(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2006-521810
(P2006-521810A)
(43)公表日　平成18年9月28日(2006.9.28)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	ZNAA	2G045
C07K 14/47	(2006.01)	C07K	14/47		4B024
C07K 16/18	(2006.01)	C07K	16/18		4B063
C07K 16/46	(2006.01)	C07K	16/46		4B064
C07K 19/00	(2006.01)	C07K	19/00		4B065

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 107 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2006-507201 (P2006-507201)
(86)(22)出願日　平成16年3月10日 (2004.3.10)
(85)翻訳文提出日　平成17年11月11日 (2005.11.11)
(86)国際出願番号　PCT/US2004/007862
(87)国際公開番号　WO2004/081199
(87)国際公開日　平成16年9月23日 (2004.9.23)
(31)優先権主張番号　60/454,025
(32)優先日　平成15年3月11日 (2003.3.11)
(33)優先権主張国　米国(US)

(71)出願人　596168317
ジェネンテック・インコーポレーテッド
ＧＥＮＥＮＴＥＣＨ，ＩＮＣ．
アメリカ合衆国カリフオルニア・９４０８０－４９９０・サウス・サン・フランシスコ・ディーエヌエー・ウェイ・１
(74)代理人　100109726
弁理士　園田　吉隆
(74)代理人　100101199
弁理士　小林　義教
(72)発明者　ボールドウィン，ダリル
アメリカ合衆国　カリフォルニア　９４７０８，バークレー，ユークリッド　アベニュー　１５９５

最終頁に続く

(54)【発明の名称】免疫関連疾患の治療のための新規組成物と方法

(57)【要約】
本発明は、新規のタンパク質を含む組成物と、免疫関連疾患の診断と治療のためのその組成物の使用法とに関する。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
図１（配列番号１）、図３（配列番号３）、図５（配列番号５）、図７（配列番号７）、図９（配列番号９）、図１１（配列番号１１）、図１３Ａ－Ｂ（配列番号１３）、図１５（配列番号１５）、図１７（配列番号１７）、図１９（配列番号１９）、図２１（配列番号２１）、図２３（配列番号２３）、図２５（配列番号２５）、図２７（配列番号２７）、図２９（配列番号２９）、図３１Ａ－Ｂ（配列番号３１）、図３３（配列番号３３）、図３５（配列番号３５）、図３７（配列番号３７）、図３９Ａ－Ｂ（配列番号３９）、図４１Ａ－Ｃ（配列番号４１）、図４３（配列番号４３）、図４５（配列番号４５）、図４７（配列番号４７）、図４９（配列番号４９）、図５１（配列番号５１）、図５３（配列番号５３）、図５５（配列番号５５）、図５７（配列番号５７）、図５９Ａ－Ｂ（配列番号５９）、図６１Ａ－Ｂ（配列番号６１）又は図６３（配列番号６３）に示すヌクレオチド配列に対して、少なくとも８０％の核酸配列同一性を有する単離された核酸。
【請求項２】
図１（配列番号１）、図３（配列番号３）、図５（配列番号５）、図７（配列番号７）、図９（配列番号９）、図１１（配列番号１１）、図１３Ａ－Ｂ（配列番号１３）、図１５（配列番号１５）、図１７（配列番号１７）、図１９（配列番号１９）、図２１（配列番号２１）、図２３（配列番号２３）、図２５（配列番号２５）、図２７（配列番号２７）、図２９（配列番号２９）、図３１Ａ－Ｂ（配列番号３１）、図３３（配列番号３３）、図３５（配列番号３５）、図３７（配列番号３７）、図３９Ａ－Ｂ（配列番号３９）、図４１Ａ－Ｃ（配列番号４１）、図４３（配列番号４３）、図４５（配列番号４５）、図４７（配列番号４７）、図４９（配列番号４９）、図５１（配列番号５１）、図５３（配列番号５３）、図５５（配列番号５５）、図５７（配列番号５７）、図５９Ａ－Ｂ（配列番号５９）、図６１Ａ－Ｂ（配列番号６１）又は図６３（配列番号６３）に示すヌクレオチド配列の完全長コード化配列からなるヌクレオチド配列に対して、少なくとも８０％の核酸配列同一性を有する単離された核酸。
【請求項３】
図１（配列番号１）、図３（配列番号３）、図５（配列番号５）、図７（配列番号７）、図９（配列番号９）、図１１（配列番号１１）、図１３Ａ－Ｂ（配列番号１３）、図１５（配列番号１５）、図１７（配列番号１７）、図１９（配列番号１９）、図２１（配列番号２１）、図２３（配列番号２３）、図２５（配列番号２５）、図２７（配列番号２７）、図２９（配列番号２９）、図３１Ａ－Ｂ（配列番号３１）、図３３（配列番号３３）、図３５（配列番号３５）、図３７（配列番号３７）、図３９Ａ－Ｂ（配列番号３９）、図４１Ａ－Ｃ（配列番号４１）、図４３（配列番号４３）、図４５（配列番号４５）、図４７（配列番号４７）、図４９（配列番号４９）、図５１（配列番号５１）、図５３（配列番号５３）、図５５（配列番号５５）、図５７（配列番号５７）、図５９Ａ－Ｂ（配列番号５９）、図６１Ａ－Ｂ（配列番号６１）又は図６３（配列番号６３）に示すヌクレオチド配列からなる単離された核酸。
【請求項４】
請求項１に記載の核酸を含んでなるベクター。
【請求項５】
ベクターで形質転換された宿主細胞によって認識されるコントロール配列に作用可能に結合している請求項４に記載のベクター。
【請求項６】
請求項４に記載のベクターを含んでなる宿主細胞。
【請求項７】
ＣＨＯ細胞、大腸菌、又は酵母細胞である、請求項６に記載の宿主細胞。
【請求項８】
ＰＲＯポリペプチドの製造方法において、前記ＰＲＯポリペプチドの発現に適した条件下で請求項６に記載の宿主細胞を培養し、細胞培養物から前記ＰＲＯポリペプチドを回収

することを含んでなる方法。
【請求項９】
図２（配列番号２）、図４（配列番号４）、図６（配列番号６）、図８（配列番号８）、図１０（配列番号１０）、図１２（配列番号１２）、図１４（配列番号１４）、図１６（配列番号１６）、図１８（配列番号１８）、図２０（配列番号２０）、図２２（配列番号２２）、図２４（配列番号２４）、図２６（配列番号２６）、図２８（配列番号２８）、図３０（配列番号３０）、図３２（配列番号３２）、図３４（配列番号３４）、図３６（配列番号３６）、図３８（配列番号３８）、図４０（配列番号４０）、図４２Ａ－Ｂ（配列番号４２）、図４４（配列番号４４）、図４６（配列番号４６）、図４８（配列番号４８）、図５０（配列番号５０）、図５２（配列番号５２）、図５４（配列番号５４）、図５６（配列番号５６）、図５８（配列番号５８）、図６０（配列番号６０）、図６２Ａ－Ｂ（配列番号６２）又は図６４（配列番号６４）に示すポリペプチドのアミノ酸配列の何れか一つに対して少なくとも８０％のアミノ酸配列同一性を有する単離されたポリペプチド。
【請求項１０】
異種アミノ酸配列と融合した請求項９に記載のポリペプチドを含んでなるキメラ分子。
【請求項１１】
前記異種アミノ酸配列がエピトープタグ配列又はイムノグロブリンのＦｃ領域である、請求項９に記載のキメラ分子。
【請求項１２】
請求項９に記載のポリペプチドと特異的に結合する抗体。
【請求項１３】
モノクローナル抗体、ヒト化抗体、又は一本鎖抗体である、請求項１２に記載の抗体。
【請求項１４】
（ａ）請求項９に記載のポリペプチド、（ｂ）前記ポリペプチドのアゴニスト、（ｃ）前記ポリペプチドのアンタゴニスト、或いは（ｄ）前記ポリペプチドと結合する抗体、を担体と組み合わせてなる組成物。
【請求項１５】
前記担体が製薬的に許容可能な担体である、請求項１４に記載の組成物。
【請求項１６】
（ａ）、（ｂ）、（ｃ）又は（ｄ）の治療的有効量を含む、請求項１５に記載の組成物。
【請求項１７】
容器；
前記容器上のラベル；並びに
（ａ）請求項９に記載のポリペプチド、（ｂ）前記ポリペプチドのアゴニスト、（ｃ）前記ポリペプチドのアンタゴニスト、或いは（ｄ）前記ポリペプチドと結合する抗体を含有し、前記容器に含められる組成物
を含む製造品であって、前記容器上のラベルによって前記組成物が乾癬の治療に使用可能であることが示される、製造品。
【請求項１８】
図２（配列番号２）、図４（配列番号４）、図６（配列番号６）、図８（配列番号８）、図１０（配列番号１０）、図１２（配列番号１２）、図１４（配列番号１４）、図１６（配列番号１６）、図１８（配列番号１８）、図２０（配列番号２０）、図２２（配列番号２２）、図２４（配列番号２４）、図２６（配列番号２６）、図２８（配列番号２８）、図３０（配列番号３０）、図３２（配列番号３２）、図３４（配列番号３４）、図３６（配列番号３６）、図３８（配列番号３８）、図４０（配列番号４０）、図４２Ａ－Ｂ（配列番号４２）、図４４（配列番号４４）、図４６（配列番号４６）、図４８（配列番号４８）、図５０（配列番号５０）、図５２（配列番号５２）、図５４（配列番号５４）、図５６（配列番号５６）、図５８（配列番号５８）、図６０（配列番号６０）、図６２Ａ

－Ｂ（配列番号６２）又は図６４（配列番号６４）に示すＰＲＯポリペプチドをコードする遺伝子の発現を阻害する化合物の同定方法であって、通常は前記ポリペプチドを発現する細胞を候補化合物に接触させ、前記遺伝子の発現の欠如を決定することを含んでなる方法。

【請求項１９】

前記候補化合物がアンチセンス核酸である、請求項２３に記載の方法。

【請求項２０】

症状の軽減が必要な哺乳動物の乾癬を軽減する方法において、（ａ）図８（配列番号８）、図１８（配列番号１８）、図２４（配列番号２４）、図２６（配列番号２６）、図２８（配列番号２８）、図３０（配列番号３０）、図３２（配列番号３２）、図３４（配列番号３４）、図３６（配列番号３６）、図３８（配列番号３８）、図４０（配列番号４０）、図４２A-B（配列番号４２）、図４４（配列番号４４）、図４６（配列番号４６）、図４８（配列番号４８）、図５０（配列番号５０）、図５２（配列番号５２）、図５４（配列番号５４）、図５６（配列番号５６）、図５８（配列番号５８)又は図６０（配列番号６０)に示すポリペプチド、（ｂ）前記ポリペプチドのアンタゴニスト、又は（ｃ）前記ポリペプチドと結合する抗体の治療的有効量を前記哺乳動物へ投与することを含んでなる方法。

【請求項２１】

哺乳動物の乾癬を診断する方法であって、（ａ）哺乳動物から得た組織細胞の試験試料、及び（ｂ）同じ細胞型の既知の正常組織細胞のコントロール試料中における、図８（配列番号８）、図１８（配列番号１８）、図２４（配列番号２４）、図２６（配列番号２６）、図２８（配列番号２８）、図３０（配列番号３０）、図３２（配列番号３２）、図３４（配列番号３４）、図３６（配列番号３６）、図３８（配列番号３８）、図４０（配列番号４０）、図４２A-B（配列番号４２）、図４４（配列番号４４）、図４６（配列番号４６）、図４８（配列番号４８）、図５０（配列番号５０）、図５２（配列番号５２）、図５４（配列番号５４）、図５６（配列番号５６）、図５８（配列番号５８)又は図６０（配列番号６０)に示すＰＲＯポリペプチドをコードする遺伝子の発現レベルを検出することを含んでなり、コントロール試料と比較して試験試料における前記遺伝子の発現レベルが高いか又は低い場合に試験組織細胞を採取した哺乳動物における乾癬の存在が示される方法。

【請求項２２】

哺乳動物の乾癬を診断する方法であって、（ａ）前記哺乳動物から採取した組織細胞の試験試料と、図８（配列番号８）、図１８（配列番号１８）、図２４（配列番号２４）、図２６（配列番号２６）、図２８（配列番号２８）、図３０（配列番号３０）、図３２（配列番号３２）、図３４（配列番号３４）、図３６（配列番号３６）、図３８（配列番号３８）、図４０（配列番号４０）、図４２A-B（配列番号４２）、図４４（配列番号４４）、図４６（配列番号４６）、図４８（配列番号４８）、図５０（配列番号５０）、図５２（配列番号５２）、図５４（配列番号５４）、図５６（配列番号５６）、図５８（配列番号５８)又は図６０（配列番号６０)に示すＰＲＯポリペプチドの抗ＰＲＯ抗体とを接触させ、（ｂ）抗体と試験試料中のポリペプチドの間の複合体の形成を検出することを含んでなり、前記複合体の形成により、試験組織細胞を採取した哺乳動物における乾癬の存在が示される方法。

【請求項２３】

症状の軽減が必要な哺乳動物のクローン病を軽減する方法において、前記哺乳動物に対し、治療的有効量の（ａ）図２（配列番号２）、図４（配列番号４）、図１２（配列番号１２）、図１６（配列番号１６）、図１８（配列番号１８）、図２０（配列番号２０）、図３２（配列番号３２）、図３８（配列番号３８）、図４０（配列番号４０）、図４２A-B（配列番号４２）、図４８（配列番号４８）、図５６（配列番号５６）、図５８（配列番号５８）、又は図６４（配列番号６４)に示すポリペプチド、（ｂ）前記ポリペプチドのアンタゴニスト、又は（ｃ）前記ポリペプチドに結合する抗体を投与することを含んで

なる方法。
【請求項２４】
哺乳動物のクローン病を診断する方法において、（ａ）前記哺乳動物から採取した組織細胞の試験試料と、（ｂ）同じ細胞型の既知の正常組織細胞のコントロール試料中における、図２（配列番号２）、図４（配列番号４）、図１２（配列番号１２）、図１６（配列番号１６）、図１８（配列番号１８）、図２０（配列番号２０）、図３２（配列番号３２）、図３８（配列番号３８）、図４０（配列番号４０）、図４２A-B（配列番号４２）、図４８（配列番号４８）、図５６（配列番号５６）、図５８（配列番号５８）、又は図６４（配列番号６４)に示すＰＲＯポリペプチドをコードする遺伝子の発現レベルを決定することを含んでなり、コントロール試料と比較して試験試料における前記遺伝子の発現レベルが高いか又は低い場合に試験組織細胞を採取した哺乳動物におけるクローン病の存在が示される方法。
【請求項２５】
哺乳動物のクローン病を診断する方法であって、（ａ）前記哺乳動物から採取した組織細胞の試験試料と、図２（配列番号２）、図４（配列番号４）、図１２（配列番号１２）、図１６（配列番号１６）、図１８（配列番号１８）、図２０（配列番号２０）、図３２（配列番号３２）、図３８（配列番号３８）、図４０（配列番号４０）、図４２A-B（配列番号４２）、図４８（配列番号４８）、図５６（配列番号５６）、図５８（配列番号５８）、又は図６４（配列番号６４)に示すＰＲＯポリペプチドの抗ＰＲＯ抗体とを接触させ、（ｂ）抗体と試験試料中のポリペプチドの間の複合体の形成を検出することを含んでなり、前記複合体の形成により、試験組織細胞を採取した哺乳動物におけるクローン病の存在が示される方法。
【請求項２６】
症状の軽減が必要な哺乳動物の潰瘍性大腸炎を軽減する方法において、前記哺乳動物に対し、治療的有効量の（ａ）図２（配列番号２）、図４（配列番号４）、図６（配列番号６）、図８（配列番号８）、図１０（配列番号１０）、図１６（配列番号１６）、図２２（配列番号２２）、図２４（配列番号２４）、図２６（配列番号２６）、図２８（配列番号２８）、図３０（配列番号３０）、図４２A-B（配列番号４２）、図４８（配列番号４８）、図５２（配列番号５２）、又は図６４（配列番号６４)に示すポリペプチド、（ｂ）前記ポリペプチドのアンタゴニスト、又は（ｃ）前記ポリペプチドに結合する抗体を投与することを含んでなる方法。
【請求項２７】
哺乳動物の潰瘍性大腸炎を診断する方法において、（ａ）前記哺乳動物から採取した組織細胞の試験試料と、（ｂ）同じ細胞型の既知の正常組織細胞のコントロール試料中における、図２（配列番号２）、図４（配列番号４）、図６（配列番号６）、図８（配列番号８）、図１０（配列番号１０）、図１６（配列番号１６）、図２２（配列番号２２）、図２４（配列番号２４）、図２６（配列番号２６）、図２８（配列番号２８）、図３０（配列番号３０）、図４２A-B（配列番号４２）、図４８（配列番号４８）、図５２（配列番号５２）、又は図６４（配列番号６４)に示すＰＲＯポリペプチドをコードする遺伝子の発現レベルを決定することを含んでなり、コントロール試料と比較して試験試料における前記遺伝子の発現レベルが高いか又は低い場合に試験組織細胞を採取した哺乳動物における潰瘍性大腸炎の存在が示される方法。
【請求項２８】
哺乳動物の潰瘍性大腸炎を診断する方法であって、（ａ）前記哺乳動物から採取した組織細胞の試験試料と、図２（配列番号２）、図４（配列番号４）、図６（配列番号６）、図８（配列番号８）、図１０（配列番号１０）、図１６（配列番号１６）、図２２（配列番号２２）、図２４（配列番号２４）、図２６（配列番号２６）、図２８（配列番号２８）、図３０（配列番号３０）、図４２A-B（配列番号４２）、図４８（配列番号４８）、図５２（配列番号５２）、又は図６４（配列番号６４)に示すＰＲＯポリペプチドの抗ＰＲＯ抗体とを接触させ、（ｂ）抗体と試験試料中のポリペプチドの間の複合体の形成を検

出することを含んでなり、前記複合体の形成により、試験組織細胞を採取した哺乳動物における潰瘍性大腸炎の存在が示される方法。

【請求項２９】

症状の軽減が必要な哺乳動物のリウマチ様関節炎を軽減する方法において、前記哺乳動物に対し、治療的有効量の（ａ）図１０（配列番号１０）、図１４（配列番号１４)、図１８（配列番号１８)、図３４（配列番号３４)、図３６（配列番号３６)、図４０（配列番号４０)、図４２Ａ－Ｂ（配列番号４２)、図４４（配列番号４４)、図４６（配列番号４６)、図４８（配列番号４８)、図５０（配列番号５０)、図５２（配列番号５２)、図５８（配列番号５８)、図６０（配列番号６０)、又は図６２Ａ－Ｂ（配列番号６２)に示すポリペプチド、（ｂ）前記ポリペプチドのアンタゴニスト、又は（ｃ）前記ポリペプチドに結合する抗体を投与することを含んでなる方法。

【請求項３０】

哺乳動物のリウマチ様関節炎を診断する方法において、（ａ）前記哺乳動物から採取した組織細胞の試験試料と、（ｂ）同じ細胞型の既知の正常組織細胞のコントロール試料中における、図１０（配列番号１０）、図１４（配列番号１４)、図１８（配列番号１８)、図３４（配列番号３４)、図３６（配列番号３６)、図４０（配列番号４０)、図４２Ａ－Ｂ（配列番号４２)、図４４（配列番号４４)、図４６（配列番号４６)、図４８（配列番号４８)、図５０（配列番号５０)、図５２（配列番号５２)、図５８（配列番号５８)、図６０（配列番号６０)、又は図６２Ａ－Ｂ（配列番号６２)に示すＰＲＯポリペプチドをコードする遺伝子の発現レベルを決定することを含んでなり、コントロール試料と比較して試験試料における前記遺伝子の発現レベルが高いか又は低い場合に試験組織細胞を採取した哺乳動物におけるリウマチ様関節炎の存在が示される方法。

【請求項３１】

哺乳動物のリウマチ様関節炎を診断する方法であって、（ａ）前記哺乳動物から採取した組織細胞の試験試料と、図１０（配列番号１０）、図１４（配列番号１４)、図１８（配列番号１８)、図３４（配列番号３４)、図３６（配列番号３６)、図４０（配列番号４０)、図４２Ａ－Ｂ（配列番号４２)、図４４（配列番号４４)、図４６（配列番号４６)、図４８（配列番号４８)、図５０（配列番号５０)、図５２（配列番号５２)、図５８（配列番号５８)、図６０（配列番号６０)、又は図６２Ａ－Ｂ（配列番号６２)に示すＰＲＯポリペプチドの抗ＰＲＯ抗体とを接触させ、（ｂ）抗体と試験試料中のポリペプチドの間の複合体の形成を検出することを含んでなり、前記複合体の形成により、試験組織細胞を採取した哺乳動物におけるリウマチ様関節炎の存在が示される方法。

【発明の詳細な説明】

【発明の開示】

【０００１】

発明の分野

本発明は免疫関連疾患の診断と軽減のための組成物と方法に関する。

【０００２】

発明の背景

免疫関連及び炎症疾患は、正常な生理機能では、発作又は傷害に反応して、発作又は傷害からの修復を開始し、外来生物体に対する生得的及び後天的防御を開始するのに重要な、かなり複雑で、多くの場合は多重に相互関連した生物学的経路の現れ又は結果である。疾患又は病理は、これらの正常な生理学的経路が、反応の強さに直接関連してか、異常な調節又は過度な刺激の結果として、自己に対する反応として、又はこれらの組合せとして、更なる発作又は傷害を引き起こすときに生じる。

これらの疾患の発生は、多くの場合、多段階経路及びしばしば多数の異なった生物学的システム／経路に関与しているが、一又は複数のこれら経路の重要な点における介在により改善又は治療効果を有し得る。治療的介在は有害なプロセス／経路の拮抗作用又は有益なプロセス／経路の刺激のいずれかにより生じる。

多くの免疫関連疾患が知られており、広範囲にわたって研究されている。このような疾

患には、免疫媒介炎症疾患、非免疫媒介炎症疾患、感染疾患、免疫欠損症、異常増殖等が含まれる。

Ｔリンパ球（Ｔ細胞）は哺乳動物の免疫反応の重要な成分である。Ｔ細胞は主要組織適合性複合体（ＭＨＣ）内の遺伝子によりコードされる自己分子に関連する抗原を認識する。抗原は抗原提示細胞、ウィルス感染細胞、癌細胞、移植片等の表面上のＭＨＣ分子と共に提示され得る。Ｔ細胞系は宿主哺乳動物の健康を脅かすこれらの改変細胞を除去するものである。Ｔ細胞はヘルパーＴ細胞及び細胞障害性Ｔ細胞を含む。ヘルパーＴ細胞は、抗原提示細胞上の抗原-ＭＨＣ複合体の認識に続いて広範囲に増殖する。またヘルパーＴ細胞は種々のサイトカイン、例えばリンホカインを分泌し、これはＢ細胞、細胞障害性Ｔ細胞、及び免疫反応に寄与している種々の他の細胞の活性化において中心的な役割を担っている。

