

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2005-229806
(P2005-229806A)

(43) 公開日 平成17年9月2日(2005.9.2)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00 Z N A A	2 G O 4 5
A 6 1 K 31/7125	A 6 1 K 31/7125	4 B O 2 4
A 6 1 K 38/00	A 6 1 K 39/395 D	4 B O 5 0
A 6 1 K 39/395	A 6 1 K 39/395 N	4 B O 6 3
A 6 1 K 45/00	A 6 1 K 45/00	4 B O 6 4
審査請求 未請求 請求項の数 33 O L (全 58 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2000-208610 (P2000-208610)	(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
(22) 出願日	平成12年7月10日 (2000.7.10)	(74) 代理人	100096219 弁理士 今村 正純
(31) 優先権主張番号	特願2000-61464 (P2000-61464)	(74) 代理人	100092635 弁理士 塩澤 寿夫
(32) 優先日	平成12年3月7日 (2000.3.7)	(74) 代理人	100095843 弁理士 釜田 淳爾
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)	(72) 発明者	宮地 宏昌 静岡県駿東郡長泉町下土狩1188 協和 醗酵工業株式会社医薬総合研究所内
		(72) 発明者	神部 素子 静岡県駿東郡長泉町下土狩1188 協和 醗酵工業株式会社医薬総合研究所内 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ホスホジエステラーゼ活性を有するポリペプチド

(57) 【要約】

【課題】ホスホジエステラーゼ (PDE) 活性を有する新規ポリペプチド、該PDEポリペプチドをコードするDNA、該ポリペプチドを認識する抗体を利用し、糖尿病、虚血性心疾患、高血圧、腎炎、膵炎、潰瘍、アレルギー、喘息、リウマチ、骨粗鬆症、痛み、不安症、分裂病、躁鬱病、パーキンソン病、痴呆、感染症または悪性腫瘍等の診断、予防または治療のための医薬を提供すること。

【解決手段】本発明によれば、PDE活性を有する新規ポリペプチド、該ポリペプチドの製造法、該ポリペプチドをコードするDNA、該DNAを組み込んで得られる組換え体ベクター、該組換え体ベクターを保有する形質転換体、該ポリペプチドを認識する抗体、該抗体を用いる本発明のポリペプチドの定量法および免疫染色法、該ポリペプチドをコードする遺伝子の発現を変動させる物質のスクリーニング法、該ポリペプチドの有する活性を変動させる物質のスクリーニング法および該DNAあるいは該抗体を用いた糖尿病、脳疾患、腎疾患または癌等の疾患の診断、予防または治療のための医薬等が提供される。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

下記の何れかのアミノ酸配列から成るポリペプチド：

(A) 配列番号 1 または配列番号 15 に記載のアミノ酸配列：又は

(B) 配列番号 1 または配列番号 15 に記載のアミノ酸配列において 1 以上のアミノ酸が欠失、置換及び/又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつホスホジエステラーゼ活性を有するポリペプチドをコードするアミノ酸配列。

【請求項 2】

請求項 1 に記載のポリペプチドをコードする DNA。

【請求項 3】

下記の何れかの塩基配列を有する DNA：

(A) 配列番号 2 または配列番号 16 に記載の塩基配列：又は

(B) 上記 (A) に記載の塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつホスホジエステラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする塩基配列。

【請求項 4】

請求項 2 又は 3 に記載の DNA を含む組換えベクター。

【請求項 5】

請求項 4 に記載の組換えベクターを保有する形質転換体。

【請求項 6】

形質転換体が、微生物、動物細胞、植物細胞および昆虫細胞から成る群から選ばれる形質転換体である、請求項 5 に記載の形質転換体。

【請求項 7】

微生物が *Escherichia* 属に属する微生物である、請求項 6 に記載の形質転換体。

【請求項 8】

受託番号 FERM BP - 6976 を有する、請求項 7 に記載の形質転換体。

【請求項 9】

請求項 5 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の形質転換体を培地で培養し、培養物中に請求項 1 に記載のポリペプチドを生成蓄積させ、該培養物から該ポリペプチドを採取することを特徴とする、請求項 1 に記載のポリペプチドの製造方法。

【請求項 10】

請求項 2 または 3 に記載の DNA の塩基配列中の連続した 5 ~ 60 塩基と同じ配列を有するセンスオリゴヌクレオチド、該センスオリゴヌクレオチドと相補的な配列を有するアンチセンスオリゴヌクレオチド、およびこれらセンス又はアンチセンスオリゴヌクレオチドのオリゴヌクレオチド誘導体から成る群から選ばれるオリゴヌクレオチド。

【請求項 11】

オリゴヌクレオチド誘導体が、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がホスホロチオエート結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合が N3' - P5' ホスホアミデート結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のリボースとリン酸ジエステル結合がペプチド核酸結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のウラシルが C - 5 プロピニルウラシルで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のウラシルが C - 5 チアゾールウラシルで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のシトシンが C - 5 プロピニルシトシンで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のシトシンがフェノキサジン修飾シトシン (phenoxazine-modified cytosine) で置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、DNA 中のリボースが 2' - O - プロピルリボースで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体およびオリゴヌクレオチド中のリボースが 2' - メトキシエトキシリボースで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体から成る群から選ばれるオリゴヌクレオチド誘導体である、請求項 10 に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項 12】

10

20

30

40

50

請求項 10 または 11 に記載のオリゴヌクレオチドを用いることを特徴とする、請求項 1 に記載のポリペプチドをコードする mRNA を検出する方法。

【請求項 13】

請求項 10 または 11 に記載のオリゴヌクレオチドを用いることを特徴とする、請求項 1 に記載のポリペプチドの発現を抑制する方法。

【請求項 14】

請求項 1 に記載のポリペプチドを認識する抗体。

【請求項 15】

請求項 14 に記載の抗体を用いることを特徴とする、請求項 1 に記載のポリペプチドの免疫学的検出法。

10

【請求項 16】

請求項 14 に記載の抗体を用いることを特徴とする、請求項 1 に記載のポリペプチドの免疫組織染色法。

【請求項 17】

請求項 14 に記載の抗体を含有する、免疫組織染色剤。

【請求項 18】

請求項 1 に記載のポリペプチドと被験試料とを接触させることを特徴とする、該ポリペプチドの有するホスホジエステラーゼ活性を変動させる化合物のスクリーニング方法。

【請求項 19】

請求項 18 に記載の方法により得られる化合物。

20

【請求項 20】

請求項 1 に記載のポリペプチドを発現する細胞と被験試料とを接触させることを特徴とする、該ポリペプチドをコードする遺伝子の発現を変動させる化合物のスクリーニング方法。

【請求項 21】

請求項 12 に記載の方法を用いて請求項 1 に記載のポリペプチドをコードする mRNA を検出することにより、該ポリペプチドをコードする遺伝子の発現の変動を検出することを特徴とする、請求項 20 に記載のスクリーニング方法。

【請求項 22】

請求項 15 に記載の方法を用いて請求項 1 に記載のポリペプチドを検出することにより、該ポリペプチドをコードする遺伝子の発現の変動を検出することを特徴とする、請求項 20 に記載のスクリーニング方法。

30

【請求項 23】

請求項 20 ~ 22 のいずれか 1 項に記載の方法により得られる化合物。

【請求項 24】

請求項 1 に記載のポリペプチドをコードする遺伝子の転写を制御するプロモーター DNA。

【請求項 25】

請求項 24 に記載のプロモーター DNA および該プロモーター DNA の下流に連結させたレポーター遺伝子を含有するプラスミドを保有する形質転換体と被験試料とを接触させ、該レポーター遺伝子の翻訳産物含量を測定することを特徴とする、該プロモーターによる転写の効率を変動させる化合物のスクリーニング方法。

40

【請求項 26】

レポーター遺伝子が、クロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼ遺伝子、
- ガラクトシダーゼ遺伝子、ルシフェラーゼ遺伝子、
- グルクロニダーゼ遺伝子、エクオリン遺伝子およびグリーン・フルオロセセント・プロテイン遺伝子から成る群から選ばれる遺伝子である、請求項 25 に記載のスクリーニング方法。

【請求項 27】

請求項 25 または 26 に記載の方法により得られる化合物。

【請求項 28】

50

請求項 1 に記載のポリペプチドを含有する、医薬。

【請求項 29】

請求項 10 または 11 に記載のオリゴヌクレオチドを含有する、医薬。

【請求項 30】

請求項 14 に記載の抗体を含有する、医薬。

【請求項 31】

請求項 19、23 または 27 に記載の化合物を含有する、医薬。

【請求項 32】

糖尿病、虚血性心疾患、高血圧、腎炎、膵炎、潰瘍、アレルギー、喘息、リウマチ、骨粗鬆症、痛み、不安症、分裂病、躁鬱病、パーキンソン病、痴呆、感染症または悪性腫瘍の予防または治療のための医薬である、請求項 28 から 31 の何れか 1 項に記載の医薬。 10

【請求項 33】

糖尿病、虚血性心疾患、高血圧、腎炎、膵炎、潰瘍、アレルギー、喘息、リウマチ、骨粗鬆症、痛み、不安症、分裂病、躁鬱病、パーキンソン病、痴呆、感染症または悪性腫瘍の診断のための医薬である、請求項 28 から 31 の何れか 1 項に記載の医薬。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、新規ホスホジエステラーゼポリペプチド、該ポリペプチドをコードする DNA、該 DNA を含むベクター、該ベクターで形質転換された形質転換体および該ホスホジエステラーゼポリペプチドの製造方法に関する。本発明はまた、該ポリペプチドの利用方法、例えば、該ポリペプチドまたはその抗体を用いたアゴニスト又はアンタゴニスト活性を有する化合物のスクリーニング方法、並びに該ポリペプチド又はその抗体を含む医薬に関する。 20

【0002】

【従来の技術】

環状ヌクレオチドは G 蛋白質共役型受容体 (GPCR) からの刺激をはじめとする多くの細胞外刺激による細胞応答を仲介することが知られている。環状ヌクレオチドホスホジエステラーゼ (PDE) は、3', 5'-環状アデノシンモノホスフェート (cAMP) および 3', 5'-環状グアノシンモノホスフェート (cGMP) などの 3', 5'-環状ヌクレオチドを加水分解し、対応するヌクレオシド 5' モノホスフェートを生成することで細胞内のこれらの環状ヌクレオチドの濃度調節に重要な役割を果たしている [Pharmac. Ther., 51, 13 (1991)]。すなわち、PDE は、細胞内の定常状態での cAMP および cGMP 濃度、さらには環状ヌクレオチドを介したシグナルの大きさおよび持続時間を調節している。多くの実験結果より PDE 活性は他のシグナル伝達系からの多種類の情報により制御されていることが示されており、シグナル伝達経路間の "cross-talk" および細胞内制御ネットワークの重要な位置を占めている [Trend. Pharmacol. Sci., 22, 217 (1997)、Physiol. Rev., 75, 725 (1995)、Arch. Biochem. Biophys., 322, 1 (1995)、及び Endocrinol. Rev., 16, 370 (1995)]。 30

【0003】

脊椎動物の PDE は構造、局在、制御、選択的 PDE 阻害剤に対する感受性等の異なるサブタイプおよびそれらのアイソフォームからなる大きなスーパーファミリーを形成している [Trend. Pharmacol. Sci., 11, 150 (1990)、Physiol. Rev., 75, 725 (1995)、Arch. Biochem. Biophys., 322, 1 (1995)、Endocrinol. Rev., 16, 370 (1995)、Kidney International, 55, 29 (1999)、Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases: Structure, Regulation and Drug Action, John Wiley & Sons, New York (1990)、及び Phosphodiesterase Inhibitors, Academic Press, New York (1996)]。PDE スーパーファミリーは現在までに生化学的特性、酵素学的特性、さらには対応する cDNA のクローン化によるアミノ酸配列の比較等により、以下の 10 種類のファミリー (PDE 1 ~ PDE 10) に分類されている [Kidney International, 55, 29 (1999)、J. Biol. Chem., 274, 18438 (1999) 40 50

9)、Gene, 234, 109 (1999)、及びProc. Natl. Acad. Sci. USA, 96, 7071 (1999)〕。

【0004】

1. Ca^{2+} / カルモジュリン依存性 PDE (PDE 1)
2. cGMP で刺激される PDE (PDE 2)
3. cGMP で阻害される PDE (PDE 3)
4. cAMP 特異的 PDE (PDE 4)
5. cGMP 特異的 PDE (PDE 5)
6. cGMP 特異的 フォトレセプター PDE (PDE 6)
7. 高親和性、cAMP 特異的 PDE (PDE 7)
8. 高親和性、cAMP 特異的 PDE (PDE 8)
9. cGMP 特異的 PDE (PDE 9)
10. cAMP PDE、cAMP で阻害される cGMP PDE (PDE 10)

10

【0005】

多くのファミリーは、異なる遺伝子によりコードされるサブタイプおよびそれらのスプライズバリエーション (アイソフォーム) からなる [Kidney International, 55, 29 (1999)、Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases: Structure, Regulation and Drug Action, John Wiley & Sons, New York (1990)、及びBiochem. Biophys. Res. Commun., 261, 551 (1999)]。いくつかの PDE アイソフォームについては組織および細胞特異的な発現が報告されている [Trend. Pharmacol. Sci., 22, 217 (1997)、Physiol. Rev., 75, 725 (1995)]、及びArch. Biochem. Biophys., 322, 1 (1995)]。現在までに、30 種以上の PDE

20

【0006】

PDE は通常 3 つの機能ドメインからなる構造を有している [Trend. Pharmacol. Sci., 22, 217 (1997)、Physiol. Rev., 75, 725 (1995)、Arch. Biochem. Biophys., 322, 1 (1995)、及びEndocrinol. Rev., 16, 370 (1995)]。中央から C 末端側にかけて存在する約 270 アミノ酸よりなる領域 (catalytic core domain) はすべての脊椎動物由来 PDE で保存されており、触媒ドメインを構成する。この領域は個々の PDE ファミリー内の遺伝子間でよく保存されており、アミノ酸配列で 80% 以上の一致が認められる。また、異なる PDE 遺伝子ファミリー間ではアミノ酸配列で 25% ~ 40% 程度一致している。catalytic core domain には 2 つの Zn^{2+} 結合モチーフが存在している [J. Biol. Chem., 269, 22477 (1994)] が、PDE 3 ファミリーの catalytic core domain には、他の PDE ファミリーには存在しない 44 アミノ酸の挿入があるために最初の Zn^{2+} 結合モチーフが破壊されている。全ての PDE の触媒ドメインに HDXXHXXXN (アミノ酸残基は一文字表記で示す。H; ヒスチジン、D; アスパラギン酸、N; アスパラギン、X; 任意のアミノ酸残基) の保存されたモチーフが見出されている。

30

【0007】

PDE 4 の catalytic core domain を含む領域は大腸菌で発現し、PDE 活性を有していることが示された [J. Biol. Chem., 267, 18929 (1992)]。保存されている触媒ドメインには PDE ファミリー特異的な基質親和性や阻害剤に対する感受性を規定する配列が含まれている [J. Biol. Chem., 274, 4839 (1999)]。触媒ドメインがよく保存されているの

40

に対して N 末端側の制御ドメインは PDE サブタイプ、アイソフォーム間で構造および大きさが異なっている [Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases: Structure, Regulation and Drug Action, John Wiley & Sons, New York (1990)]。このドメインには、リガンド結合部位、リン酸化部位、膜結合部位、蛋白-蛋白相互作用に關与する配列等が含まれている。

相対的に小さい C 末端ドメインの機能的な重要性については十分には明らかにされていない。PDE4B2B アイソフォームの 487 番目のセリン残基が mitogen-activated protein kinase によりリン酸化を受けることが報告されている [Biochem. J., 316, 751 (1996)]。

【0008】

PDE サブタイプあるいはアイソフォーム特異的なアゴニストあるいはアンタゴニストは

50

、細胞内環状ヌクレオチド量の変動が関与している多種類の疾患に対して、予防的あるいは治療的な効果が期待される。例えば免疫および炎症応答に関する多くの機能は細胞内 cAMP を増加させる薬剤により阻害される〔Mol. Pharmacol., 47, 1164 (1995)〕。一方、cGMP は、平滑筋、肺および脳細胞の機能に関与している〔Pharmac. Ther., 51, 13 (1991)〕。非特異的 PDE 阻害剤、さらには PDE サブタイプに選択性を示す阻害剤が合成され、それらのうちいくつかについては治療薬としての可能性が実験的あるいは臨床的に検討されている〔Trends Pharmacol. Sci., 22, 217 (1997)、Physiol., Rev., 75, 725 (1995)、Phosphodiesterase Inhibitors, Academic Press, New York (1996)〕。例えば、PDE 3 阻害剤は、抗血栓剤、降圧剤およびうっ血性心不全治療に有用な強心剤として開発されている。最近、PDE 3 B がレプチンのインスリン分泌阻害に関与していることが報告された〔J. Clin. Invest., 102, 869 (1998)〕。PDE 4 阻害剤としては、rolipram が鬱病治療薬として用いられている。TNF- α は *in vitro* で HIV-1 の複製を促進することが報告されている。rolipram は lipopolysaccharide 刺激による TNF- α 産生を抑制することから、HIV-1 複製を阻害する可能性が指摘されている〔AIDS, 9, 1137 (1995)〕。また、TNF- α 、インターフェロン γ などのサイトカイン産生を抑制する活性を有していることから、脳脊髄炎(encephalomyelitis)、多発性硬化症(MS)、遅発性運動異常(tardive dyskinesia)などに対する効果も期待されている。PDE 4 阻害剤は、抗炎症作用を有することからリウマチなどの治療薬として、また抗炎症作用のみならず気管支拡張作用も有することから喘息の治療薬として、その可能性が評価されている〔Clin. Exp. Immunol., 100, 126 (1995)、Am. J. Respir. Crit. Care Med., 157, 351 (1998)〕。PDE は多くの細胞の増殖に関与しており、悪性腫瘍の治療薬のターゲットとしても興味を持たれている〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91, 5330 (1994)〕。また、ラットメサンギウム細胞を用いた系で、PDE 3 阻害剤がメサンギウム細胞の分裂抑制作用を有すること〔J. Clin. Invest., 96, 401 (1995)〕、PDE 4 阻害剤が活性酸素代謝産物(reactive oxygen metabolite)の産生を抑制することが報告されている〔J. Biol. Chem., 272, 9854 (1997)〕。さらに、抗Thy-1腎炎ラットでPDE阻害剤が蛋白尿の進展を抑制することが示された〔J. Clin. Invest., 98, 262 (1996)〕。

10

20

【0009】

糖尿病、虚血性心疾患、高血圧、腎炎、膵炎、潰瘍、アレルギー、喘息、リウマチ、骨粗鬆症、痛み、不安症、分裂病、躁鬱病、パーキンソン病、痴呆、感染症または悪性腫瘍などのような環状ヌクレオチドを介したシグナル伝達の異常が発症および病態の進展に関与している可能性のある疾患を予防あるいは治療するために、その疾患に関与するPDEサブタイプ、さらにはアイソフォーム選択的なアゴニスト、アンタゴニストの開発が求められている。非特異的な薬剤は目的とする組織および細胞以外の組織、細胞におけるcAMPあるいはcGMPを介するシグナル伝達系への影響が問題になるのであまり望ましくない。

