
[标]申请(专利权)人(译)	国立大学法人东京工业大学		
申请(专利权)人(译)	东京工业大学长 协和醱酵工业株式会社		
[标]发明人	半田宏 冈崎彰 杉本整治 小根山千歳		
发明人	半田 宏 冈崎 彰 杉本 整治 小根山 千歳		
IPC分类号	G01N33/50 A61K31/4745 A61K45/00 A61P37/02 C07K14/47 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12P21/02 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/566		
FI分类号	A61K45/00 A61P37/02 C07K14/47 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02.C C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/566 A61K31/4745 C12N15/00.ZNA.A C12N5/00.B C12N5/00.C C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A C12N5/00.102 C12N5/00.103 C12N5/10		
F-TERM分类号	2G045/AA34 2G045/AA35 2G045/BB01 2G045/BB07 2G045/BB10 2G045/BB20 2G045/BB24 2G045/BB50 2G045/BB51 2G045/DA13 2G045/DA36 2G045/FB02 4B024/AA11 4B024/BA80 4B024/CA04 4B024/DA06 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA12 4B063/QA18 4B063/QQ08 4B063/QQ13 4B063/QQ42 4B063/QR59 4B063/QR77 4B063/QR80 4B063/QS12 4B063/QS24 4B063/QS28 4B064/AG01 4B064/CA02 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA13 4B065/AA26X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/CA24 4B065/CA46 4C084/AA17 4C084/MA01 4C084/NA14 4C084/ZB072 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/CB05 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/ZB07 4H045/AA10 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA50 4H045/FA74		
优先权	2001380423 2001-12-13 JP		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种搜索与LK6-A结合的蛋白或其衍生物的方法，一种搜索用于自身免疫性疾病的治疗剂或使用该蛋白的免疫抑制剂的方法。 解决方案：通过使固定的LK6-A或其衍生物的载体与测试蛋白样品接触，并从测试蛋白样品中选择与LK6-A衍生物特异性结合的蛋白，可以制备LK6-A或其衍生物。 搜索结合的蛋白质。