【０００３】

皮膚病の幾つかは、異常なＴ細胞反応及び自己免疫と相関関係を有している。乾癬は自己免疫疾患と考えられている。特に、免疫系のＴ細胞は、皮膚中のタンパク質を認識してタンパク質が見つかった領域を攻撃するので、その結果新規皮膚細胞の成長速度が大きくなり過ぎ、痛みを伴い、隆起したうろこ状の病変が生じる。これらの病変は、乾癬病変の表皮におけるケラチノサイトの過剰増殖と活性Ｔ細胞の蓄積を特徴とする。乾癬には複数の形態があり、滴状形態は子供及び１０代に最も多い形態である。病変に先立って、上気道炎を起こすことがある。滴状乾癬は非伝染性であり、通常は体幹、四肢及び頭皮に散在する小さな滴状の病変を特徴とする。アメリカ乾癬基金によると、全米の感染患者は約７００万人である。毎年約２万人の子供が乾癬と診断されており、多くの症例が上気道炎の結果とされている。現在の治療に不満足であるために、乾癬患者のうち治療を求めているのは約１．５万人に過ぎないと推定されている。疾病の最初の分子的原因は不明であるが、乾癬感受性座位の少なくとも７つで遺伝的連鎖がマッピングされいている（６ｐ２１．３のＰｓｏｒ１、１７ｑのＰｓｏｒ２、４ｑのＰｓｏｒ３、１　ｃｅｎｔ－ｑ２１のＰｓｏｒ４、３ｑ２１のＰｓｏｒ５、１９ｐ１３のＰｓｏｒ６、及び１ｐのＰｓｏｒ７）。これら座位の一部は、リウマチ様関節炎、アトピー性皮膚炎、及び過敏性腸疾患を含めたほかの自己免疫／炎症性疾患と重複している。本明細書では、実験により、正常な皮膚と比較して乾癬の皮膚で１つの遺伝子が上方制御されることを決定する。

炎症性腸疾患（「ＩＢＤ」）という用語は、腸管（腸）に炎症を起こし、時に反復性の腹痛又は下痢を起こす原因不明の慢性炎症性障害の一群を意味する。米国におけるＩＢＤの罹患率は、人口１０万人あたり約２００人と推定されている。ＩＢＤ患者は、潰瘍性大腸炎（「ＵＣ」）を伴うグループ、及びクローン病（「ＣＤ」）を伴うグループの、２つの主要グループに分けられる。

【０００４】

ＵＣ患者には、主に結腸粘膜の炎症性反応が見られる。通常炎症は均一且つ連続的で、部分的にしろ途中に正常粘膜は見られない。陰窩上皮および粘膜下、並びに表面の粘膜細胞に、好中球の浸潤による炎症反応が起こっている。通常最終的にこのような状況は上皮の損傷へと進行し、上皮細胞が失われてその結果複数の潰瘍形成、繊維症、異形成、及び縦方向の大腸退縮が起こる。

ＣＤは、炎症が腸壁の全ての層に亘る点でＵＣとは異なり、またリンパ節だけでなく腸管壁にも炎症が起こる。ＣＤは、口から肛門までに亘る、消化管のいずれの部分にも起こり得る。この疾病は不連続性であることが多く、つまり腸の重症部分と明らかに疾病を有さない領域とが分離している。ＣＤではまた、腸壁が厚くなり、閉塞に繋がることがあり得る。加えて、瘻孔及び亀裂が珍しくない。

【０００５】

臨床的に、ＩＢＤは、慢性の予測不能な経過に繋がることが多い多様な症状を特徴とする。観血的な下痢、及び腹痛は、多くの場合発熱と体重減少を伴う。重度の疲労感と同様に貧血も多い。関節痛から急性関節炎に亘る関節症状や、肝機能の異常も一般にＩＢＤと関連しているとされる。また、ＩＢＤ患者が大腸癌にかかる危険は平均より大きい。ＩＢ

Ｄの急性の「発作」が起こっている間は、仕事やその他の日常活動は通常不可能であり、患者が入院することも多い。

ＩＢＤの原因は依然として不明であるが、遺伝、感染、及び免疫的感受性等の複数の要因が関係していると思われている。ＩＢＤは白人に多く、特にユダヤ系の白人に多い。症状が慢性的炎症性の性質であることにより、感染的原因の可能性に対する熱心な調査が急ぎ行われた。急性炎症を刺激する薬剤が見つかったものの、ＩＢＤに関連して慢性的炎症の原因となるものは見つかっていない。ＩＢＤが自己免疫性疾患であるという仮説は、関節炎など前述したようにＩＢＤが腸以外に症状を有すること、並びに、免疫反応を抑制することが知られている副腎性グルココルチコイド、シクロスポリン及びアザチオプリン等の治療薬によりＩＢＤにポジティブな反応が見られることが既知であることにより支持されている。加えて、胃腸管は、身体の他のどの器官よりも、連続的に食物由来のタンパク質、細菌性副産物（ＬＰＳ）等の抗原性物質の可能性に曝されている。

【０００６】

典型的な内視鏡検査による診断がなされた後の治療の目標は、寛解を導き、それを維持することである。一般に患者に与えられる最も毒性の小さい薬剤は、アミノサリチル酸である。通常１日４回投与されるスルファサラジン（アザルフィジン）は、アゾ結合によりスルファピリジンに連結するアミノサリチル酸（５－ＡＳＡ）の活性分子から構成される。大腸内の嫌気性菌はアゾ結合を分裂させて活性５－ＡＳＡを放出する。しかしながら、スルファピリジンは可逆性精子異常、消化不良、又は硫酸成分に対するアレルギー反応等の重度の副作用に関連しているため、患者の少なくとも２０％はそれに耐えることができない。ｏｌｓａｌａｚｉｎｅを服用している患者ではこれらの副作用は軽減される。しかしながら、スルファサラジン及びｏｌｓａｌａｚｉｎｅはどちらも小腸の炎症に対しては効果を有さない。小腸で放出される５－ＡＳＡの他の製剤が開発されている（例えばメサラミン及びａｓａｃｏｌ）。通常、５－ＡＳＡによる療法が完全な効果を発揮するまでに６～８週間を要する。５－ＡＳＡ療法に反応しない患者、又はさらに重症度の高い疾病を有する患者には、副腎皮質ステロイドが処方される。しかしながら、これは短期療法であり、維持療法として使用することができない。副腎皮質ステロイドによる臨床的寛解は２～４週間で達成されるが、副作用が大きく、それら副作用にはクッシングの満月様顔貌、顔面の発毛、重度の情緒不安定、及び不眠が含まれる。スルファサラジン及び５－アミノサリチル酸の処方に対する反応は、クローン病では小さく、初期潰瘍性大腸炎では高～中程度であり、重度の潰瘍性大腸炎では小さい。これらの薬剤が効かない場合、通常、シクロスポリン、プレドニゾン、６－メルカプトプリン又はアザチオプリン（肝臓で６－メルカプトプリンに変換される）等の強力な免疫抑制剤が試される。クローン病患者の場合、この疾病に多い瘻孔及び膿瘍に腹腔内敗血症が発生する危険が高いため、副腎皮質ステロイド及びその他免疫抑制剤の使用は注意深くモニターしなければならない。病気の経過中、ＩＢＤ患者の約２５％に手術（結腸切除）が必要となる。

さらに、重度の潰瘍性大腸炎を持つ患者では、特に疾病が複数年に亘る場合、大腸癌の危険が上昇する（３２倍以上）。大量出血、慢性的衰弱性の病気、大腸の穿孔、又は癌の危険のため、約２０～２５％のＩＢＤ患者に最終的に大腸切除手術が必要になる。他の形態の医学的処置が失敗した場合、或いは、ステロイドの副作用や他の薬物適用により患者の健康が脅かされる場合にも手術が行われる場合がある。手術は浸潤性であり、劇的に人生を変えるので、あまり望ましい治療方式ではなく、通常は最後の処置である。

【０００７】

製薬的医薬及び手術に加え、栄養療法等の非従来的なＩＢＤの治療法も試みられている。例えば、Ｆｌｅｘｉｃａｌ（登録商標）という半成分的処方物が、ステロイドのプレドニゾロンと同じ効果を有することが示されている。Sanderson等、Arch. Dis. Child. 51: 123-7 (1987)。しかしながら、半成分的処方物は比較的高価であり、通常は好まれない。よってその使用は制限されている。タンパク質全体を包含する栄養療法はまた、ＩＢＤの症状を軽減する目的で使用されてきた。Giafer等、Lancet 335:816-9 (1990)。米国特許第5,461,033号には、牛乳から単離された酸性カゼイン及びＴＧＦ－２の使用が開示され

ている。Beattie等、Aliment. Pharmacol. Ther. 8:1-6 (1994)には、ＩＢＤを有する子供の幼児期の処方にカゼインを使用する方法が開示されている。米国特許第5,952,295号には、ＩＢＤの治療用の腸溶性製剤にカゼインを使用する方法が開示されている。しかしながら、栄養療法は、非毒性ではあるが対症療法に過ぎず、疾病の元である原因を治療することはできない。

上述したように免疫細胞の研究が進歩しているとはいえ、哺乳動物の免疫関連疾患の存在を検知し及び効果的にこれらの苦痛を抑える能力を有する更なる診断薬及び治療薬に対する需要は大きい。従って、本発明の目的は、正常組織と比較して免疫関連疾患の状態に過剰発現するポリペプチドを同定することと、このようなポリペプチドとそれがコードする核酸を使用して、哺乳動物の免疫関連疾患の診断的検出及び治療的処置に有用な物質の成分を生産することである。

【０００８】

発明の概要

Ａ．実施態様

本発明は、ヒトを含む、哺乳動物における免疫関連疾患の診断及び治療にとって有用な組成物及び方法に関する。本発明は、哺乳動物の免疫関連疾患の結果として生じるタンパク質（アゴニスト及びアンタゴニスト抗体を含む）の同定に基づいている。乾癬又はＩＢＤ等の免疫関連疾患は、免疫反応を抑制又は高めることによって治療することができる。免疫反応を高める分子は、抗原に対する免疫反応を刺激又は増強する。免疫反応の向上が有益である場合には、免疫反応を刺激する分子は治療的に用いることができる。或いは、免疫反応の減弱が有益である場合には（例えば炎症）、抗原に対する免疫反応を和らげる又は減じる免疫反応を抑制する分子（例えば中和抗体）を治療的に用いることができる。従って、ＰＲＯポリペプチド、そのアゴニスト及びアンタゴニストもまた、免疫関連疾患の治療のための医薬及び薬剤を調製するために有用である。特定の態様では、そのような医薬及び薬剤は、製薬的に許容可能な担体と共に、ＰＲＯポリペプチド、そのアゴニスト又はアンタゴニストの治療的有効量を含む。好ましくは、混合物は無菌である。

更なる実施態様では、本発明では、ＰＲＯポリペプチドと候補化合物を接触させ、前記ＰＲＯポリペプチドによって媒介される生物活性をモニタリングすることを含む、ＰＲＯポリペプチドのアゴニスト又はＰＲＯポリペプチドに対するアンタゴニストを同定する方法に関する。好ましくは、ＰＲＯポリペプチドは、天然配列ＰＲＯポリペプチドである。特定の態様では、ＰＲＯアゴニスト又はアンタゴニストは、抗ＰＲＯ抗体である。

【０００９】

その他の態様では、本発明は、ＰＲＯポリペプチド、或いはポリペプチドと結合するアゴニスト又はアンタゴニスト抗体を、担体又は賦形剤と混合して含有する組成物に関する。一態様では、組成物は治療的有効量のポリペプチド又は抗体を含有する。更なる態様では、この組成物が免疫関連疾患阻害分子を含む場合には、組成物は、（ａ）それを必要とする哺乳動物の乾癬又は患部大腸組織の量を減少させ、（ｂ）それを必要とする哺乳動物での自己免疫反応を阻害し又は減じるために、有用である。その他の態様では、この組成物は更なる活性成分を含み、それは、例えば、更なる抗体、或いは細胞障害性又は化学療法剤でありうる。好ましくは、この組成物は無菌である。

他の実施態様では、本発明は有効量のＰＲＯポリペプチド、そのアゴニスト又はそのアンタゴニストを哺乳動物に投与することを含む、それを必要とする哺乳動物における免疫関連疾患を治療する方法に関する。

【００１０】

その他の実施態様では、本発明は、上記又は下記のポリペプチドのいずれかに特異的に結合する抗体を提供する。場合によっては、この抗体はモノクローナル抗体、ヒト化抗体、抗体断片又は一本鎖抗体である。一態様では、本発明は、ＰＲＯポリペプチドと結合する単離された抗体に関する。その他の態様では、抗体はＰＲＯポリペプチドの活性を模倣するか（アゴニスト抗体）、或いは逆に抗体はＰＲＯポリペプチドの活性を阻害又は中和する（アンタゴニスト抗体）。その他の態様では、この抗体はモノクローナル抗体であり

、それは好ましくは非ヒトの相補性決定領域（ＣＤＲ）残基及びヒトフレームワーク領域（ＦＲ）残基を有する。抗体は標識されてもよいし、固体支持体へ固定されてもよい。更なる態様では、抗体は抗体断片、モノクローナル抗体、一本鎖抗体、又は抗イディオタイプ抗体である。

更なるその他の実施態様では、本発明は、製薬的に許容可能な担体と混合して抗ＰＲＯ抗体を含有する組成物を提供する。一態様では、この組成物は治療的に有効量の抗体を含む。好ましくは、この組成物は無菌である。この組成物は、保存料を添加して長期の貯蔵安定性を達成してもよい液体医薬製剤の形で投与されうる。或いは、この抗体は、モノクローナル抗体、抗体断片、ヒト化抗体、又は一本鎖抗体である。

【００１１】

更なる実施態様では、本発明は：

(ａ)ＰＲＯポリペプチド又はそのアゴニスト又はアンタゴニストを含む物質の組成物；

(ｂ)前記組成物を収容する容器；並びに

(ｃ)免疫関連疾患の治療における前記ＰＲＯポリペプチド又はそのアゴニスト又はアンタゴニストの使用を記した前記容器に含まれる包装挿入物、又は前記容器に添付されるラベルを含んでなる製造品に関する。この組成物は、ＰＲＯポリペプチド、或いはそのアゴニスト又はアンタゴニストの治療的有効量を含みうる。

その他の実施態様では、本発明は、（ａ）哺乳動物から得られた組織細胞の試験試料、並びに（ｂ）同じ細胞型の既知の正常組織細胞のコントロール試料においてＰＲＯポリペプチドをコードする遺伝子の発現のレベルを検出することを含んでなる、哺乳動物における免疫関連疾患を診断する方法に関し、この方法では、コントロール試料と比較して試験試料でのより高い又は低い発現レベルが、試験組織細胞が得られた哺乳動物における免疫関連疾患の存在を示す。

【００１２】

その他の実施態様では、本発明は、試験試料において、（ａ）哺乳動物から得られた組織細胞の試験試料と抗ＰＲＯ抗体を接触せしめ、（ｂ）この抗体とＰＲＯポリペプチド間の複合体の形成を検出することを含んでなる、哺乳動物における免疫関連疾患を診断する方法に関し、この方法では、前記複合体の形成が、前記免疫関連疾患の存在の有無を示す。検出は定性的又は定量的であってもよく、同じ細胞型の既知の正常組織細胞のコントロール試料における複合体の形成をモニターし比較して行われる。試験試料における多量の形成された複合体は、試験組織細胞が得られた哺乳動物における免疫関連疾患の存在の有無を示す。抗体は、好ましくは検出可能なラベルを有する。複合体の形成は、例えば、光学顕微鏡、フローサイトメトリー、蛍光定量法、或いは当該分野で知られている他の技術によってモニターすることができる。試験試料は、通常、免疫関連疾患を有することが疑われる個体から得る。

その他の実施態様では、本発明は、ＰＲＯポリペプチドを含有すると思われる細胞の試験試料を抗ＰＲＯ抗体へ曝露し、前記抗体の前記細胞試料への結合を測定することを含んでなる、試料中のＰＲＯポリペプチドの存在を測定する方法を提供する。特定の態様では、この試料はＰＲＯポリペプチドを含有すると思われる細胞を含み、抗体は細胞へ結合する。この抗体は、好ましくは検出可能に標識され及び／又は固体支持体へ結合している。

【００１３】

その他の実施態様では、本発明は、抗ＰＲＯ抗体と担体を適切な包装体に含んでなる、免疫関連疾患診断用キットに関する。このキットは、好ましくは、ＰＲＯポリペプチドを検出するために抗体を用いるための指示書を含む。好ましくは、この担体は製薬的に許容可能である。

その他の実施態様では、本発明は、適切な包装体に抗ＰＲＯ抗体を含む診断用キットに関する。このキットは、好ましくは、この抗体をＰＲＯポリペプチドを検出するために用いるための指示書を含む。

その他の実施態様では、本発明は、哺乳動物から得られた組織細胞の試験試料におけるＰＲＯポリペプチドの存在又は不存在を検出することを含む、哺乳動物における免疫関連

疾患を診断する方法を提供し、前記試験試料中のＰＲＯポリペプチドの存否を検出することが、前記哺乳動物における免疫関連疾患の存在を示す。

その他の実施態様では、本発明は：

（ａ）通常は、ＰＲＯポリペプチドによって誘導される細胞応答の誘導のために適した条件下でスクリーニングされる試験化合物と細胞を接触させ；

（ｂ）前記細胞応答の誘導を測定して試験化合物が有効アゴニストであるかどうかを確定することを含み、前記細胞応答の誘導により、前記試験化合物が有効なアゴニストであることが示される、ＰＲＯポリペプチドのアゴニストを同定する方法に関する。

【００１４】

その他の実施態様では、本発明は、候補化合物とＰＲＯポリペプチドの相互作用を可能にするのに十分な条件と時間にわたってこの二つの成分を接触させ、ＰＲＯポリペプチドの活性が阻害されるかどうかを測定することを含んでなる、ＰＲＯポリペプチドの活性を阻害することが可能な化合物を同定する方法に関する。特定の態様では、候補化合物又はＰＲＯポリペプチドのいずれかが固体支持体上に固定される。その他の態様では、非固定化成分が検出可能なラベルを有する。好ましい態様では、この方法は：

（ａ）通常は、ＰＲＯポリペプチドによって誘導される細胞応答に適した条件下でスクリーニングされる試験化合物と細胞を接触させること；並びに

（ｂ）試験化合物が有効アンタゴニストであるかどうかを確定するために、前記細胞応答の誘導を測定する段階を含む。

その他の実施態様では、本発明は、通常はポリペプチドを発現する細胞においてＰＲＯポリペプチドの発現を阻害する化合物を同定する方法において、細胞を試験化合物と接触せしめて、ＰＲＯポリペプチドの発現が阻害されるかどうかを確定することを含む方法を提供する。好ましい態様では、この方法は：

（ａ）ＰＲＯポリペプチドの発現を可能にする好適な条件下でスクリーニングされる試験化合物と細胞を接触させ；

（ｂ）前記ポリペプチドの発現の阻害を測定する段階を含む。

【００１５】

更にその他の実施態様では、本発明は、（ａ）ＰＲＯポリペプチド、（ｂ）ＰＲＯポリペプチドのアゴニスト、又は（ｃ）ＰＲＯポリペプチドのアンタゴニストのいずれかをコードする核酸分子を哺乳動物へ投与することを含んでなる、免疫関連疾患を患っている哺乳動物においてこの疾患を治療する方法に関し、ここで、アゴニスト又はアンタゴニストは抗ＰＲＯ抗体であってもよい。好ましい実施態様では、この哺乳動物はヒトである。その他の好ましい実施態様では、この核酸はエキソビボ（生体外）遺伝子治療によって投与される。更なる好ましい実施態様では、核酸は、ベクター、より好ましくはアデノウィルス、アデノ随伴ウィルス、レンチウィルス又はレトロウィルスベクターである。

更にその他の態様では、本発明は、プロモーター、（ａ）ＰＲＯポリペプチド、（ｂ）ＰＲＯポリペプチドのアゴニスト、又は（ｃ）ＰＲＯポリペプチドのアンタゴニストをコードする核酸、並びにポリペプチドの細胞分泌のためのシグナル配列から本質的になるウィルスベクターを含んでなる組換えウィルス粒子を提供し、ここで、ウィルスベクターがウィルス構造タンパク質に関連する。好ましくは、シグナル配列は哺乳動物、例えば天然ＰＲＯポリペプチドからのものである。

より更なる実施態様では、本発明は、レトロウィルス構造タンパク質を発現する核酸コンストラクトを含んでなるエキソビボ産生細胞に関し、またプロモーター、（ａ）ＰＲＯポリペプチド、（ｂ）ＰＲＯポリペプチドのアゴニスト、又は（ｃ）ＰＲＯポリペプチドのアンタゴニストをコードする核酸、並びにポリペプチドの細胞分泌のためのシグナル配列から本質的になるレトロウィルスベクターを含み、前記産生細胞は、組換えレトロウィルス粒子を生産するように、構造タンパク質と関連するレトロウィルスベクターを包み込んでいる。

【００１６】

Ｂ．更なる実施態様

本発明の他の実施態様では、本発明は、ここに開示されるポリペプチドのいずれかをコードするＤＮＡを含むベクターを提供する。また、そのようなベクターを含む宿主細胞が提供される。例として、宿主細胞はＣＨＯ細胞、大腸菌、又は酵母である。ここに開示されるポリペプチドのいずれかを生産する方法が更に提供され、該方法は、所望のポリペプチドの発現に適した条件下で宿主細胞を培養し、細胞培養物から所望のポリペプチドを回収することを含む。

他の実施態様では、本発明は、異種ポリペプチド又はアミノ酸配列に融合したここに開示されるポリペプチドのいずれかを含むキメラ分子を提供する。そのようなキメラ分子の例には、免疫グロブリンのＦｃ領域又はエピトープタグ配列に融合したここに開示のポリペプチドのいずれかを含むキメラ分子が含まれる。

別の実施態様では、本発明は上述又は後述のポリペプチドのいずれかに特異的に結合する抗体を提供する。場合によっては、抗体はモノクローナル抗体、ヒト化抗体、抗体断片又は一本鎖抗体である。

また別の実施態様では、本発明は、アンチセンスプローブとして又はゲノム及びｃＤＮＡヌクレオチド配列の単離に有用なオリゴヌクレオチドプローブを提供し、それらのプローブは前述又は後述のヌクレオチド配列のいずれかから得られる。

他の実施態様では、本発明は、ＰＲＯポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む単離された核酸分子を提供する。

【００１７】

一態様では、単離された核酸分子は、（ａ）ここに開示された完全長アミノ酸配列、ここに開示されたシグナルペプチドを欠くアミノ酸配列、ここに開示された膜貫通タンパク質の細胞外ドメインでシグナルペプチドを有する又は有しないもの、或いはここに開示された完全長アミノ酸配列のその他の具体的に定義された断片を有するＰＲＯポリペプチドをコードするＤＮＡ分子、或いは（ｂ）（ａ）のＤＮＡ分子の相補鎖に対して、少なくとも約８０％の核酸配列同一性、或いは少なくとも約８１％の核酸配列同一性、或いは少なくとも約８２％の核酸配列同一性、或いは少なくとも約８３％の核酸配列同一性、或いは少なくとも約８４％の核酸配列同一性、或いは少なくとも約８５％の核酸配列同一性、或いは少なくとも約８６％の核酸配列同一性、或いは少なくとも約８７％の核酸配列同一性、或いは少なくとも約８８％の核酸配列同一性、或いは少なくとも約８９％の核酸配列同一性、或いは少なくとも約９０％の核酸配列同一性、或いは少なくとも約９１％の核酸配列同一性、或いは少なくとも約９２％の核酸配列同一性、或いは少なくとも約９３％の核酸配列同一性、或いは少なくとも約９４％の核酸配列同一性、或いは少なくとも約９５％の核酸配列同一性、或いは少なくとも約９６％の核酸配列同一性、或いは少なくとも約９７％の核酸配列同一性、或いは少なくとも約９８％の核酸配列同一性、或いは少なくとも約９９％の核酸配列同一性を有しているヌクレオチド配列を含む。