30

【0010】

PDEの場合、酵素の存在量が極微量であること、基本的に同様の反応を触媒しており、基質特異性が重複していることなどから組織あるいは細胞からのアイソフォームの精製及び単離は容易ではない。古典的な酵素学的手法を用いた新規なアイソフォームの単離は、現在用いられている精製法の限界および単一の精製酵素標品が得られたことを確認することの困難さにより阻まれている。他のアプローチとして、アイソフォーム選択的なアッセイ条件を用いることや、免疫学的手法を用いたサブタイプやアイソフォームの分離及び同定が行われてきた。これらのアプローチには、サブタイプやアイソフォームを同定するために必要な判定基準の確立が必要であり、時間と労力を要するばかりでなく、技術的に困難な場合もある。結果として、多くの研究は、複数のサブタイプあるいはアイソフォームを含む部分精製PDE標品を用いて行われてきた。

40

組織あるいは細胞特異的な新規PDEアイソフォームを組換えDNA技術を用いて大量に調製することができれば、これらの困難を克服でき、より特異的かつ安全なアゴニストおよびアンタゴニスト開発が可能になることが期待される。

50

【 0 0 1 1 】

【 発明が解決しようとする課題 】

本発明は、新規 P D E ポリペプチド及び該 P D E ポリペプチドをコードする D N A を提供することを目的とする。本発明はまた、該 P D E ポリペプチド又は該ポリペプチドを認識する抗体などを利用して、糖尿病、虚血性心疾患、高血圧、腎炎、膵炎、潰瘍、アレルギー、喘息、リウマチ、骨粗鬆症、痛み、不安症、分裂病、躁鬱病、パーキンソン病、痴呆、感染症または悪性腫瘍等の予防及び / 又は治療のための医薬を提供することを目的とする。

【 0 0 1 2 】

【 課題を解決するための手段 】

本発明者らは、HepG2細胞から c D N A ライブラリーを調製しランダムに塩基配列の解析を行った。ヒト PDE10A (GenBank: AB020593) の遺伝子配列情報を基に、このようにして取得したヒト c D N A 配列に対して、BLASTサーチ相同性検索ソフトウェアを用いて解析し、ヒト PDE10A およびヒト PDE5A の触媒部位と相同性の認められる部分配列を見出した。これらの配列を解析し、ポリペプチドを発現させて P D E 活性を検出することにより、本発明を完成するに至った。

10

【 0 0 1 3 】

即ち、本発明は以下の (1) ~ (3 3) の発明に関する。

(1) 下記の何れかのアミノ酸配列から成るポリペプチド :

(A) 配列番号 1 または配列番号 1 5 に記載のアミノ酸配列 : 又は

20

(B) 配列番号 1 または配列番号 1 5 に記載のアミノ酸配列において 1 以上のアミノ酸が欠失、置換及び / 又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつホスホジエステラーゼ活性を有するポリペプチドをコードするアミノ酸配列。

【 0 0 1 4 】

(2) (1) に記載のポリペプチドをコードする D N A 。

(3) 下記の何れかの塩基配列を有する D N A :

(A) 配列番号 2 または配列番号 1 6 に記載の塩基配列 : 又は

(B) 上記 (A) に記載の塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつホスホジエステラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする塩基配列。

(4) (2) または (3) に記載の D N A を含む組換えベクター。

30

(5) (4) に記載の組換えベクターを保有する形質転換体。

(6) 形質転換体が、微生物、動物細胞、植物細胞および昆虫細胞から成る群から選ばれる形質転換体である、(5) に記載の形質転換体。

(7) 微生物が Escherichia 属に属する微生物である、(6) に記載の形質転換体。

(8) 受託番号 F E R M B P - 6 9 7 6 を有する、(7) に記載の形質転換体。

(9) (5) ~ (8) のいずれかに記載の形質転換体を培地で培養し、培養物中に (1) に記載のポリペプチドを生成蓄積させ、該培養物から該ポリペプチドを採取することを特徴とする、(1) に記載のポリペプチドの製造方法。

【 0 0 1 5 】

(1 0) (2) または (3) に記載の D N A の塩基配列中の連続した 5 ~ 6 0 塩基と同じ配列を有するセンスオリゴヌクレオチド、該センスオリゴヌクレオチドと相補的な配列を有するアンチセンスオリゴヌクレオチド、およびこれらセンス又はアンチセンスオリゴヌクレオチドのオリゴヌクレオチド誘導体から成る群から選ばれるオリゴヌクレオチド。

40

(1 1) オリゴヌクレオチド誘導体が、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がホスホロチオエート結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合が N 3 ' - P 5 ' ホスホアミデート結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のリボースとリン酸ジエステル結合がペプチド核酸結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のウラシルが C - 5 プロピニルウラシルで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のウラシルが C - 5 チアゾールウラシルで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴ

50

ヌクレオチド中のシトシンが C - 5 プロピニルシトシンで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のシトシンがフェノキサジン修飾シトシン (phenoxazine-modified cytosine) で置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、DNA 中のリボースが 2'-O-プロピルリボースで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体およびオリゴヌクレオチド中のリボースが 2'-メトキシエトキシリボースで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体から成る群から選ばれるオリゴヌクレオチド誘導体である、(10)に記載のオリゴヌクレオチド。

【0016】

(12) (10) または (11) に記載のオリゴヌクレオチドを用いることを特徴とする、(1)に記載のポリペプチドをコードする mRNA を検出する方法。 10

(13) (10) または (11) に記載のオリゴヌクレオチドを用いることを特徴とする、(1)に記載のポリペプチドの発現を抑制する方法。

(14) (1) に記載のポリペプチドを認識する抗体。

(15) (14) に記載の抗体を用いることを特徴とする、(1)に記載のポリペプチドの免疫学的検出法。

(16) (14) に記載の抗体を用いることを特徴とする、(1)に記載のポリペプチドの免疫組織染色法。

(17) (14) に記載の抗体を含有する、免疫組織染色剤。

【0017】

(18) (1) に記載のポリペプチドと被験試料とを接触させることを特徴とする、該ポリペプチドの有するホスホジエステラーゼ活性を変動させる化合物のスクリーニング方法。 20

(19) (18) に記載の方法により得られる化合物。

(20) (1) に記載のポリペプチドを発現する細胞と被験試料とを接触させることを特徴とする、該ポリペプチドをコードする遺伝子の発現を変動させる化合物のスクリーニング方法。

(21) (12) に記載の方法を用いて (1) に記載のポリペプチドをコードする mRNA を検出することにより、該ポリペプチドをコードする遺伝子の発現の変動を検出することを特徴とする、(20)に記載のスクリーニング方法。

(22) (15) に記載の方法を用いて (1) に記載のポリペプチドを検出することにより、該ポリペプチドをコードする遺伝子の発現の変動を検出することを特徴とする、(20)に記載のスクリーニング方法。 30

(23) (20) ~ (22) のいずれかに記載の方法により得られる化合物。

【0018】

(24) (1) に記載のポリペプチドをコードする遺伝子の転写を制御するプロモーター DNA。

(25) (24) に記載のプロモーター DNA および該プロモーター DNA の下流に連結させたレポーター遺伝子を含有するプラスミドを保有する形質転換体と被験試料とを接触させ、該レポーター遺伝子の翻訳産物含量を測定することを特徴とする、該プロモーターによる転写の効率を変動させる化合物のスクリーニング方法。 40

(26) レポーター遺伝子が、クロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼ遺伝子、 β -ガラクトシダーゼ遺伝子、ルシフェラーゼ遺伝子、 β -グルクロニダーゼ遺伝子、エクオリン遺伝子およびグリーン・フルオレッセント・プロテイン遺伝子から成る群から選ばれる遺伝子である、(25)に記載のスクリーニング方法。

(27) (25) または (26) に記載の方法により得られる化合物。

【0019】

(28) (1) に記載のポリペプチドを含有する、医薬。

(29) (10) または (11) に記載のオリゴヌクレオチドを含有する、医薬。

(30) (14) に記載の抗体を含有する、医薬。

(31) (19)、(23) または (27) に記載の化合物を含有する、医薬。 50

(32) 糖尿病、虚血性心疾患、高血圧、腎炎、膵炎、潰瘍、アレルギー、喘息、リウマチ、骨粗鬆症、痛み、不安症、分裂病、躁鬱病、パーキンソン病、痴呆、感染症または悪性腫瘍の予防または治療のための医薬である、(28)から(31)の何れかに記載の医薬。

(33) 糖尿病、虚血性心疾患、高血圧、腎炎、膵炎、潰瘍、アレルギー、喘息、リウマチ、骨粗鬆症、痛み、不安症、分裂病、躁鬱病、パーキンソン病、痴呆、感染症または悪性腫瘍の診断のための医薬である、(28)から(31)の何れかに記載の医薬。

【0020】

【発明の実施の形態】

本発明のポリペプチドは、下記の何れかのアミノ酸配列から成ることを特徴とする。

10

(A) 配列番号1または配列番号15に記載のアミノ酸配列：又は

(B) 配列番号1または配列番号15に記載のアミノ酸配列において1以上のアミノ酸が欠失、置換及び/又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつホスホジエステラーゼ活性を有するポリペプチドをコードするアミノ酸配列。

配列番号1または配列番号15に記載のアミノ酸配列において1以上のアミノ酸が欠失、置換または付加されたアミノ酸配列からなり、かつホスホジエステラーゼ(PDE)活性を有するポリペプチドは、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989) (以下、モレキュラー・クローニング 第2版と略す)、Current Protocols in Molecular Biology, Supplement 1~38, John Wiley & Sons (1987-1997) (以下、カレント・プロトコル・イン・モレキュラ・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)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 5662 (1984)、Science, 224, 1431 (1984)、国際公開W085/00817号、及びNature, 316, 601 (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または配列番号15で示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする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。

20

【0021】

欠失、置換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。

30

また、本発明のポリペプチドがホスホジエステラーゼ活性を有するためには、配列番号1または15に記載のアミノ酸配列との相同性がBLAST [J. Mol. Biol., 215, 403(1990)] やFASTA [Methods in Enzymology, 183, 63(1990)] 等の解析ソフトを用いて計算したときに、少なくとも60%以上、好ましくは70%以上、より好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上、特に好ましくは95%以上、最も好ましくは98%以上であることが好ましい。

ただし、本発明のポリペプチドには、公知のポリペプチドは含まれない。

【0022】

本発明はまた、上記した本発明のポリペプチドをコードするDNAを提供するものである。本発明のポリペプチドをコードするDNAの具体例として、下記の何れかの塩基配列を有するDNAが挙げられる。

40

(A) 配列番号2または配列番号16に記載の塩基配列：

(B) 上記(A)に記載の塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつホスホジエステラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする塩基配列。

【0023】

上記の「ストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつホスホジエステラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする塩基配列」とは、配列番号2または配列番号16に記載の塩基配列を有する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、

50

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NaCl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 (saline-sodium citrate) 溶液 (1倍濃度のSSC溶液の組成は、150 mmol/L塩化ナトリウム、15 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。

【0024】

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2版、カレント・プロトコル・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 Press (1995)等の実験書に記載されている方法に準じて行うことができる。

【0025】

ハイブリダイズ可能なDNAとして具体的には、BLAST (J.Mol.Biol., 215, 403, 1990) やFASTA (Methods in Enzymology, 183, 63-69) 等の解析ソフトを用いて計算したときに、配列番号2または配列番号16で表される塩基配列と少なくとも80%以上、好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上、特に好ましくは98%以上の同一性を有するDNAを挙げることができる。

ただし、本発明のDNAには、公知のDNAは含まれない。

【0026】

以下、本発明の実施方法および利用方法について詳細に説明する。

[1]本発明のDNAの取得およびオリゴヌクレオチドの調製

ヒトPDE10A (GenBank: AB020593) のアミノ酸配列と同一性をもつ遺伝子を、遺伝子データベース、蛋白質データベースより、Blast、Smith-Waterman法等を利用したプログラムあるいはフレームサーチ [イスラエル、コンピュジェン (Compugen) 社製] 同一性検索ソフトウェアを利用して検索する。

データベースとしてはGenBank、Swiss-Plot等の公的なデータベースを利用することができる。

また私的に持っているcDNAライブラリー中のクローンのcDNAを、ランダムかつ大規模に塩基配列決定し、得られた配列データを集積し、作製した私的なデータベースを利用することもできる。

得られた、ヒトPDE10A (GenBank: AB020593) と同一性をもつ遺伝子が、EST (Expressed Sequence Tag) のように、遺伝子の一部の塩基配列のみである場合は、以下のようにしてそのcDNAの全長を得ることができ、該cDNAより本発明のDNAを取得することができる。

本発明のDNAの起源が特に制限されることはないが、好ましくは哺乳動物であり、特に好ましくはヒトである。

【0027】

(1) cDNAライブラリーの作製

cDNAライブラリーを作製するために、適切な細胞または組織より全RNAあるいはmRNAを調製する。

全RNAを調製する方法として、チオシアン酸グアニジン・トリフルオロ酢酸セシウム法 [Methods in Enzymology, 154, 3 (1987)]、酸性グアニジンチオシアネート・フェノール・クロロホルム (AGPC) 法 [Analytical Biochemistry, 162, 156 (1987)、及び実験医学 9, 1937 (1991)] 等を用いることができる。全RNAからポリ(A)⁺RNAとしてmRNAを調製する方法として、オリゴ(dT)固定化セルロースカラム法 (モレキュラー・クローニング第2版) やオリゴdTラテックスを用いる方法等を用いることができる。

【0028】

ファースト・トラック・mRNA単離キット [Fast Track mRNA Isolation Kit; インビトロジェン (Invitrogen) 社製]、クイック・プレップ・mRNA精製キット [Quick Pr

ep mRNA Purification Kit; ファルマシア (Pharmacia) 社製] 等のキットを用いて組織や細胞から直接 mRNA を調製することもできる。適切な細胞または組織として、データベースから見出された EST 等が含まれていた cDNA ライブラリーの種類を調べ、該ライブラリーを構築するために用いた細胞または組織、あるいは該組織由来の細胞株等を用いることが好ましい。

【0029】

得られた全 RNA あるいは mRNA を用い、常法により cDNA ライブラリーを作製する。

cDNA ライブラリー作製法として、モレキュラー クローニング 第2版やカレント・プロトコル・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 Press (1995) 等に記載された方法、あるいは市販のキット、例えばスーパースクリプト・プラスミド・システム・フォー・cDNA・シンセシス・アンド・プラスミド・クローニング [SuperScript Plasmid System for cDNA Synthesis and Plasmid Cloning; ギブコ BRL (Gibco BRL) 社製] やザップ・cDNA・シンセシス・キット [ZAP-cDNA Synthesis Kit、ストラタジーン社製] を用いる方法等をあげることができる。

【0030】

cDNA ライブラリーを作製するためのクローニングベクターとしては、大腸菌 K12 株中で自立複製できるものであれば、ファージベクター、プラスミドベクター等いずれでも使用できる。

具体的には、ZAP Express [ストラタジーン社製、Strategies, 5, 58 (1992)]、pBluescript II SK(+) [Nucleic Acids Research, 17, 9494 (1989)]、Lambda ZAP II (ストラタジーン社製)、gt10、gt11 [DNA Cloning, A Practical Approach, 1, 49 (1985)]、TriplEx (クローンテック社製)、ExCell (ファルマシア社製)、pT7T318U (ファルマシア社製)、pcD2 [Mol. Cell. Biol., 3, 280 (1983)]、pUC18 [Gene, 33, 103 (1985)]、pAMo [J. Biol. Chem., 268, 22782-22787 (1993)、別名 pAM oPRC3Sc (特開平05-336963)] 等を挙げることができる。

【0031】

宿主微生物としては、大腸菌 *Escherichia coli* に属する微生物であればいずれも用いることができる。具体的には、*Escherichia coli* XL1-Blue MRF' [ストラタジーン社製、Strategies, 5, 81 (1992)]、*Escherichia coli* C600 [Genetics, 39, 440 (1954)]、*Escherichia coli* Y1088 [Science, 222, 778 (1983)]、*Escherichia coli* Y1090 [Science, 222, 778 (1983)]、*Escherichia coli* NM522 [J. Mol. Biol., 166, 1 (1983)]、*Escherichia coli* K802 [J. Mol. Biol., 16, 118 (1966)]、*Escherichia coli* JM105 [Gene, 38, 275 (1985)]、*Escherichia coli* SOLRTM Strain (ストラタジーン社製)、*Escherichia coli* LE392 (モレキュラー・クローニング第2版) 等を用いることができる。

上記方法により作製した cDNA ライブラリーに加え、市販の cDNA ライブラリーも利用することができる。

市販の cDNA ライブラリーとして、クローンテック社、ライフテックオリエンタル社等のヒト、ウシ、マウス、ラット、ウサギ等由来の各臓器 cDNA ライブラリーをあげることができる。

【0032】

(2) 本発明の DNA の取得

上記(1)で作製した cDNA ライブラリーより、本発明の DNA 又はその一部を含有する cDNA クローンを、アイソトープあるいは蛍光標識したプローブを用いたコロニー・ハイブリダイゼーション法あるいはプラーク・ハイブリダイゼーション法 [モレキュラー クローニング 第2版] 等により選択することができる。

プローブとしては、一部明らかになっている塩基配列に基づいたプライマーを用いて、PCR [PCR Protocols, Academic Press (1990)] を利用した方法で cDNA の一部を増幅した断片や、一部明らかになっている塩基配列に基づいたオリゴヌクレオチドを利用

することができる。

【0033】

プライマーとして、全長cDNAの5'末端側および3'末端側の両方の塩基配列がEST等により明らかになっている場合には、その塩基配列に基づいて調製したプライマーを用いることができる。

該cDNAの両端にアダプターを付加し、このアダプターの塩基配列と一部明らかになっている塩基配列に基づいたプライマーでPCRを行う5'-RACE (rapid amplification of cDNA ends) および3'-RACE [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 8998 (1988)] により、プライマーに用いた配列よりも5'末端側および3'末端側のcDNA断片を得ることができる。

10

得られたcDNA断片を連結することにより、本発明の全長DNAを取得することができる。

また、上記cDNAライブラリーから取得されたcDNAが完全長のポリペプチドをコードしていない場合は、以下のようにして完全長のポリペプチドをコードするcDNAを得ることもできる。

各種臓器または各種細胞から調製した一本鎖cDNAライブラリーまたは上記記載の方法で作製できるcDNAライブラリーを鋳型にして、該cDNAに特異的なプライマーセットを用いてPCRを行うことにより、該cDNAに対応する遺伝子を発現する臓器や細胞を特定し、特定された臓器あるいは細胞由来のcDNAライブラリーに対し、該cDNAをプローブにしてコロニーハイブリダイゼーション法 (モレキュラー・クローニング第2版) を行うことにより改めて該cDNAの全長を含むcDNAをcDNAライブラリーから選択することができる。

20

各種臓器または各種細胞由来の一本鎖cDNAライブラリーは、常法または市販されているキットに従って作製することができるが、例えば以下に示す方法で作製できる。

各種臓器または各種細胞からグアニジウム チオシアネート フェノール-クロロホルム法 [Anal. Biochem., 162, 156 (1987)] により全RNAを抽出する。必要に応じて、全RNAをデオキシリボヌクレアーゼI (Life Technologies社製) で処理し、混入の可能性がある染色体DNAを分解する。得られた全RNA各々について、オリゴ(dT)プライマーまたはランダムプライマーを用いてSUPERSCRIPTTM Preamplification System for First Strand cDNA System (Life Technologies社製) により、一本鎖cDNAライブラリーを作製できる。

30

【0034】

上記の方法により取得されたDNAの塩基配列は、該DNA断片をそのままあるいは適当な制限酵素等で切断後常法によりベクターに組み込み、通常用いられる塩基配列解析方法、例えばサンガー (Sanger) らのジデオキシ法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5463 (1977)] あるいはパーキン・エルマー社 (Perkin Elmer: 373A・DNAシーケンサー)、ファルマシア社、ライコア (LI-COR) 社等の塩基配列分析装置を用いて分析することにより決定することができる。上記方法により取得された本発明のDNAおよびその一部を含むプラスミドとして、例えば、配列番号2で表される塩基配列からなるDNAの一部を有するプラスミドhep10314、および配列番号16で表される塩基配列からなるDNAの一部を有するプラスミドp23-1k、p23-2kをあげることができる。

40

プラスミドhep10314を含有する大腸菌 *Escherichia coli* JM109/hep10314は、FERMBP-6976として、平成11年12月22日付けで工業技術院生命工学工業技術研究所、日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号 (郵便番号305-8566) に寄託されている。

【0035】

また、上記方法で取得したDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAを選択することにより、他の組織あるいは、他の動物由来、例えばヒトおよびマウス由来の目的とするDNAを取得することができる。

上記方法により得られた塩基配列情報に基づき、DNA合成機で化学合成することにより目的とするDNAを調製することもできる。DNA合成機としては、チオホスファイト法

50

を利用した島津製作所社製のDNA合成機、ホスホアミダイト法を利用したパーキン・エルマー社製のDNA合成機model 392等をあげることができる。

得られた塩基配列の新規性に関しては、BLAST等の相同性検索プログラムを用いて、GenBank、EMBLおよびDDBJ等の塩基配列データベースを検索することにより確認することができる。

新規な塩基配列については、アミノ酸配列に変換したのちFASTA、フレームサーチ(FrameSearch)等の相同性検索プログラムを用いて、GenPept、PIR、Swiss-Prot等のアミノ酸配列データベースを検索することにより、相同性をもつ既存の遺伝子を検索することができる。

【0036】

10

(3) 本発明のオリゴヌクレオチドの調製

上述の方法で取得した本発明のDNAまたはDNA断片を用いて、常法あるいは上記のDNA合成機により、本発明のDNAの一部の配列を有するアンチセンス・オリゴヌクレオチド、センス・オリゴヌクレオチド等のオリゴヌクレオチドを調製することができる。

該オリゴヌクレオチドとしては、上記DNAの有する塩基配列中の連続した5～60塩基と同じ配列を有するDNAまたは該DNAと相補的な配列を有するDNAをあげることができ、具体的には、配列番号2または配列番号16で表される塩基配列中の連続した5～60塩基と同じ配列を有するDNAまたは該DNAと相補的な配列を有するDNAをあげることができる。センスプライマーおよびアンチセンスプライマーとして用いる場合には、両者の融解温度(T_m)および塩基数が極端に変わることはない上記のオリゴヌクレオチドが好ましい。

20

該オリゴヌクレオチドとして、例えば、配列番号10または11で表されるオリゴヌクレオチドをあげることができる。

【0037】

更に、これらオリゴヌクレオチドの誘導体(本明細書中では、オリゴヌクレオチド誘導体とも言う)も本発明のオリゴヌクレオチドとして利用することができる。

該オリゴヌクレオチド誘導体としては、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がホスホロチオエート結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がN3'-P5'ホスフォアミデート結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のリボースとリン酸ジエステル結合がペプチド核酸結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のウラシルがC-5プロピニルウラシルで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のウラシルがC-5チアゾールウラシルで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のシトシンがC-5プロピニルシトシンで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のシトシンがフェノキサジン修飾シトシン(phenoxazine-modified cytosine)で置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のリボースが2'-O-プロピルリボースで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、あるいはオリゴヌクレオチド中のリボースが2'-メトキシエトキシリボースで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体等をあげることができる〔細胞工学, 16, 1463 (1997)〕。

30

【0038】

40

[2] 本発明のポリペプチドの調製

(1) 形質転換体の作製

上記[1]に記載の方法により取得した本発明のDNAを宿主細胞中で発現させ、本発明のポリペプチドを製造するために、モレキュラー・クローニング第2版、カレント・プロトコル・イン・モレキュラ・バイオロジー等に記載された方法を用いることができる。

即ち、本発明のDNAを適当な発現ベクターのプロモーター下流に挿入した組換えベクターを造成し、該ベクターを宿主細胞に導入することにより、本発明のポリペプチドを発現する形質転換体を取得し、該形質転換体を培養することにより、本発明のポリペプチドを製造することができる。

【0039】

50

宿主細胞としては、微生物（細菌、酵母等）、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。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ものは染色体中への組込が可能で、本発明の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、本発明のポリペプチド遺伝子発現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及び転写終結配列より構成された組換え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。

【0040】

発現ベクターとしては、例えば、pBTrp2、pBTac1、pBTac2（いずれもベリンガーマンハイム社より市販）、pKK233-2（ファルマシア社）、pSE280（インビトロジェン社）、pGEMEX-1〔プロメガ(Promega)社〕、pQE-8（キアゲン(QIAGEN)社）、pKYP10（特開昭58-110600）、pKYP200〔Agric. Biol. Chem., 48, 669 (1984)〕、pLSA1〔Agric. Biol. Chem., 53, 277 (1989)〕、pGEL1〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 4306 (1985)〕、pBluescript II SK (-)（ストラタジーン社）、pTrs32（FERM BP-5408）、pGHA2（FERM BP-400）、pGKA2（FERM BP-6798）、pTerm2（特開平3-22979、US4686191、US4939094、US5160735）、pGEX（ファルマシア社）、pET-3（ノバジェン社）、pSupex、pUB110、pTP5、pC194、pTrxFus（Invitrogen社）、pMAL-c2（New England Biolabs社）等を挙げることができる。

10

20

【0041】

プロモーターとしては、大腸菌や枯草菌等の宿主細胞中で発現でき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_{lac}）、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、SPO1プロモーター、SPO2プロモーター、penPプロモーター等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} × 2）、tacプロモーター、lacT7プロモーター、let I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としては、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。

30

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。

【0042】

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、プレビバクテリウム属、コリネバクテリウム属、ミ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、Serratia ficaria、Serratia fonticola、Serratia liquefaciens、Serratia marcescens、Bacillus subtilis、Bacillus amyloliquefaciens、Brevibacterium ammoniagenes、Brevibacterium immariophilum ATCC14068、Brevibacterium saccharolyticum ATCC14066、Corynebacterium glutamicum ATCC13032、Corynebacterium glutamicum ATCC14067、Corynebacterium glutamicum ATCC13869、Corynebacterium acetoacidophilum ATCC13870、Microbacterium ammoniophilum ATCC15354、Pseudomonas sp. D-0110等をあげることができる。

40

【0043】

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用いることができ、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）、エレクトロポレー

50

ション法〔Gene, 17, 107 (1982)、Molecular & General Genetics, 168, 111 (1979)〕等を挙げることができる。酵母菌株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等を用いることができる。

【0044】

プロモーターとしては、酵母菌株中で発現できるものであればいずれのものを用いてもよく、例えば、PH05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プロモーター等のプロモーターを挙げることができる。

宿主細胞としては、サッカロマイセス属、シゾサッカロマイセス属、クルイベロミセス属、トリコスポロン属、シワニオミセス属等に属する酵母菌株をあげることができ、具体的には、Saccharomyces cerevisiae、Schizosaccharomyces pombe、Kluyveromyces lactis、Trichosporon pullulans、Schwanniomyces alluvius、Pichia pastoris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 in Enzymology, 194, 182 (1990)〕、スフェロプラスト法〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 4889 (1984)〕、酢酸リチウム法〔Journal of Bacteriology, 153, 163 (1983)〕等をあげることができる。

【0045】

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、p c DNA I / A m p (インビトロジェン社製)、p c DNA I、p C D M 8〔Nature, 329, 840 (1987)〕、p A G E 1 0 7〔特開平3-22979、Cytotechnology, 3, 133 (1990)〕、p R E P 4 (インビトロジェン社製)、p A G E 1 0 3〔Journal of Biochemistry, 101, 1307 (1987)〕、p A M o、p A M o A、p A S 3 - 3 (特開平2-227075)等が用いられる。

プロモーターとしては、動物細胞中で発現でき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あるいはメタロチオネインのプロモーター、レトロウイルスのプロモーター、ヒートショックプロモーター、S R 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。

【0046】

動物細胞としては、マウス・ミエローマ細胞、ラット・ミエローマ細胞、マウス・ハイブリドーマ細胞、ヒトの細胞であるナマルバ (Namalwa) 細胞またはNamalwa KJM-1細胞〔Cytotechnology, 1, 151 (1988)〕、ヒト胎児腎臓細胞、ヒト白血病細胞、アフリカミドリザル腎臓細胞、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。

マウス・ミエローマ細胞としては、SP2/0、NS0等、ラット・ミエローマ細胞としてはYB2/0等、ヒト胎児腎臓細胞としてはHEK293(ATCC: CRL-1573)等、ヒト白血病細胞としては、B ALL-1等、アフリカミドリザル腎臓細胞としてはCOS-1、COS-7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、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)に記載の方法等をあげることができる。

【0047】

昆虫細胞を宿主として用いる場合には、例えばバキュロウイルス・イクスプレッション・ベクターズ・ア・ラボラトリー・マニュアル〔Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual, W. H. Freeman and Company, New York (1992)〕、モレキュラー・バイオロジー・ア・ラボラトリー・マニュアル (Molecular Biology, A Laboratory Manual)、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、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。

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、pBlueBacIII (ともにインビトロジェン社製) 等をあげることができる。

【0048】

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ア・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、Trichoplusia niの卵巣細胞、カイコ卵巣由来の培養細胞等を用いることができる。

10

Spodoptera frugiperdaの卵巣細胞としてはSf9、Sf21 (バキュロウイルス・イクスプレッション・ベクターズ・ア・ラボラトリー・マニュアル) 等、Trichoplusia niの卵巣細胞としてはHigh 5、BTI-TN-5B1-4 (インビトロジェン社製) 等、カイコ卵巣由来の培養細胞としてはBombyx mori N4等をあげることができる。

【0049】

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。

20

遺伝子の発現方法としては、直接発現以外に、モレキュラー・クローニング第2版に記載されている方法等に準じて、分泌生産、融合蛋白質発現等を行うことができる。

【0050】

酵母、動物細胞または昆虫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ポリペプチドを得ることができる。

以上のようにして得られる形質転換体を培地に培養し、培養物中に本発明のポリペプチドを生成蓄積させ、該培養物から採取することにより、本発明のポリペプチドを製造することができる。

また、患者の生体内から採取した細胞に、適切な本発明のポリペプチドを発現させるための発現ベクターを導入した後、細胞を生体内に戻すことにより、本発明のポリペプチドを患者の生体内で発現させることもできる。

30

【0051】

(2) 形質転換体の培養

本発明の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。

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を培養する培地としては、該生物が資化し得る炭素源、窒素源、無機塩類等を含有し、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。

炭素源としては、該生物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、プロパノール等のアルコール類等を用いることができる。

40

【0052】

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、並びに、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

50

を用いることができる。

培養は、通常振盪培養または深部通気攪拌培養等の好氣的条件下で行う。培養温度は15～40℃がよく、培養時間は、通常16～96時間である。培養中pHは3.0～9.0に保持する。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、アンモニア等を用いて行う。

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。

【0053】

プロモーターとして誘導性のプロモーターを用いた発現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発現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発現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。

10

【0054】

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, 122, 501 (1952)〕、DMEM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%CO₂存在下等の条件下で1～7日間行う

20

また、培養中必要に応じて、カナマイシン、ペニシリン、ストレプトマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

【0055】

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〔ファーミンジェン(Pharmingen)社製〕、Sf-900 II SFM培地(ライフ・テクノロジー社製)、ExCell400、ExCell405〔いずれもJRHバイオサイエンス(JRH Biosciences)社製〕、Grace's Insect Medium〔Nature, 195, 788 (1962)〕等を用いることができる。

培養は、通常pH6～7、25～30℃等の条件下で1～5日間行う。

30

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。

【0056】

(3) 発現させたポリペプチドの単離精製

上記形質転換体の培養液から、上記方法により発現させたポリペプチドを単離精製するためには、通常の酵素の単離、精製法を用いればよい。

例えば、本発明のポリペプチドが、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懸濁後、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た上清から、通常の酵素の単離精製法、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(ファルマシア社製)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、等電点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用い、精製標品を得ることができる。

40

【0057】

また、該ポリペプチド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得られた沈殿画分より、通常の方法により該ポリペプチドを回収後、該ポリペプチドの不溶体を蛋白質変性剤で可溶化する。

50

該可溶化液を、蛋白質変性剤を含まない溶液あるいは蛋白質変性剤の濃度が蛋白質が変性しない程度に希薄な溶液に希釈あるいは透析し、該ポリペプチドを正常な立体構造に構成させた後、上記と同様の単離精製法により精製標品を得ることができる。

本発明のポリペプチドあるいはその糖鎖修飾体等の誘導体が細胞外に分泌された場合には、培養上清に該ポリペプチドあるいはその糖鎖付加体等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可溶性画分を取得し、該可溶性画分から、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。

【0058】

また、本発明のポリペプチドを他のタンパク質との融合タンパク質として生産し、融合したタンパク質に親和性をもつ物質を用いたアフィニティークロマトグラフィーを利用して精製することもできる。例えば、ロウらの方法〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 8227 (1989)、Genes & Dev., 4, 1288 (1990)〕、特開平05-336963、W094/23021に記載の方法に準じて、本発明のポリペプチドをプロテインAとの融合タンパク質として生産し、イムノグロブリンGを用いるアフィニティークロマトグラフィーにより精製することができる。また、本発明のポリペプチドをFlagペプチドとの融合タンパク質として生産し、抗Flag抗体を用いるアフィニティークロマトグラフィーにより精製することができる〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 8227 (1989)、Genes & Dev., 4, 1288 (1990)〕。更に、該ポリペプチドに対する抗体を用いたアフィニティークロマトグラフィーで精製することもできる。

10

20

【0059】

更に、本発明のポリペプチドは、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、アドバンスト・ケムテック（Advanced ChemTech）社、パーキン・エルマー社、ファルマシア社、プロテイン・テクノロジー・インストゥルメント（Protein Technology Instrument）社、シンセセル・ベガ（Synthecell-Vega）社、パーセプティブ（PerSeptive）社、島津製作所等のペプチド合成機を利用し化学合成することもできる。

精製した本発明のポリペプチドの構造解析は、蛋白質化学で通常用いられる方法、例えば遺伝子クローニングのためのタンパク質構造解析（平野久著、東京化学同人発行、1993年）に記載の方法により実施可能である。

30

【0060】

[3] 本発明のポリペプチドを認識する抗体の調製

(1) ポリクローナル抗体の調製

上記[2]に記載の方法により取得した本発明のポリペプチドの全長または部分断片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。

40

該抗原の投与量は動物1匹当たり50～100 μ gが好ましい。

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等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。

【0061】

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 Press (1988)〕等で確認する。

免疫に用いた抗原に対し、該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

50

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。

【0062】

(2)モノクローナル抗体の調製

(2-1)抗体産生細胞の調製

上記(1)において、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ラットを抗体産生細胞の供給源として供する。 10

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。

【0063】

(2-2)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(P3-U1)〔Curr. Topics Microbiol. Immunol., 81, 1 (1978)、Eur. 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^{-5} mol/L)、ジェンタマイシン(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 2×10^7 個以上用いる。 20 30

【0064】

(2-3)ハイブリドーマの作製

(2-1)で取得した抗体産生細胞と(2-2)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1L、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、 10^8 抗体産生細胞あたり、ポリエチレングリコール-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、更に1～2分間毎にMEM培地1～2mLを数回添加する。 40

添加後、MEM培地を加えて全量が50mLになるように調製する。該調製液を900rpm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(1.5×10^{-5} mol/L)およびアミノプテリン(4×10^{-7} mol/L)を加えた培地〕100mL中に懸濁する。

該懸濁液を96穴培養用プレートに100μL/穴ずつ分注し、5%CO₂インキュベーター中、37℃で7～14日間培養する。

【0065】

培養後、培養上清の一部をとりアンチボディイズ〔Antibodies-A Laboratory Manual, Co 50

Id Spring Harbor Laboratory Press, Chapter14 (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的例として、以下の方法をあげることができる。

免疫の際、抗原に用いた本発明のポリペプチドの全長または部分断片精製標品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(2-4)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イムノ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ない、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ポリペプチドに対する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、HT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ポリペプチドに対する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。

10

【0066】

(2-4)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、(2-3)で取得した本発明のポリペプチドに対するモノクローナル抗体を生産する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。

20

該腹水癌化したマウスから腹水を採取し、3,000rpm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、ポリクローナル抗体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設定は、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。蛋白質量は、ローリー法あるいは280nmでの吸光度より算出する。

【0067】

[4]本発明のポリペプチドのPDE活性の測定

[2]に記載の方法により、大腸菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞等を宿主として、本発明のポリペプチドを発現させたもの、あるいは、アフリカツメガエル卵母細胞にDNAあるいはin vitroで調製したcRNAを用いてマイクロインジェクション法〔Methods in Enzymology, 207, 225 (1992)、Methods in Enzymology, 254, 458 (1995)〕により発現させたもの、in vitro翻訳産物等をPDE活性の測定に用いる。PDE活性は検出可能な試薬(例えば、放射性試薬、蛍光試薬または比色試薬)で標識された環状ヌクレオチド(例えば、 $[^3\text{H}]cAMP$ あるいは $[^3\text{H}]cGMP$)の3'-ホスホエステル結合を加水分解して生成するヌクレオシド5'-モノホスフェート(例えば、 $[^3\text{H}]5'AMP$ あるいは $[^3\text{H}]5'GMP$)の分離、定量、あるいはさらに、5'ヌクレオチダーゼ処理した後、生成物を分離、定量することにより測定する〔J. Biol. Chem., 257, 1973 (1982)、Methods in Enzymology, 159, 457 (1988)〕。また、内在性の2つのPDE(pde1、pde2)を欠損した酵母〔例えば、Saccharomyces cerevisiae strain PP5 (ATCC number 96135)、Saccharomyces cerevisiae strain 10DAB (ATCC number 74049)〕中で本発明のポリペプチドを発現させ、熱ショック感受性、窒素欠乏に対する感受性などの回復を指標にPDE活性を検出することもできる〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 11970 (1993)、J. Biol. Chem., 274, 4839 (1999)〕。

30

40

【0068】

[5]本発明のポリペプチドのアゴニストまたはアンタゴニストの探索・同定および治療薬としての利用

上記[4]の活性測定に用いることのできる細胞、あるいは、後述[7]の方法で本発明のポリペプチドあるいはmRNAを発現していることの確認された組織、細胞等を用い、

50

被験試料を添加し、上記[4]記載の方法で、PDE活性を測定する。

被験試料の添加の有無における、本発明のポリペプチドのPDE活性の比較、あるいは、本発明のポリペプチドを発現させた内在性PDE欠損酵母を用いたバイオアッセイにより、被験試料の中からPDE活性を増強する物質(アゴニスト)および阻害する物質(アンタゴニスト)をスクリーニングすることができる。