【００１８】

別の態様では、単離された核酸分子は、（ａ）ここに開示された完全長ＰＲＯポリペプチドｃＤＮＡのコード配列、ここに開示されたシグナルペプチドを欠くＰＲＯポリペプチドのコード配列、ここに開示された膜貫通タンパク質の細胞外ドメインのコード配列でシグナルペプチドを有する又は有しないもの、或いはここに開示された完全長アミノ酸配列のその他の具体的に定義された断片のコード配列を含んでなるＤＮＡ分子、或いは（ｂ）（ａ）のＤＮＡ分子の相補鎖に対して、少なくとも約８０％の核酸配列同一性、或いは少なくとも約８１％の核酸配列同一性、或いは少なくとも約８２％の核酸配列同一性、或いは少なくとも約８３％の核酸配列同一性、或いは少なくとも約８４％の核酸配列同一性、或いは少なくとも約８５％の核酸配列同一性、或いは少なくとも約８６％の核酸配列同一性、或いは少なくとも約８７％の核酸配列同一性、或いは少なくとも約８８％の核酸配列同一性、或いは少なくとも約８９％の核酸配列同一性、或いは少なくとも約９０％の核酸配列同一性、或いは少なくとも約９１％の核酸配列同一性、或いは少なくとも約９２％の核酸配列同一性、或いは少なくとも約９３％の核酸配列同一性、或いは少なくとも約９４％の核酸配列同一性、或いは少なくとも約９５％の核酸配列同一性、或いは少なくとも約

９６％の核酸配列同一性、或いは少なくとも約９７％の核酸配列同一性、或いは少なくとも約９８％の核酸配列同一性、或いは少なくとも約９９％の核酸配列同一性を有しているヌクレオチド配列を含む。

【００１９】

更なる態様では、本発明は、（ａ）ここに開示したヒトタンパク質ｃＤＮＡのいずれかによってコードされているのと同じ成熟ポリペプチドをコードするＤＮＡ分子、或いは（ｂ）（ａ）のＤＮＡ分子の相補鎖に対して、少なくとも約８０％の核酸配列同一性、或いは少なくとも約８１％の核酸配列同一性、或いは少なくとも約８２％の核酸配列同一性、更に或いは少なくとも約８３％の核酸配列同一性、更に或いは少なくとも約８４％の核酸配列同一性、更に或いは少なくとも約８５％の核酸配列同一性、更に或いは少なくとも約８６％の核酸配列同一性、更に或いは少なくとも約８７％の核酸配列同一性、更に或いは少なくとも約８８％の核酸配列同一性、更に或いは少なくとも約８９％の核酸配列同一性、更に或いは少なくとも約９０％の核酸配列同一性、更に或いは少なくとも約９１％の核酸配列同一性、更に或いは少なくとも約９２％の核酸配列同一性、更に或いは少なくとも約９３％の核酸配列同一性、更に或いは少なくとも約９４％の核酸配列同一性、更に或いは少なくとも約９５％の核酸配列同一性、更に或いは少なくとも約９６％の核酸配列同一性、更に或いは少なくとも約９７％の核酸配列同一性、更に或いは少なくとも約９８％の核酸配列同一性、更に或いは少なくとも約９９％の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含んでなる単離された核酸分子に関する。

【００２０】

別の態様では、本発明は、膜貫通ドメイン欠損又は膜貫通ドメイン不活性化のいずれかであるＰＲＯポリペプチドコード化ヌクレオチド配列を含むか、或いはそのようなコード化ヌクレオチド配列に対して相補的であるヌクレオチド配列を含んでなる単離された核酸分子を提供する。そのようなポリペプチドの膜貫通ドメインはここに開示される。従って、ここに開示されたＰＲＯポリペプチドの可溶性細胞外ドメインが考察されている。

他の実施態様は、ＰＲＯポリペプチドのコード配列の断片、又はその相補鎖に関し、それらは、例えば、場合によっては抗ＰＲＯ抗体に対する結合部位を含むポリペプチドをコードするＰＲＯポリペプチドのコード化断片のハイブリダイゼーションプローブとして、又はアンチセンスオリゴヌクレオチドプローブとしての用途が見いだされ得る。このような核酸断片は、通常は少なくとも約２０ヌクレオチド長、或いは少なくとも約３０ヌクレオチド長、或いは少なくとも約４０ヌクレオチド長、或いは少なくとも約５０ヌクレオチド長、或いは少なくとも約６０ヌクレオチド長、或いは少なくとも約７０ヌクレオチド長、或いは少なくとも約８０ヌクレオチド長、或いは少なくとも約９０ヌクレオチド長、或いは少なくとも約１００ヌクレオチド長、或いは少なくとも約１１０ヌクレオチド長、或いは少なくとも約１２０ヌクレオチド長、或いは少なくとも約１３０ヌクレオチド長、或いは少なくとも約１４０ヌクレオチド長、或いは少なくとも約１５０ヌクレオチド長、或いは少なくとも約１６０ヌクレオチド長、或いは少なくとも約１７０ヌクレオチド長、或いは少なくとも約１８０ヌクレオチド長、或いは少なくとも約１９０ヌクレオチド長、或いは少なくとも約２００ヌクレオチド長、或いは少なくとも約２５０ヌクレオチド長、或いは少なくとも約３００ヌクレオチド長、或いは少なくとも約３５０ヌクレオチド長、或いは少なくとも約４００ヌクレオチド長、或いは少なくとも約４５０ヌクレオチド長、或いは少なくとも約５００ヌクレオチド長、或いは少なくとも約６００ヌクレオチド長、或いは少なくとも約７００ヌクレオチド長、或いは少なくとも約８００ヌクレオチド長、或いは少なくとも約９００ヌクレオチド長、或いは少なくとも約１０００ヌクレオチド長であり、ここで「約」という語の内容は参照する長さのプラス又はマイナス１０％のヌクレオチド配列長を指すことを意味する。ＰＲＯポリペプチドコード化ヌクレオチド配列の新規な断片は、多くの良く知られた配列アラインメントプログラムの任意のものを用いてＰＲＯポリペプチドコード化ヌクレオチド配列と他の公知のヌクレオチド配列とを整列させ、いずれのＰＲＯポリペプチドコード化ヌクレオチド配列断片が新規であるかを決定することにより、日常的な手法で同定してもよい。このようなＰＲＯポリペプチドコード化ヌ

クレオチド配列の全ては、ここで考慮される。また、これらのヌクレオチド分子断片、好ましくは抗ＰＲＯ抗体に対する結合部位を含むＰＲＯポリペプチド断片によってコードされるＰＲＯポリペプチド断片も考慮される。

【００２１】

他の実施態様では、本発明は、上記で特定された単離された核酸配列のいずれかによってコードされる単離されたＰＲＯポリペプチドを提供する。

或る態様では、本発明は、ここに開示した完全長アミノ酸配列、ここに開示したシグナルペプチドを欠くアミノ酸配列、ここに開示したシグナルペプチドを有するか又は有しない膜貫通タンパク質の細胞外ドメイン、或いはここに開示した完全長アミノ酸配列のその他の具体的に定義された断片を有するＰＲＯポリペプチドに対して、少なくとも約８０％のアミノ酸配列同一性、或いはは少なくとも約８１％のアミノ酸配列同一性、或いは少なくとも約８２％のアミノ酸配列同一性、或いは少なくとも約８３％のアミノ酸配列同一性、或いは少なくとも約８４％のアミノ酸配列同一性、或いは少なくとも約８５％のアミノ酸配列同一性、或いは少なくとも約８６％のアミノ酸配列同一性、或いは少なくとも約８７％のアミノ酸配列同一性、或いは少なくとも約８８％のアミノ酸配列同一性、或いは少なくとも約８９％のアミノ酸配列同一性、或いは少なくとも約９０％のアミノ酸配列同一性、或いは少なくとも約９１％のアミノ酸配列同一性、或いは少なくとも約９２％のアミノ酸配列同一性、或いは少なくとも約９３％のアミノ酸配列同一性、或いは少なくとも約９４％のアミノ酸配列同一性、或いは少なくとも約９５％のアミノ酸配列同一性、或いは少なくとも約９６％のアミノ酸配列同一性、或いは少なくとも約９７％のアミノ酸配列同一性、或いは少なくとも約９８％のアミノ酸配列同一性、そして、或いは少なくとも約９９％のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含んでなる、単離されたＰＲＯポリペプチドに関する。

更なる態様では、本発明は、ここに開示したヒトタンパク質ｃＤＮＡのいずれかによってコードされるアミノ酸配列に対して、少なくとも約８０％のアミノ酸配列同一性、或いは少なくとも約８１％のアミノ酸配列同一性、或いは少なくとも約８２％のアミノ酸配列同一性、或いは少なくとも約８３％のアミノ酸配列同一性、或いは少なくとも約８４％のアミノ酸配列同一性、或いは少なくとも約８５％のアミノ酸配列同一性、或いは少なくとも約８６％のアミノ酸配列同一性、或いは少なくとも約８７％のアミノ酸配列同一性、或いは少なくとも約８８％のアミノ酸配列同一性、或いは少なくとも約８９％のアミノ酸配列同一性、或いは少なくとも約９０％のアミノ酸配列同一性、或いは少なくとも約９１％のアミノ酸配列同一性、或いは少なくとも約９２％のアミノ酸配列同一性、或いは少なくとも約９３％のアミノ酸配列同一性、或いは少なくとも約９４％のアミノ酸配列同一性、或いは少なくとも約９５％のアミノ酸配列同一性、或いは少なくとも約９６％のアミノ酸配列同一性、或いは少なくとも約９７％のアミノ酸配列同一性、或いは少なくとも約９８％のアミノ酸配列同一性、そして、或いは少なくとも約９９％のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含んでなる単離されたＰＲＯポリペプチドに関する。

【００２２】

特定の態様では、本発明は、Ｎ-末端シグナル配列及び／又は開始メチオニンを有しない、上記したようなアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列によってコードされる単離されたＰＲＯポリペプチドを提供する。それらを製造する方法もここに記載され、それらの方法は、適したコード化核酸分子を含むベクターを含んでなる宿主細胞をＰＲＯポリペプチドの発現に適した条件下で培養し、細胞培養物からＰＲＯポリペプチドを回収することを含む。

本発明の他の態様では、膜貫通ドメインの欠失した或いは膜貫通ドメインが不活性化している単離されたＰＲＯポリペプチドを提供する。それらを製造する方法もここに記載され、それらの方法は、適したコード化核酸分子を含むベクターを含んでなる宿主細胞をＰＲＯポリペプチドの発現に適した条件下で培養し、細胞培養物からＰＲＯポリペプチドを回収することを含む。

更に他の実施態様では、本発明は、ここで定義される天然ＰＲＯポリペプチドのアゴニ

スト及びアンタゴニストに関する。特別な実施態様では、アゴニスト又はアンタゴニストは抗ＰＲＯ抗体或いは小分子である。

更なる実施態様では、本発明は、ＰＲＯポリペプチドのアゴニスト又はアンタゴニストを同定する方法に関し、それは、ＰＲＯポリペプチドを候補分子と接触させ、前記ＰＲＯポリペプチドによって媒介される生物学的活性をモニターすることを含む。好ましくは、ＰＲＯポリペプチドは天然ＰＲＯポリペプチドである。

また更なる実施態様では、本発明は、ＰＲＯポリペプチド、或いはここに記載したＰＲＯポリペプチドのアゴニスト又はアンタゴニスト、又は抗ＰＲＯ抗体を、担体と組み合わせて含有する組成物に関する。場合によっては、担体は製薬的に許容される担体である。

本発明のその他の実施態様は、ＰＲＯポリペプチド、又は上記したようなそのアゴニスト又はアンタゴニスト、又は抗ＰＲＯ抗体を、ＰＲＯポリペプチド、そのアゴニスト又はアンタゴニスト又は抗ＰＲＯ抗体に対して反応性である症状の治療に有用な医薬の調製のために用いることに関する。

【００２３】

好ましい実施態様の詳細な説明

Ｉ．定義

ここで使用される際の「ＰＲＯポリペプチド」及び「ＰＲＯ」という用語は、直後に数値符号がある場合に種々のポリペプチドを指し、完全な符号（例えば、ＰＲＯ／番号）は、ここに記載する特定のポリペプチド配列を意味する。「数字」がここで使用される実際の数値符号である、ここで使用される「ＰＲＯ／番号ポリペプチド」及び「ＰＲＯ／番号」という用語は、天然配列ポリペプチド及び変異体（ここで更に詳細に定義する）を含む。ここで記載されているＰＲＯポリペプチドは、ヒト組織型又は他の供給源といった種々の供給源から単離してもよく、組換え又は合成方法によって調製してもよい。「ＰＲＯポリペプチド」という用語は、ここで開示されている各個々のＰＲＯ／番号ポリペプチドに指す。「ＰＲＯポリペプチド」を指すこの明細書中の全ての開示は、各ポリペプチドを個別にも組み合わせとしても言及する。例えば、調製の、精製の、誘導の、抗体の形成、投与の、含有する組成物、疾患の治療、などの記述は、本発明の各ポリペプチドに個別に関係する。また、「ＰＲＯポリペプチド」という用語は、ここに開示されているＰＲＯ／番号ポリペプチドの変異体を含む。

「天然配列ＰＲＯポリペプチド」は、天然由来の対応するＰＲＯポリペプチドと同一のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含んでいる。このような天然配列ＰＲＯポリペプチドは、自然から単離することもできるし、組換え又は合成手段により生産することもできる。「天然配列ＰＲＯポリペプチド」という用語には、特に、特定のＰＲＯポリペプチドの自然に生じる切断又は分泌形態（例えば、細胞外ドメイン配列）、自然に生じる変異形態(例えば、選択的にスプライシングされた形態)及びそのポリペプチドの自然に生じる対立遺伝子変異体が含まれる。本発明の種々の実施態様において、ここに開示されている天然配列ＰＲＯポリペプチドは、関連する図に示されている完全長アミノ酸配列を含有する成熟又は完全長天然配列ポリペプチドである。開始及び終止コドンは、太い書体及び下線で図中に示さている。しかし、関連する図に開示されているＰＲＯポリペプチドは、該図においてアミノ酸位置１と称されているメチオニン残基で開始することが示されている一方で、図のアミノ酸位置１より上流又は下流のいずれかに位置する他のメチオニン残基が、ＰＲＯポリペプチドの開始アミノ酸残基として用いられることも考えられるし可能である。

【００２４】

ＰＲＯポリペプチド「細胞外ドメイン」又は「ＥＣＤ」は、膜貫通及び細胞質ドメインを実質的に有しないＰＲＯポリペプチドの形態を意味する。通常、ＰＲＯポリペプチドＥＣＤは、それらの膜貫通及び／又は細胞質ドメインを１％未満、好ましくはそのようなドメインを０．５％未満しか持たない。本発明のＰＲＯポリペプチドについて同定された任意の膜貫通ドメインは、疎水性ドメインのその型を同定するために当該分野において日常的に使用される基準に従い同定されることが理解されるであろう。膜貫通ドメインの厳密

な境界は変わり得るが、最初に同定されたドメインのいずれかの末端から約５アミノ酸を越えない可能性が高い。従って、ＰＲＯポリペプチド細胞外ドメインは、場合によっては、実施例又明細書おいてに同定された膜貫通ドメインのいずれかの末端から約５を越えないアミノ酸を含みうるし、付着のシグナルペプチドを有する又は有しないそのようなポリペプチド及びそれらをコードする核酸は、本発明において考慮される。

ここに開示する種々のＰＲＯポリペプチドの「シグナルペプチド」の適切な位置は、本明細書と添付の図面に示される。しかし、注記するように、シグナルペプチドのＣ-末端境界は変化しうるが、ここで最初に定義したようにシグナルペプチドＣ-末端境界のいずれかの側で約５アミノ酸未満である可能性が最も高く、シグナルペプチドのＣ-末端境界は、そのような型のアミノ酸配列成分を同定するのに日常的に使用される基準に従って同定しうる（例えば、Nielsen等，Prot. Eng. 10:1-6 (1997)及びvon Heinje等，Nucl. Acids. Res. 14:4683-4690 (1986)）。更に、幾つかの場合には、分泌ポリペプチドからのシグナルペプチドの切断は完全に均一ではなく、一つ以上の分泌種をもたらすことも認められる。シグナルペプチドがここに定義されるシグナルペプチドのＣ-末端境界のいずれかの側の約５アミノ酸未満内で切断されるこれらの成熟ポリペプチド、及びそれらをコードするポリヌクレオチドは、本発明で考慮される。

【００２５】

「ＰＲＯポリペプチド変異体」とは、上記又は下記に定義されるように、ここに開示される完全長天然配列ＰＲＯポリペプチド、ここに開示されたシグナルペプチドを欠く完全長天然配列ＰＲＯポリペプチド配列、シグナルペプチド有無のここに開示されたＰＲＯの細胞外ドメイン又はここに開示された完全長ＰＲＯポリペプチドの他の断片と、少なくとも約８０％のアミノ酸配列同一性を有する活性ＰＲＯポリペプチドを意味する。このようなＰＲＯポリペプチド変異体には、例えば、完全長天然アミノ酸配列のＮ-又はＣ-末端において一つ又は複数のアミノ酸残基が付加、もしくは欠失されたＰＲＯポリペプチドが含まれる。通常、ＰＲＯポリペプチド変異体は、ここに開示される完全長天然アミノ酸配列、ここに開示されたシグナルペプチドを欠く完全長天然配列ＰＲＯポリペプチド配列、シグナルペプチドを有する又は有しないここに開示されたＰＲＯの細胞外ドメイン又はここに開示された完全長ＰＲＯポリペプチドの特に同定された他の断片と、少なくとも約８０％のアミノ酸配列同一性、或いは少なくとも約８１％のアミノ酸配列同一性、或いは少なくとも約８２％のアミノ酸配列同一性、或いは少なくとも約８３％のアミノ酸配列同一性、或いは少なくとも約８４％のアミノ酸配列同一性、或いは少なくとも約８５％のアミノ酸配列同一性、或いは少なくとも約８６％のアミノ酸配列同一性、或いは少なくとも約８７％のアミノ酸配列同一性、或いは少なくとも約８８％のアミノ酸配列同一性、或いは少なくとも約８９％のアミノ酸配列同一性、或いは少なくとも約９０％のアミノ酸配列同一性、或いは少なくとも約９１％のアミノ酸配列同一性、或いは少なくとも約９２％のアミノ酸配列同一性、或いは少なくとも約９３％のアミノ酸配列同一性、或いは少なくとも約９４％のアミノ酸配列同一性、或いは少なくとも約９５％のアミノ酸配列同一性、或いは少なくとも約９６％のアミノ酸配列同一性、或いは少なくとも約９７％のアミノ酸配列同一性、或いは少なくとも約９８％のアミノ酸配列同一性、そして、或いは少なくとも約９９％のアミノ酸配列同一性を有している。通常は、ＰＲＯ変異体ポリペプチドは、少なくとも約１０アミノ酸長、或いは少なくとも約２０アミノ酸長、或いは少なくとも約３０アミノ酸長、或いは少なくとも約４０アミノ酸長、或いは少なくとも約５０アミノ酸長、或いは少なくとも約６０アミノ酸長、或いは少なくとも約７０アミノ酸長、或いは少なくとも約８０アミノ酸長、或いは少なくとも約９０アミノ酸長、或いは少なくとも約１００アミノ酸長、或いは少なくとも約１５０アミノ酸長、或いは少なくとも約２００アミノ酸長、或いは少なくとも約３００アミノ酸長、又はそれ以上である。

ここに定義されるＰＲＯポリペプチドに対してここで同定されている「パーセント（％）アミノ酸配列同一性」は、配列を整列させ、最大のパーセント配列同一性を得るために必要ならば間隙を導入し、如何なる保存的置換も配列同一性の一部と考えないとした、ＰＲＯポリペプチドのアミノ酸残基と同一である候補配列中のアミノ酸残基のパーセントと

して定義される。パーセントアミノ酸配列同一性を決定する目的のためのアラインメントは、当業者の技量の範囲にある種々の方法、例えばＢＬＡＳＴ、ＢＬＡＳＴ-２、ＡＬＩＧＮ、又はＭｅｇａｌｉｇｎ（ＤＮＡＳＴＡＲ）ソフトウエアのような公に入手可能なコンピュータソフトウエアを使用することにより達成可能である。当業者であれば、比較される配列の完全長に対して最大のアラインメントを達成するために必要な任意のアルゴリズムを含む、アラインメントを測定するための適切なパラメータを決定することができる。しかし、ここでの目的のためには、％アミノ酸配列同一性値は、ＡＬＩＧＮ-２プログラム用の完全なソースコードが下記の表１に提供されている配列比較プログラムＡＬＩＧＮ-２を使用することによって得られる。ＡＬＩＧＮ-２配列比較コンピュータプログラムはジェネンテック社によって作製され、下記の表１に示したソースコードは米国著作権庁、ワシントンＤ．Ｃ．，２０５５９に使用者用書類とともに提出され、米国著作権登録番号ＴＸＵ５１００８７の下で登録されている。ＡＬＩＧＮ-２はジェネンテック社、サウスサンフランシスコ、カリフォルニアから好適に入手可能であり、下記の表１に提供されたソースコードからコンパイルしてもよい。ＡＬＩＧＮ-２プログラムは、ＵＮＩＸ（登録商標）オペレーティングシステム、好ましくはデジタルＵＮＩＸ（登録商標） Ｖ４．０Ｄでの使用のためにコンパイルされる。全ての配列比較パラメータは、ＡＬＩＧＮ-２プログラムによって設定され変動しない。

【００２６】

アミノ酸配列比較にＡＬＩＧＮ-２が用いられる状況では、与えられたアミノ酸配列Ａの、与えられたアミノ酸配列Ｂとの、又はそれに対する％アミノ酸配列同一性（或いは、与えられたアミノ酸配列Ｂと、又はそれに対して或る程度の％アミノ酸配列同一性を持つ又は含む与えられたアミノ酸配列Ａと言うこともできる）は次のように計算される：

分率Ｘ／Ｙの１００倍

ここで、Ｘは配列アラインメントプログラムＡＬＩＧＮ-２のＡ及びＢのアラインメントによって同一であると一致したスコアのアミノ酸残基の数であり、ＹはＢの全アミノ酸残基数である。アミノ酸配列Ａの長さがアミノ酸配列Ｂの長さと異なる場合、ＡのＢに対する％アミノ酸配列同一性は、ＢのＡに対する％アミノ酸配列同一性とは異なることは理解されるであろう。この方法を用いた％アミノ酸配列同一性の計算の例として、表２及び３に、「比較タンパク質」と称されるアミノ酸配列の「ＰＲＯ」と称されるアミノ酸配列に対する％アミノ酸配列同一性の計算方法を示す。「ＰＲＯ」は対象となる仮説的ＰＲＯポリペプチドのアミノ酸配列を表し、「比較タンパク質」は対象となる「ＰＲＯ」ポリペプチドが比較されているポリペプチドのアミノ酸配列を表し、そして「Ｘ」、「Ｙ」及び「Ｚ」の各々は異なった仮説的アミノ酸残基を表している。

特に断らない限りは、ここでの全ての％アミノ酸配列同一性値は上記のようにＡＬＩＧＮ-２配列比較コンピュータプログラムを用いて得られる。しかしながら、％アミノ酸配列同一性値は、ＷＵ-ＢＬＡＳＴ-２コンピュータプログラム（Altschul等, Methods in Enzymology 266:460-480 (1996)）を用いて決定してもよい。更に、殆どのＷＵ-ＢＬＡＳＴ-２検索パラメータは初期値に設定される。初期値に設定されない、即ち調節可能なパラメータは以下の値に設定する：オーバーラップスパン＝１、オーバーラップフラクション＝０．１２５、ワード閾値（Ｔ）＝１１、及びスコアリングマトリクス＝ＢＬＯＳＵＭ６２。ＷＵ-ＢＬＡＳＴ-２が用いられた場合には、％アミノ酸配列同一性値は、（ａ）天然ＰＲＯポリペプチドから誘導された配列を有する対象とするＰＲＯポリペプチドのアミノ酸配列と、対象とする比較アミノ酸配列（即ち、対象とするＰＲＯポリペプチドが比較されるＰＲＯポリペプチド変異体であってもよい配列）との間の、ＷＵ-ＢＬＡＳＴ-２によって決定した一致する同一アミノ酸残基の数を、（ｂ）対象とするＰＲＯポリペプチドの残基の総数で除した商によって決定される。例えば、「アミノ酸配列Ｂに対して少なくとも８０％のアミノ酸配列同一性を持つ又は持っているアミノ酸配列Ａを含んでなるポリペプチド」という表現では、アミノ酸配列Ａが対象である比較アミノ酸配列であり、アミノ酸配列Ｂが対象であるＰＲＯポリペプチドのアミノ酸配列である。

【００２７】

また、％アミノ酸配列同一性は、配列比較プログラムＮＣＢＩ-ＢＬＡＳＴ２（Altschul等, Nucleic Acids Res. 25:3389-3402 (1997)）を用いて決定してもよい。ＮＣＢＩ-ＢＬＡＳＴ２配列比較プログラムは、http://www.ncbi.nlm.nih.govからダウンロードでき、又は別な方法で米国国立衛生研究所、ベセスダ、メリーランドから得ることができる。ＮＣＢＩ-ＢＬＡＳＴ２は幾つかの検索パラメータを使用し、それら検索パラメータの全ては初期値に設定され、例えば、unmask＝可、鎖＝全て、予測される発生＝１０、最小低複合長＝１５／５、マルチパスｅ-値＝０．０１、マルチパスの定数＝２５、最終ギャップアラインメントのドロップオフ＝２５、及びスコアリングマトリクス＝ＢＬＯＳＵＭ６２を含む。

アミノ酸配列比較にＮＣＢＩ-ＢＬＡＳＴ２が用いられる状況では、与えられたアミノ酸配列Ａの、与えられたアミノ酸配列Ｂとの、又はそれに対する％アミノ酸配列同一性（或いは、与えられたアミノ酸配列Ｂと、又はそれに対して或る程度の％アミノ酸配列同一性を持つ又は含む与えられたアミノ酸配列Ａと言うこともできる）は次のように計算される：

分率Ｘ／Ｙの１００倍

ここで、Ｘは配列アラインメントプログラムＮＣＢＩ-ＢＬＡＳＴ２のＡ及びＢのアラインメントによって同一であると一致したスコアのアミノ酸残基の数であり、ＹはＢの全アミノ酸残基数である。アミノ酸配列Ａの長さがアミノ酸配列Ｂの長さと異なる場合、ＡのＢに対する％アミノ酸配列同一性は、ＢのＡに対する％アミノ酸配列同一性とは異なることは理解されるであろう。

【００２８】

「ＰＲＯ変異体ポリヌクレオチド」又は「ＰＲＯ変異体核酸配列」とは、下記に定義されるように、活性ＰＲＯポリペプチドをコードする核酸分子であり、ここに開示する完全長天然配列ＰＲＯポリペプチド配列、ここに開示するシグナルペプチドを欠いた完全長天然配列ＰＲＯポリペプチド配列、シグナルペプチドを有する又は有しないここに開示するＰＲＯポリペプチドの細胞外ドメイン、又はここに開示する完全長ＰＲＯポリペプチド配列の他の任意の断片をコードする核酸配列と少なくとも約８０％の核酸配列同一性、好ましくは或いは少なくとも約８１％の核酸配列同一性、或いは少なくとも約８２％の核酸配列同一性、或いは少なくとも約８３％の核酸配列同一性、或いは少なくとも約８４％の核酸配列同一性、或いは少なくとも約８５％の核酸配列同一性、或いは少なくとも約８６％の核酸配列同一性、或いは少なくとも約８７％の核酸配列同一性、或いは少なくとも約８８％の核酸配列同一性、或いは少なくとも約８９％の核酸配列同一性、或いは少なくとも約９０％の核酸配列同一性、或いは少なくとも約９１％の核酸配列同一性、或いは少なくとも約９２％の核酸配列同一性、或いは少なくとも約９３％の核酸配列同一性、或いは少なくとも約９４％の核酸配列同一性、或いは少なくとも約９５％の核酸配列同一性、或いは少なくとも約９６％の核酸配列同一性、或いは少なくとも約９７％の核酸配列同一性、或いは少なくとも約９８％の核酸配列同一性、そして、或いは少なくとも約９９％の核酸配列同一性を有している。変異体は、天然ヌクレオチド配列を含まない。

通常は、ＰＲＯ変異体ポリヌクレオチドは、少なくとも約３０ヌクレオチド長、或いは少なくとも約６０ヌクレオチド長、或いは少なくとも約９０ヌクレオチド長、或いは少なくとも約１２０ヌクレオチド長、或いは少なくとも約１５０ヌクレオチド長、或いは少なくとも約１８０ヌクレオチド長、或いは少なくとも約２１０ヌクレオチド長、或いは少なくとも約２４０ヌクレオチド長、或いは少なくとも約２７０ヌクレオチド長、或いは少なくとも約３００ヌクレオチド長、或いは少なくとも約４５０ヌクレオチド長、或いは少なくとも約６００ヌクレオチド長、或いは少なくとも約９００ヌクレオチド長、又はそれ以上である。

【００２９】

ここで同定されるＰＲＯコード化核酸配列に対する「パーセント(％)核酸配列同一性」は、配列を整列させ、最大のパーセント配列同一性を得るために必要ならば間隙を導入し、ＰＲＯ配列のヌクレオチドと同一である候補配列中のヌクレオチドのパーセントとして

定義される。パーセント核酸配列同一性を決定する目的のためのアラインメントは、当業者の知る範囲にある種々の方法、例えばＢＬＡＳＴ、ＢＬＡＳＴ-２、ＡＬＩＧＮ、又はＭｅｇａｌｉｇｎ（ＤＮＡＳＴＡＲ）ソフトウエアのような公に入手可能なコンピュータソフトウエアを使用することにより達成可能である。ここでの目的のためには、％アミノ酸配列同一性値は、ＡＬＩＧＮ-２プログラム用の完全なソースコードが下記の表１に提供されている配列比較プログラＡＬＩＧＮ-２を使用することによって得られる。ＡＬＩＧＮ-２配列比較コンピュータプログラムはジェネンテック社によって作製され、下記の表１に示したソースコードは米国著作権庁、ワシントンＤ．Ｃ．，２０５５９に使用者用書類とともに提出され、米国著作権登録番号ＴＸＵ５１００８７の下で登録されている。ＡＬＩＧＮ-２はジェネンテック社、サウス サン フランシスコ，カリフォルニアから好適に入手可能であり、下記の表１に提供されたソースコードからコンパイルしてもよい。ＡＬＩＧＮ-２プログラムは、ＵＮＩＸ（登録商標）オペレーティングシステム、好ましくはデジタルＵＮＩＸ（登録商標） Ｖ４．０Ｄでの使用のためにコンパイルされる。全ての配列比較パラメータは、ＡＬＩＧＮ-２プログラムによって設定され変動しない。

核酸配列比較にＡＬＩＧＮ-２が用いられる状況では、与えられた核酸配列Ｃの、与えられた核酸配列Ｄとの、又はそれに対する％核酸配列同一性（或いは、与えられたアミノ酸配列Ｄと、又はそれに対して或る程度の％核酸配列同一性を持つ又は含む与えられた核酸配列Ｃと言うこともできる）は次のように計算される：

分率Ｗ／Ｚの１００倍

ここで、Ｗは配列アラインメントプログラムＡＬＩＧＮ-２のＣ及びＤのアラインメントによって同一であると一致したスコアの核酸残基の数であり、ＺはＤの全核酸残基数である。核酸配列Ｃの長さがアミノ酸配列Ｄの長さと異なる場合、ＣのＤに対する％核酸配列同一性は、ＤのＣに対する％核酸配列同一性とは異なることは理解されるであろう。この方法を用いた％核酸配列同一性の計算の例として、表４及び５に「比較ＤＮＡ」と称される核酸配列の「ＰＲＯ-ＤＮＡ」と称される核酸配列に対する％核酸配列同一性の計算方法を示す。「ＰＲＯ-ＤＮＡ」は対象となる仮説的ＰＲＯコード化核酸配列を表し、「比較ＤＮＡ」は対象となる「ＰＲＯ-ＤＮＡ」核酸分子が比較されている核酸配列を表し、そして「Ｎ」、「Ｌ」及び「Ｖ」の各々は異なった仮説的アミノ酸残基を表している。

【００３０】

特に断らない限りは、ここでの全ての％核酸配列同一性値は、直上のパラグラフに示したようにＡＬＩＧＮ-２配列比較コンピュータプログラムを用いて得られる。しかしながら、％核酸配列同一性値は、ＷＵ-ＢＬＡＳＴ-２コンピュータプログラム（Altschul等，Methods in Enzymology 266:460-480 (1996)）を用いて決定してもよい。更に、殆どのＷＵ-ＢＬＡＳＴ-２検索パラメータは初期値に設定される。初期値に設定されない、即ち調節可能なパラメータは以下の値に設定する：オーバーラップスパン＝１、オーバーラップフラクション＝０．１２５、ワード閾値（Ｔ）＝１１、及びスコアリングマトリクス＝ＢＬＯＳＵＭ６２。ＷＵ-ＢＬＡＳＴ-２が用いられた場合、％核酸配列同一性値は、（ａ）天然配列ＰＲＯポリペプチドコード化核酸から誘導された配列を有する対象とするＰＲＯポリペプチドコード化核酸分子の核酸配列と、対象とする比較核酸配列（即ち、対象とするＰＲＯポリペプチドコード化核酸分子が比較されるＰＲＯポリペプチド変異体であってもよい配列）との間の、ＷＵ-ＢＬＡＳＴ-２によって決定した一致する同一核酸残基の数を、（ｂ）対象とするＰＲＯポリペプチドコード化核酸分子のヌクレオチドの総数で除した商によって決定される。例えば、「核酸配列Ｂに対して少なくとも８０％の核酸配列同一性を持つ又は持っている核酸配列Ａを含んでなるポリペプチド」という表現では、核酸配列Ａが対象とする比較核酸配列であり、核酸配列Ｂが対象とするＰＲＯポリペプチドコード化核酸分子の核酸配列である。

また、％核酸配列同一性は、配列比較プログラムＮＣＢＩ-ＢＬＡＳＴ２（Altschul等，Nucleic Acids Res. 25:3389-3402 (1997)）を用いて決定してもよい。ＮＣＢＩ-ＢＬＡＳＴ２配列比較プログラムは、http://www.ncbi.nlm.nih.govからダウンロードでき、又は別な方法で米国国立衛生研究所、ベセスダ、メリーランドから得ることができる。ＮＣ

ＢＩ-ＢＬＡＳＴ２は幾つかの検索パラメータを使用し、それら検索パラメータの全ては初期値に設定され、例えば、unmask＝可、鎖＝全て、予測される発生＝１０、最小低複合長＝１５／５、マルチパスｅ-値＝０．０１、マルチパスの定数＝２５、最終ギャップアラインメントのドロップオフ＝２５、及びスコアリングマトリクス＝ＢＬＯＳＵＭ６２を含む。

【００３１】

核酸配列比較にＮＣＢＩ-ＢＬＡＳＴ２が用いられる状況では、与えられた核酸配列Ｃの、与えられた核酸配列Ｄとの、又はそれに対する％核酸配列同一性（或いは、与えられた核酸配列Ｄと、又はそれに対して或る程度の％核酸配列同一性を持つ又は含む与えられた核酸配列Ｃと言うこともできる）は次のように計算される：

分率Ｗ／Ｚの１００倍

ここで、Ｗは配列アラインメントプログラムＮＣＢＩ-ＢＬＡＳＴ２のＣ及びＤのアラインメントによって同一であると一致したスコアの核酸残基の数であり、ＺはＤの全核酸残基数である。核酸配列Ｃの長さが核酸配列Ｄの長さと異なる場合、ＣのＤに対する％核酸配列同一性は、ＤのＣに対する％核酸配列同一性とは異なることは理解されるであろう。

他の実施態様では、ＰＲＯ変異体ポリペプチドヌクレオチドは、活性ＰＲＯポリペプチドをコードし、好ましくは緊縮性ハイブリダイゼーション及び洗浄条件下で、ここに開示する完全長ＰＲＯポリペプチドをコードするヌクレオチド配列にハイブリダイゼーションする核酸分子である。ＰＲＯ変異体ポリペプチドは、ＰＲＯ変異体ポリヌクレオチドにコードされるものであってもよい。

【００３２】

「単離された」とは、ここで開示された種々のポリペプチドを記述するために使用するときは、その自然環境の成分から同定され分離され及び／又は回収されたポリペプチドを意味する。その自然環境の汚染成分とは、そのポリペプチドの診断又は治療への使用を典型的には妨害する物質であり、酵素、ホルモン、及び他のタンパク質様又は非タンパク質様溶質が含まれる。好ましい実施態様において、ポリペプチドは、（１）スピニングカップシークエネーターを使用することにより、少なくとも１５残基のＮ末端或いは内部アミノ酸配列を得るのに充分なほど、或いは、（２）クーマシーブルー或いは好ましくは銀染色を用いた非還元或いは還元条件下でのＳＤＳ-ＰＡＧＥによる均一性まで精製される。単離されたポリペプチドには、ＰＲＯポリペプチドの自然環境の少なくとも一つの成分が存在しないため、組換え細胞内のインサイツのタンパク質が含まれる。しかしながら、通常は、単離されたポリペプチドは少なくとも一つの精製工程により調製される。

「単離された」ＰＲＯポリペプチドコード化核酸は、同定され、ＰＲＯポリペプチドをコードする核酸の天然源に通常付随している少なくとも一つの汚染核酸分子から分離された核酸分子である。単離されたＰＲＯポリペプチドコード化核酸分子は、天然に見出される形態或いは設定以外のものである。ゆえに、単離されたＰＲＯポリペプチドコード化核酸分子は、天然の細胞中に存在するＰＲＯポリペプチドコード化核酸分子とは区別される。しかし、単離されたＰＲＯポリペプチドコード化核酸分子は、例えば、核酸分子が天然細胞のものとは異なった染色体位置にあるＰＲＯポリペプチドを通常発現する細胞に含まれるＰＲＯポリペプチド核酸分子を含む。

【００３３】

「コントロール配列」という表現は、特定の宿主生物において作用可能に結合したコード配列を発現するために必要なＤＮＡ配列を指す。例えば原核生物に好適なコントロール配列は、プロモーター、場合によってはオペレータ配列、及びリボソーム結合部位を含む。真核生物の細胞は、プロモーター、ポリアデニル化シグナル及びエンハンサーを利用することが知られている。

核酸は、他の核酸配列と機能的な関係にあるときに「作用可能に結合し」ている。例えば、プレ配列或いは分泌リーダーのＤＮＡは、ポリペプチドの分泌に参画するプレタンパク質として発現されているなら、そのポリペプチドのＤＮＡに作用可能に結合している；プロモーター又はエンハンサーは、配列の転写に影響を及ぼすならば、コード配列に作用

可能に結合している；又はリボソーム結合部位は、もしそれが翻訳を容易にするような位置にあるなら、コード配列と作用可能に結合している。一般的に、「作用可能に結合している」とは、結合したＤＮＡ配列が近接しており、分泌リーダーの場合には近接していて読みフェーズにあることを意味する。しかし、エンハンサーは必ずしも近接している必要はない。結合は簡便な制限部位でのライゲーションにより達成される。そのような部位が存在しない場合は、従来の手法に従って、合成オリゴヌクレオチドアダプター或いはリンカーが使用される。

【００３４】

「抗体」という用語は最も広い意味において使用され、例えば、単一の抗ＰＲＯポリペプチドモノクローナル抗体（アゴニスト、アンタゴニスト、及び中和抗体を含む）、多エピトープ特異性を持つ抗ＰＲＯ抗体組成物、一本鎖抗ＰＲＯ抗体、及び抗ＰＲＯ抗体の断片を包含している（下記参照）。ここで使用される「モノクローナル抗体」という用語は、実質的に均一な抗体の集団、すなわち、構成する個々の抗体が、少量存在しうる自然に生じる可能性のある突然変異を除いて同一である集団から得られる抗体を称する。

ハイブリダイゼーション反応の「緊縮性」は、当業者によって容易に決定され、一般的にプローブ長、洗浄温度、及び塩濃度に依存する経験的な計算である。一般に、プローブが長くなると適切なアニーリングのための温度が高くなり、プローブが短くなると温度は低くなる。ハイブリダイゼーションは、一般的に、相補的鎖がその融点に近いがそれより低い環境に存在する場合における変性ＤＮＡの再アニールする能力に依存する。プローブとハイブリダイゼーション可能な配列との間の所望の相同性の程度が高くなると、使用できる相対温度が高くなる。その結果、より高い相対温度は、反応条件をより緊縮性にするが、低い温度は緊縮性を低下させる。更に、緊縮性は塩濃度に逆比例する。ハイブリダイゼーション反応の緊縮性の更なる詳細及び説明は、Ausubel等，Current Protocols in Molecular Biology，Wiley Interscience Publishers，(1995)を参照のこと。

【００３５】

ここで定義される「緊縮性条件」又は「高度の緊縮性条件」は、（１）洗浄のために低イオン強度及び高温度を用いるもの、例えば、５０℃において０．０１５Ｍの塩化ナトリウム／０．００１５Ｍのクエン酸ナトリウム／０．１％のドデシル硫酸ナトリウムを用いるもの；（２）ハイブリダイゼーション中にホルムアミド等の変性剤を用いるもの、例えば、４２℃において５０％（ｖ／ｖ）ホルムアミド、０．１％ウシ血清アルブミン／０．１％フィコール／０．１％のポリビニルピロリドン／５０ｍＭのｐＨ６．５のリン酸ナトリウムバッファーに７５０ｍＭの塩化ナトリウム、７５ｍＭのクエン酸ナトリウムを添加したもの；又は（３）４２℃において５０％ホルムアミド、５×ＳＳＣ（０．７５ＭのＮａＣｌ、０．０７５Ｍのクエン酸ナトリウム）、５０ｍＭのリン酸ナトリウム（ｐＨ６．８）、０．１％のピロリン酸ナトリウム、５×デンハード液、超音波処理サケ精子ＤＮＡ（５０μｇ／ｍｌ）、０．１％ＳＤＳ、及び１０％のデキストラン硫酸を用い、４２℃において０．２×ＳＳＣ（塩化ナトリウム／クエン酸ナトリウム）中で、５５℃において５０％ホルムアミド中で洗浄した後、５５℃においてＥＤＴＡを含む０．１×ＳＳＣからなる高緊縮性洗浄を用いるものによって同定できる。

【００３６】

「中程度の緊縮性条件」は、Sambrook等，Molecular Cloning: A Laboratory Manual，New York: Cold Spring Harbor Press，1989に記載されているように特定され、上記のものより緊縮性が低い洗浄液及びハイブリダイゼーション条件（例えば、温度、イオン強度及び％ＳＤＳ）の使用を含む。中程度の緊縮性条件は、２０％ホルムアミド、５×ＳＳＣ（１５０ｍＭのＮａＣｌ、１５ｍＭのクエン酸三ナトリウム）、５０ｍＭリン酸ナトリウム（ｐＨ７．６）、５×デンハード液、１０％デキストラン硫酸、及び２０ｍｇ／ｍＬの変性剪断サケ精子ＤＮＡを含む溶液中の３７℃での終夜インキュベーション後に、３７～５０℃にて１×ＳＳＣ中でフィルター洗浄を行うという条件である。プローブ長などの因子に必要に応じて適合させるには、どのようにして温度、イオン強度等を調節するかは当業者であれば分かるであろう。

【００３７】
「エピトープタグ」なる用語は、ここで用いられるときは、「タグポリペプチド」に融合したＰＲＯポリペプチド、又はそれらのドメイン配列を含んでなるキメラポリペプチドを指す。タグポリペプチドは、その抗体が産生され得るエピトープ、又は幾つかの他の試薬によって同定できるエピトープを提供するに十分な数の残基を有しているが、その長さは対象とするＰＲＯポリペプチドの活性を阻害しないよう充分に短い。また、タグポリペプチドは、好ましくは、抗体が他のエピトープと実質的に交差反応をしないようにかなり独特である。適切なタグポリペプチドは、一般に、少なくとも６のアミノ酸残基、通常は約８～約５０のアミノ酸残基(好ましくは約１０～約２０の残基)を有する。
ここで用いられる「イムノアドヘシン」なる用語は、異種タンパク質（「アドヘシン」）の結合特異性と免疫グロブリン定常ドメインとを結合した抗体様分子を指す。構造的には、イムノアドヘシンは、所望の結合特異性を持ち、抗体の抗原認識及び結合部位以外である（即ち「異種の」）アミノ酸配列と、免疫グロブリン定常ドメイン配列との融合物を含む。イムノアドヘシン分子のアドヘシン部分は、典型的には少なくともレセプター又はリガンドの結合部位を含む隣接アミノ酸配列である。イムノアドヘシンの免疫グロブリン定常ドメイン配列は、ＩｇＧ-１、ＩｇＧ-２、ＩｇＧ-３又はＩｇＧ-４サブタイプ、ＩｇＡ（ＩｇＡ-１及びＩｇＡ-２を含む）、ＩｇＥ、ＩｇＤ又はＩｇＭなどの任意の免疫グロブリンから得ることができる。
【００３８】
ここでの目的に対する「活性な」又は「活性」とは、天然又は天然に生じるＰＲＯの生物学的及び／又は免疫学的活性を保持するＰＲＯポリペプチドの形態を意味し、ここで、「生物学的」活性とは、天然又は天然に生じるＰＲＯが保持する抗原性エピトープに対する抗体の生産を誘発する能力以外の、天然又は天然に生じるＰＲＯによって引き起こされる生物機能（阻害又は刺激）を意味し、「免疫」活性とは、天然又は天然に生じるＰＲＯが保持する抗原性エピトープに対する抗体の生産を誘発する能力を意味する。
「アンタゴニスト」なる用語は最も広い意味で用いられ、ここに開示した天然ＰＲＯポリペプチドの生物学的活性を阻止、阻害、又は中和する任意の分子を指す。同様に「アゴニスト」なる用語は最も広い意味で用いられ、ここに開示した天然ＰＲＯポリペプチドの生物学的活性を模倣する任意の分子を指す。好適なアゴニスト又はアンタゴニスト分子は特に、アゴニスト又はアンタゴニスト抗体又は抗体断片、天然ＰＲＯポリペプチドの断片又はアミノ酸配列変異体、ペプチド、アンチセンスオリゴヌクレオチド、有機小分子、などを含む。ＰＲＯポリペプチドのアゴニスト又はアンタゴニストの同定方法は、ＰＲＯポリペプチドを候補アンタゴニスト又はアゴニストと接触させ、ＰＲＯポリペプチドに正常に関連している一又は複数の生物学的活性の変化を測定することを含んでもよい。
【００３９】
「治療」とは、治癒的処置、予防的療法及び防止的療法の両方を意味し、患者は標的とする病理学的状態又は疾患を防止又は低下（減少）させられる。治療が必要なものとは、既に疾患に罹っているもの、並びに疾患に罹りやすいもの又は疾患が防止されているものを含む。
「慢性」投与とは、急性様式とは異なり連続的な様式での薬剤を投与し、初期の治療効果（活性）を長時間に渡って維持することを意味する。「間欠」投与とは、中断無く連続的になされるのではなく、むしろ本質的に周期的になされる処理である。
治療の対象のための「哺乳動物」は、ヒト、家庭及び農業用動物、動物園、スポーツ、又はペット動物、例えばイヌ、ネコ、ウシ、ウマ、ヒツジ、ブタ、ウサギなどを含む哺乳類に分類される任意の動物を意味する。好ましくは、哺乳動物はヒトである。
一又は複数の治療薬と「組み合わせた」投与とは、同時（同時期）及び任意の順序での連続した投与を含む。
【００４０】
ここで用いられる「担体」は、製薬的に許容されうる担体、賦形剤、又は安定化剤を含み、用いられる用量及び濃度でそれらに暴露される細胞又は哺乳動物に対して非毒性であ