【0069】

被験試料としては、合成化合物、天然に存在する蛋白質、人工的に合成された蛋白質、ペプチド、糖質、脂質、これらの修飾体、誘導体を、また哺乳動物(例えばマウス、ラット、モルモット、ハムスター、ブタ、ヒツジ、ウシ、ウマ、イヌ、ネコ、サル、ヒト等)の尿、体液、組織抽出物、細胞培養上清、細胞抽出物を、更に、非ペプチド性化合物、発酵生産物、植物その他の生物の抽出物等をあげることができる。

10

上記の方法により取得される、本発明のポリペプチドのアゴニストまたはアンタゴニストは、治療薬として単独で用いることが可能ではあるが、通常は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用いることが望ましい。

【0070】

該治療薬の投与方法としては、治療に際し最も効果的な方法を使用することが望ましく、経口投与または、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による方法を用いることができる。

該治療薬の剤形としては、軟膏剤、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、テープ剤等をあげることができる。

20

経口投与に適切な製剤としては、乳剤、シロップ剤、カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤等をあげることができる。

【0071】

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、大豆油等の油類、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することができる。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することができる。

30

【0072】

非経口投与に適切な製剤としては、注射剤、座剤、噴霧剤等があげられる。

注射剤は、例えば、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ことができる。

座剤は、例えば、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することができる。

噴霧剤は、上記で取得されたアゴニストまたはアンタゴニストをそのまま噴霧剤として用いることが可能であるが、受容者の口腔および気道粘膜を刺激せず、かつ該化合物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した噴霧剤が好ましい。

40

担体として、具体的には乳糖、グリセリン等を例示することができる。

【0073】

上記で取得されたアゴニストまたはアンタゴニスト、および担体の性質により、エアロゾル、ドライパウダー等の製剤を調製することが可能である。

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ができる。

投与量または投与回数は、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 μ g/kg~8mg/kgである。

50

【 0 0 7 4 】

[6]本発明のポリペプチドの発現を調節する化合物（以下、発現調節化合物と略す）の探索および同定

(1)本発明の抗体を用いた発現調節化合物の探索および同定

本発明のポリペプチドを発現する細胞を被験試料と接触させた後、本発明の抗体を用いることにより、本発明のポリペプチドの発現調節化合物を探索、同定することができる。

細胞としては、本発明のポリペプチドを発現している細胞、細胞株、組織ならいかなるものでも用いることができる。

例えば、下記 [7] に記載した抗体により免疫学的に検出する方法あるいは mRNA を検出する方法を用い、該ポリペプチドの発現が認められた細胞、細胞株あるいは組織を用いることができる。

10

好適な細胞株として、例えば、HepG2細胞をあげることができる。

被験試料としては上記 [5] の被験試料であげたものを用いることができる。

【 0 0 7 5 】

本発明のポリペプチドを発現する細胞を、該細胞の増殖することのできる培地に懸濁し、被験試料を該培地に添加し、該細胞と接触させた後、本発明の抗体を用い、該細胞の発現したポリペプチド含量を定量する。定量する方法としては、例えば下記の免疫細胞染色を利用した方法をあげることができる。

培養附着細胞を P B S 緩衝液で洗浄し、0 . 0 5 % トリプシン、0 . 0 2 % E D T A (エチレンジアミン 4 酢酸) を含む P B S 緩衝液 3 m L を加え、余分な溶液を除いた後、3

20

7 、 5 分間インキュベートすることによりフラスコより細胞を剥がす。

浮遊細胞については培養細胞をそのまま用いることができる。該細胞を P B S 緩衝液で洗浄後、固定液に懸濁する。固定液としては例えば 3 . 7 % ホルムアルデヒドを含む P B S 緩衝液を挙げることができる。室温にて 3 0 分インキュベート後、P B S 緩衝液で洗浄し膜透過性反応液に懸濁する。膜透過性反応液としては例えば 0 . 1 % T r i t o n X - 1 0 0 を含む P B S 緩衝液を挙げることができる。

【 0 0 7 6 】

該処理を行った細胞を免疫細胞染色用緩衝液 (1 % B S A 、 0 . 0 2 % E D T A 、 0 . 0 5 % アジ化ナトリウムを含む P B S) 等に懸濁し、1 ~ 2 0 × 1 0 ⁵ 個ずつ丸底 9 6 穴プレートに分注する。

30

該プレートに、本発明のモノクローナル抗体を分注する。

モノクローナル抗体としては、[3] (2 - 3) で取得した本発明のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマの培養上清、[3] (2 - 4) で取得した精製モノクローナル抗体をあげることができる。更に、該モノクローナル抗体を標識した抗体も用いることができる。モノクローナル抗体を標識した抗体としては、例えばビオチン標識した抗体をあげることができる。

ビオチン標識した抗体は公知の方法 (酵素抗体法 : 学際企画刊 1 9 8 5 年) で調製することができる。

上記抗体を、免疫細胞染色用緩衝液あるいは 1 0 % 動物血清を含む免疫細胞染色用緩衝液を用いて 0 . 1 ~ 5 0 μ g / m L の濃度になるように希釈する。

40

該希釈抗体を 2 0 ~ 5 0 0 μ L / 穴となるように分注し、氷冷下で 3 0 分間放置する。

【 0 0 7 7 】

標識されていない抗体を用いた場合には、上記プレートに免疫細胞染色用緩衝液を添加し、細胞を洗浄する。F I T C (fluorescein isothiocyanate) あるいはフィコエリスリン等の蛍光色素で標識した抗マウスイムノグロブリン抗体あるいは抗ラットイムノグロブリン抗体を 0 . 1 ~ 5 0 μ g / m L 程度の濃度で含む免疫細胞染色用緩衝液を 5 0 ~ 5 0 0 μ L / 穴ほど分注し、氷冷下で 3 0 分間遮光して放置する。

ビオチン標識した該モノクローナル抗体を用いた場合には、上記プレートに F I T C あるいはフィコエリスリン等の蛍光色素で標識したストレプトアビジンを 5 0 ~ 5 0 0 μ L / 穴ほど分注し、氷冷下で 3 0 分間遮光して放置する。

50

両ケースとも、放置後、プレートに免疫細胞染色用緩衝液を添加し、細胞をよく洗浄し、蛍光顕微鏡、セルソーター等により解析する。

被験試料を添加しない系と比較し、本発明のポリペプチド含量を増加あるいは減少させる被験試料を探索することにより、発現調節化合物を同定することができる。

【0078】

(2) 本発明のポリペプチド遺伝子の転写産物定量系を用いた探索および同定

本発明のポリペプチドあるいは該ポリペプチドをコードするmRNAを発現する細胞を被験試料と接触させた後、該mRNA含量を定量することにより発現調節化合物を探索、同定することができる。

本発明のポリペプチドあるいは該ポリペプチドmRNAを発現する細胞としては、例えば上記[6](1)記載の細胞株を、被験試料としては上記[5]のものをを用いることができる。

本発明のポリペプチドあるいは該ポリペプチドをコードするmRNAを発現する細胞を、該細胞の増殖することのできる培地に懸濁し、被験試料を該培地に添加し、該細胞を接触させた後、該細胞の発現した該mRNAの含量を、通常のノーザンハイブリダイゼーション法、RNAのドットプロットハイブリダイゼーション法、RT-PCR法等を用い定量する。

【0079】

ハイブリダイゼーション法等に用いることのできるプローブおよびRT-PCR法等に用いることのできるプライマーとして、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子断片をあげるすることができる。

具体的には、配列番号2または配列番号16に記載の塩基配列中の連続した5~60塩基と同じ配列を有するオリゴヌクレオチド、該オリゴヌクレオチドと相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドを好適に用いることができる。

被験試料を添加しない系と比較し、本発明のポリペプチドをコードするmRNA含量を増加あるいは減少させる被験試料を探索することにより、発現調節化合物を同定することができる。

【0080】

(3) レポーター遺伝子を用いた探索および同定

本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の転写を制御する領域(以下、転写制御領域と略す)の下流にレポーター遺伝子の連結されたDNAを含むプラスミドで形質転換された形質転換体と被験試料とを接触させた後、レポーター遺伝子によりコードされたポリペプチドの発現量を定量することにより発現調節化合物を探索、同定することができる。

転写制御領域は、通常、遺伝子の5'上流に含まれることが多い。本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の5'上流領域は、例えばGenome Walker kits(Clontech社製)等を用いて調製することができる。また、該領域を適当な制限酵素を用い、適切な長さに切断した断片を転写制御領域として用いることができる。

【0081】

レポーター遺伝子としては、該遺伝子の翻訳産物が細胞内で安定であり、該翻訳産物の存在量が容易に定量できるものであればいかなるものでも用いることができ、該遺伝子がコードするポリペプチドとして、例えば、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ(CAT)、 β -ガラクトシダーゼ(β -gal)、ルシフェラーゼ(Luc)、 β -グルクロニダーゼ、エクオリン、グリーンフルオレッセントプロテイン(GFP)等をあげることができる。

該転写制御領域を含むレポータープラスミドを導入する宿主細胞としては、いかなる細胞も用いることができるが、好適には、[6](1)記載の本発明のポリペプチドあるいは該ポリペプチドmRNAの発現が認められている細胞株を用いることができる。

【0082】

被験試料として、上記[5]のものをを用いることができる。

転写制御領域の下流に常法によりレポーター遺伝子を連結し、作製したプラスミドを用い

、常法により宿主細胞を形質転換する。

また、ポジティブセレクション用マーカー（G418耐性遺伝子等）およびネガティブセレクション用マーカー（単純ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼやジフテリア毒素Aフラグメント遺伝子等）をつないだジーンターゲットングベクターを作製し、本発明のポリペプチドをコードする染色体遺伝子の一部をレポーター遺伝子で置換した細胞株を作製することもできる〔Nature, 336, 348 (1988)、Analytical Biochemistry, 214, 77 (1993)、Gene Targeting, The Practical Approach Series, IRL Press (1993)〕。

【0083】

該形質転換体を、例えば該細胞の増殖することのできる培地に懸濁し、被験試料を該培地に添加し、該細胞を接触させた後、該細胞の発現したレポーター遺伝子にコードされたポリペプチドの量を、該ポリペプチドに適した方法で検出、定量する。

検出、定量法として、CATの場合には、例えば、モレキュラー・クローニング第2版、16章、60頁に記載の方法を、galの場合には、例えば、モレキュラー・クローニング第2版、16章、66頁に記載の方法を、lucの場合には、例えば、実験医学別冊バイオマニュアルシリーズ4 遺伝子導入と発現・解析法、89(1994)に記載の方法を、GFPの場合には、例えば、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94, 4653 (1997)記載の方法等をあげることができる。被験試料を添加しない系と比較し、レポーター遺伝子にコードされたポリペプチド含量を増加あるいは減少させる被験試料を探索することにより、発現調節化合物を同定することができる。

【0084】

[7] 本発明のDNA、ポリペプチド、抗体、アゴニスト、アンタゴニストおよび発現調節化合物の利用

(1) 本発明のDNAは、該DNAをプローブとして用いて、ヒトおよびマウスなど非ヒト哺乳動物の組織や細胞から1と同様にして抽出したRNAについてノーザンハイブリダイゼーションを行うことにより、その組織や細胞における本発明のポリペプチド遺伝子のmRNAを検出あるいは定量することができる。各種の組織でそのmRNAの発現量を比較することにより本発明のポリペプチドの組織発現分布を知ることができる。

【0085】

(2) 本発明のオリゴヌクレオチドは、本発明のDNAの特異的プライマーとして用いて、ヒトおよびマウスなど非ヒト哺乳動物の組織や細胞から1と同様にして抽出したRNAについてRT-PCR〔reverse transcription PCR; PCR Protocols (1990)〕を行うことにより、本発明のポリペプチドをコードするmRNAの検出や定量を行うことができる。

該mRNAを定量する方法は、本遺伝子が関与する病態の診断に用いることができる。各種病態モデル動物において、該mRNAを定量することにより、病態における該遺伝子産物の重要性を明らかにすることができる。また、薬剤の有無による該mRNAの発現量を比較することにより薬剤を評価することができる。

【0086】

(3) 本発明のオリゴヌクレオチドは、これをプローブとして用いて、ヒトおよびマウスなど非ヒト哺乳動物の組織切片に対してin situハイブリダイゼーション〔Methods in Enzymology, 254, 419 (1995)〕を行うことにより、組織内での本発明のポリペプチドの発現細胞の特定等のより細かい発現分布を知ることができる。

これらの方法によって得られる、本発明のポリペプチドがどのような組織や細胞で発現しているかに関する情報および細胞がどのような刺激を受けたときに発現量が変化するかに関する情報は、本発明のポリペプチドの生理機能や病態への関与を解析するために有用である。

【0087】

(4) 本発明のDNAをプローブとして用い、ゲノムDNAに対してサザンハイブリダイゼーション〔モレキュラー クローニング 第2版〕を行うことにより、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の変異を検出することができる。

変異の検出を行うことにより、該遺伝子の変異が原因となっている可能性のある、例えば糖尿病、虚血性心疾患、高血圧、腎炎、膵炎、潰瘍、アレルギー、喘息、リウマチ、骨粗鬆症、痛み、不安症、分裂病、躁鬱病、パーキンソン病、痴呆または悪性腫瘍等の疾患の診断を行うことができる。

【0088】

(5) 本発明のポリペプチドをコードする遺伝子をPCR等を用いて増幅して塩基配列を解析することにより、あるいはDNAチップ等を用いて解析を行うことにより、1塩基多型(single nucleotide polymorphisms; SNP)などの多型を検出することができる。多型の検出を行うことにより、該遺伝子の多型が関連している可能性のある、例えば糖尿病、虚血性心疾患、高血圧、腎炎、膵炎、潰瘍、アレルギー、喘息、リウマチ、骨粗鬆症、痛み、不安症、分裂病、躁鬱病、パーキンソン病、痴呆または悪性腫瘍等の疾患の診断を行うことができる。

10

【0089】

(6) 本発明のアンチセンス・オリゴヌクレオチド(RNA、DNAまたはその誘導体)を用い、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の転写もしくはmRNAの翻訳を抑制することにより〔化学、46, 681 (1991)、Bio/Technology, 9, 358 (1992)〕、該遺伝子が発症に関与している可能性のある、例えば糖尿病、虚血性心疾患、高血圧、腎炎、膵炎、潰瘍、アレルギー、喘息、リウマチ、骨粗鬆症、痛み、不安症、分裂病、躁鬱病、パーキンソン病、痴呆、感染症または悪性腫瘍等の疾患の予防や治療に用いることができる。

20

【0090】

上述のアンチセンス・オリゴヌクレオチドは、本発明のポリペプチドをコードするDNAの塩基配列中の連続した5~60塩基と相補的な配列を有するオリゴヌクレオチド、好ましくは本発明のポリペプチドをコードするDNAの翻訳開始領域にある5~60塩基と相補的な塩基配列を基にして設計・調製し、生体内に投与する。

本発明のDNAを含有する医薬は、上記〔5〕の本発明のポリペプチドのアゴニストまたはアンタゴニストの医薬製剤の調製法と同様な方法を用いて調製することができ、調製された該医薬製剤を上記〔5〕の場合と同様な方法で投与することができる。

【0091】

(7) 本発明のDNAを用い、〔2〕記載の方法により本発明のポリペプチドを取得することができる。

30

本発明のポリペプチドの用途としては、糖尿病、虚血性心疾患、高血圧、腎炎、膵炎、潰瘍、アレルギー、喘息、リウマチ、骨粗鬆症、痛み、不安症、分裂病、躁鬱病、パーキンソン病、痴呆、感染症または悪性腫瘍等の疾患の治療薬または予防薬が考えられる。

本発明のポリペプチドを含有する医薬は、上記〔5〕の本発明のポリペプチドのアゴニストまたはアンタゴニストの医薬製剤の調製法と同様な方法を用いて調製することができ、調製された該医薬製剤を上記〔5〕の場合と同様な方法で投与することができる。

【0092】

(8) 本発明のオリゴヌクレオチドは一本鎖または二本鎖としてレトロウィルス、アデノウィルス、アデノ随伴ウィルス等のウィルスベクター、その他のベクターに組み込んで遺伝子治療用ベクターとし、遺伝子治療に用いることができる。

40

【0093】

(9) 本発明のポリペプチドを抗原として用い、〔3〕記載の方法により本発明のポリペプチドに対する抗体を製造することができる。

本発明のポリペプチドに対する抗体を用いて、本発明のポリペプチドを免疫学的に検出または定量することができる。

具体的には、マイクロタイタープレートを用いるELISA法、酵素標識抗体法や蛍光抗体法による免疫組織染色、ウェスタンブロット法等を用いた検出法をあげることができる。

具体的には、液相中で本発明のポリペプチド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、¹²⁵I等の放射性同位体で

50

標識した本発明のポリペプチドと本発明のポリペプチドを認識する抗体を用いるラジオイムノアッセイ法等をあげることができる。

【0094】

また、本発明の抗体は病理組織切片を用いた免疫組織染色にも利用できる。

本発明の抗体を用い、健常者および被験者の細胞または組織に存在する本発明のポリペプチドを免疫学的に検出または定量し、その量を健常者と被験者とで比較し、発現量が変化しているかどうかを調べることにより、被験者の糖尿病、虚血性心疾患、高血圧、腎炎、膵炎、潰瘍、アレルギー、喘息、リウマチ、骨粗鬆症、痛み、不安症、分裂病、躁鬱病、パーキンソン病、痴呆、感染症または悪性腫瘍等の病態の診断に用いることができる。

また、本発明の抗体を用いて、各種病態モデル動物の組織および細胞に存在する該ポリペプチドを免疫学的に検出または定量し、正常動物と比較することにより、病態における該ポリペプチドの重要性を明らかにすることができる。さらに、薬剤の有無による該ポリペプチドの発現量を比較することにより薬剤を評価することができる。

【0095】

(10) 本発明のポリペプチドの機能(PDE活性)を阻害する抗体を投与することにより、糖尿病、虚血性心疾患、高血圧、腎炎、膵炎、潰瘍、アレルギー、喘息、リウマチ、骨粗鬆症、痛み、不安症、分裂病、躁鬱病、パーキンソン病、痴呆、感染症または悪性腫瘍等の疾患の治療または予防が期待される。

本発明の抗体を含有する医薬は、上記[5]の本発明のポリペプチドのアゴニストまたはアンタゴニストの医薬剤の調製法と同様な方法を用いて調製することができ、調製された該医薬剤を上記[5]の場合と同様の方法で投与することができる。

【0096】

(11) 本発明のアゴニスト、アンタゴニストおよび本発明のポリペプチド遺伝子の発現を調節する化合物は、糖尿病、虚血性心疾患、高血圧、腎炎、膵炎、潰瘍、アレルギー、喘息、リウマチ、骨粗鬆症、痛み、不安症、分裂病、躁鬱病、パーキンソン病、痴呆、感染症または悪性腫瘍等の疾患の治療または予防に用いることが期待される。

以下の実施例により本発明を具体的に例示するが、本発明の範囲は実施例によって限定されることはない。

【0097】

【実施例】

実施例1：PDE活性を有する蛋白質をコードするヒトcDNA断片のクローニング(1) Hep G2細胞由来cDNAライブラリーの作製

ヒト肝細胞株HepG2から、文献(J. Sambrook, E. F. Fritsch & T. Maniatis, Molecular Cloning Second edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989)に記載されているCytoplasmic RNA抽出法およびPolyA(+)RNA精製法に準じmRNAを抽出し、精製した。それぞれのpolyA(+)RNAよりオリゴキャップ法[M. Maruyama and S. Sugano, Gene, 138, 171 (1994)]によりcDNAライブラリーを作製した。Oligo-cap linker(配列番号3)およびOligo dT primer(配列番号4)を用いて、文献[鈴木・菅野, 蛋白質 核酸 酵素, 41, 197 (1996)、Y. Suzuki et al., Gene, 200, 149 (1997)]に従ってBAP(Bacterial Alkaline Phosphatase)処理、TAP(Tobacco Acid Pyrophosphatase)処理、RNAライゲーション、第一鎖cDNAの合成とRNAの除去を行った。次いで、5'末端側と3'末側のPCRプライマー(配列番号5および6)を用いたPCR(polymerase chain reaction)により2本鎖cDNAに変換した後、制限酵素SfiIで切断した。該cDNAをDraIIIで切断したベクター-pME18SFL3(GenBank AB009864, Expression vector, 3392 bp)に組み込み、cDNAライブラリーを作製した。cDNAは発現が可能な方向に組み込んだ。

【0098】

(2) ランダムシーケンス

上記(1)で調製したcDNAライブラリーの各大腸菌クローンから常法に従ってプラスミドDNAを取得し、各プラスミドが含有するcDNAの5'末端の塩基配列を決定した。塩基配列の決定は、キット(BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction K

10

20

30

40

50

it, PE Biosystems社製)とDNAシーケンサー(ABI PRISM 377, PE Biosystems社製)を用いて行った。プライマーとしては、配列番号7および8に示す合成DNAを使用した。

【0099】

(3) N末領域のクローン化と相同性検索ソフトウェアを用いた解析

得られた塩基配列についてはヒトPDE10A(GenBank:AB020593)の遺伝子配列情報を基にブラストサーチ相同性検索ソフトウェアを用いて解析し、相同性の認められる配列を見出した。該クローンの全塩基配列を決定した結果、プラスミドhep10314には配列番号2に記載された塩基配列の塩基番号339番目からの約2.1kbのcDNAが含まれ、配列番号1に記載された新規ポリペプチド中の341アミノ酸がコードされていた。

該配列情報をもとに配列番号9および配列番号10に記載されたDNAプライマーを設計し、Human Pancreas Marathon-Ready cDNAキット(クロンテック社製)を用いて、以下に示す方法によりN末領域をPCR増幅した。

10

【0100】

即ち、Human Pancreas Marathon-Ready cDNA 2 μ L、配列番号9およびAP1(キットに添付)のプライマー各々0.2 μ mol/L、各成分200 μ mol/LのdNTP(dATP、dGTP、dCTP、dTTP)混合液、Taq Goldポリメラーゼ(パーキンエルマー社製)2.5単位および1 \times Taq Gold 緩衝液を含む反応溶液50 μ Lを用い、下記条件下でPCRを行なった。

即ち、TaKaRa PCR Thermal Cycler 480を用い、95 $^{\circ}$ Cで10分間加熱後、94 $^{\circ}$ Cで30秒間、60 $^{\circ}$ Cで2分間の工程を1サイクルとして30サイクル行ない、更に72 $^{\circ}$ Cで8分間加熱した。続いて、得られた該PCR反応液の100倍希釈液 2 μ L、配列番号10およびAP2(キットに添付)のプライマー各々0.2 μ mol/L、各成分200 μ mol/LのdNTP(dATP、dGTP、dCTP、dTTP)混合液、Taq Goldポリメラーゼ(パーキンエルマー社製)2.5単位および1 \times Taq Gold 緩衝液を含む反応溶液50 μ Lを用いて、上記方法で同様にPCRを行なった。

20

【0101】

得られた該PCR反応液より5 μ Lを分取し、アガロース電気泳動により約0.7kbのDNA断片が増幅されたことを確認後、QIAEX II Gel Extraction Kit(QIAGEN社製)を用いてマニュアルに従ってDNA断片を精製した。

上記で回収したDNA断片50ngおよびpT7Blue T-Vector(Novagen社製)50ngをDNA Ligation Kit Ver. 2(宝酒造社製)を用いてマニュアルに従って結合反応を行なった。該反応により得られた組み換えプラスミドDNAを用いて大腸菌JM109株を形質転換し、常法によりプラスミドpT-1を得た。

30

プラスミドpT-1に含まれるDNA断片の塩基配列を常法によって決定することにより、挿入DNA断片は挿入断片中のClaI部位でhep10314のClaI部位と連結可能であることが判明した。連結した塩基配列を配列番号2に記載した。該配列には、配列番号1に記載された新規ポリペプチドがコードされていた。

また、既知タンパク質配列データベースに対して、該アミノ酸配列のSmith&Waterman検索を行なったところ、PDE5A、PDE10Aファミリーとの相同性が強く検出された。そこで、各々のファミリーからヒトPDE5Aアミノ酸配列(GenBank:CAA06170)、ヒトPDE10Aアミノ酸配列(GenBank:BAA78034)を選択しアライメントを作製した。図1にヒトPDE5A配列、図2にヒトPDE10A配列とのアライメント結果を示す。PDEに共通したアミノ酸配列であるHDXXHXXXXN配列も認められた(図1、図2の下線部)。

40

【0102】

実施例2:ノーザンハイブリダイゼーションによるmRNAの発現解析

実施例1で決定した塩基配列の情報を基に配列番号11に示される5'端側DNAプライマーと配列番号10に示される3'端側DNAプライマーを設計し、合成した。

得られた2種類のプライマー各々0.2 μ mol/L、実施例1のプラスミド

(hep10314)10ng、各成分200 μ mol/LのdNTP(dATP、dGTP、dCTP、dTTP)混合液、ExTaqポリメラーゼ(宝酒造社製)2.5単位および1 \times ExTaq緩衝液を含む反応溶液50 μ Lを用い、下記条件下でPCRを行なった。

即ち、TaKaRa PCR Thermal Cycler 480を用い、95 $^{\circ}$ Cで3分間加熱後、94 $^{\circ}$ Cで1分間、60 $^{\circ}$ C

50

で1分間の工程を1サイクルとして25サイクル行ない、更に72℃で8時間加熱した。

得られた該PCR反応液より5μLを分取し、アガロース電気泳動により約0.2kbのDNA断片が増幅されたことを確認後、QIAEX II Gel Extraction Kit (QIAGEN社製)を用いてマニュアルに従ってDNA断片を精製した。

【0103】

一方、pBluescript II KS(-)(STRATAGENE社製)2μgを50mmol/Lトリス - 塩酸(pH7.5)、10mmol/L 塩化マグネシウム、1mmol/L ジチオスレイトール(以下、DTTと略記する)、100mmol/L 塩化ナトリウムからなる緩衝液50μLに溶解し、10単位のEcoRV(宝酒造社製)を加え、37℃で3時間消化反応を行った。フェノール抽出とエタノール沈殿の後、該DNA断片を50mmol/Lトリス - 塩酸(pH9.0)、1mmol/L 塩化マグネシウムからなる緩衝液50μLに溶解し、0.5単位のアルカリホスファターゼ(以下、BAPと略記する)(E. coli C75)(宝酒造社製)を加えて60℃で30分間脱リン酸化反応を行った。該反応液をアガロース電気泳動し、QIAEX II Gel Extraction Kit(QIAGEN社製)を用いてpBluescript II KS(-)由来のEcoRV-BAP処理断片(3.0kb)を精製した。

10

上記で回収したDNA断片50ngおよびpBluescriptII KS(-)由来のEcoRV-BAP処理断片をDNA Blunting Kit(宝酒造社製)を用いてマニュアルに従って結合反応を行った。該反応により得られた組み換えプラスミドDNAを用いて大腸菌JM109株を形質転換し、常法によりプラスミドp200を得た。

【0104】

プラスミドp200の2μgを50mmol/L トリス - 塩酸(pH7.5)、10mmol/L 塩化マグネシウム、1mmol/L DTT、100mmol/L 塩化ナトリウムからなる緩衝液50μLに溶解し、10単位のEcoRI(宝酒造社製)とBstXI(宝酒造社製)を加え、37℃で3時間消化反応を行った。フェノール抽出とエタノール沈殿の後、該DNA断片をDNA Blunting Kit(宝酒造社製)を用いてマニュアルに従って結合反応を行った。該反応により得られた組み換えプラスミドDNAを用いて大腸菌JM109株を形質転換し、常法によりNorthern解析プローブ作製用プラスミドp200-EBを調製した。該プラスミドの構築過程および制限酵素地図を図3に示す。

20

調製したプラスミドp200-EB 10μgを10mmol/L トリス - 塩酸(pH7.5)、10mmol/L 塩化マグネシウム、50mmol/L 塩化ナトリウム、1mmol/L DTTからなる緩衝液50μLに溶解し、30単位のHindIII(宝酒造社製)を加え、37℃で6時間消化反応を行った。該反応液を用いてフェノール - クロロホルム抽出、エタノール沈殿を行い、DNA断片を回収した。

30

【0105】

該DNA断片の1μgを、40mmol/Lトリス - 塩酸(pH8.0)、6mmol/L 塩化マグネシウム、2mmol/L スペルミジン、10mmol/L DTT、1mmol/L ATP、1mmol/L CTP、1mmol/L GTP、0.65mmol/L UTP、0.35mmol/L ディゴキシゲニン-11-UTPを含む緩衝液50μLに溶解し、40単位のT7 RNAポリメラーゼ(ベーリンガーマンハイム社製)を添加し、37℃で2時間in vitro転写反応を行なった。

反応後、得られた該反応液より、エタノール沈殿によりディゴキシゲニン標識cRNAプローブを回収した。

該プローブを用いて、ヒト心臓、脳、胎盤、肺、肝臓、骨格筋、腎臓、膵臓のpoly(A)⁺ RNAフィルター〔Human Multiple Tissue Northern Blotsのフィルター(Clontech社製)〕とヒト心臓、脳、肝臓、膵臓、胎盤、肺のpoly(A)⁺ RNAフィルター〔Human Normal Tissue mRNA blot I (Normalized)のフィルター(東洋紡社製)〕に対して、以下に示す条件に従いノーザンハイブリダイゼーションを行った。

40

【0106】

該フィルターを、50%ホルムアミド、5倍濃度のSSC(1倍濃度のSSCの組成は、150mmol/L 塩化ナトリウムおよび15mmol/L クエン酸ナトリウムよりなる)、0.5%ドデシル硫酸ナトリウム(以下、SDSと略記する)、2%ブロッキング試薬(ベーリンガーマンハイム社製)、0.1mg/mL サケ精子DNAを含む緩衝液(以下、ハイブリダイゼーションバッファーと略記する)中に浸漬し、70℃で2時間プレハイブリダイゼーションを行なった。

該フィルターを、上述のディゴキシゲニン標識cRNAプローブが1μg/mLの濃度で溶解し

50

ているハイブリダイゼーションバッファーに浸漬し、70℃で15時間ハイブリダイゼーションを行なった。

該フィルターを2倍濃度のSSC、0.1% SDSよりなる緩衝液中で70℃、10分間浸漬する条件で1回、0.2倍濃度のSSC、0.1% SDSよりなる緩衝液中で70℃、30分間浸漬する条件で3回洗浄した。

該フィルターを100mmol/L マレイン酸 (pH7.5)、150mmol/L 塩化ナトリウムよりなる緩衝液 (以下、DIG I 緩衝液と略記する) 中で室温、15分間浸漬する条件で2回洗浄し、SDSを除去した。

該フィルターを100mmol/L マレイン酸 (pH7.5)、150mmol/L 塩化ナトリウム、1% ブロッキング試薬よりなる緩衝液 (以下、DIGII 緩衝液と略記する) に浸漬し、1時間室温にてブロッキングを行った。 10

【0107】

該フィルターを、DIGII 緩衝液で10000倍に希釈したアルカリホスファターゼ標識抗ディオキシゲニン抗体Fabフラグメント (ベーリンガー・マンハイム社製) 溶液中に浸漬し、室温で30分間抗原抗体反応を行った。

該フィルターをDIGI 緩衝液で室温、30分間浸漬する条件で3回洗浄し、余分な抗体を除去した後、100mmol/L トリス - 塩酸 (pH9.0)、100mmol/L 塩化ナトリウム、50mmol/L 塩化マグネシウムからなる緩衝液 (以下、DIGIII 緩衝液と略記する) に5分間浸漬し平衡化した。

該フィルターを、DIGIII 緩衝液で100倍に希釈した発光基質CDP-Star (ベーリンガー・マンハイム社製) 溶液中に室温で15分間浸漬し、シグナルを発光させ、CCDカメラ (富士写真フィルム社製) で検出した。 20

結果を図4に示す。臍臓において約2.6キロヌクレオチドのバンドが認められた。

【0108】

実施例3: GST融合蛋白質発現大腸菌を用いたPDE活性の測定

A. GST融合蛋白質発現用プラスミドの構築

実施例1で取得したDNA断片について、PDE活性を有するアミノ酸配列をコードしていることを確認するため、グルタチオンSトランスフェラーゼ (以下、GSTと略記する) 融合蛋白質発現大腸菌を作製した。

実施例1で決定した塩基配列の情報をもとに配列番号12に示される5'端側DNAプライマーと配列番号13に示される3'端側DNAプライマーを設計し、合成した。 30

得られた2種類のプライマー各々0.2μmol/L、実施例1のプラスミド (hep10314) 10ng、各成分200μmol/LのdNTP (dATP、dGTP、dCTP、dTTP) 混合液、PLATINUM Pfx DNAポリメラーゼ (ライフテック社製) 2.5単位および1× PLATINUM Pfx DNAポリメラーゼ緩衝液を含む反応溶液50μLを用い、下記条件下でPCRを行った。

即ち、サーマルサイクラーPTC-200 (MJリサーチ社製) を用い、95℃で3分間加熱後、94℃で1分間、60℃で1分間の工程を1サイクルとして25サイクル行い、更に72℃で8分間加熱した。

【0109】

得られた該PCR反応液より5μLを分取し、アガロース電気泳動により約1.0kbのDNA断片が増幅されたことを確認した。フェノール抽出とエタノール沈殿の後、20mmol/L トリス - 塩酸 (pH7.5)、10mmol/L 塩化マグネシウム、1mmol/L DTT、100mmol/L 塩化カリウムからなる緩衝液50μLに溶解し、10単位のBamHI (宝酒造社製) を加え、37℃で3時間消化反応を行った。フェノール抽出とエタノール沈殿の後、該DNA断片を10mmol/L トリス - 塩酸 (pH7.5)、10mmol/L 塩化マグネシウム、1mmol/L DTT、50mmol/L 塩化ナトリウム、0.01% ウシ血清アルブミンからなる緩衝液50μLに溶解し、10単位のXbaI (宝酒造社製) を加えて37℃で3時間消化反応を行った。該反応液をアガロース電気泳動し、QIAEX II Gel Extraction Kit (QIAGEN社製) を用いてBamHI - XbaI 断片 (1.0kb) を精製した。 40

【0110】

一方、プラスミドpVL1393 (ファーミンジェン社製) 2μgを20mmol/L トリス - 塩酸 (pH7.5) 50

、10mmol/L 塩化マグネシウム、1mmol/L DTT、100mmol/L 塩化カリウムからなる緩衝液50 μ Lに溶解し、10単位のBamHIを加え、37 $^{\circ}$ Cで3時間消化反応を行った。フェノール抽出とエタノール沈殿の後、該DNA断片を10mmol/L トリス - 塩酸(pH7.5)、10mmol/L 塩化マグネシウム、1mmol/L DTT、50mmol/L 塩化ナトリウム、0.01% ウシ血清アルブミンからなる緩衝液50 μ Lに溶解し、10単位のXbaIを加えて37 $^{\circ}$ Cで3時間消化反応を行った。該反応液をアガロース電気泳動し、QIAEX II Gel Extraction Kit(QIAGEN社製)を用いてBamHI - XbaI断片(9.6kb)を精製した。

上記で回収したPCR増幅BamHI - XbaI断片(1.0kb)50ngおよびpVL1393由来のBamHI - XbaI断片(9.6kb)をDNA Ligation Kit Ver.2(宝酒造社製)を用いてマニュアルに従って結合反応を行った。該反応により得られた組み換えプラスミドDNAを用いて大腸菌JM109株を形質転換し、常法によりプラスミドpPDE-1393を得た。

10

【0111】

該プラスミドpPDE-1393の2 μ gを50mmol/L トリス - 塩酸(pH7.5)、10mmol/L 塩化マグネシウム、1mmol/L DTT、100mmol/L 塩化ナトリウム、0.01% ウシ血清アルブミン、0.01% Triton X-100からなる緩衝液50 μ Lに溶解し、それぞれ10単位のClaIおよびNotIを加えて37 $^{\circ}$ Cで3時間消化反応を行った。該反応液をアガロース電気泳動し、QIAEX II Gel Extraction Kit(QIAGEN社製)を用いてClaI - NotI断片(1.0kb)を精製した。

実施例1で取得したプラスミドpT-1 2 μ gを50mmol/Lトリス - 塩酸(pH7.5)、10mmol/L 塩化マグネシウム、1mmol/L DTT、100mmol/L 塩化ナトリウムからなる緩衝液50 μ Lに溶解し、それぞれ10単位のEcoRVおよびClaIを加えて37 $^{\circ}$ Cで3時間消化反応を行った。該反応液をアガロース電気泳動し、QIAEX II Gel Extraction Kit(QIAGEN社製)を用いてEcoRV - ClaI (0.3kb)を精製した。

20

【0112】

一方、プラスミドpGEX-5X-1(ファルマシア社製)2 μ gを33mmol/L トリス - 塩酸(pH7.9)、10mmol/L 酢酸マグネシウム、0.5mmol/L DTT、66mmol/L 酢酸カリウムからなる緩衝液50 μ Lに溶解し、10単位のSmaIを加え、30 $^{\circ}$ Cで3時間消化反応を行った。フェノール抽出とエタノール沈殿の後、該DNA断片を50mmol/L トリス - 塩酸(pH7.5)、10mmol/L 塩化マグネシウム、1mmol/L DTT、100mmol/L 塩化ナトリウム、0.01% ウシ血清アルブミン、0.01% Triton X-100からなる緩衝液50 μ Lに溶解し、10単位のNotIを加えて37 $^{\circ}$ Cで3時間消化反応を行った。該反応液をアガロース電気泳動し、QIAEX II Gel Extraction Kit(QIAGEN社製)を用いてSmaI - NotI断片(5.0kb)を精製した。

30

上記で回収したpPDE-1393由来のClaI - NotI断片(1.0kb)50ng、pT-1由来のEcoRV - ClaI断片(0.3kb)50ngおよびpGEX-5X-1由来のSmaI - NotI断片(5.0kb)50ngをDNA Ligation Kit Ver.2(宝酒造社製)を用いてマニュアルに従って結合反応を行った。該反応により得られた組み換えプラスミドDNAを用いて大腸菌JM109株を形質転換し、常法によりプラスミドpGST-PDEを含む大腸菌JM109/pGST-PDE株を得た。該プラスミドの構築過程および制限酵素地図を図5に示す。