る。生理学的に許容されうる担体は、水性ｐＨ緩衝溶液であることが多い。生理学的に許容されうる担体の例は、リン酸塩、クエン酸塩、及び他の有機酸塩のバッファー；アスコルビン酸を含む酸化防止剤；低分子量（約１０残基未満）ポリペプチド；タンパク質、例えば血清アルブミン、ゼラチン、又は免疫グロブリン；疎水性ポリマー、例えばポリビニルピロリドン；アミノ酸、例えばグリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニン又はリシン；グルコース、マンノース又はデキストランを含む単糖類、二糖類、及び他の炭水化物；ＥＤＴＡ等のキレート剤；マンニトール又は祖ルビトール等の糖アルコール；ナトリウム等の塩形成対イオン；及び／又は非イオン性界面活性剤、例えば、TWEEN(商品名)、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）、及びPLURONICS(商品名)を含む。

「抗体断片」は、原型の抗体の一部、好ましくは原型の抗体の抗原結合又は可変領域を含む。抗体断片の例は、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）$_2$、及びＦｖ断片；ダイアボディ(diabodies)；直鎖状抗体（Zapata等, Protein Eng. 8(10):1057-1062 [1995]）；一本鎖抗体分子；及び抗体断片から形成された多重特異性抗体を含む。

【００４１】

抗体のパパイン消化は、「Ｆａｂ」断片と呼ばれる二つの同一の抗体結合断片を生成し、その各々は単一の抗原結合部位を持ち、残りは容易に結晶化する能力を反映して「Ｆｃ」断片と命名される。ペプシン処理はＦ（ａｂ’）$_2$断片を生じ、それは二つの抗原結合部位を持ち、抗原を交差結合することができる。

「Ｆｖ」は、完全な抗原認識及び結合部位を含む最小の抗体断片である。この領域は、密接に非共有結合した１本の重鎖と１本の軽鎖の可変領域の二量体からなる。この配置において各ドメインの三つのＣＤＲが相互作用してV_H－V_Lに量体の表面に抗原結合部位を決定する。正しくは、６つのＣＤＲが抗体に対する抗原結合特異性を与える。しかしながら、単一の可変ドメイン（又は抗原に特異的な三つのＣＤＲのみを含んでなるＦｖの半分）でさえ、結合部位全体よりは低い親和性であるが、抗原を認識し結合する能力を持つ。

【００４２】

またＦａｂ断片は、軽鎖の定常ドメイン及び重鎖の第一の定常ドメイン（ＣＨ１）も含む。Ｆａｂ断片は、抗体ヒンジ領域からの一つ又は複数のシステインを含む重鎖ＣＨ１ドメインのカルボキシ末端に幾つかの残基が付加されていることによりＦａｂ’断片と相違する。ここで、Ｆａｂ’-ＳＨは、定常ドメインのシステイン残基が遊離のチオール基を持つＦａｂ’を表す。Ｆ（ａｂ’）$_2$抗体断片は、最初はＦａｂ’断片の対として生成され、それらの間にヒンジシステインを有する。抗体断片の他の化学的結合も知られている。

任意の脊椎動物種からの抗体（免疫グロブリン）の「軽鎖」は、それらの定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、カッパ及びラムダと呼ばれる二つの明らかに異なる型の一方に分類される。

【００４３】

それらの重鎖の定常ドメインのアミノ酸配列によって、免疫グロブリンは異なるクラスに分類できる。免疫グロブリンの五つの主要なクラス：ＩｇＡ、ＩｇＤ、ＩｇＥ、ＩｇＧ及びＩｇＭがあり、それらの幾つかは更にサブクラス（アイソタイプ）、例えばＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、ＩｇＧ４、ＩｇＡ及びＩｇＡ２に分類される。

「一本鎖Ｆｖ」又は「ｓＦｖ」抗体断片は、抗体のV_H及びV_Lドメインを含む抗体断片を含み、これらのドメインは単一のポリペプチド鎖に存在する。好ましくは、Ｆｖポリペプチドは、ｓＦｖが抗原結合とって望ましい構造の形成を可能にする、V_H及びV_Lドメイン間のポリペプチドリンカーを更に含む。ｓＦｖの概説については、The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenburg及びMoore編, Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994)のPluckthunを参照のこと。

【００４４】

「ダイアボディ(diabodies)」という用語は、二つの抗原結合部位を持つ小型の抗体断片を指し、その断片は同じポリペプチド鎖（V_H-V_L）内で軽鎖可変ドメイン（V_L）

に結合した重鎖可変ドメイン（V_H）を含む。同じ鎖の二つのドメイン間に対形成するには短すぎるリンカーを用いることにより、ドメインは強制的に他の鎖の相補的ドメインと対形成して二つの抗原結合部位を生成する。ダイアボディは、例えば、EP404,097；WO93/11161；及びHollinger等，Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 6444-6448 (1993)に、より十分に記載されている。

「単離された」抗体は、その自然環境の成分から同定され分離及び／又は回収されたものである。その自然環境の汚染成分とは、その抗体の診断又は治療への使用を妨害する物質であり、酵素、ホルモン、及び他のタンパク質様又は非タンパク質様溶質が含まれる。好ましい実施態様において、抗体は、（１）ローリー法で測定した場合９５％を越える抗体、最も好ましくは９９重量％を越えるまで、（２）スピニングカップシークエネーターを使用することにより、少なくとも１５残基のＮ末端或いは内部アミノ酸配列を得るのに充分なほど、或いは、（３）クーマシーブルー或いは好ましくは銀染色を用いた非還元或いは還元条件下でのＳＤＳ-ＰＡＧＥによる均一性まで精製される。単離された抗体には、抗体の自然環境の少なくとも一つの成分が存在しないため、組換え細胞内のインサイツの抗体が含まれる。しかしながら、通常は、単離された抗体は少なくとも一つの精製工程により調製される。

【００４５】

「特異的に結合する」抗体、又は特定のポリペプチド又は特定のポリペプチド上のエピトープへ特異的な抗体とは、他のポリペプチド又はポリペプチドエピトープとは実質的に結合せずに、特定のポリペプチド又は特定のポリペプチド上のエピトープへ結合するものである。

「標識」なる語は、ここで用いられる場合、「標識」抗体が生成されるように、抗体に直接又は間接的に抱合している検出可能な化合物又は組成物を意味する。標識は、それ自身検出可能でもよく（例えば、放射性標識又は蛍光標識）、又は酵素標識の場合、検出可能な基質化合物又は組成物の化学変換を触媒してもよい。

【００４６】

「固相」とは、本発明の抗体がそれに付着することのできる非水性マトリクスを意味する。ここに意図する固相の例は、部分的又は全体的に、ガラス（例えば、孔制御ガラス）、多糖類（例えばアガロース）、ポリアクリルアミド、ポリスチレン、ポリビニルアルコール及びシリコーンから形成されたものを含む。或る種の実施態様では、内容に応じて、固相はアッセイプレートのウェルを構成することができ；その他では精製カラム（例えばアフィニティクロマトグラフィーカラム）とすることもできる。また、この用語は、米国特許第4,275,149号に記載されたような、別個の粒子の不連続な固相も包含する。

「リポソーム」は、種々の型の脂質、リン脂質及び／又は界面活性剤からなる小型の小胞であり、哺乳動物への薬物（ＰＲＯポリペプチド又はその抗体など）の輸送に有用である。リポソームの成分は、通常は生体膜の脂質配列に類似する二層形式に配列させる。

「小分子」とは、ここで、約５００ダルトン未満の分子量を持つと定義される。

【００４７】

「免疫関連疾患」という用語は、哺乳動物の免疫系の構成成分が哺乳動物の病的状態を引き起こし、媒介し、或いは寄与する疾患を意味する。また、免疫反応の刺激又は処置が、疾患の進行に対して改善的な効果を有するような疾患をも含む。この用語には、免疫媒介炎症誘発性疾患、非免疫媒介炎症誘発性疾患、感染性疾患、免疫不全性疾患、腫瘍形成等が含まれる。

「Ｔ細胞媒介疾患」という用語は、Ｔ細胞が哺乳動物の病的状態を直接、又は間接に媒介する、或いは寄与する疾患を意味する。Ｔ細胞媒介疾患は、細胞媒介効果、リンホカイン媒介効果等、そして例えば、Ｔ細胞によって分泌されたリンホカインによってＢ細胞が刺激された場合に、Ｂ細胞と関連している効果にさえも関連している。

本明細書で使用する「乾癬」という用語は、肘、膝、頭皮及び体幹に顕著な極限性の、分散性及び集密的、赤味を帯びた、銀色の鱗状の、丘疹の発疹と定義される。

本明細書で使用する「炎症性腸疾患」という用語は、腸管（腸）に炎症を起こし、多く

の場合反復性の腹痛又は下痢を引き起こす炎症性障害と定義される。

【００４８】

「有効量」とは、特に定まった目的を達成することを引き起こすＰＲＯポリペプチド及び／又はアゴニスト／アンタゴニストの濃度又は量である。更には、「治療的有効量」とは、定まった治療的有効量を達成するために効果的なＰＲＯポリペプチド及び／又はアゴニスト／アンタゴニストの濃度又は量である。また、この量は実験的に確定してもよい。

ここで用いられる「細胞障害性薬」は、細胞の機能を阻害又は抑制し、及び／又は細胞破壊を起こす物質を意味する。この用語は、放射性同位元素（例えば、I^{131}、I^{125}、Y^{90}及びRe^{186}）、化学治療薬、及び細菌、真菌、植物又は動物由来の酵素活性毒素又はその断片を意味する。

【００４９】

「化学療法剤」は、癌の治療に有用な化合物である。化学療法剤の例には、アドリアマイシン、ドキソルビシン、エピルビシン、５-フルオロウラシル、シトシンアラビノシド（「Ａｒａ-Ｃ」）、シクロホスファミド、チオテパ、ブスルファン、タキソイド類、例えばパクリタキセル（タキソール(Taxol), Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, NJ）及びドキセタキセル(doxetaxel)（タキソテール(Taxotere), Rhone-Poulenc Rorer, Antony, France）、トキソテール、メトトレキセート、シスプラチン、メルファラン、ビンブラスチン、ブレオマイシン、エトポシド、イホスファミド、マイトマイシンＣ、ミトキサントロン、ビンクリスチン、ビノレルビン(vinorelbine)、カルボプラチン、テニポシド(teniposide)、ダウノマイシン、カルミノマイシン(carminomycin)、アミノプテリン、ダクチノマイシン、マイトマイシン、エスペラミシン(esperamicins)（米国特許第4,675,187号参照）、メルファラン、及び他の関連したナイトロジェンマスタードが含まれる。またこの定義には、腫瘍に対するホルモン作用を調節又は阻害するように働くホルモン剤、例えばタモキシフェン及びオナプリストン(onapristone)も含まれる。

ここで使用される場合の「成長阻害剤」とは、インビトロ又はインビボのいずれかにおいて、特にここで同定された任意の遺伝子を過剰発現する細胞の成長を阻害する化合物又は組成物を指すものである。よって、成長阻害剤とは、Ｓ期におけるそのような遺伝子の過剰発現細胞のパーセンテージを有意に低減させるものである。成長阻害剤の例には、細胞分裂周期の進行をブロックする薬剤（Ｓ期以外の場所において）、例えばＧ１停止及びＭ期停止を誘発する薬剤が含まれる。伝統的なＭ期ブロッカーには、ビンカ（ビンクリスチン及びビンブラスチン）、タキソール、及びトポＩＩインヒビター、例えばドキソルビシン、エピルビシン、ダウノルビシン、エトポシド、及びブレオマイシンが含まれる。Ｇ１を停止させるこれらの薬剤、例えばＤＮＡアルキル化剤、例えばタモキシフェン、プレドニソン、ダカーバジン、メクロレタミン、シスプラチン、メトトレキセート、５-フルオロウラシル、及びａｒａ-ＣがＳ期停止へ波及する。更なる情報は、Murakami等により「細胞分裂周期の調節、オンコジーン、及び抗新生物薬（Cell cycle regulation, oncogene, and antineoplastic drugs）」と題された、癌の分子的基礎（The Molecular Basis of Cancer）、Mendelsohn及びIsrael編、第一章（WB Saunders; Philadelphia, 1995）、特に１３頁に見出すことができる。

【００５０】

「サイトカイン」という用語は、一つの細胞集団から放出されるタンパク質であって、他の細胞に対して細胞間メディエータとして作用するものの包括的な用語である。このようなサイトカインの例としては、リンホカイン、モノカイン、及び伝統的なポリペプチドホルモンを挙げることができる。サイトカインには、成長ホルモン、例えばヒト成長ホルモン、Ｎ-メチオニルヒト成長ホルモン、及びウシ成長ホルモン；副甲状腺ホルモン；チロキシン；インスリン；プロインスリン；リラクシン；プロリラクシン；卵胞刺激ホルモン（ＦＳＨ）のような糖タンパク質ホルモン、副甲状腺刺激ホルモン（ＴＳＨ）、及び黄体形成ホルモン（ＬＨ）；肝臓成長因子；繊維芽細胞成長因子；プロラクチン；胎盤ラクトゲン；腫瘍壊死因子-α及び-β；ミュラー阻害物質；マウス性腺刺激ホルモン関連ペプチド；インヒビン；アクチビン；血管内皮成長因子；インテグリン；トロンボポエチン（

ＴＰＯ）；ＮＧＦ-β等の神経成長因子；血小板成長因子；ＴＧＦ-α及びＴＧＦ-βのような形質転換成長因子（ＴＧＦ）；インスリン様成長因子-Ｉ及び-II；エリスロポイエチン（ＥＰＯ）；オステオインダクティブ因子；インターフェロン-α、-β、及び-γのようなインターフェロン；マクロファージＣＳＦ（Ｍ-ＣＳＦ）のようなコロニー刺激因子（ＣＳＦ）；顆粒球マクロファージＣＳＦ（ＧＭ-ＣＳＦ）及び顆粒球ＣＳＦ（Ｇ-ＣＳＦ）；ＩＬ-１、ＩＬ-１ａ、ＩＬ-２、ＩＬ-３、ＩＬ-４、ＩＬ-５、ＩＬ-６、ＩＬ-７、ＩＬ-８、ＩＬ-９、ＩＬ-１１、ＩＬ-１２のインターロイキン（ＩＬ）；腫瘍壊死因子、例えばＴＮＦ-α又はＴＮＦ-β；及びＬＩＦ及びキットリガンド（ＫＬ）を含む他のポリペプチド因子が含まれる。ここで使用される場合、サイトカインなる用語は天然源由来或いは組換え細胞培養由来のタンパク質及び天然配列サイトカインの生物的に活性な等価物を含む。

ここで用いられる「イムノアドヘシン」なる用語は、異種タンパク質（「アドヘシン」）の結合特異性と免疫グロブリン定常ドメインとを結合した抗体様分子を指す。構造的には、イムノアドヘシンは、所望の結合特異性を持ち、抗体の抗原認識及び結合部位以外である（即ち「異種の」）アミノ酸配列と、免疫グロブリン定常ドメイン配列との融合物を含む。イムノアドヘシン分子のアドヘシン部分は、典型的には少なくともレセプター又はリガンドの結合部位を含む隣接アミノ酸配列である。イムノアドヘシンの免疫グロブリン定常ドメイン配列は、ＩｇＧ-１、ＩｇＧ-２、ＩｇＧ-３又はＩｇＧ-４サブタイプ、ＩｇＡ（ＩｇＡ-１及びＩｇＡ-２を含む）、ＩｇＥ、ＩｇＤ又はＩｇＭなどの任意の免疫グロブリンから得ることができる。

ここで用いられる「炎症性細胞」という用語は、単核細胞、好酸球、マクロファージ、及び多形核球好中球（ＰＭＮ）等の炎症性反応を増強する細胞を意味する。

【００５１】

表1

```
/*
 *
 * C-C increased from 12 to 15
 * Z is average of EQ
 * B is average of ND
 * match with stop is _M; stop-stop = 0; J (joker) match = 0
 */
#define  _M      -8      /* value of a match with a stop */

int      _day[26][26] = {
/*    A  B  C  D  E  F  G  H  I  J  K  L  M  N  O  P  Q  R  S  T  U  V  W  X  Y  Z */
/* A */   { 2, 0,-2, 0, 0,-4, 1,-1,-1, 0,-1,-2,-1, 0,_M, 1, 0,-2, 1, 1, 0, 0,-6, 0,-3, 0},
/* B */   { 0, 3,-4, 3, 2,-5, 0, 1,-2, 0, 0,-3,-2, 2,_M,-1, 1, 0, 0, 0, 0,-2,-5, 0,-3, 1},
/* C */   {-2,-4,15,-5,-5,-4,-3,-3,-2, 0,-5,-6,-5,-4,_M,-3,-5,-4, 0,-2, 0,-2,-8, 0, 0,-5},
/* D */   { 0, 3,-5, 4, 3,-6, 1, 1,-2, 0, 0,-4,-3, 2,_M,-1, 2,-1, 0, 0, 0,-2,-7, 0,-4, 2},
/* E */   { 0, 2,-5, 3, 4,-5, 0, 1,-2, 0, 0,-3,-2, 1,_M,-1, 2,-1, 0, 0, 0,-2,-7, 0,-4, 3},
/* F */   {-4,-5,-4,-6,-5, 9,-5,-2, 1, 0,-5, 2, 0,-4,_M,-5,-5,-4,-3,-3, 0,-1, 0, 0, 7,-5},
/* G */   { 1, 0,-3, 1, 0,-5, 5,-2,-3, 0,-2,-4,-3, 0,_M,-1,-1,-3, 1, 0, 0,-1,-7, 0,-5, 0},
/* H */   {-1, 1,-3, 1, 1,-2,-2, 6,-2, 0, 0,-2,-2, 2,_M, 0, 3, 2,-1,-1, 0,-2,-3, 0, 0, 2},
/* I */   {-1,-2,-2,-2,-2, 1,-3,-2, 5, 0,-2, 2, 2,-2,_M,-2,-2,-2,-1, 0, 0, 4,-5, 0,-1,-2},
/* J */   { 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0,_M, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0},
/* K */   {-1, 0,-5, 0, 0,-5,-2, 0,-2, 0, 5,-3, 0, 1,_M,-1, 1, 3, 0, 0, 0,-2,-3, 0,-4, 0},
/* L */   {-2,-3,-6,-4,-3, 2,-4,-2, 2, 0,-3, 6, 4,-3,_M,-3,-2,-3,-3,-1, 0, 2,-2, 0,-1,-2},
/* M */   {-1,-2,-5,-3,-2, 0,-3,-2, 2, 0, 0, 4, 6,-2,_M,-2,-1, 0,-2,-1, 0, 2,-4, 0,-2,-1},
/* N */   { 0, 2,-4, 2, 1,-4, 0, 2,-2, 0, 1,-3,-2, 2,_M,-1, 1, 0, 1, 0, 0,-2,-4, 0,-2, 1},
/* O */   {_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M},
/* P */   { 1,-1,-3,-1,-1,-5,-1, 0,-2, 0,-1,-3,-2,-1,_M, 6, 0, 0, 1, 0, 0,-1,-6, 0,-5, 0},
/* Q */   { 0, 1,-5, 2, 2,-5,-1, 3,-2, 0, 1,-2,-1, 1,_M, 0, 4, 1,-1,-1, 0,-2,-5, 0,-4, 3},
/* R */   {-2, 0,-4,-1,-1,-4,-3, 2,-2, 0, 3,-3, 0, 0,_M, 0, 1, 6, 0,-1, 0,-2, 2, 0,-4, 0},
/* S */   { 1, 0, 0, 0, 0,-3, 1,-1,-1, 0, 0,-3,-2, 1,_M, 1,-1, 0, 2, 1, 0,-1,-2, 0,-3, 0},
/* T */   { 1, 0,-2, 0, 0,-3, 0,-1, 0, 0, 0,-1,-1, 0,_M, 0,-1,-1, 1, 3, 0, 0,-5, 0,-3, 0},
/* U */   { 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0,_M, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0},
/* V */   { 0,-2,-2,-2,-2,-1,-1,-2, 4, 0,-2, 2, 2,-2,_M,-1,-2,-2,-1, 0, 0, 4,-6, 0,-2,-2},
/* W */   {-6,-5,-8,-7,-7, 0,-7,-3,-5, 0,-3,-2,-4,-4,_M,-6,-5, 2,-2,-5, 0,-6,17, 0, 0,-6},
/* X */   { 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0,_M, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0},
/* Y */   {-3,-3, 0,-4,-4, 7,-5, 0,-1, 0,-4,-1,-2,-2,_M,-5,-4,-4,-3,-3, 0,-2, 0, 0,10,-4},
/* Z */   { 0, 1,-5, 2, 3,-5, 0, 2,-2, 0, 0,-2,-1, 1,_M, 0, 3, 0, 0, 0, 0,-2,-6, 0,-4, 4}
};
```

表１（続き）

```
/*
 */
#include <stdio.h>
#include <ctype.h>

#define  MAXJMP          16      /* max jumps in a diag */
#define  MAXGAP          24      /* don't continue to penalize gaps larger than this */
#define  JMPS            1024    /* max jmps in an path */
#define  MX              4       /* save if there's at least MX-1 bases since last jmp */

#define  DMAT            3       /* value of matching bases */
#define  DMIS            0       /* penalty for mismatched bases */
#define  DINS0           8       /* penalty for a gap */
#define  DINS1           1       /* penalty per base */
#define  PINS0           8       /* penalty for a gap */
#define  PINS1           4       /* penalty per residue */

struct jmp {
        short           n[MAXJMP];      /* size of jmp (neg for dely) */
        unsigned short  x[MAXJMP];      /* base no. of jmp in seq x */
};                                      /* limits seq to 2^16 -1 */

struct diag {
        int             score;          /* score at last jmp */
        long            offset;         /* offset of prev block */
        short           ijmp;           /* current jmp index */
        struct jmp      jp;             /* list of jmps */
};

struct path {
        int     spc;                    /* number of leading spaces */
        short   n[JMPS];/* size of jmp (gap) */
        int     x[JMPS];/* loc of jmp (last elem before gap) */
};

char            *ofile;                 /* output file name */
char            *namex[2];              /* seq names: getseqs() */
char            *prog;                  /* prog name for err msgs */
char            *seqx[2];               /* seqs: getseqs() */
int             dmax;                   /* best diag: nw() */
int             dmax0;                  /* final diag */
int             dna;                    /* set if dna: main() */
int             endgaps;                /* set if penalizing end gaps */
int             gapx, gapy;             /* total gaps in seqs */
int             len0, len1;             /* seq lens */
int             ngapx, ngapy;           /* total size of gaps */
int             smax;                   /* max score: nw() */
int             *xbm;                   /* bitmap for matching */
long            offset;                 /* current offset in jmp file */
struct  diag    *dx;                    /* holds diagonals */
struct  path    pp[2];                  /* holds path for seqs */

char            *calloc(), *malloc(), *index(), *strcpy();
char            *getseq(), *g_calloc();
```