【0113】

B. GST融合蛋白質の大腸菌を用いた発現とPDE活性の測定
200 μ g/mLのアンピシリンを含むLB培地50mLに該大腸菌前培養液(30 $^{\circ}$ C、200 μ g/mLのアンピシリンを含むLB培地で一晚培養)を1/100量加え、25 $^{\circ}$ Cで振とう培養した。OD₅₅₀値が0.5になったところで、イソプロピル- β -D-チオガラクトピラノシド(2mmol/L)を添加し、25 $^{\circ}$ Cで3時間の条件で発現を誘導した。遠心分離(3,000rpmで10分間)により菌体を回収し、抽出液(20mmol/Lトリス - 酢酸(pH7.5)、2mmol/L 塩化マグネシウム、1mmol/L DTT、250 μ g/mL アプロチニン、40 μ g/mL フッ化フェニルメチルスルホニル、1 μ g/mL ペプスタチンA)に懸濁して、超音波破碎機(TOMY model UR-200R)を用いて大腸菌を破壊した。上記抽出液を10,000rpmで30分間遠心分離し、上清をPDE活性測定に用いた。

40

【0114】

C. PDE活性の測定

50

PDE活性はKincaid, R.L.とManganiello, V.C.の方法〔Method. Enzymol., 159, 457-470(1988)〕に従って測定した。[³H]-cAMPまたは[³H]-cGMPを基質として300 μLの反応液〔50mmol/LのN,N-ビス(2-ヒドロキシエチル)-2-アミノエタンスルホン酸(pH7.2)、1mmol/L塩化マグネシウム、0.1mmol/Lエチレンジグリコールビス(4-アミノエチルエーテル)-N,N,N',N'-四酢酸二ナトリウム〕中で行った。基質濃度は、1 μmol/Lとした。反応液を30°Cで15分インキュベートした後、HClを添加して反応を停止した。反応生成物を5'-ヌクレオチダーゼ(シグマ社製)によってアデノシンに変換し、DEAE-Sephadex A-25カラム(ファルマシア社製)で未反応物と分離した。溶出液をシンチレーションバイアルに移し、ウルチマゴールド(Packard社製)を6mL加え、液体シンチレーションカウンター(Beckman LS6500)を用いて放射活性を測定した。非触媒的水解量は、大腸菌可溶性画分を添加しない時の[³H]-cAMPおよび[³H]-cGMP分解量とした。大腸菌可溶性画分による分解量は全分解量から非触媒的水解量を差し引くことにより求めた。蛋白量は、Bio Rad Protein Assay法を用いて定量した。コントロールとしてプラスミドpGEX-5X-1のみを導入した大腸菌可溶性画分を用いた。結果を図6に示す。

10

以上、本発明のポリペプチドがcAMP及びcGMPを加水分解するPDE活性を有することが明白となった。

【0115】

実施例4：PDE活性を有する蛋白質をコードする全長ヒトcDNA断片のクローニング
(1)ヒト胎児腎由来cDNAライブラリーからのクローニング

プラスミドpGST-PDE 30 μgを、20mmol/L トリス - 塩酸 (pH8.5)、10mmol/L 塩化マグネシウム、100mmol/L 塩化カリウム、1mmol/L DTTを含む緩衝液50 μLに溶解し、40単位のBamHIおよびHpaI(宝酒造社製)を加え、37°Cで4時間消化反応を行った。

20

該反応液をアガロース電気泳動にかけ、約1kbのDNA断片を回収した。

該DNA断片を、QIAEX II Gel Extraction Kit(QIAGEN社製)を用い、マニュアルに従って精製した。精製された該DNA断片を、ECLダイレクト核酸ラベリング・検出システム(Amersham社製)を用いて、ホースラディッシュパーオキシダーゼ標識し、プローブとして用いた。

【0116】

該プローブを用いてヒト胎児腎由来cDNAライブラリー(クロンテック社製、商品名：Human Fetal Kidney 5'-STRETCH PLUS cDNA Library)2×10⁵クローニングを用いて、ブランクハイブリダイゼーションを行い、プローブにハイブリダイズする2個の独立したファージクローニング(ベクター：pGT10)を得た(クローニング6-1、23-1)。該ハイブリダイゼーションの操作は、全てECLダイレクト核酸ラベリング・検出システム(Amersham社製)のマニュアルに従って行った。該ファージクローニングのうちクローニング23-1に含まれるcDNA断片を、ファージベクターからプラスミドベクターへ組み換え直した。

30

【0117】

該ファージクローニング23-1のDNA 20 μgを、50mmol/L トリス - 塩酸 (pH7.5)、10mmol/L 塩化マグネシウム、100mmol/L 塩化ナトリウム、1mmol/L DTTを含む緩衝液30 μL中に溶解し、15単位のEcoRI(宝酒造社製)を添加し、37°Cで4時間消化反応を行った。該反応液をアガロース電気泳動し、約2kbおよび1kbのDNA断片を回収した。

該DNA断片を、QIAEX II Gel Extraction Kit(QIAGEN社製)を用い、マニュアルに従って精製した。

40

pBluescript II KS(-)(STRATAGENE社製)5 μgを50mmol/L トリス - 塩酸 (pH7.5)、10mmol/L 塩化マグネシウム、100mmol/L 塩化ナトリウム、1mmol/L DTTを含む緩衝液30 μLに溶解し、15単位のEcoRI(宝酒造社製)を添加し、37°Cで2時間消化反応を行った。該反応液よりエタノール沈殿によりEcoRI消化DNA断片を回収した。

該DNA断片を50mmol/L トリス - 塩酸 (pH9.0)、1mmol/L 塩化マグネシウムを含む緩衝液30 μLに溶解し、0.5単位のBAP(E. coli C75)(宝酒造社製)を添加し、60°Cで30分間脱リン酸化反応を行った。該反応液をアガロース電気泳動し、約3.0kbのDNA断片を回収した。該DNA断片を、QIAEX II Gel Extraction Kit(QIAGEN社製)を用い、マニュアルに従って精製した。

50

【0118】

上述のクローン23-1より得られた約2.0kb、約1.0kbのEcoRI DNA断片150ngおよびpBluescript II KS(-)のEcoRI - BAP処理済み断片50ngを66mmol/L トリス - 塩酸 (pH7.5)、6.6mmol/L 塩化マグネシウム、10mmol/L DTT、0.1mmol/L アデノシン3リン酸を含む緩衝液20μLに溶解し、T4 DNAリガーゼ(宝酒造社製)175単位を添加し、16℃で16時間結合反応を行った。

該結合反応により得られた組み換えプラスミドDNAを用いて大腸菌JM109株を形質転換し、常法によりプラスミドp23-1kおよびp23-2kを取得した。

該プラスミドに含まれるcDNA断片の塩基配列を決定した結果、プラスミドp23-1kおよびp23-2kの挿入DNA断片はEcoRI部位で連結可能であり、配列番号16に記載された約3.0kbのcDNAが含まれ、該cDNAには配列番号15に記載された576アミノ酸よりなる新規のポリペプチドがコードされていた。p23-1kおよびp23-2kの構造を図7に示す。

該ポリペプチドが有するアミノ酸配列を、既知のPDE配列と比較したところ、PDE5Aとの高い相同性が認められた。該アミノ酸配列とヒトPDE5Aアミノ酸配列(GenBank:CAA06170)とのアライメントを図8に示す。

以上の結果から、該配列は新規PDEをコードしていると考えられる。

【0119】

(2)RT-PCR法を用いた発現解析

上記した実施例4の(1)で決定した塩基配列の情報を基に配列番号17に示される5'端側DNAプライマーと配列番号18に示される3'端側DNAプライマーを設計し、合成した。

2種類のプライマー(配列番号17および配列番号18)各々1.0μmol/L、ヒト組織mRNAから作成したcDNAライブラリー2μL、各成分200μmol/LのdNTP(dATP、dGTP、dCTP、dTTP)混合液、Taq Goldポリメラーゼ(パーキンエルマー社製)2.5単位および1×Taq Gold緩衝液(Mg plus)を含む反応溶液20μLを用い、下記条件下でPCRを行なった。

【0120】

即ち、サーマルサイクラーPTC-200(MJリサーチ社製)を用い、95℃で10分間加熱後、94℃で1分間、60℃で1分間の工程を1サイクルとして38サイクル行い、更に72℃で8分間加熱した。

得られた該PCR反応液より10μLを分取し、アガロース電気泳動により予想される約400bpのDNA断片の増幅を確認した。精巣、前立腺、乳腺、膵臓での発現が認められた。電気泳動結果を図9に示す。

【0121】

【発明の効果】

本発明により得られる新規PDEポリペプチドのDNAを用いることにより、糖尿病、虚血性心疾患、高血圧、腎炎、膵炎、潰瘍、アレルギー、喘息、リウマチ、骨粗鬆症、痛み、不安症、分裂病、躁鬱病、パーキンソン病、痴呆、感染症、悪性腫瘍等の疾患の診断、予防、治療が可能となる。

【0122】

【配列表フリーテキスト】

配列番号3 - 人工配列の説明：合成DNA
 配列番号4 - 人工配列の説明：合成DNA
 配列番号5 - 人工配列の説明：合成DNA
 配列番号6 - 人工配列の説明：合成DNA
 配列番号7 - 人工配列の説明：合成DNA
 配列番号8 - 人工配列の説明：合成DNA
 配列番号9 - 人工配列の説明：合成DNA
 配列番号10 - 人工配列の説明：合成DNA
 配列番号11 - 人工配列の説明：合成DNA
 配列番号12 - 人工配列の説明：合成DNA
 配列番号13 - 人工配列の説明：合成DNA

40

50

配列番号 14 - 環状ヌクレオチドホスホジエステラーゼの触媒ドメイン内のモチーフ

配列番号 17 - 人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 18 - 人工配列の説明：合成 DNA

【 0 1 2 3 】

【 配列表 】

SEQUENCE LISTING

<110> KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.

<120> A peptide having a phosphodiesterase activity

<130> A01305MA

<160> 18

【 0 1 2 4 】

<210> 1

<211> 474

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Glu Lys Ser Ser Tyr Ser Asp Trp Leu Ile Asn Asn Ser Ile Ala
 1 5 10 15

10

Glu Leu Val Ala Ser Thr Gly Leu Pro Val Asn Ile Ser Asp Ala Tyr
 20 25 30

Gln Asp Pro Arg Phe Asp Ala Glu Ala Asp Gln Ile Ser Gly Phe His
 35 40 45

Ile Arg Ser Val Leu Cys Val Pro Ile Trp Asn Ser Asn His Gln Ile
 50 55 60

Ile Gly Val Ala Gln Val Leu Asn Arg Leu Asp Gly Lys Pro Phe Asp
 65 70 75 80

20

Asp Ala Asp Gln Arg Leu Phe Glu Ala Phe Val Ile Phe Cys Gly Leu
 85 90 95

Gly Ile Asn Asn Thr Ile Met Tyr Asp Gln Val Lys Lys Ser Trp Ala
 100 105 110

Lys Gln Ser Val Ala Leu Asp Val Leu Ser Tyr His Ala Thr Cys Ser
 115 120 125

30

Lys Ala Glu Val Asp Lys Phe Lys Ala Ala Asn Ile Pro Leu Val Ser
 130 135 140

Glu Leu Ala Ile Asp Asp Ile His Phe Asp Asp Phe Ser Leu Asp Val
 145 150 155 160

Asp Ala Met Ile Thr Ala Ala Leu Arg Met Phe Met Glu Leu Gly Met
 165 170 175

Val Gln Lys Phe Lys Ile Asp Tyr Glu Thr Leu Cys Arg Trp Leu Leu
 180 185 190

40

Thr Val Arg Lys Asn Tyr Arg Met Val Leu Tyr His Asn Trp Arg His	
195	200 205
Ala Phe Asn Val Cys Gln Leu Met Phe Ala Met Leu Thr Thr Ala Gly	
210	215 220
Phe Gln Asp Ile Leu Thr Glu Val Glu Ile Leu Ala Val Ile Val Gly	
225	230 235 240
Cys Leu Cys His Asp Leu Asp His Arg Gly Thr Asn Asn Ala Phe Gln	10
245	250 255
Ala Lys Ser Gly Ser Ala Leu Ala Gln Leu Tyr Gly Thr Ser Ala Thr	
260	265 270
Leu Glu His His His Phe Asn His Ala Val Met Ile Leu Gln Ser Glu	
275	280 285
Gly His Asn Ile Phe Ala Asn Leu Ser Ser Lys Glu Tyr Ser Asp Leu	
290	295 300
Met Gln Leu Leu Lys Gln Ser Ile Leu Ala Thr Asp Leu Thr Leu Tyr	
305	310 315 320
Phe Glu Arg Arg Thr Glu Phe Phe Glu Leu Val Ser Lys Gly Glu Tyr	
325	330 335
Asp Trp Asn Ile Lys Asn His Arg Asp Ile Phe Arg Ser Met Leu Met	
340	345 350
Thr Ala Cys Asp Leu Gly Ala Val Thr Lys Pro Trp Glu Ile Ser Arg	30
355	360 365
Gln Val Ala Glu Leu Val Thr Ser Glu Phe Phe Glu Gln Gly Asp Arg	
370	375 380
Glu Arg Leu Glu Leu Lys Leu Thr Pro Ser Ala Ile Phe Asp Arg Asn	
385	390 395 400
Arg Lys Asp Glu Leu Pro Arg Leu Gln Leu Glu Trp Ile Asp Ser Ile	
405	410 415
Cys Met Pro Leu Tyr Gln Ala Leu Val Lys Val Asn Val Lys Leu Lys	40

420 425 430
Pro Met Leu Asp Ser Val Ala Thr Asn Arg Ser Lys Trp Glu Glu Leu
435 440 445
His Gln Lys Arg Leu Leu Ala Ser Thr Ala Ser Ser Ser Ser Pro Ala
450 455 460
Ser Val Met Val Ala Lys Glu Asp Arg Asn
465 470

10

【 0 1 2 5 】

<210> 2

<211> 2513

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

atg gag aaa tca tca tac tcc gac tgg cta ata aat aac agc att gct	48	
Met Glu Lys Ser Ser Tyr Ser Asp Trp Leu Ile Asn Asn Ser Ile Ala		10
1 5 10 15		
gag ctg gtt gct tca aca ggc ctt cca gtg aac atc agt gat gcc tac	96	
Glu Leu Val Ala Ser Thr Gly Leu Pro Val Asn Ile Ser Asp Ala Tyr		
20 25 30		
cag gat ccg cgc ttt gat gca gag gca gac cag ata tct ggt ttt cac	144	
Gln Asp Pro Arg Phe Asp Ala Glu Ala Asp Gln Ile Ser Gly Phe His		20
35 40 45		
ata aga tct gtt ctt tgt gtc cct att tgg aat agc aac cac caa ata	192	
Ile Arg Ser Val Leu Cys Val Pro Ile Trp Asn Ser Asn His Gln Ile		
50 55 60		
att gga gtg gct caa gtg tta aac aga ctt gat ggg aaa cct ttt gat	240	
Ile Gly Val Ala Gln Val Leu Asn Arg Leu Asp Gly Lys Pro Phe Asp		
65 70 75 80		
gat gcg gat caa cga ctt ttt gag gct ttt gtc atc ttt tgt gga ctt	288	30
Asp Ala Asp Gln Arg Leu Phe Glu Ala Phe Val Ile Phe Cys Gly Leu		
85 90 95		
ggc atc aac aac aca att atg tat gat caa gtg aag aag tcc tgg gcc	336	
Gly Ile Asn Asn Thr Ile Met Tyr Asp Gln Val Lys Lys Ser Trp Ala		
100 105 110		
aag cag tct gtg gct ctt gat gtg cta tca tac cat gca aca tgt tca	384	
Lys Gln Ser Val Ala Leu Asp Val Leu Ser Tyr His Ala Thr Cys Ser		40
115 120 125		

aaa gct gaa gtt gac aag ttt aag gca gcc aac atc cct ctg gtg tca	432	
Lys Ala Glu Val Asp Lys Phe Lys Ala Ala Asn Ile Pro Leu Val Ser		
130 135 140		
gaa ctt gcc atc gat gac att cat ttt gat gac ttt tct ctc gac gtt	480	
Glu Leu Ala Ile Asp Asp Ile His Phe Asp Asp Phe Ser Leu Asp Val		
145 150 155 160		
gat gcc atg atc aca gct gct ctc cgg atg ttc atg gag ctg ggg atg	528	10
Asp Ala Met Ile Thr Ala Ala Leu Arg Met Phe Met Glu Leu Gly Met		
165 170 175		
gta cag aaa ttt aaa att gac tat gag aca ctg tgt agg tgg ctt ttg	576	
Val Gln Lys Phe Lys Ile Asp Tyr Glu Thr Leu Cys Arg Trp Leu Leu		
180 185 190		
aca gtg agg aaa aac tat cgg atg gtt cta tac cac aac tgg aga cat	624	
Thr Val Arg Lys Asn Tyr Arg Met Val Leu Tyr His Asn Trp Arg His		20
195 200 205		
gcc ttc aac gtg tgt cag ctg atg ttc gcg atg tta acc act gct ggg	672	
Ala Phe Asn Val Cys Gln Leu Met Phe Ala Met Leu Thr Thr Ala Gly		
210 215 220		
ttt caa gac att ctg acc gag gtg gaa att tta gcg gtg att gtg gga	720	
Phe Gln Asp Ile Leu Thr Glu Val Glu Ile Leu Ala Val Ile Val Gly		
225 230 235 240		30
tgc ctg tgt cat gac ctc gac cac agg gga acc aac aat gcc ttc caa	768	
Cys Leu Cys His Asp Leu Asp His Arg Gly Thr Asn Asn Ala Phe Gln		
245 250 255		
gct aag agt ggc tct gcc ctg gcc caa ctc tat gga acc tct gct acc	816	
Ala Lys Ser Gly Ser Ala Leu Ala Gln Leu Tyr Gly Thr Ser Ala Thr		
260 265 270		
ttg gag cat cac cat ttc aac cac gcc gtg atg atc ctt cag agt gag	864	40
Leu Glu His His His Phe Asn His Ala Val Met Ile Leu Gln Ser Glu		

275	280	285		
ggg cac aat atc ttt gct aac ctg tcc tcc aag gaa tat agt gac ctt			912	
Gly His Asn Ile Phe Ala Asn Leu Ser Ser Lys Glu Tyr Ser Asp Leu				
290	295	300		
atg cag ctt ttg aag cag tca ata ttg gca aca gac ctc acg ctg tac			960	
Met Gln Leu Leu Lys Gln Ser Ile Leu Ala Thr Asp Leu Thr Leu Tyr				
305	310	315	320	10
ttt gag agg aga act gaa ttc ttt gaa ctt gtc agt aaa gga gaa tac			1008	
Phe Glu Arg Arg Thr Glu Phe Phe Glu Leu Val Ser Lys Gly Glu Tyr				
	325	330	335	
gat tgg aac atc aaa aac cat cgt gat ata ttt cga tca atg tta atg			1056	
Asp Trp Asn Ile Lys Asn His Arg Asp Ile Phe Arg Ser Met Leu Met				
	340	345	350	
aca gcc tgt gac ctt gga gcc gtg acc aaa ccg tgg gag atc tcc aga			1104	20
Thr Ala Cys Asp Leu Gly Ala Val Thr Lys Pro Trp Glu Ile Ser Arg				
	355	360	365	
cag gtg gca gaa ctt gta acc agt gag ttc ttc gaa caa gga gat cgg			1152	
Gln Val Ala Glu Leu Val Thr Ser Glu Phe Phe Glu Gln Gly Asp Arg				
	370	375	380	
gag aga tta gag ctc aaa ctc act cct tca gca att ttt gat cgg aac			1200	
Glu Arg Leu Glu Leu Lys Leu Thr Pro Ser Ala Ile Phe Asp Arg Asn				30
385	390	395	400	
cgg aag gat gaa ctg cct cgg ttg caa ctg gag tgg att gat agc atc			1248	
Arg Lys Asp Glu Leu Pro Arg Leu Gln Leu Glu Trp Ile Asp Ser Ile				
	405	410	415	
tgc atg cct ttg tat cag gca ctg gtg aag gtc aac gtg aaa ctg aag			1296	
Cys Met Pro Leu Tyr Gln Ala Leu Val Lys Val Asn Val Lys Leu Lys				
	420	425	430	40
ccg atg cta gat tca gta gct aca aac aga agt aag tgg gaa gag cta			1344	