表１（続き）

```
/* Needleman-Wunsch alignment program
 *
 * usage: progs file1 file2
 *   where file1 and file2 are two dna or two protein sequences.
 *   The sequences can be in upper- or lower-case an may contain ambiguity
 *   Any lines beginning with ';', '>' or '<' are ignored
 *   Max file length is 65535 (limited by unsigned short x in the jmp struct)
 *   A sequence with 1/3 or more of its elements ACGTU is assumed to be DNA
 *   Output is in the file "align.out"
 *
 * The program may create a tmp file in /tmp to hold info about traceback.
 * Original version developed under BSD 4.3 on a vax 8650
 */
#include "nw.h"
#include "day.h"

static  _dbval[26] = {
        1,14,2,13,0,0,4,11,0,0,12,0,3,15,0,0,0,5,6,8,8,7,9,0,10,0
};

static  _pbval[26] = {
        1, 2|(1<<('D'-'A'))|(1<<('N'-'A')), 4, 8, 16, 32, 64,
        128, 256, 0xFFFFFFF, 1<<10, 1<<11, 1<<12, 1<<13, 1<<14,
        1<<15, 1<<16, 1<<17, 1<<18, 1<<19, 1<<20, 1<<21, 1<<22,
        1<<23, 1<<24, 1<<25|(1<<('E'-'A'))|(1<<('Q'-'A'))
};

main(ac, av)
        main
        int     ac;
        char    *av[ ];
{
        prog = av[0];
        if (ac != 3) {
                fprintf(stderr,"usage: %s file1 file2\n", prog);
                fprintf(stderr,"where file1 and file2 are two dna or two protein sequences.\n");
                fprintf(stderr,"The sequences can be in upper- or lower-case\n");
                fprintf(stderr,"Any lines beginning with ';' or '<' are ignored\n");
                fprintf(stderr,"Output is in the file \"align.out\"\n");
                exit(1);
        }
        namex[0] = av[1];
        namex[1] = av[2];
        seqx[0] = getseq(namex[0], &len0);
        seqx[1] = getseq(namex[1], &len1);
        xbm = (dna)? _dbval : _pbval;

        endgaps = 0;                    /* 1 to penalize endgaps */
        ofile = "align.out";            /* output file */

        nw();                   /* fill in the matrix, get the possible jmps */
        readjmps();             /* get the actual jmps */
        print();                /* print stats, alignment */

        cleanup(0);             /* unlink any tmp files */
}
```

表１（続き）

```
/* do the alignment, return best score: main()
 * dna: values in Fitch and Smith, PNAS, 80, 1382-1386, 1983
 * pro: PAM 250 values
 * When scores are equal, we prefer mismatches to any gap, prefer
 * a new gap to extending an ongoing gap, and prefer a gap in seqx
 * to a gap in seq y.
 */
nw()
        nw
{
        char            *px, *py;       /* seqs and ptrs */
        int             *ndely, *dely;  /* keep track of dely */
        int             ndelx, delx;    /* keep track of delx */
        int             *tmp;           /* for swapping row0, row1 */
        int             mis;            /* score for each type */
        int             ins0, ins1;     /* insertion penalties */
        register        id;             /* diagonal index */
        register        ij;             /* jmp index */
        register        *col0, *col1;   /* score for curr, last row */
        register        xx, yy;         /* index into seqs */

        dx = (struct diag *)g_calloc("to get diags", len0+len1+1, sizeof(struct diag));

        ndely = (int *)g_calloc("to get ndely", len1+1, sizeof(int));
        dely = (int *)g_calloc("to get dely", len1+1, sizeof(int));
        col0 = (int *)g_calloc("to get col0", len1+1, sizeof(int));
        col1 = (int *)g_calloc("to get col1", len1+1, sizeof(int));
        ins0 = (dna)? DINS0 : PINS0;
        ins1 = (dna)? DINS1 : PINS1;

        smax = -10000;
        if (endgaps) {
                for (col0[0] = dely[0] = -ins0, yy = 1; yy <= len1; yy++) {
                        col0[yy] = dely[yy] = col0[yy-1] - ins1;
                        ndely[yy] = yy;
                }
                col0[0] = 0;            /* Waterman Bull Math Biol 84 */
        }
        else
                for (yy = 1; yy <= len1; yy++)
                        dely[yy] = -ins0;

        /* fill in match matrix
         */
        for (px = seqx[0], xx = 1; xx <= len0; px++, xx++) {
                /* initialize first entry in col
                 */
                if (endgaps) {
                        if (xx == 1)
                                col1[0] = delx = -(ins0+ins1);
                        else
                                col1[0] = delx = col0[0] - ins1;
                        ndelx = xx;
                }
                else {
                        col1[0] = 0;
                        delx = -ins0;
                        ndelx = 0;
                }
```

表１（続き）

...nw

```
for (py = seqx[1], yy = 1; yy <= len1; py++, yy++) {
        mis = col0[yy-1];
        if (dna)
                mis += (xbm[*px-'A']&xbm[*py-'A'])? DMAT : DMIS;
        else
                mis += _day[*px-'A'][*py-'A'];

        /* update penalty for del in x seq;
         * favor new del over ongong del
         * ignore MAXGAP if weighting endgaps
         */
        if (endgaps || ndely[yy] < MAXGAP) {
                if (col0[yy] - ins0 >= dely[yy]) {
                        dely[yy] = col0[yy] - (ins0+ins1);
                        ndely[yy] = 1;
                } else {
                        dely[yy] -= ins1;
                        ndely[yy]++;
                }
        } else {
                if (col0[yy] - (ins0+ins1) >= dely[yy]) {
                        dely[yy] = col0[yy] - (ins0+ins1);
                        ndely[yy] = 1;
                } else
                        ndely[yy]++;
        }

        /* update penalty for del in y seq;
         * favor new del over ongong del
         */
        if (endgaps || ndelx < MAXGAP) {
                if (col1[yy-1] - ins0 >= delx) {
                        delx = col1[yy-1] - (ins0+ins1);
                        ndelx = 1;
                } else {
                        delx -= ins1;
                        ndelx++;
                }
        } else {
                if (col1[yy-1] - (ins0+ins1) >= delx) {
                        delx = col1[yy-1] - (ins0+ins1);
                        ndelx = 1;
                } else
                        ndelx++;
        }

        /* pick the maximum score; we're favoring
         * mis over any del and delx over dely
         */
```

表１（続き）

...nw

```
                id = xx - yy + len1 - 1;
                if (mis >= delx && mis >= dely[yy])
                        col1[yy] = mis;
                else if (delx >= dely[yy]) {
                        col1[yy] = delx;
                        ij = dx[id].ijmp;
                        if (dx[id].jp.n[0] && (!dna || (ndelx >= MAXJMP
                        && xx > dx[id].jp.x[ij]+MX) || mis > dx[id].score+DINS0)) {
                                dx[id].ijmp++;
                                if (++ij >= MAXJMP) {
                                        writejmps(id);
                                        ij = dx[id].ijmp = 0;
                                        dx[id].offset = offset;
                                        offset += sizeof(struct jmp) + sizeof(offset);
                                }
                        }
                        dx[id].jp.n[ij] = ndelx;
                        dx[id].jp.x[ij] = xx;
                        dx[id].score = delx;
                }
                else {
                        col1[yy] = dely[yy];
                        ij = dx[id].ijmp;
if (dx[id].jp.n[0] && (!dna || (ndely[yy] >= MAXJMP
                        && xx > dx[id].jp.x[ij]+MX) || mis > dx[id].score+DINS0)) {
                                dx[id].ijmp++;
                                if (++ij >= MAXJMP) {
                                        writejmps(id);
                                        ij = dx[id].ijmp = 0;
                                        dx[id].offset = offset;
                                        offset += sizeof(struct jmp) + sizeof(offset);
                                }
                        }
                        dx[id].jp.n[ij] = -ndely[yy];
                        dx[id].jp.x[ij] = xx;
                        dx[id].score = dely[yy];
                }
                if (xx == len0 && yy < len1) {
                        /* last col
                         */
                        if (endgaps)
                                col1[yy] -= ins0+ins1*(len1-yy);
                        if (col1[yy] > smax) {
                                smax = col1[yy];
                                dmax = id;
                        }
                }
        }
        if (endgaps && xx < len0)
                col1[yy-1] -= ins0+ins1*(len0-xx);
        if (col1[yy-1] > smax) {
                smax = col1[yy-1];
                dmax = id;
        }
        tmp = col0; col0 = col1; col1 = tmp;
}
(void) free((char *)ndely);
(void) free((char *)dely);
(void) free((char *)col0);
(void) free((char *)col1);                      }
```

表１（続き）

```
/*
 *
 * print() -- only routine visible outside this module
 *
 * static:
 * getmat() -- trace back best path, count matches: print()
 * pr_align() -- print alignment of described in array p[ ]: print()
 * dumpblock() -- dump a block of lines with numbers, stars: pr_align()
 * nums() -- put out a number line: dumpblock()
 * putline() -- put out a line (name, [num], seq, [num]): dumpblock()
 * stars() - -put a line of stars: dumpblock()
 * stripname() -- strip any path and prefix from a seqname
 */

#include "nw.h"

#define SPC     3
#define P_LINE  256     /* maximum output line */
#define P_SPC   3       /* space between name or num and seq */

extern  _day[26][26];
int     olen;           /* set output line length */
FILE    *fx;            /* output file */

print()
        print
{
        int     lx, ly, firstgap, lastgap;      /* overlap */

        if ((fx = fopen(ofile, "w")) == 0) {
                fprintf(stderr,"%s: can't write %s\n", prog, ofile);
                cleanup(1);
        }
        fprintf(fx, "<first sequence: %s (length = %d)\n", namex[0], len0);
        fprintf(fx, "<second sequence: %s (length = %d)\n", namex[1], len1);
        olen = 60;
        lx = len0;
        ly = len1;
        firstgap = lastgap = 0;
        if (dmax < len1 - 1) {          /* leading gap in x */
                pp[0].spc = firstgap = len1 - dmax - 1;
                ly -= pp[0].spc;
        }
        else if (dmax > len1 - 1) {     /* leading gap in y */
                pp[1].spc = firstgap = dmax - (len1 - 1);
                lx -= pp[1].spc;
        }
        if (dmax0 < len0 - 1) {         /* trailing gap in x */
                lastgap = len0 - dmax0 -1;
                lx -= lastgap;
        }
        else if (dmax0 > len0 - 1) {    /* trailing gap in y */
                lastgap = dmax0 - (len0 - 1);
                ly -= lastgap;
        }
        getmat(lx, ly, firstgap, lastgap);
        pr_align();
}
```

表１（続き）

```
/*
 * trace back the best path, count matches
 */
static
getmat(lx, ly, firstgap, lastgap)                                    getmat
        int     lx, ly;                 /* "core" (minus endgaps) */
        int     firstgap, lastgap;      /* leading trailing overlap */
{
        int             nm, i0, i1, siz0, siz1;
        char            outx[32];
        double          pct;
        register        n0, n1;
        register char   *p0, *p1;

        /* get total matches, score
         */
        i0 = i1 = siz0 = siz1 = 0;
        p0 = seqx[0] + pp[1].spc;
        p1 = seqx[1] + pp[0].spc;
        n0 = pp[1].spc + 1;
        n1 = pp[0].spc + 1;

        nm = 0;
        while ( *p0 && *p1 ) {
                if (siz0) {
                        p1++;
                        n1++;
                        siz0--;
                }
                else if (siz1) {
                        p0++;
                        n0++;
                        siz1--;
                }
                else {
                        if (xbm[*p0-'A']&xbm[*p1-'A'])
                                nm++;
                        if (n0++ == pp[0].x[i0])
                                siz0 = pp[0].n[i0++];
                        if (n1++ == pp[1].x[i1])
                                siz1 = pp[1].n[i1++];
                        p0++;
                        p1++;
                }
        }

        /* pct homology:
         * if penalizing endgaps, base is the shorter seq
         * else, knock off overhangs and take shorter core
         */
        if (endgaps)
                lx = (len0 < len1)? len0 : len1;
        else
                lx = (lx < ly)? lx : ly;
        pct = 100.*(double)nm/(double)lx;
        fprintf(fx, "\n");
        fprintf(fx, "<%d match%s in an overlap of %d: %.2f percent similarity\n",
                nm, (nm == 1)? "" : "es", lx, pct);
```

表１（続き）

```
        fprintf(fx, "<gaps in first sequence: %d", gapx);                    ...getmat
        if (gapx) {
                (void) sprintf(outx, " (%d %s%s)",
                        ngapx, (dna)? "base":"residue", (ngapx == 1)? "":"s");
                fprintf(fx,"%s", outx);

        fprintf(fx, ", gaps in second sequence: %d", gapy);
        if (gapy) {
                (void) sprintf(outx, " (%d %s%s)",
                        ngapy, (dna)? "base":"residue", (ngapy == 1)? "":"s");
                fprintf(fx,"%s", outx);
        }
        if (dna)
                fprintf(fx,
                "\n<score: %d (match = %d, mismatch = %d, gap penalty = %d + %d per base)\n",
                smax, DMAT, DMIS, DINS0, DINS1);
        else
                fprintf(fx,
                "\n<score: %d (Dayhoff PAM 250 matrix, gap penalty = %d + %d per residue)\n",
                smax, PINS0, PINS1);
        if (endgaps)
                fprintf(fx,
                "<endgaps penalized. left endgap: %d %s%s, right endgap: %d %s%s\n",
                firstgap, (dna)? "base" : "residue", (firstgap == 1)? "" : "s",
                lastgap, (dna)? "base" : "residue", (lastgap == 1)? "" : "s");
        else
                fprintf(fx, "<endgaps not penalized\n");
}
 static          nm;             /* matches in core -- for checking */
 static          lmax;           /* lengths of stripped file names */
 static          ij[2];          /* jmp index for a path */
 static          nc[2];          /* number at start of current line */
 static          ni[2];          /* current elem number -- for gapping */
 static          siz[2];
 static char     *ps[2];         /* ptr to current element */
 static char     *po[2];         /* ptr to next output char slot */
 static char     out[2][P_LINE]; /* output line */
 static char     star[P_LINE];   /* set by stars() */

/*
 * print alignment of described in struct path pp[ ]
 */
static
pr_align()                                                          pr_align
{
        int             nn;     /* char count */
        int             more;
        register        i;

        for (i =  0, lmax = 0; i < 2; i++) {
                nn = stripname(namex[i]);
                if (nn > lmax)
                        lmax = nn;

                nc[i] = 1;
                ni[i] = 1;
                siz[i] = ij[i] = 0;
                ps[i] = seqx[i];
                po[i] = out[i];                         }
```

表１（続き）

...pr_align

```
        for (nn = nm = 0, more = 1; more; ) {
                for (i = more = 0; i < 2; i++) {
                        /*
                         * do we have more of this sequence?
                         */
                        if (!*ps[i])
                                continue;

                        more++;

                        if (pp[i].spc) {        /* leading space */
                                *po[i]++ = ' ';
                                pp[i].spc--;
                        }
                        else if (siz[i]) {      /* in a gap */
                                *po[i]++ = '-';
                                siz[i]--;
                        }
                        else {                  /* we're putting a seq element
                                                 */
                                *po[i] = *ps[i];
                                if (islower(*ps[i]))
                                        *ps[i] = toupper(*ps[i]);
                                po[i]++;
                                ps[i]++;

                                /*
                                 * are we at next gap for this seq?
                                 */
                                if (ni[i] == pp[i].x[ij[i]]) {
                                        /*
                                         * we need to merge all gaps
                                         * at this location
                                         */
                                        siz[i] = pp[i].n[ij[i]++];
                                        while (ni[i] == pp[i].x[ij[i]])
                                                siz[i] += pp[i].n[ij[i]++];
                                }
                                ni[i]++;
                        }
                }
                if (++nn == olen || !more && nn) {
                        dumpblock();
                        for (i = 0; i < 2; i++)
                                po[i] = out[i];
                        nn = 0;
                }
        }
}

/*
 * dump a block of lines, including numbers, stars: pr_align()
 */
static
dumpblock()
```

dumpblock

```
{
        register  i;
        for (i = 0; i < 2; i++)
                *po[i]-- = '\0';
```

表１（続き）

...dumpblock

```
        (void) putc('\n', fx);
        for (i = 0; i < 2; i++) {
                if (*out[i] && (*out[i] != ' ' || *(po[i]) != ' ')) {
                        if (i == 0)
                                nums(i);
                        if (i == 0 && *out[1])
                                stars();
                        putline(i);
                        if (i == 0 && *out[1])
                                fprintf(fx, star);
                        if (i == 1)
                                nums(i);
                }
        }
}

/*
 * put out a number line: dumpblock()
 */
static
```

nums

```
nums(ix)
        int     ix;     /* index in out[ ] holding seq line */
{
        char            nline[P_LINE];
        register        i, j;
        register char   *pn, *px, *py;

        for (pn = nline, i = 0; i < lmax+P_SPC; i++, pn++)
                *pn = ' ';
        for (i = nc[ix], py = out[ix]; *py; py++, pn++) {
                if (*py == ' ' || *py == '-')
                        *pn = ' ';
                else {
                        if (i%10 == 0 || (i == 1 && nc[ix] != 1)) {
                                j = (i < 0)? -i : i;
                                for (px = pn; j; j /= 10, px--)
                                        *px = j%10 + '0';
                                if (i < 0)
                                        *px = '-';
                        }
                        else
                                *pn = ' ';
                        i++;
                }
        }
        *pn = '\0';
        nc[ix] = i;
        for (pn = nline; *pn; pn++)
                (void) putc(*pn, fx);
        (void) putc('\n', fx);
}

/*
 * put out a line (name, [num], seq, [num]): dumpblock()
 */
static
```

putline

```
putline(ix)
        int     ix;                     {
```

表１（続き）

...putline

```
        int             i;
        register char   *px;

        for (px = namex[ix], i = 0; *px && *px != ':'; px++, i++)
                (void) putc(*px, fx);
        for (; i < lmax+P_SPC; i++)
                (void) putc(' ', fx);

        /* these count from 1:
         * ni[ ] is current element (from 1)
         * nc[ ] is number at start of current line
         */
        for (px = out[ix]; *px; px++)
                (void) putc(*px&0x7F, fx);
        (void) putc('\n', fx);
}


/*
 * put a line of stars (seqs always in out[0], out[1]): dumpblock()
 */
static
stars()
        stars
{
        int             i;
        register char   *p0, *p1, cx, *px;

        if (!*out[0] || (*out[0] == ' ' && *(po[0]) == ' ') ||
           !*out[1] || (*out[1] == ' ' && *(po[1]) == ' '))
                return;
        px = star;
        for (i = lmax+P_SPC; i; i--)
                *px++ = ' ';

        for (p0 = out[0], p1 = out[1]; *p0 && *p1; p0++, p1++) {
                if (isalpha(*p0) && isalpha(*p1)) {

                        if (xbm[*p0-'A']&xbm[*p1-'A']) {
                                cx = '*';
                                nm++;
                        }
                        else if (!dna && _day[*p0-'A'][*p1-'A'] > 0)
                                cx = '.';
                        else
                                cx = ' ';
                }
                else
                        cx = ' ';
                *px++ = cx;
        }
        *px++ = '\n';
        *px = '\0';
}
```

表１（続き）

```
/*
 * strip path or prefix from pn, return len: pr_align()
 */
static
stripname(pn)
        stripname
        char    *pn;    /* file name (may be path) */
{
        register char   *px, *py;

        py = 0;
        for (px = pn; *px; px++)
                if (*px == '/')
                        py = px + 1;
        if (py)
                (void) strcpy(pn, py);
        return(strlen(pn));

}
```

表１（続き）

```
/*
 * cleanup() -- cleanup any tmp file
 * getseq() -- read in seq, set dna, len, maxlen
 * g_calloc() -- calloc() with error checkin
 * readjmps() -- get the good jmps, from tmp file if necessary
 * writejmps() -- write a filled array of jmps to a tmp file: nw()
 */
#include "nw.h"
#include <sys/file.h>

char    *jname = "/tmp/homgXXXXXX";             /* tmp file for jmps */
FILE    *fj;

int     cleanup();                              /* cleanup tmp file */
long    lseek();

/*
 * remove any tmp file if we blow
 */
cleanup(i)                                                          cleanup
        int     i;
{
        if (fj)
                (void) unlink(jname);
        exit(i);
}

/*
 * read, return ptr to seq, set dna, len, maxlen
 * skip lines starting with ';', '<', or '>'
 * seq in upper or lower case
 */
char    *
getseq(file, len)                                                   getseq
        char    *file;  /* file name */
        int     *len;   /* seq len */
{
        char            line[1024], *pseq;
        register char   *px, *py;
        int             natgc, tlen;
        FILE            *fp;

        if ((fp = fopen(file,"r")) == 0) {
                fprintf(stderr,"%s: can't read %s\n", prog, file);
                exit(1);
        }
        tlen = natgc = 0;
        while (fgets(line, 1024, fp)) {
                if (*line == ';' || *line == '<' || *line == '>')
                        continue;
                for (px = line; *px != '\n'; px++)
                        if (isupper(*px) || islower(*px))
                                tlen++;
        }
        if ((pseq = malloc((unsigned)(tlen+6))) == 0) {
                fprintf(stderr,"%s: malloc() failed to get %d bytes for %s\n", prog, tlen+6, file);
                exit(1);
        }
        pseq[0] = pseq[1] = pseq[2] = pseq[3] = '\0';
```

表１（続き）

...getseq

```
        py = pseq + 4;
        *len = tlen;
        rewind(fp);

        while (fgets(line, 1024, fp)) {
                if (*line == ';' || *line == '<' || *line == '>')
                        continue;
                for (px = line; *px != '\n'; px++) {
                        if (isupper(*px))
                                *py++ = *px;
                        else if (islower(*px))
                                *py++ = toupper(*px);
                        if (index("ATGCU",*(py-1)))
                                natgc++;
                }
        }
        *py++ = '\0';
        *py = '\0';
        (void) fclose(fp);
        dna = natgc > (tlen/3);
        return(pseq+4);
}

char    *
g_calloc(msg, nx, sz)
```

g_calloc

```
        char    *msg;           /* program, calling routine */
        int     nx, sz;         /* number and size of elements */
{
        char            *px, *calloc();

        if ((px = calloc((unsigned)nx, (unsigned)sz)) == 0) {
                if (*msg) {
                        fprintf(stderr, "%s: g_calloc() failed %s (n=%d, sz=%d)\n", prog, msg, nx, sz);
                        exit(1);
                }
        }
        return(px);
}

/*
 * get final jmps from dx[ ] or tmp file, set pp[ ], reset dmax: main()
 */
readjmps()
```

readjmps

```
{
        int             fd = -1;
        int             siz, i0, i1;
        register  i, j, xx;

        if (fj) {
                (void) fclose(fj);
                if ((fd = open(jname, O_RDONLY, 0)) < 0) {
                        fprintf(stderr, "%s: can't open() %s\n", prog, jname);
                        cleanup(1);
                }
        }
        for (i = i0 = i1 = 0, dmax0 = dmax, xx = len0; ; i++) {
                while (1) {
                        for (j = dx[dmax].ijmp; j >= 0 && dx[dmax].jp.x[j] >= xx; j--)
                                ;
```

表１（続き）

...readjmps

```
                if (j < 0 && dx[dmax].offset && fj) {
                        (void) lseek(fd, dx[dmax].offset, 0);
                        (void) read(fd, (char *)&dx[dmax].jp, sizeof(struct jmp));
                        (void) read(fd, (char *)&dx[dmax].offset, sizeof(dx[dmax].offset));
                        dx[dmax].ijmp = MAXJMP-1;
                }
                else
                        break;
        }
        if (i >= JMPS) {
                fprintf(stderr, "%s: too many gaps in alignment\n", prog);
                cleanup(1);
        }
        if (j >= 0) {
                siz = dx[dmax].jp.n[j];
                xx = dx[dmax].jp.x[j];
                dmax += siz;
                if (siz < 0) {                  /* gap in second seq */
                        pp[1].n[i1] = -siz;
                        xx += siz;
                        /* id = xx - yy + len1 - 1
                         */
                        pp[1].x[i1] = xx - dmax + len1 - 1;
                        gapy++;
                        ngapy -= siz;
/* ignore MAXGAP when doing endgaps */
                        siz = (-siz < MAXGAP || endgaps)? -siz : MAXGAP;
                        i1++;
                }
                else if (siz > 0) {     /* gap in first seq */
                        pp[0].n[i0] = siz;
                        pp[0].x[i0] = xx;
                        gapx++;
                        ngapx += siz;
/* ignore MAXGAP when doing endgaps */
                        siz = (siz < MAXGAP || endgaps)? siz : MAXGAP;
                        i0++;
                }
        }
        else
                break;
}

/* reverse the order of jmps
 */
for (j = 0, i0--; j < i0; j++, i0--) {
        i = pp[0].n[j]; pp[0].n[j] = pp[0].n[i0]; pp[0].n[i0] = i;
        i = pp[0].x[j]; pp[0].x[j] = pp[0].x[i0]; pp[0].x[i0] = i;
}
for (j = 0, i1--; j < i1; j++, i1--) {
        i = pp[1].n[j]; pp[1].n[j] = pp[1].n[i1]; pp[1].n[i1] = i;
        i = pp[1].x[j]; pp[1].x[j] = pp[1].x[i1]; pp[1].x[i1] = i;
}
if (fd >= 0)
        (void) close(fd);
if (fj) {
        (void) unlink(jname);
        fj = 0;
        offset = 0;
}                                       }
```

表１（続き）

```
/*
 * write a filled jmp struct offset of the prev one (if any): nw()
 */
writejmps(ix)
        writejmps
        int     ix;
{
        char    *mktemp();

        if (!fj) {
                if (mktemp(jname) < 0) {
                        fprintf(stderr, "%s: can't mktemp() %s\n", prog, jname);
                        cleanup(1);
                }
                if ((fj = fopen(jname, "w")) == 0) {
                        fprintf(stderr, "%s: can't write %s\n", prog, jname);
                        exit(1);
                }
        }
        (void) fwrite((char *)&dx[ix].jp, sizeof(struct jmp), 1, fj);
        (void) fwrite((char *)&dx[ix].offset, sizeof(dx[ix].offset), 1, fj);
        }
```

【００５２】

表2

PRO	XXXXXXXXXXXXXXX	(長さ = 15 アミノ酸)
比較タンパク質	XXXXXYYYYYYY	(長さ = 12 アミノ酸)

% アミノ酸配列同一性 =

（ALIGN-2 によって決定した二つのポリペプチド配列間で等しく一致するアミノ酸残基の数）
÷（PRO ポリペプチドの全アミノ酸残基の数）＝
5 ÷ 15 = 33.3%

表3

PRO	XXXXXXXXXX	(長さ = 10 アミノ酸)
比較タンパク質	XXXXXYYYYYYZZYZ	(長さ = 15 アミノ酸)

% アミノ酸配列同一性 =

（ALIGN-2 によって決定した二つのポリペプチド配列間で等しく一致するアミノ酸残基の数）
÷（PRO ポリペプチドの全アミノ酸残基の数）＝
5 ÷ 10 = 50%

表4

PRO-DNA	**NNNNNNNNNNNNNN**	**(長さ = 14 ヌクレオチド)**
比較 DNA	**NNNNNNLLLLLLLLL**	**(長さ = 16 ヌクレオチド)**

% 核酸配列同一性 =

(ALIGN-2 によって決定した二つの核酸配列間で等しく一致するヌクレオチドの数)
÷ (PRO-DNA 核酸配列の全ヌクレオチドの数) =
6 ÷ 14 = 42.9%

表5

PRO-DNA	**NNNNNNNNNNN**	**(長さ = 12 ヌクレオチド)**
比較 DNA	**NNNNLLLVV**	**(長さ = 9 ヌクレオチド)**

% 核酸配列同一性 =

(ALIGN-2 によって決定した二つの核酸配列間で等しく一致するヌクレオチドの数)
÷ (PRO-DNA 核酸配列の全ヌクレオチドの数) =
4 ÷ 12 = 33.3%

【００５３】
ＩＩ．本発明の組成物と方法
Ａ．完全長ＰＲＯポリペプチド
本発明は、本出願でＰＲＯポリペプチドと呼ばれるポリペプチドをコードする新規に同定され単離された核酸配列を提供する。特に下記の実施例で更に詳細に説明するように、種々のＰＲＯポリペプチドをコードするｃＤＮＡが同定され単離された。しかしながら、単純化のために、本明細書において、ここに開示した完全長天然核酸分子にコードされるタンパク質並びに上記のＰＲＯの定義に含まれる更なる天然相同体及び変異体は、それらの起源又は調製形式に関わらず、「ＰＲＯ／番号」で呼称する。
下記の実施例に開示するように、種々のｃＤＮＡクローンの配列が開示されている。予測されるアミノ酸配列は、ヌクレオチド配列から常套的技量を用いて決定できる。ここに記載したＰＲＯポリペプチド及びコード化核酸について、本出願人は、現時点で入手可能な配列情報と最も良く一致するリーディングフレームであると考えられるものを同定した。

【００５４】
Ｂ．ＰＲＯポリペプチド変異体
ここに記載した完全長天然配列ＰＲＯポリペプチドに加えて、ＰＲＯ変異体も調製できると考えられる。ＰＲＯ変異体は、ＰＲＯＤＮＡに適当なヌクレオチド変化を導入することにより、及び／或いは所望のＰＲＯポリペプチドを合成することにより調製できる。当業者は、グリコシル化部位の数又は位置の変化或いは膜固着特性の変化などのアミノ酸変化がＰＲＯポリペプチドの翻訳後プロセスを変えうることを理解するであろう。

天然完全長配列ＰＲＯ又はここに記載したＰＲＯポリペプチドの種々のドメインにおける変異は、例えば、米国特許第5,364,934号に記載されている保存的及び非保存的変異についての任意の技術及び指針を用いてなすことができる。変異は、結果として天然配列ＰＲＯと比較してＰＲＯポリペプチドのアミノ酸配列が変化するＰＲＯポリペプチドをコードする一又は複数のコドンの置換、欠失又は挿入であってよい。場合によっては、変異は少なくとも一のアミノ酸のＰＲＯポリペプチドの一又は複数のドメインの任意の他のアミノ酸による置換である。いずれのアミノ酸残基が所望の活性に悪影響を与えることなく挿入、置換又は欠失されるかの指針は、ＰＲＯポリペプチドの配列を相同性の知られたタンパク質分子の配列と比較し、相同性の高い領域内でなされるアミノ酸配列変化を最小にすることによって見出される。アミノ酸置換は、一のアミノ酸の類似した構造及び／又は化学特性を持つ他のアミノ酸での置換、例えばロイシンのセリンでの置換、即ち保存的アミノ酸置換の結果とすることができる。挿入及び欠失は、場合によっては１から５のアミノ酸の範囲内とすることができる。許容される変異は、配列においてアミノ酸の挿入、欠失又は置換を系統的に作製し、得られた変異体を完全長又は成熟天然タンパク質によって提示された活性について試験することにより決定される。

【００５５】

ＰＲＯポリペプチド断片がここに提供される。このような断片は、例えば、完全長天然タンパク質と比較した際に、Ｎ-末端又はＣ-末端で切断されてもよく、又は内部残基を欠いていてもよい。或る種の断片は、ＰＲＯポリペプチドの所望の生物学的活性に必須ではないアミノ酸残基を欠いている。

ＰＲＯ断片は、多くの従来技術の任意のものによって調製してよい。所望のペプチド断片は化学合成してもよい。代替的方法は、酵素的消化、例えば特定のアミノ酸残基によって決定される部位のタンパク質を切断することが知られた酵素でタンパク質を処理することにより、或いは適当な制限酵素でＤＮＡを消化して所望の断片を単離することによるＰＲＯ断片の生成を含む。更に他の好適な技術は、ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）により、所望のポリペプチド断片をコードするＤＮＡ断片を単離し増幅することを含む。ＤＮＡ断片の所望の末端を決定するオリゴヌクレオチドは、ＰＣＲの５’及び３’プライマーで用いられる。好ましくは、ＰＲＯポリペプチド断片は、ここに開示した天然ＰＲＯポリペプチドと少なくとも一の生物学的及び／又は免疫学的活性を共有する。

特別の実施態様では、対象とする保存的置換を、好ましい置換と題して表６に示す。このような置換が生物学的活性の変化をもたらす場合、表６に例示的置換と名前を付けた又は以下にアミノ酸分類で更に記載するように、より実質的な変化が導入され生成物がスクリーニングされる。

【００５６】

表6

元の残基	例示的置換	好ましい置換
Ala (A)	val; leu; ile	val
Arg (R)	lys; gln; asn	lys
Asn (N)	gln; his; lys; arg	gln
Asp (D)	glu	glu
Cys (C)	ser	ser
Gln (Q)	asn	asn
Glu (E)	asp	asp
Gly (G)	pro; ala	ala
His (H)	asn; gln; lys; arg	arg
Ile (I)	leu; val; met; ala; phe; ノルロイシン	leu
Leu (L)	ノルロイシン; ile; val; met; ala; phe	ile
Lys (K)	arg; gln; asn	arg
Met (M)	leu; phe; ile	leu
Phe (F)	leu; val; ile; ala; tyr	leu
Pro (P)	ala	ala
Ser (S)	thr	thr
Thr (T)	ser	ser
Trp (W)	tyr; phe	tyr
Tyr (Y)	trp; phe; thr; ser	phe
Val (V)	ile; leu; met; phe; ala; ノルロイシン	leu

【００５７】

ＰＲＯポリペプチドの機能及び免疫学的同一性の実質的修飾は、（ａ）置換領域のポリペプチド骨格の構造、例えばシート又は螺旋配置、（ｂ）標的部位の電荷又は疎水性、又は（ｃ）側鎖の嵩を維持しながら、それらの効果において実質的に異なる置換基を選択することにより達成される。天然に生じる残基は共通の側鎖特性に基づいてグループに分けることができる：

（１）疎水性：ノルロイシン，met，ala，val，leu，ile；

（２）中性の親水性：cys，ser，thr；

（３）酸性：asp，glu；

（４）塩基性：asn，gln，his，lys，arg；

（５）鎖配向に影響する残基：gly，pro；及び

（６）芳香族：trp，tyr，phe。

【００５８】

非保存的置換は、これらの分類の一つのメンバーを他の分類に交換することを必要とするであろう。また、そのように置換された残基は、保存的置換部位、好ましくは残された（非保存）部位に導入されうる。

変異は、オリゴヌクレオチド媒介（部位特異的）突然変異誘発、アラニンスキャンニング、及びＰＣＲ突然変異誘発といったこの分野で知られた方法を用いてなすことができる。部位特異的突然変異誘発［Carter等，Nucl. Acids Res.，13:4331 (1986)；Zoller等，Nucl. Acids Res.，10:6487 (1987)］、カセット突然変異誘発［Wells等，Gene，34:315 (1985)］、制限的選択突然変異誘発［Wells等，Philos. Trans. R. Soc. London SerA，317:415 (1986)］又は他の知られた技術をクローニングしたＤＮＡに実施してＰＲＯ変異体ＤＮＡを作製することもできる。

【００５９】

また、隣接配列に沿って一つ又は複数のアミノ酸を同定するのにスキャンニングアミノ酸分析を用いることができる。好ましいスキャンニングアミノ酸は比較的小さく、中性のアミノ酸である。そのようなアミノ酸は、アラニン、グリシン、セリン、及びシステイン

を含む。アラニンは、ベータ炭素を越える側鎖を排除し変異体の主鎖構造を変化させにくいので、この群の中で典型的に好ましいスキャンニングアミノ酸である［Cunningham及びWells, Science, 244:1081-1085 (1989)］。また、アラニンは最もありふれたアミノ酸であるため典型的には好ましい。更に、それは埋もれた及び露出した位置の両方に見られることが多い［Creighton, The Proteins, (W.H. Freeman & Co., N.Y.); Chothia, J. Mol. Biol., 150:1(1976)］。アラニン置換が十分な量の変異体を生じない場合は、アイソテリック(isoteric)アミノ酸を用いることができる。

【００６０】

Ｃ．ＰＲＯの修飾

ＰＲＯポリペプチドの共有結合的修飾は本発明の範囲内に含まれる。共有結合的修飾の一つの型は、ＰＲＯポリペプチドの標的とするアミノ酸残基を、ＰＲＯの選択された側鎖又はＮ又はＣ末端残基と反応できる有機誘導体化試薬と反応させることである。二官能性試薬での誘導体化が、例えばＰＲＯを水不溶性支持体マトリクス或いは抗ＰＲＯ抗体の精製方法、及びその逆で用いるための表面に架橋させるのに有用である。通常用いられる架橋剤は、例えば、１，１-ビス(ジアゾアセチル)-２-フェニルエタン、グルタルアルデヒド、Ｎ-ヒドロキシスクシンイミドエステル、例えば４-アジドサリチル酸とのエステル、３，３’-ジチオビス(スクシンイミジルプロピオネート)等のジスクシンイミジルエステルを含むホモ二官能性イミドエステル、ビス-Ｎ-マレイミド-１，８-オクタン等の二官能性マレイミド、及びメチル-３-[(ｐ-アジドフェニル)-ジチオ］プロピオイミダート等の試薬を含む。

他の修飾は、グルタミニル及びアスパラギニル残基の各々対応するグルタミル及びアスパルチル残基への脱アミノ化、プロリン及びリシンのヒドロキシル化、セリル又はトレオニル残基のヒドロキシル基のリン酸化、リシン、アルギニン、及びヒスチジン側鎖のα-アミノ基のメチル化[T.E. Creighton, Proteins: Structure and Molecular Properties, W.H. Freeman & Co., San Francisco, pp.79-86 (1983)]、Ｎ末端アミンのアセチル化、及び任意のＣ末端カルボキシル基のアミド化を含む。

【００６１】

本発明の範囲内に含まれるＰＲＯポリペプチドの共有結合的修飾の他の型は、ポリペプチドの天然グリコシル化パターンの変更を含む。「天然グリコシル化パターンの変更」とは、天然配列ＰＲＯに見られる一又は複数の炭水化物部分の欠失（存在するグリコシル化部位の除去又は化学的及び／又は酵素的手段によるグリコシル化の削除のいずれかによる）、及び／又は天然配列ＰＲＯに存在しない一又は複数のグリコシル化部位の付加をここでは意味する。更に、この語句は、天然タンパク質のグリコシル化における定性的変化を含み、そこには、存在する種々の炭水化物部分の性質及び特性の変化も含まれる。

ＰＲＯポリペプチドへのグリコシル化部位の付加はアミノ酸配列の変更を伴ってもよい。この変更は、例えば、一又は複数のセリン又はトレオニン残基の天然配列ＰＲＯ（Ｏ-結合グリコシル化部位）への付加、又は置換によってなされてもよい。ＰＲＯアミノ酸配列は、場合によっては、ＤＮＡレベルでの変化、特に、ＰＲＯポリペプチドをコードするＤＮＡを予め選択された塩基において変異させ、所望のアミノ酸を翻訳するようにコドンを生成することによって変更されてもよい。

【００６２】

ＰＲＯポリペプチド上に炭水化物部分の数を増加させる他の手段は、グリコシドのポリペプチドへの化学的又は酵素的結合による。このような方法は、この技術分野において、例えば、1987年9月11日に公開されたWO87/05330、及びAplin及びWriston, CRC Crit. Rev. Biochem., pp. 259-306 (1981)に記載されている。

ＰＲＯポリペプチド上に存在する炭水化物部分の除去は、化学的又は酵素的に、或いはグルコシル化の標的として提示されたアミノ酸残基をコードするコドンの変異的置換によってなすことができる。化学的脱グリコシル化技術は、この分野で知られており、例えば、Hakimuddi等, Arch. Biochem. Biophys., 259:52 (1987)により、及びEdge等, Anal. Biochem., 118: 131 (1981)により記載されている。ポリペプチド上の炭水化物部分の酵素

的切断は、Thotakura等，Meth. Enzymol. 138:350 (1987)に記載されているように、種々のエンド及びエキソグリコシダーゼを用いることにより達成される。

本発明のＰＲＯの共有結合的修飾の他の型は、ＰＲＯポリペプチドの、種々の非タンパク質様ポリマー、例えばポリエチレングリコール（ＰＥＧ）、ポリプロピレングリコール、又はポリオキシアルキレンの一つへの、米国特許第4,640,835号；第4,496,689号；第4,301,144号；第4,670,417号；第4,791,192号又は第4,179,337号に記載された方法での結合を含む。

また、本発明のＰＲＯポリペプチドは、他の異種ポリペプチド又はアミノ酸配列に融合したＰＲＯポリペプチドを含むキメラ分子を形成する方法で修飾してもよい。

【００６３】

一実施態様では、このようなキメラ分子は、抗タグ抗体が選択的に結合できるエピトープを提供するタグポリペプチドとＰＲＯポリペプチドとの融合を含む。エピトープタグは、一般的にはＰＲＯポリペプチドのアミノ又はカルボキシル末端に位置する。このようなＰＲＯポリペプチドのエピトープタグ形態の存在は、タグポリペプチドに対する抗体を用いて検出することができる。また、エピトープタグの提供は、抗タグ抗体又はエピトープタグに結合する他の型の親和性マトリクスを用いたアフィニティ精製によってＰＲＯポリペプチドを容易に精製できるようにする。種々のタグポリペプチド及びそれら各々の抗体はこの分野で良く知られている。実施例は、ポリ－ヒスチジン（ポリ-ｈｉｓ）又はポリ－ヒスチジン－グリシン（ｐｏｌｙ-ｈｉｓ-ｇｌｙ）タグ；ｆｌｕ ＨＡタグポリペプチド及びその抗体１２ＣＡ５［Fieldら，Mol. Cell. Biol., 8:2159-2165 (1988)］；c-mycタグ及びそれに対する８Ｆ９、３Ｃ７、６Ｅ１０、Ｇ４、Ｂ７及び９Ｅ１０抗体［Evan等，Molecular and Cellular Biology, 5:3610-3616 (1985)］；及び単純ヘルペスウィルス糖タンパク質Ｄ（ｇＤ）タグ及びその抗体［Paborsky等，Protein Engineering, 3(6):547-553 (1990)］を含む。他のタグポリペプチドは、フラッグペプチド［Hopp等，BioTechnology, 6:1204-1210(1988)］；ＫＴ３エピトープペプチド［Martin等，Science, 255:192-194 (1992)］；α-チューブリンエピトープペプチド［Skinner等，J. Biol. Chem., 266:15163-15166 (1991)］；及びＴ７遺伝子１０タンパク質ペプチドタグ［Lutz-Freyermuth等，Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6393-6397(1990)］を含む。

それに代わる実施態様では、キメラ分子はＰＲＯの免疫グロブリン又は免疫グロブリンの特定領域との融合体を含んでもよい。キメラ分子の二価形態（「イムノアドヘシン」とも呼ばれる）については、そのような融合体はＩｇＧ分子のＦｃ領域であり得る。Ｉｇ融合体は、好ましくはＩｇ分子内の少なくとも一つの可変領域に換えてＰＲＯポリペプチドの可溶化（膜貫通ドメイン欠失又は不活性化）形態を含む。特に好ましい実施態様では、免疫グロブリン融合体は、ＩｇＧ１分子のヒンジ、ＣＨ２及びＣＨ３、又はヒンジ、ＣＨ１、ＣＨ２及びＣＨ３領域を含む。免疫グロブリン融合体の製造については、1995年6月27日発行の米国特許第5,428,130号を参照のこと。

【００６４】

Ｄ．ＰＲＯの調製

以下の説明は、主として、ＰＲＯ核酸を含むベクターで形質転換又は形質移入された細胞を培養することによりＰＲＯを生産する方法に関する。もちろん、当該分野においてよく知られている他の方法を用いてＰＲＯを調製することができると考えられる。例えば、ＰＲＯ配列、又はその一部は、固相技術を用いた直接ペプチド合成によって生産してもよい［例えば、Stewart等，Solid-Phase Peptide Synthesis, W.H. Freeman Co., サン フランシスコ，カリフォルニア (1969)；Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 85:2149-2154 (1963)参照］。手動技術又は自動によるインビトロタンパク質合成を行ってもよい。自動合成は、例えば、アプライド・バイオシステムズ・ペプチド合成機（フォスターシティー，カリフォルニア）を用いて、製造者の指示により実施してもよい。ＰＲＯの種々の部分は、別々に化学的に合成され、化学的又は酵素的方法を用いて結合させて完全長ＰＲＯを生産してもよい。

【００６５】

１．ＰＲＯをコードするＤＮＡの単離

ＰＲＯをコードするＤＮＡは、ＰＲＯｍＲＮＡを保有していてそれを検出可能なレベルで発現すると考えられる組織から調製されたｃＤＮＡライブラリから得ることができる。従って、ヒトＰＲＯＤＮＡは、実施例に記載されるように、ヒトの組織から調製されたｃＤＮＡライブラリから簡便に得ることができる。またＰＲＯ-コード化遺伝子は、ゲノムライブラリから又は公知の合成方法（例えば、自動化核酸合成）により得ることもできる。

ライブラリは、対象となる遺伝子或いはその遺伝子によりコードされるタンパク質を同定するために設計されたプローブ（ＰＲＯに対する抗体又は少なくとも約２０－８０塩基のオリゴヌクレオチド等）によってスクリーニングできる。選択されたプローブによるｃＤＮＡ又はゲノムライブラリのスクリーニングは、例えばSambrook等, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)に記載されている標準的な手順を使用して実施することができる。所望のＰＲＯポリペプチドをコードする遺伝子を単離する他の方法はＰＣＲ法を使用するものである［Sambrook等, 上掲；Dieffenbach等, PCR Primer: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995)］。

下記の実施例には、ｃＤＮＡライブラリのスクリーニング技術を記載している。プローブとして選択されたオリゴヌクレオチド配列は、充分な長さで、疑陽性が最小化されるよう充分に明瞭でなければならない。オリゴヌクレオチドは、スクリーニングされるライブラリ内のＤＮＡとのハイブリダイゼーション時に検出可能であるように標識されていることが好ましい。標識化の方法は当該分野において良く知られており、^{32}Ｐ標識されたＡＴＰのような放射線標識、ビオチン化或いは酵素標識の使用が含まれる。中程度の緊縮性及び高度の緊縮性を含むハイブリダイゼーション条件は、上掲のSambrook等,に示されている。

このようなライブラリスクリーニング法において同定された配列は、Genbank等,の公共データベース又は個人の配列データベースに寄託され公衆に利用可能とされている周知の配列と比較及びアラインメントすることができる。分子の決定された領域内又は完全長に渡っての（アミノ酸又は核酸レベルのいずれかでの）配列同一性は、当該分野で知られた、及びここに記載した方法を用いて決定することができる。

タンパク質コード化配列を有する核酸は、初めてここで開示された推定アミノ酸配列を使用し、また必要ならば、ｃＤＮＡに逆転写されていないｍＲＮＡの生成中間体及び先駆物質を検出する上掲のSambrook等,に記述されているような従来のプライマー伸展法を使用して選択されたｃＤＮＡ又はゲノムライブラリをスクリーニングすることによって得られる。

【００６６】

２．宿主細胞の選択及び形質転換

宿主細胞を、ここに記載したＰＲＯ生産のための発現又はクローニングベクターで形質移入又は形質転換し、プロモーターを誘導し、形質転換体を選択し、又は所望の配列をコードする遺伝子を増幅するために適当に変性された常套的栄養培地で培養する。培養条件、例えば培地、温度、ｐＨ等々は、過度の実験をすることなく当業者が選ぶことができる。一般に、細胞培養の生産性を最大にするための原理、プロトコール、及び実用技術は、Mammalian Cell Biotechnology: a Practical Approach, M.Butler編（IRL Press, 1991）及びSambrook等, 上掲に見出すことができる。

原核生物細胞形質移入及び真核生物細胞形質移入の方法、例えば、$CaCl_2$、$CaPO_4$、リポソーム媒介及びエレクトロポレーションは当業者に知られている。用いられる宿主細胞に応じて、その細胞に対して適した標準的な方法を用いて形質転換はなされる。前掲のSambrook等,に記載された塩化カルシウムを用いるカルシウム処理又はエレクトロポレーションが、一般的に原核生物に対して用いられる。アグロバクテリウム・トゥメファシエンス(Agrobacterium tumefaciens)による感染が、Shaw等, Gene, 23:315 (1983)及び1989年6月29日公開のＷＯ89/05859に記載されているように、或る種の植物細胞の形質