Pro Met Leu Asp Ser Val Ala Thr Asn Arg Ser Lys Trp Glu Glu Leu
435 440 445
cac caa aaa cga ctg ctg gcc tca act gcc tca tcc tcc tcc cct gcc 1392
His Gln Lys Arg Leu Leu Ala Ser Thr Ala Ser Ser Ser Ser Pro Ala
450 455 460
agt gtt atg gta gcc aag gaa gac agg aac taa acctccaggt cagctgcagc 1445
Ser Val Met Val Ala Lys Glu Asp Arg Asn
465470
igcaaaaiga ctacagcctg aagggccatt ttcagtccag caatgtcatc cttttgttct 1505
tttagctcag aaagacctaa catctcaagg atgcactggg aacctgcct gggctttcac 1565
ctigaagcat ggtcagcagc agagagagca acgggaagga caaagaaaga ggtggggcag 1625
ggagcacacc ccaggacct cactttccc taatgaacac gcatgggctg aaatgaaggc 1685
tcgggtagg ggactgtttt ggatecaagg acctgtggac agtcggccta ctactctga 1745
gctgagggaa cactgaacag taaaagcgtc attagcgtc cttcattttg tatagggctt 1805
ttctgtttgt tacaagccaa acattgcctg tctttgctc ccgtccciga atgccttttt 1865
gtgccagact gtcccagaa tectaattg tattecatag aggtatttta ttttaatec 1925
tagagcttct tatgatgga tctttagaa ttgcctacct aaaaggtaaa ctatactatc 1985
cttataaata ctgatcaatc ccagttctcc cctaaaaat gaatacatag taggactata 2045
gcaaatgigt ttgatggta attctagact gggactatgg taccctttc cagagtttta 2105
aaattcaacc ttcgttacag acaaagttt cteccagaag gaatggattg atagattttg 2165
attaaagtaa gggigggaagg aatctgtag ctggatttac cacaagtac atctagaac 2225
tatagttcac aggacagagc agagccatgg agaataagca ttgactacct tgagttctcc 2285
tagtgaggag ttcigtata aaatttaaga ttactaccag taaccaactt aaagcaaact 2345
ataggggtcc ctaattttgg attttccctt aagtgtgaaga aacaatgctt caaatgttaa 2405
gaaataacag cctggggcag cagcgagact ccgtctcaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2465
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aagaaggg

10

20

30

<210> 3

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 3

agcaucgagu cggccuuguu ggccuacugg

30

[0 1 2 7]

<210> 4

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 4

ggcgcagaag acggcctatg tggccttttt ttttttttt tt

42

[0 1 2 8]

<210> 5

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 5

agcatcgagt cggccttggt g

21

[0 1 2 9]

10

20

30

<210> 6

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 6

gcggctgaag acggcctatg t

21

10

[0 1 3 0]

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 7

cttcgctct aaaagctgcg

20

20

[0 1 3 1]

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 8

tgaggaggt tttttctcta

20

30

[0 1 3 2]

<210> 9

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 9

cctcactctg aaggatcatc a

21

10

[0 1 3 3]

<210> 10

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 10

gtcaaaagcc acctacacag t

21

20

[0 1 3 4]

<210> 11

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 11

taaggcagct tacatccctc t

21

30

[0 1 3 5]

<210> 12

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 12

cggtatcccc ccaccatgaa gtttaaggca gccaacatc

39

10

[0 1 3 6]

<210> 13

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 13

gctctagagc atccttgaga tgttaggtct

30

20

[0 1 3 7]

<210> 14

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> motif in catalytic core domain of cyclic nucleotide phosphodiester
ase

<220>

<222> (3), (4), (6), (7), (8) and (9)

<223> any amino acid

<400> 14

His Asp Xaa Xaa His Xaa Xaa Xaa Xaa Asn

510

30

40

[0 1 3 8]

<210> 15

<211> 576

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 15

Met Gln Met Tyr Leu Pro Phe Cys Gly Ile Ala Ile Ser Asn Ala Gln

1 5 10 15

Leu Phe Ala Ala Ser Arg Lys Glu Tyr Glu Arg Ser Arg Ala Leu Leu

20 25 30

Glu Val Val Asn Asp Leu Phe Glu Glu Gln Thr Asp Leu Glu Lys Ile

35 40 45

Val Lys Lys Ile Met His Arg Ala Gln Thr Leu Leu Lys Cys Glu Arg

50 55 60

Cys Ser Val Leu Leu Leu Glu Asp Ile Glu Ser Pro Val Val Lys Phe

65 70 75 80

Thr Lys Ser Phe Glu Leu Met Ser Pro Lys Cys Ser Ala Asp Ala Glu

85 90 95

Asn Ser Phe Lys Glu Ser Met Glu Lys Ser Ser Tyr Ser Asp Trp Leu

100 105 110

Ile Asn Asn Ser Ile Ala Glu Leu Val Ala Ser Thr Gly Leu Pro Val

115 120 125

Asn Ile Ser Asp Ala Tyr Gln Asp Pro Arg Phe Asp Ala Glu Ala Asp

130 135 140

Gln Ile Ser Gly Phe His Ile Arg Ser Val Leu Cys Val Pro Ile Trp

145 150 155 160

Asn Ser Asn His Gln Ile Ile Gly Val Ala Gln Val Leu Asn Arg Leu

165 170 175

Asp Gly Lys Pro Phe Asp Asp Ala Asp Gln Arg Leu Phe Glu Ala Phe

180 185 190

10

20

30

40

Val Ile Phe Cys Gly Leu Gly Ile Asn Asn Thr Ile Met Tyr Asp Gln	
195	200 205
Val Lys Lys Ser Trp Ala Lys Gln Ser Val Ala Leu Asp Val Leu Ser	
210	215 220
Tyr His Ala Thr Cys Ser Lys Ala Glu Val Asp Lys Phe Lys Ala Ala	
225	230 235 240
Asn Ile Pro Leu Val Ser Glu Leu Ala Ile Asp Asp Ile His Phe Asp	10
245	250 255
Asp Phe Ser Leu Asp Val Asp Ala Met Ile Thr Ala Ala Leu Arg Met	
260	265 270
Phe Met Glu Leu Gly Met Val Gln Lys Phe Lys Ile Asp Tyr Glu Thr	
275	280 285
Leu Cys Arg Trp Leu Leu Thr Val Arg Lys Asn Tyr Arg Met Val Leu	
290	295 300
Tyr His Asn Trp Arg His Ala Phe Asn Val Cys Gln Leu Met Phe Ala	
305	310 315 320
Met Leu Thr Thr Ala Gly Phe Gln Asp Ile Leu Thr Glu Val Glu Ile	
325	330 335
Leu Ala Val Ile Val Gly Cys Leu Cys His Asp Leu Asp His Arg Gly	
340	345 350
Thr Asn Asn Ala Phe Gln Ala Lys Ser Gly Ser Ala Leu Ala Gln Leu	30
355	360 365
Tyr Gly Thr Ser Ala Thr Leu Glu His His His Phe Asn His Ala Val	
370	375 380
Met Ile Leu Gln Ser Glu Gly His Asn Ile Phe Ala Asn Leu Ser Ser	
385	390 395 400
Lys Glu Tyr Ser Asp Leu Met Gln Leu Leu Lys Gln Ser Ile Leu Ala	
405	410 415
Thr Asp Leu Thr Leu Tyr Phe Glu Arg Arg Thr Glu Phe Phe Glu Leu	40

<210> 16

<211> 2994

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 16

gtgcgtgcgt gcgtgtgtgt gtgtgtgaga gagagacaga gagacataga gtctatgata 6

0

10

taaacaatgct ttttccctc ttgcctttaga gaagtcctaa gtatgtcact tgtttcatct 12

0

acattgccgaa gaatttaggg aatagttct ttcagttttt acttggagca tttatctctt 18

0

ctggaatcag agattctgga gatgaattc ttgagagtgc aaggcagtag taaaaatccc 24

0

tatgcctaaa cctccatgat gagaaagtct ttgttagggg taggcccctc acggctgggt 30

0

20

gtttctgccc ataggaggac tttccatta caggctccca gcctttctc atcaggcttc 36

0

tgcagaagca tcccaccagt atgattigtg tccagttatg tctacacagt ggcagacaca 42

0

attagaactc tgtcgcagaa ggctgccagg ccctctgacc cctagtctcc actgggcccc 48

0

30

tcctgacagg catgtttaaa actggtagca gataggtcta gaatcaagct gaaatccctg 54

0

ctacagaatg gaattgtatg ccatatacat atggtatatg ccatatgcca acgaaagaat 60

0

tgacttatat cctgcctacc tccaaatgtt atg cag atg tat ctt cca ttt tgt 654

Met Gln Met Tyr Leu Pro Phe Cys

1

5

40

gga atc gcc ata tct aac gct cag ctc ttt gct gcc tca agg aaa gaa 702

Gly Ile Ala Ile Ser Asn Ala Gln Leu Phe Ala Ala Ser Arg Lys Glu		
10	15	20
tat gaa aga agc aga gct ttg cta gag gtg gtt aat gac ctc ttt gaa		750
Tyr Glu Arg Ser Arg Ala Leu Leu Glu Val Val Asn Asp Leu Phe Glu		
25	30	35
gaa cag act gac ctg gag aaa att gtc aag aaa ata atg cat cgg gcc		798
Glu Gln Thr Asp Leu Glu Lys Ile Val Lys Lys Ile Met His Arg Ala		
	45	50
caa act ctg ctg aaa tgt gaa cgc tgt tct gtt tta ctc cta gag gac		846
Gln Thr Leu Leu Lys Cys Glu Arg Cys Ser Val Leu Leu Leu Glu Asp		
	60	65
atc gaa tca cca gtg gtg aaa ttt acc aaa tcc ttt gaa ttg atg tcc		894
Ile Glu Ser Pro Val Val Lys Phe Thr Lys Ser Phe Glu Leu Met Ser		
	75	80
cca aag tgc agt gct gat gct gag aac agt ttc aaa gaa agc atg gag		942
Pro Lys Cys Ser Ala Asp Ala Glu Asn Ser Phe Lys Glu Ser Met Glu		
	90	95
aaa tca tca tac tcc gac tgg cta ata aat aac agc att gct gag ctg		990
Lys Ser Ser Tyr Ser Asp Trp Leu Ile Asn Asn Ser Ile Ala Glu Leu		
105	110	115
gtt gct tca aca ggc ctt cca gtg aac atc agt gat gcc tac cag gat		1038
Val Ala Ser Thr Gly Leu Pro Val Asn Ile Ser Asp Ala Tyr Gln Asp		
	125	130
ccg cgc ttt gat gca gag gca gac cag ata tct ggt ttt cac ata aga		1086
Pro Arg Phe Asp Ala Glu Ala Asp Gln Ile Ser Gly Phe His Ile Arg		
	140	145
tct gtt ctt tgt gtc cct att tgg aat agc aac cac caa ata att gga		1134
Ser Val Leu Cys Val Pro Ile Trp Asn Ser Asn His Gln Ile Ile Gly		
	155	160
		165

10

20

30

40

gtg gct caa gtg tta aac aga ctt gat ggg aaa cct ttt gat gat gca	1182	
Val Ala Gln Val Leu Asn Arg Leu Asp Gly Lys Pro Phe Asp Asp Ala		
170 175 180		
gat caa cga ctt ttt gag gct ttt gtc atc ttt tgt gga ctt ggc atc	1230	
Asp Gln Arg Leu Phe Glu Ala Phe Val Ile Phe Cys Gly Leu Gly Ile		
185 190 195 200		
aac aac aca att atg tat gat caa gtg aag aag tcc tgg gcc aag cag	1278	10
Asn Asn Thr Ile Met Tyr Asp Gln Val Lys Lys Ser Trp Ala Lys Gln		
205 210 215		
tct gtg gct ctt gat gtg cta tca tac cat gca aca tgt tca aaa gct	1326	
Ser Val Ala Leu Asp Val Leu Ser Tyr His Ala Thr Cys Ser Lys Ala		
220 225 230		
gaa gtt gac aag ttt aag gca gcc aac atc cct ctg gtg tca gaa ctt	1374	
Glu Val Asp Lys Phe Lys Ala Ala Asn Ile Pro Leu Val Ser Glu Leu		20
235 240 245		
gcc atc gat gac att cat ttt gat gac ttt tct ctc gac gtt gat gcc	1422	
Ala Ile Asp Asp Ile His Phe Asp Asp Phe Ser Leu Asp Val Asp Ala		
250 255 260		
atg atc aca gct gct ctc cgg atg ttc atg gag ctg ggg atg gta cag	1470	
Met Ile Thr Ala Ala Leu Arg Met Phe Met Glu Leu Gly Met Val Gln		
265 270 275 280		30
aaa ttt aaa att gac tat gag aca ctg tgt agg tgg ctt ttg aca gtg	1518	
Lys Phe Lys Ile Asp Tyr Glu Thr Leu Cys Arg Trp Leu Leu Thr Val		
285 290 295		
agg aaa aac tat cgg atg gtt cta tac cac aac tgg aga cat gcc ttc	1566	
Arg Lys Asn Tyr Arg Met Val Leu Tyr His Asn Trp Arg His Ala Phe		
300 305 310		
aac gtg tgt cag ctg atg ttc gcg atg tta acc act gct ggg ttt caa	1614	40
Asn Val Cys Gln Leu Met Phe Ala Met Leu Thr Thr Ala Gly Phe Gln		

315	320	325	
gac att ctg acc gag gtg gaa att tta gcg gtg att gtg gga tgc ctg			1662
Asp Ile Leu Thr Glu Val Glu Ile Leu Ala Val Ile Val Gly Cys Leu			
330	335	340	
tgt cat gac ctc gac cac agg gga acc aac aat gcc ttc caa gct aag			1710
Cys His Asp Leu Asp His Arg Gly Thr Asn Asn Ala Phe Gln Ala Lys			
345	350	355	360
agt ggc tct gcc ctg gcc caa ctc tat gga acc tct gct acc ttg gag			1758
Ser Gly Ser Ala Leu Ala Gln Leu Tyr Gly Thr Ser Ala Thr Leu Glu			
365	370	375	
cat cac cat ttc aac cac gcc gtg atg atc ctt caa agt gag ggt cac			1806
His His His Phe Asn His Ala Val Met Ile Leu Gln Ser Glu Gly His			
380	385	390	
aat atc ttt gct aac ctg tcc tcc aag gaa tat agt gac ctt atg cag			1854
Asn Ile Phe Ala Asn Leu Ser Ser Lys Glu Tyr Ser Asp Leu Met Gln			
395	400	405	
ctt ttg aag cag tca ata ttg gca aca gac ctc acg ctg tac ttt gag			1902
Leu Leu Lys Gln Ser Ile Leu Ala Thr Asp Leu Thr Leu Tyr Phe Glu			
410	415	420	
agg aga act gaa ttc ttt gaa ctt gtc agt aaa gga gaa tac gat tgg			1950
Arg Arg Thr Glu Phe Phe Glu Leu Val Ser Lys Gly Glu Tyr Asp Trp			
425	430	435	440
aac atc aaa aac cat cgt gat ata ttt cga tca atg tta atg aca gcc			1998
Asn Ile Lys Asn His Arg Asp Ile Phe Arg Ser Met Leu Met Thr Ala			
445	450	455	
tgt gac ctt gga gcc gtg acc aaa ccg tgg gag atc tcc aga cag gtg			2046
Cys Asp Leu Gly Ala Val Thr Lys Pro Trp Glu Ile Ser Arg Gln Val			
460	465	470	
gca gaa ctt gta acc agt gag ttc ttc gaa caa gga gat cgg gag aga			2094

10

20

30

40

Ala Glu Leu Val Thr Ser Glu Phe Phe Glu Gln Gly Asp Arg Glu Arg		
475	480	485
tta gag ctc aaa ctc act cct tca gca att ttt gat cgg aac cgg aag	2142	
Leu Glu Leu Lys Leu Thr Pro Ser Ala Ile Phe Asp Arg Asn Arg Lys		
490	495	500
gat gaa ctg cct cgg ttg caa ctg gag tgg att gat agc atc tgc atg	2190	
Asp Glu Leu Pro Arg Leu Gln Leu Glu Trp Ile Asp Ser Ile Cys Met		10
505	510	515
520		
cct ttg tat cag gca ctg gtg aag gtc aac gtg aaa ctg aag ccg atg	2238	
Pro Leu Tyr Gln Ala Leu Val Lys Val Asn Val Lys Leu Lys Pro Met		
525	530	535
cta gat tca gta gct aca aac aga agt aag tgg gaa gag cta cac caa	2286	
Leu Asp Ser Val Ala Thr Asn Arg Ser Lys Trp Glu Glu Leu His Gln		
540	545	550
555		
aaa cga ctg ctg gcc tca act gcc tca tcc tcc tcc cct gcc agt gtt	2334	
Lys Arg Leu Leu Ala Ser Thr Ala Ser Ser Ser Ser Pro Ala Ser Val		
555	560	565
atg gta gcc aag gaa gac agg aac taaacctcca ggtcagctgc agctgcaaaa	2388	
Met Val Ala Lys Glu Asp Arg Asn		
570	575	
igactacagc ctgaaggcc atttcagtc cagcaatgtc atccitttgt tcttttagct	2448	30
cagaaaagacc taacatctca aggatgcact gggaaccatg cctgggcttt caccttgaag	2508	
catggtcagc agcagagaga gcaacgggaa ggacaaagaa agaggtgggg cagggagcac	2568	
accccaggac cctcactttt cctaatagaa cacgcatggg ctgaaatgaa ggctctgggt	2628	
aggggactgt ttggatcca aggacctgtg gacagtcggc ctacttactc tgagctgagg	2688	
gaacactgaa cagtaaaagc gtcattagcg ctgcttcatt ttgtataggg cttttctgtt	2748	
igtacaagc caaacattgc ctgtctttgc ttcccgtccc tgaatgcctt ttgtgccag	2808	
actgtcccaa gaatcetaat ttgtatcca tagaggtatt ttatitttaa tccatagagct	2868	40
tctattgat ggatccttta gaattgccia cctaaaaggt aaactatact atccttataa	2928	
atactgatca atcccagttc tccccctaaa aatgaataca tagtaggact atagcaaagt	2988	
tgtttg	2994	

[0 1 4 0]

<210> 17

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 17

tgaagaacag actgacctgg a

21

【 0 1 4 1 】

<210> 18

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 18

gtcgttgatc cgcatcatca

20

【 図面の簡単な説明 】

【 図 1 】 新規ヒトPDEのアミノ酸配列(上段:アミノ酸番号を数字+ ' で記載)と、ヒトPDE 5A (GenBank : CAA06170) のアミノ酸配列(下段:アミノ酸番号を数字+ " で記載)との比較を示した図である。アスタリスクは一致しているアミノ酸残基、ピリオドは相同性のあるアミノ酸残基を示す。(アミノ酸残基は一文字表記で示す。)下線はHDXXHXXXXNモチーフを示す。 30

【 図 2 】 新規ヒトPDEのアミノ酸配列(上段:アミノ酸番号を数字+ ' で記載)と、ヒトPDE 10A (GenBank : BAA78034) のアミノ酸配列(下段:アミノ酸番号を数字+ " で記載)との比較を示した図である。アスタリスクは一致しているアミノ酸残基、ピリオドは相同性のあるアミノ酸残基を示す。(アミノ酸残基は一文字表記で示す。)下線はHDXXHXXXXNモチーフを示す。

【 図 3 】 プラスミドp200-EBの構築過程および制限酵素地図を示した図である。

【 図 4 】 新規ヒトPDEホモログcDNAの一部の配列(約0.2kb)をプローブとしてヒト心臓、脳、胎盤、肺、肝臓、骨格筋、腎臓、膵臓のpoly(A)⁺ RNAフィルター〔Human Multiple Tissue Northern Blotsのフィルター(Clontech社製)〕およびヒト心臓、脳、肝臓、膵臓、胎盤、肺のpoly(A)⁺ RNAフィルター〔Human Normal Tissue mRNA blot I (Normalized)のフィルター(東洋紡社製)〕に対してノーザンハイブリダイゼーションを行なった結果を示す図である。 40

【 図 5 】 プラスミドpGST - PDEの構築過程および制限酵素地図を示した図である。

【 図 6 】 発現大腸菌可溶性画分におけるPDE活性測定の結果を示す。GSTはベクターのみを導入した大腸菌、GST-PDEはGST-PDE融合蛋白発現大腸菌を示す。

【 図 7 】 プラスミドp23 - 2kおよびp23 - 1kの構築過程および制限酵素地図を示した図である。

【 図 8 】 新規ヒトPDEのアミノ酸配列(上段)と、ヒトPDE5A (GenBank : CAA06170) のアミ 50

ノ酸配列(下段)との比較を示した図である。アスタリスクは一致しているアミノ酸残基、ピリオドは相同性のあるアミノ酸残基を示す。(アミノ酸残基は一文字表記で示す。)下線はHDXHXXXXNモチーフを示す。

【図9】新規ヒトPDEホモログcDNAの配列情報を基にPCRプライマーを設計し、ヒト臍臓、肺、乳腺、前立腺、骨格筋、精巣各組織のmRNAより調製したcDNAを鋳型にPCRを行なった。増幅産物をアガロース電気泳動した結果を示す。

【符号の説明】

kb: キロ塩基対 (kilobase pairs)

Ap: アンピシリン耐性遺伝子

T7: T7プロモーター

GST: グルタチオンSトランスフェラーゼ

【図1】

```

1'          MEKSSYSDWLNNLSIAELVASTGL
          ** * . *
361" FMQVQKCTIFIVDEDCSDSFSVFHMECELEKSSDILTREHDANKINMYAQYVKNTME

25' PVNISDAYQDPRF---DAEADQISGFHRSVLCVFIWNS-NHQIICVAQVLNRL----D
* . * . * . * * . . . . . * * * * * * * * . . . . . * . . . . . * . . . . .
421" PLNIPDWSKDKRFPWTTETWGNWOOCCIRSLCTPIKNGKXKVIQVQCVLWVHHEENYK

76' GKPFDDADORLFEAFVIFCGLGINNIIMYDQVKKSNARQVALDVLVSHATCSKAE---V
* * * . * . . . . . * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
481" VKPFNRNDEQLEAFVIFCGLGIONTQMYEAVERAMAKQVTLVSLVSHASAAEEETEL

133" DKFKAANIPLVSELAIDDIHFDDFSLDWDAMI*PAALRHFNEMLVQKFKIDYETLCRWLL
. . . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . *
541" QSLAAAVPSAQTKITDFSFSDPELSDLETALCTIRMPDNLNQNFMQREVLRCWIL

193" TVRKNYRM-VLYHNWRHAFNVCQLMFAHLLTAGFQDILTEVEILLAVIGCLCHDLQHEST
. * . * . * . * . * . * * * * * * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . *
601" SVRKNYRKNVAYHNWRHAFNVAQCMPAALKAGKIQNKLTDLLELALLIAALSBLDHEGV

252" HNAFQARSGSALAQLYGTSALEHFFHNAVHILQSECHNIFAMLSKEYSDLMQLLQSG
* . . . . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . *
661" NNSYIQRSEHPLAQLY-CHSIMEHHFDQCLMILNSFGNQLSGLSIEERYKTLKIKQA

312" ILATDLTLFYERRTEFFELVSKGEYDWNIKNRDIFRSMMLTACDLGAVTKPWEISRVA
* * * * * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . *
720" ILATDLALYIKRRGFPELLIKKQFNLEDHOKELFLAMLTACDLSAITKPFWIOORIA

372" ELVTSEFFQGGORERELKLP*SAIFDNRKDELPRILEWIDSI*CMPLYQALVKNVKL
* * * . * * * . * * * * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . *
780" ELVATEFFDGGDRERKELNIEPTDLNREKKNIPSNQVGFDAICLQLYEALHVSIEDC

432" KPMLDSVATNRSKWEEL--HQKLLASTASSSSPASVMVAKEDRN
* . * . * * * * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . *
840" FPLDGCRRNRQKWAALAEQCEKRLNGESGQAKRN

```

図1

【図2】

```

1'          MEKSSYSDWLNNLSIAELVASTGLPVNISDAYQDPRFDAEADOIS
          * . . * . * . * * * . * * * . * * * . * * . *
301" SLDLFDIGEEKEGKPVFKKTKRFRFSIEKGIAGQVARTQSVLNIPDAYADPRFNRVLDLYT

46' GFHRSVLCVPIWNSNHQIIGVAQVLNRLDCKPFDDADQRLFEAFVIFCGLGINNTIMYD
* . * . * * * * . * . * * * . * . . . . * . * . * . * . . . . *
361" GYTRNLLCMPI-VSRGSGVIGVQVWVKISGSAFSTDRNFMFAVFCALALACANMYH

106' QVKKGNARQVALDVLVSHATCSKAEVOKFKAANIPLVSELAIDDIHFDDFSLDWDAMIT
* * * . * . . . . . * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
420" RIRHSECIYRVIMEKLSYHSICTSEWQGLMQFTLPVRLCKEIELEFHFDIGPP--ENNWP

166" AALRSEMELGWQKFKIDYETLCRWMLLTVRKNYRMVLYHNWRHAFNVCQLMFAHLLTAGF
. . . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . *
478" GIF-VYVHRSCTSCFELEKLCRFIMEVKNIYRVVPHNWKHAFVVAHCHYAIL--QNN

226" QDILTEVEILLAVIGCLCHDLHGRGTNNAFQAKSGSALAQLYGTSALEHFFHNAVHIL
* . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . *
535" HTLFPDLERKGLLELCLCHDLHGRGFSYSLQKFDHPLAALYSTS-TMEQHFSQTVSIL

286" QSEGHNIPANLSKEYSDLMQLLQKQSLA*ADLTLFYERRTEFFELVSKGEYDWNIKNRD
* * * * * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . *
594" QLBGHNIFSTLSSEYQVLEIIRKAIATDIALYFGNRKQLEWYQTSGLNINQSHRD

346" IFRSMMLTACDLGAVTKPWEISRQVAELVTEFFEQGGDRERLEKLP*SAIFORNKDEL
* . * . * * * * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . *
654" RVIGLMLTACDLC*SVTKLWVTKLTANDIYAEFVAEGD-EMKKLGIQIPNMDRDKDEV

406" PRLEQLEWIDSI*CMPLYQALVKNVKL*PMLDSVATNRSKWEELHQKLLASTASSSSPAS
* . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . *
713" PQQQLGFYNAVAIPCYTTLTQILPPEPLKACRDNLSQWERVIRCEETATWISSPVAQ

466" VMVAKEDRN
* . * *
773" RAAASED

```

図2

【 図 3 】

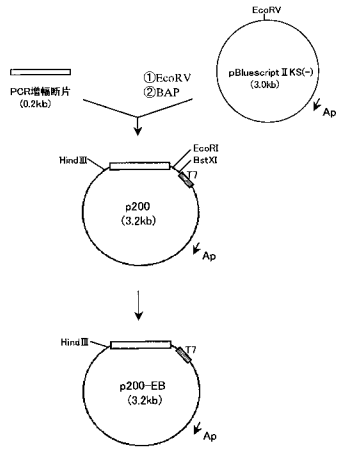


図3

【 図 4 】

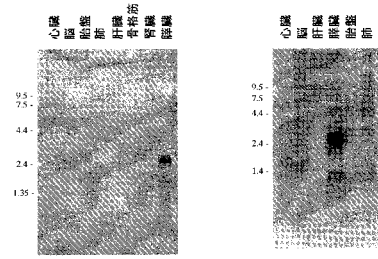


図4

【 図 5 】

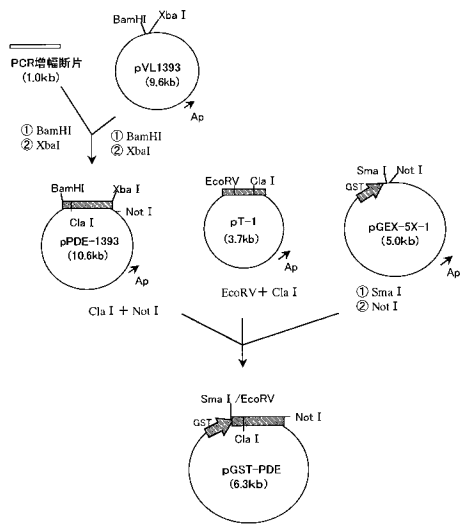


図5

【 図 6 】

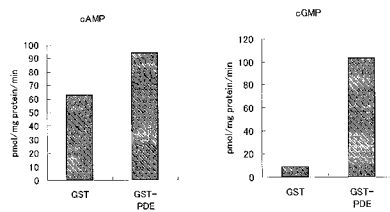


図6

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 48/00	A 6 1 K 48/00	4 B 0 6 5
A 6 1 P 1/04	A 6 1 P 1/04	4 C 0 8 4
A 6 1 P 1/18	A 6 1 P 1/18	4 C 0 8 5
A 6 1 P 3/10	A 6 1 P 3/10	4 C 0 8 6
A 6 1 P 9/10	A 6 1 P 9/10	4 H 0 4 5
A 6 1 P 9/12	A 6 1 P 9/12	
A 6 1 P 11/06	A 6 1 P 11/06	
A 6 1 P 13/12	A 6 1 P 13/12	
A 6 1 P 19/10	A 6 1 P 19/10	
A 6 1 P 25/16	A 6 1 P 25/16	
A 6 1 P 25/18	A 6 1 P 25/18	
A 6 1 P 25/22	A 6 1 P 25/22	
A 6 1 P 25/24	A 6 1 P 25/24	
A 6 1 P 25/28	A 6 1 P 25/28	
A 6 1 P 29/00	A 6 1 P 29/00	1 0 1
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 37/08	A 6 1 P 37/08	
C 0 7 K 14/47	C 0 7 K 14/47	
C 0 7 K 16/40	C 0 7 K 16/40	
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 9/16	C 1 2 N 9/16	C
C 1 2 P 21/02	C 1 2 P 21/02	C
C 1 2 Q 1/44	C 1 2 Q 1/44	
C 1 2 Q 1/66	C 1 2 Q 1/66	
C 1 2 Q 1/68	C 1 2 Q 1/68	A
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/573	G 0 1 N 33/573	A
G 0 1 N 33/68	G 0 1 N 33/68	
// C 1 2 P 21/08	A 6 1 K 37/02	
(C 1 2 N 1/21	C 1 2 P 21/08	
C 1 2 R 1:19)	C 1 2 N 1/21	
(C 1 2 N 9/16	C 1 2 R 1:19	
C 1 2 R 1:19)	C 1 2 N 9/16	C
(C 1 2 P 21/02	C 1 2 R 1:19	
C 1 2 R 1:19)	C 1 2 P 21/02	C
	C 1 2 R 1:19	

(72)発明者 太田 紀夫
東京都町田市旭町3 - 6 - 6 協和醗酵工業株式会社東京研究所内

(72)発明者 川端 彩子
東京都町田市旭町3 - 6 - 6 協和醗酵工業株式会社東京研究所内

(72)発明者 菅野 純夫
東京都杉並区南荻窪4 - 8 - 13

(72)発明者 中村 祐輔
神奈川県横浜市青葉区あざみ野1 - 17 - 33

Fターム(参考) 2G045 AA28 AA34 AA35 AA40 BB20 CB01 CB17 CB20 CB21 DA12
DA13 DA14 DA20 DA36 FB01 FB02 FB03 FB04
4B024 AA01 BA11 CA04 CA07 CA09 CA12 DA03 DA06 EA03 EA04
FA02 GA11 HA13
4B050 CC01 CC03 CC05 DD07 DD11 LL01
4B063 QA01 QA07 QA08 QA19 QQ26 QQ33 QQ35 QQ53 QQ79 QQ95
QR06 QR13 QR15 QR33 QR48 QR56 QR58 QR60 QR80 QS05
QS34 QS36 QS38 QX02
4B064 AG01 AG27 CA02 CA10 CA19 CA20 CC24 DA01 DA13
4B065 AA93Y AB01 BA02 BA24 CA31 CA44
4C084 AA02 AA07 AA13 BA01 BA22 CA53 CA56 NA14 ZA082 ZA122
ZA152 ZA182 ZA362 ZA592 ZA682 ZA812 ZA972 ZB132 ZB152 ZB262
ZC352
4C085 AA13 AA14 CC21 DD22 DD23 EE01
4C086 AA01 AA03 EA16 NA14 ZA08 ZA12 ZA15 ZA18 ZA36 ZA59
ZA68 ZA81 ZA97 ZB13 ZB15 ZB26 ZB32 ZC35
4H045 AA10 AA11 BA10 CA40 DA76 DA89 EA20 EA50 FA72 FA74

专利名称(译)	具有磷酸二酯酶活性的多肽		
公开(公告)号	JP2005229806A	公开(公告)日	2005-09-02
申请号	JP2000208610	申请日	2000-07-10
申请(专利权)人(译)	协和醱酵工业株式会社		
[标]发明人	宫地宏昌 神部素子 太田紀夫 川端彩子 菅野純夫 中村祐輔		
发明人	宫地 宏昌 神部 素子 太田 紀夫 川端 彩子 菅野 純夫 中村 祐輔		
IPC分类号	G01N33/50 A61K31/7125 A61K38/00 A61K39/395 A61K45/00 A61K48/00 A61P1/04 A61P1/18 A61P3/10 A61P9/10 A61P9/12 A61P11/06 A61P13/12 A61P19/10 A61P25/16 A61P25/18 A61P25/22 A61P25/24 A61P25/28 A61P29/00 A61P35/00 A61P37/08 C07K14/47 C07K16/40 C12N1/21 C12N9/16 C12N15/09 C12N15/12 C12N15/55 C12P21/02 C12P21/08 C12Q1/44 C12Q1/66 C12Q1/68 C12R1/19 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/573 G01N33/68		
CPC分类号	A61K38/00 A61K48/00 A61P1/04 A61P1/18 A61P3/10 A61P9/10 A61P9/12 A61P11/06 A61P13/12 A61P19/10 A61P25/16 A61P25/18 A61P25/22 A61P25/24 A61P25/28 A61P29/00 A61P35/00 A61P37/08 C12N9/16		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K31/7125 A61K39/395.D A61K39/395.N A61K45/00 A61K48/00 A61P1/04 A61P1/18 A61P3/10 A61P9/10 A61P9/12 A61P11/06 A61P13/12 A61P19/10 A61P25/16 A61P25/18 A61P25/22 A61P25/24 A61P25/28 A61P29/00.101 A61P35/00 A61P37/08 C07K14/47 C07K16/40 C12N1/21 C12N9/16.C C12P21/02.C C12Q1/44 C12Q1/66 C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/573.A G01N33/68 A61K37/02 C12P21/08 C12R1/19 A61K38/00 A61K38/16 C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A		
F-TERM分类号	2G045/AA28 2G045/AA34 2G045/AA35 2G045/AA40 2G045/BB20 2G045/CB01 2G045/CB17 2G045/CB20 2G045/CB21 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA20 2G045/DA36 2G045/FB01 2G045/FB02 2G045/FB03 2G045/FB04 4B024/AA01 4B024/BA11 4B024/CA04 4B024/CA07 4B024/CA09 4B024/CA12 4B024/DA03 4B024/DA06 4B024/EA03 4B024/EA04 4B024/FA02 4B024/GA11 4B024/HA13 4B050/CC01 4B050/CC03 4B050/CC05 4B050/DD07 4B050/DD11 4B050/LL01 4B063/QA01 4B063/QA07 4B063/QA08 4B063/QA19 4B063/QQ26 4B063/QQ33 4B063/QQ35 4B063/QQ53 4B063/QQ79 4B063/QQ95 4B063/QR06 4B063/QR13 4B063/QR15 4B063/QR33 4B063/QR48 4B063/QR56 4B063/QR58 4B063/QR60 4B063/QR80 4B063/QS05 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QS38 4B063/QX02 4B064/AG01 4B064/AG27 4B064/CA02 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/BA02 4B065/BA24 4B065/CA31 4B065/CA44 4C084/AA02 4C084/AA07 4C084/AA13 4C084/BA01 4C084/BA22 4C084/CA53 4C084/CA56 4C084/NA14 4C084/ZA082 4C084/ZA122 4C084/ZA152 4C084/ZA182 4C084/ZA362 4C084/ZA592 4C084/ZA682 4C084/ZA812 4C084/ZA972 4C084/ZB132 4C084/ZB152 4C084/ZB262 4C084/ZC352 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/CC21 4C085/DD22 4C085/DD23 4C085/EE01 4C086/AA01 4C086/AA03 4C086/EA16 4C086/NA14 4C086/ZA08 4C086/ZA12 4C086/ZA15 4C086/ZA18 4C086		

/ZA36 4C086/ZA59 4C086/ZA68 4C086/ZA81 4C086/ZA97 4C086/ZB13 4C086/ZB15 4C086/ZB26
4C086/ZB32 4C086/ZC35 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045
/DA89 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/FA74

代理人(译) 今村正纯

优先权 2000061464 2000-03-07 JP

外部链接 [Espacenet](#)

摘要(译)

具有磷酸二酯酶 (PDE) 活性的新多肽，编码PDE多肽的DNA和识别该多肽的抗体用于糖尿病，缺血性心脏病，高血压，肾炎，胰腺炎，溃疡和变态反应。提供用于诊断，预防或治疗哮喘，风湿病，骨质疏松症，疼痛，焦虑症，精神分裂症，躁狂抑郁症，帕金森病，痴呆，感染或恶性肿瘤的药物。根据本发明，具有PDE活性的新多肽，产生该多肽的方法，编码该多肽的DNA，通过掺入该DNA获得的重组载体和重组载体识别多肽的抗体，使用该抗体定量和免疫染色本发明多肽的方法，筛选改变编码多肽的基因表达的物质的方法，本发明提供了改变多肽活性的物质的筛选方法，以及使用该DNA或抗体诊断，预防或治疗诸如糖尿病，脑疾病，肾病或癌症的疾病的药物。 [选择图]无