転換に用いられる。このような細胞壁のない哺乳動物の細胞に対しては、Graham及びvan der Eb, Virology, 52:456-457 (1978)のリン酸カルシウム沈降法が好ましい。哺乳動物細胞の宿主系形質転換の一般的な態様は米国特許第4,399,216号に記載されている。酵母菌中への形質転換は、典型的には、Van Solingen等, J. Bact., 130:946 (1977)及びHsiao等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76:3829 (1979)の方法に従って実施される。しかしながら、ＤＮＡを細胞中に導入する他の方法、例えば、核マイクロインジェクション、エレクトロポレーション、未処理の細胞、又はポリブレン、ポリオルニチン等のポリカチオンを用いる細菌プロトプラスト融合もまた用いることもできる。哺乳動物細胞を形質転換するための種々の技術については、Keown等, Methods in Enzymology, 185:527-537 (1990)及び Mansour等, Nature, 336:348-352 (1988)を参照のこと。

【００６７】

ここに記載のベクターにＤＮＡをクローニング或いは発現するために適切な宿主細胞は、原核生物、酵母菌、又は高等真核生物細胞である。適切な原核生物は、限定するものではないが、真正細菌、例えばグラム陰性又はグラム陽性生物体、例えば大腸菌のような腸内細菌科を含む。種々の大腸菌株が公衆に利用可能であり、例えば、大腸菌Ｋ１２株ＭＭ２９４（ＡＴＣＣ３１，４４６）；大腸菌Ｘ１７７６（ＡＴＣＣ３１，５３７）；大腸菌株Ｗ３１１０（ＡＴＣＣ２７，３２５）及びＫ５７７２（ＡＴＣＣ５３，６３５）である。他の好ましい原核動物宿主細胞は、大腸菌、例えば、E. coli、エンテロバクター、エルビニア(Erwinia)、クレブシエラ(Klebsiella)、プロテウス(Proteus)、サルモネラ、例えば、ネズミチフス菌、セラチア、例えば、セラチアマルセサンス(Serratia marcescans)、及び赤痢菌、並びに桿菌、例えばバチルス・スブチルス(B. subtilis)及びバチルス・リチェニフォルミス(B. licheniformis)（例えば、1989年4月12日発行のDD266,710に記載されたバチルス・リチェニフォルミス４１Ｐ）、シュードモナス、例えば緑膿菌及びストレプトマイセスなどの腸内細菌科を含む。これらの例は限定ではなく例示である。株Ｗ３１１０は、組換えＤＮＡ生産発行のための共通の宿主株であるので一つの特に好ましい宿主又は親宿主である。好ましくは、宿主細胞は最小量のタンパク質分解酵素を分泌する。例えば、株Ｗ３１１０は、細胞に外来のタンパク質をコードする遺伝子における遺伝子変異をするように修飾してもよく、そのような宿主の例としては、完全な遺伝子型tonAを有する大腸菌Ｗ３１１０株１Ａ２；完全な遺伝子型tonA ptr3を有する大腸菌Ｗ３１１０株９Ｅ４；完全な遺伝子型tonA prt3 phoA E15 (argF-lac) 169 degP ompT kan^{r}を有する大腸菌Ｗ３１１０株２７Ｃ７（ＡＴＣＣ　５５，２４４）；完全な遺伝子型tonA ptr3 phoA E15 (algF-lac) 169 degP ompT rbs7 ilvG kan^{r}を有する大腸菌Ｗ３１１０株３７Ｄ６；非カナマイシン耐性ｄｅｇＰ欠失変異を持つ３７Ｄ６株である大腸菌Ｗ３１１０株４０Ｂ４；及び1990年8月7日発行の米国特許第4,946,783号に開示された変異周辺質プロテアーゼを有する大腸菌株を含む。或いは、クローニングのインビトロ法、例えばＰＣＲ又は他の核酸ポリメラーゼ反応が好ましい。

【００６８】

原核生物に加えて、糸状菌又は酵母菌のような真核微生物は、ＰＲＯコード化ベクターのための適切なクローニング又は発現宿主である。サッカロミセス・セレヴィシアは、通常用いられる下等真核生物宿主微生物である。他に、シゾサッカロミセス・プロンブ(Schizosaccharomyces prombe)（Beach及びNurse, Nature, 290:140 [1981]；1985年5月2日発行のEP139,383）；クルベロミセス宿主(Kluveromyces hosts)（米国特許第4,943,529号；Fleer等, Bio/Technology, 9:968-975 (1991)）、例えばクルベロミセスラクチス(K. lactis)（MW98-8C, CBS683, CBS4574；Louvencourt等, J. Bacteriol.154(2):737-742 [1983]）、クルベロミセス・フラギリス(K. fragilis)（ＡＴＣＣ　１２，４２４）、クルベロミセス・ブルガリクス(K. bulgaricus)（ＡＴＣＣ　１６，０４５）、クルベロミセス・ウィケラミイ(K. wickeramii)（ＡＴＣＣ　２４,１７８）、クルベロミセスワルチイ(K. waltii)（ＡＴＣＣ　５６，５００）、クルベロミセス・ドロソフィラルム(K. drosophilarum)（ＡＴＣＣ　３６，９０６；Van den Berg等, Bio/Technology, 8:135 (1990)）、クルベロミセス・テモトレランス(K. thermotolerans)及びクルベロミセス・マルキシアナ

ス(K. marxianus)；ヤロウィア(yarrowia)（EP402,226）；ピチア・パストリス(Pichia pastoris)（EP183,070；Sreekrishna等，J. Basic Microbiol, 28:265-278 [1988]）；カンジダ；トリコデル・マレーシア(Trichoderma reesia)（EP244,234）；アカパンカビ（Case等，Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76:5259-5263 [1979]）；シュワニオマイセス(Schwanniomyces)、例えばシュワニオマイセスオクシデンタリス(Schwanniomyces occidentalis)（1990年10月31日発行のEP394,538）；及び糸状真菌、例えば、ニューロスポラ、ペニシリウム、トリポクラジウム(Tolypocladium)（1991年1月10日発行のWO91/00357）；及びアスペルギルス宿主、例えばアスペルギルス・ニダランス（Balance等，Biochem. Biophys. Res. Commun., 112:284-289 [1983]；Tilburn等，Gene, 26:205-221 [1983]；Yelton等，Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:1470-1474 [1984]）、及びアスペルギルス・ニガー（Kelly及びHynes, EMBO J., 4:475-479 [1985]）が含まれる。ここで好ましいメチロトロピック(Ｃ１化合物資化性、Methylotropic)酵母は、これらに限られないが、ハンセヌラ(Hansenula)、カンジダ、クロエケラ(Kloeckera)、ピチア(Pichia)、サッカロミセス、トルロプシス(Torulopsis)、及びロドトルラ(Rhodotorula)からなる属から選択されたメタノールで成長可能な酵母を含む。この酵母の分類の例示である特定の種のリストは、C. Anthony, The Biochemistry of Methylotrophs, 269 (1982)に記載されている。

グリコシル化ＰＲＯの発現に適切な宿主細胞は、多細胞生物から誘導される。無脊椎動物細胞の例としては、ショウジョウバエＳ２及びスポドスペラＳｆ９等の昆虫細胞並びに植物細胞が含まれる。有用な哺乳動物宿主株化細胞の例は、チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）及びＣＯＳ細胞を含む。より詳細な例は、ＳＶ４０によって形質転換されたサル腎臓ＣＶ１株（ＣＯＳ-７，ＡＴＣＣ ＣＲＬ １６５１）；ヒト胚腎臓株（２９３又は懸濁培養での増殖のためにサブクローン化された２９３細胞、Graham等，J. Gen Virol., 36:59 (1977)）；チャイニーズハムスター卵巣細胞／-ＤＨＦＲ（CHO, Urlaub及びChasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216 (1980)）；マウスのセルトリ細胞（ＴＭ４，Mather, Biol. Reprod., 23:243-251 (1980)）ヒト肺細胞（Ｗ１３８，ＡＴＣＣ ＣＣＬ７５）；ヒト肝細胞 （Ｈｅｐ Ｇ２，ＨＢ ８０６５）；及びマウス乳房腫瘍細胞（ＭＭＴ ０６０５６２，ＡＴＣＣ ＣＣＬ５１）を含む。適切な宿主細胞の選択は、この分野の技術常識内にある。

【００６９】

３．複製可能なベクターの選択及び使用

ＰＲＯをコードする核酸（例えば、ｃＤＮＡ又はゲノムＤＮＡ）は、クローニング（ＤＮＡの増幅）又は発現のために複製可能なベクター内に挿入される。様々なベクターが公的に入手可能である。ベクターは、例えば、プラスミド、コスミド、ウィルス粒子、又はファージの形態とすることができる。適切な核酸配列が、種々の手法によってベクターに挿入される。一般に、ＤＮＡはこの分野で周知の技術を用いて適当な制限エンドヌクレアーゼ部位に挿入される。ベクター成分としては、一般に、これらに制限されるものではないが、一つ又は複数のシグナル配列、複製開始点、一つ又は複数のマーカー遺伝子、エンハンサーエレメント、プロモーター、及び転写終結配列を含む。これらの成分の一つ又は複数を含む適当なベクターの作製には、当業者に知られた標準的なライゲーション技術を用いる。

ＰＲＯは直接的に組換え手法によって生産されるだけではなく、シグナル配列或いは成熟タンパク質或いはポリペプチドのＮ-末端に特異的切断部位を有する他のポリペプチドである異種性ポリペプチドとの融合ペプチドとしても生産される。一般に、シグナル配列はベクターの成分であるか、ベクターに挿入されるＰＲＯ-コード化ＤＮＡの一部である。シグナル配列は、例えばアルカリフォスファターゼ、ペニシリナーゼ、ｌｐｐ或いは熱安定性エンテロトキシンＩＩリーダーの群から選択された原核生物シグナル配列であってよい。酵母の分泌に関しては、シグナル配列は、酵母インベルターゼリーダー、アルファ因子リーダー（サッカロミセス(Saccharomyces)及びクルイベロマイシス(Kluyveromyces)α因子リーダーを含み、後者は米国特許第5,010,182号に記載されている）、又は酸ホスファターゼリーダー、カンジダ・アルビカンス(C.albicans)グルコアミラーゼリーダー（

1990年4月4日発行のEP362179）、又は1990年11月15日に公開されたWO90/13646に記載されているシグナルであり得る。哺乳動物細胞の発現においては、哺乳動物シグナル配列は、同一或いは関連ある種の分泌ポリペプチド由来のシグナル配列並びにウィルス分泌リーダーのようなタンパク質の直接分泌に使用してもよい。

【００７０】

発現及びクローニングベクターは、共に一又は複数の選択された宿主細胞においてベクターの複製を可能にする核酸配列を含む。そのような配列は多くの細菌、酵母及びウィルスに対してよく知られている。プラスミドｐＢＲ３２２に由来する複製開始点は大部分のグラム陰性細菌に好適であり、２μプラスミド開始点は酵母に適しており、様々なウィルス開始点（ＳＶ４０、ポリオーマ、アデノウィルス、ＶＳＶ又はＢＰＶ）は哺乳動物細胞におけるクローニングベクターに有用である。

発現及びクローニングベクターは、典型的には、選べるマーカーとも称される選択遺伝子を含む。典型的な選択遺伝子は、（ａ）アンピシリン、ネオマイシン、メトトレキセート或いはテトラサイクリンのような抗生物質或いは他の毒素に耐性を与え、（ｂ）栄養要求性欠陥を補い、又は（ｃ）複合培地から得られない重要な栄養素、例えば桿菌のＤ-アラニンラセマーゼをコードしている遺伝子を供給するタンパク質をコードする。

【００７１】

哺乳動物細胞に適切な選択可能なマーカーの例は、ＤＨＦＲ或いはチミジンキナーゼのようにＰＲＯ-コード化核酸を取り込むことのできる細胞成分の同定を可能にするものである。野生型ＤＨＦＲを用いた場合の好適な宿主細胞は、Urlaub等により Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216 (1980)に記載されているように調製され増殖された、ＤＨＦＲ活性に欠陥のあるＣＨＯ株化細胞である。酵母菌中での使用に好適な選択遺伝子は酵母プラスミドＹＲｐ７に存在するｔｒｐ１遺伝子である［Stinchcomb等, Nature, 282:39 (1979)；Kingsman等, Gene, 7:141 (1979)；Tschemper等, Gene, 10:157 (1980)］。ｔｒｐ１遺伝子は、例えば、ＡＴＣＣ番号４４０７６或いはＰＥＰ４-１のようなトリプトファン内で成長する能力を欠く酵母菌の突然変異株に対する選択マーカーを提供する［Jones, Genetics, 85:12 (1977)］。

発現及びクローニングベクターは、通常、ＰＲＯコード化核酸配列に作用可能に結合し、ｍＲＮＡ合成を制御するプロモーターを含む。種々の可能な宿主細胞により認識される好適なプロモーターが知られている。原核生物宿主での使用に好適なプロモーターはβ-ラクタマーゼ及びラクトースプロモーター系［Chang等, Nature, 275:615 (1978)； Goeddel等, Nature, 281:544 (1979)］、アルカリフォスファターゼ、トリプトファン(trp)プロモーター系［Goeddel, Nucleic Acids Res., 8:4057 (1980); EP 36,776］、及びハイブリッドプロモーター、例えばｔａｃプロモーター［deBoer 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80:21-25 (1983)］を含む。細菌系で使用するプロモーターもまたＰＲＯをコードするＤＮＡと作用可能に結合したシャイン-ダルガーノ(Ｓ．Ｄ．)配列を有する。

【００７２】

酵母宿主と共に用いて好適なプロモーター配列の例としては、３-ホスホグリセラートキナーゼ［Hitzeman 等, J. Biol. Chem., 255:2073 (1980)］又は他の糖分解酵素［Hess 等, J. Adv. Enzyme Reg., 7:149 (1968)；Holland, Biochemistry, 17:4900(1987)］、例えばエノラーゼ、グリセルアルデヒド-３-リン酸デヒドロゲナーゼ、ヘキソキナーゼ、ピルビン酸デカルボキシラーゼ、ホスホフルクトキナーゼ、グルコース-６-リン酸イソメラーゼ、３-ホスホグリセレートムターゼ、ピルビン酸キナーゼ、トリオセリン酸イソメラーゼ、ホスホグルコースイソメラーゼ、及びグルコキナーゼが含まれる。

他の酵母プロモーターとしては、成長条件によって転写が制御される付加的効果を有する誘発的プロモーターであり、アルコールデヒドロゲナーゼ２、イソチトクロムＣ、酸フォスファターゼ、窒素代謝と関連する分解性酵素、メタロチオネイン、グリセルアルデヒド-３-リン酸デヒドロゲナーゼ、及びマルトース及びガラクトースの利用を支配する酵素のプロモーター領域がある。酵母菌での発現に好適に用いられるベクターとプロモーターはEP73,657に更に記載されている。

【００７３】
哺乳動物の宿主細胞におけるベクターからのＰＲＯ転写は、例えば、ポリオーマウィルス、伝染性上皮腫ウィルス（1989年7月5日公開のUK2,211,504）、アデノウィルス（例えばアデノウィルス２）、ウシ乳頭腫ウィルス、トリ肉腫ウィルス、サイトメガロウィルス、レトロウィルス、Ｂ型肝炎ウィルス及びサルウィルス４０（ＳＶ４０）のようなウィルスのゲノムから得られるプロモーター、異種性哺乳動物プロモーター、例えばアクチンプロモーター又は免疫グロブリンプロモーター、及び熱衝撃プロモーターから得られるプロモーターによって、このようなプロモーターが宿主細胞系に適合し得る限り制御される。
より高等の真核生物による所望のＰＲＯをコードするＤＮＡの転写は、ベクター中にエンハンサー配列を挿入することによって増強され得る。エンハンサーは、通常は約１０から３００塩基対で、プロモーターに作用してその転写を増強するＤＮＡのシス作動要素である。哺乳動物遺伝子由来の多くのエンハンサー配列が現在知られている（グロビン、エラスターゼ、アルブミン、α-フェトプロテイン及びインスリン）。しかしながら、典型的には、真核細胞ウィルス由来のエンハンサーが用いられるであろう。例としては、複製起点の後期側のＳＶ４０エンハンサー（１００－２７０塩基対）、サイトメガロウィルス初期プロモーターエンハンサー、複製起点の後期側のポリオーマエンハンサー及びアデノウィルスエンハンサーが含まれる。エンハンサーは、ＰＲＯコード配列の５’又は３’位でベクター中にスプライシングされ得るが、好ましくはプロモーターから５’位に位置している。
【００７４】
また、真核生物宿主細胞（酵母、真菌、昆虫、植物、動物、ヒト、又は他の多細胞生物由来の有核細胞）に用いられる発現ベクターは、転写の終結及びｍＲＮＡの安定化に必要な配列も含む。このような配列は、真核生物又はウィルスのＤＮＡ又はｃＤＮＡの通常は５’、時には３’の非翻訳領域から取得できる。これらの領域は、ＰＲＯをコードするｍＲＮＡの非翻訳部分にポリアデニル化断片として転写されるヌクレオチドセグメントを含む。
組換え脊椎動物細胞培養でのＰＲＯの合成に適応化するのに適切な他の方法、ベクター及び宿主細胞は、Gething等, Nature, 293:620-625 (1981)；Mantei等, Nature, 281:40-46 (1979)；EP117,060；及びEP117,058に記載されている。
【００７５】
４．遺伝子増幅／発現の検出
遺伝子の増幅及び／又は発現は、ここで提供された配列に基づき、適切に標識されたプローブを用い、例えば、従来よりのサザンブロット法、ｍＲＮＡの転写を定量化するノーザンブロット法［Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:5201-5205 (1980)］、ドットブロット法（ＤＮＡ分析）、又はインサイツハイブリダイゼーション法によって、直接的に試料中で測定することができる。或いは、ＤＮＡ二本鎖、ＲＮＡ二本鎖及びＤＮＡ-ＲＮＡハイブリッド二本鎖又はＤＮＡ-タンパク二本鎖を含む、特異的二本鎖を認識することができる抗体を用いることもできる。次いで、抗体を標識し、アッセイを実施することができ、ここで二本鎖は表面に結合しており、その結果二本鎖の表面での形成の時点でその二本鎖に結合した抗体の存在を検出することができる。
或いは、遺伝子の発現は、遺伝子産物の発現を直接的に定量する免疫学的な方法、例えば細胞又は組織切片の免疫組織化学的染色及び細胞培養又は体液のアッセイによって、測定することもできる。試料液の免疫組織化学的染色及び／又はアッセイに有用な抗体は、モノクローナルでもポリクローナルでもよく、任意の哺乳動物で調製することができる。簡便には、抗体は、天然配列ＰＲＯポリペプチドに対して、又はここで提供されるＤＮＡ配列をベースとした合成ペプチドに対して、又はＰＲＯ ＤＮＡに融合し特異的抗体エピトープをコードする外因性配列に対して調製され得る。
【００７６】
５．ポリペプチドの精製
ＰＲＯの形態は、培地又は宿主細胞の溶菌液から回収することができる。膜結合性であ

るならば、適切な洗浄液（例えばトリトン-Ｘ１００）又は酵素的切断を用いて膜から引き離すことができる。ＰＲＯの発現に用いられる細胞は、凍結融解サイクル、超音波処理、機械的破壊、又は細胞溶解剤などの種々の化学的又は物理的手段によって破壊することができる。

ＰＲＯを、組換え細胞タンパク又はポリペプチドから精製することが望ましい。適切な精製手順の例である次の手順により精製される：すなわち、イオン交換カラムでの分画；エタノール沈殿；逆相ＨＰＬＣ；シリカ又はカチオン交換樹脂、例えばＤＥＡＥによるクロマトグラフィー；クロマトフォーカシング；ＳＤＳ-ＰＡＧＥ；硫酸アンモニウム沈殿；例えばセファデックスＧ-７５を用いるゲル濾過；ＩｇＧのような汚染物を除くプロテインＡセファロースカラム；及びＰＲＯのエピトープタグ形態を結合させる金属キレート化カラムである。この分野で知られ、例えば、Deutscher, Methodes in Enzymology, 182 (1990)；Scopes, Protein Purification: Principles and Practice, Springer-Verlag, New York (1982)に記載された多くのタンパク質精製方法を用いることができる。選ばれる精製過程は、例えば、用いられる生産方法及び特に生産される特定のＰＲＯの性質に依存する。

【００７７】

Ｅ．組織分布

本発明のＰＲＯを発現する組織の位置は、種々のヒト組織でのｍＲＮＡ発現の測定により確認できる。そのような遺伝子の位置は、ＰＲＯポリペプチドの活性の刺激及び阻害によって最も影響を受けやすい組織に関する情報を提供する。また、特定の組織中の遺伝子の位置は、下記において論じる活性遮断アッセイのための試料組織を提供する。

上記したように、種々の組織における遺伝子増幅又は遺伝子発現は、ｍＲＮＡの転写の定量化のための従来のサザンブロット、ノーザンブロット（Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:5201-5205 [1980]）、ドットブロット（ＤＮＡ分析）、又はインサイツハイブリダイゼーションによって、ここに提供する配列に基づき、適切な標識プローブを用いて測定できる。或いは、ＤＮＡ二重鎖、ＲＮＡ二重鎖、及びＤＮＡ-ＲＮＡハイブリッド二重鎖又はＤＮＡ-タンパク質二重鎖を含む特定の二重鎖を認識する抗体を用いてもよい。

或いは、種々の組織における遺伝子発現は、遺伝子産物を直接定量化するための、組織断片及び細胞培地又は体液の免疫組織学的染色などの免疫的方法によっても測定できる。免疫組織学的染色又は試料液のアッセイに有用な抗体は、モノクローナルでもポリクローナルでもよく、任意の動物から調製される。都合良く、抗体は、ＰＲＯポリペプチドの天然配列に対して、又は本発明のポリペプチドをコードするＤＮＡ配列に基づく合成ペプチドに対して、或いはＰＲＯポリペプチドをコードし、特異的抗体エピトープをコードするＤＮＡと融合した外来配列に対して調製してもよい。下記に、抗体を生成するための一般的な技術、並びにノーザンブロット及びインサイツハイブリダイゼーションのプロトコールを提供する。

【００７８】

Ｆ．抗体結合の研究

本発明のＰＲＯポリペプチドの活性は、組織細胞に対するＰＲＯポリペプチドの効果を阻害する抗ＰＲＯ抗体の能力が試験される抗体結合の研究によって更に確認できる。例示的な抗体は、ポリクローナル、モノクローナル、ヒト化、二重特異性、及びヘテロコンジュゲート抗体を含み、その調製は以下に記載する。

抗体結合の研究は、競合的結合アッセイ、直接及び間接サンドウィッチアッセイ、及び免疫沈降アッセイなどの既知のアッセイ法で実施してよい。Zola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, pp.147-158 (CRC Press, Inc., 1987)。

競合的結合アッセイは、標識標準物の、限られた量の抗体との結合について試験分析物と競合する能力による。試験試料中の（腫瘍細胞で増幅された遺伝子にコードされる）標的タンパク質の量は、抗体に結合し始める標準物の量に逆比例する。結合し始める標準物の量の測定を促進するために、抗体は好ましくは競合の前又は後に固定化し、抗体に結合

した標準品及び分析物が未結合で残っている標準物及び分析物から容易に分離できるようにする。

サンドウィッチアッセイは二つの抗体の使用を含み、各々が検出すべきタンパク質の異なる免疫原部分、又はエピトープに結合できる。サンドウィッチアッセイにおいて試験試料分析物は固体支持体上に固定化された第一の抗体に結合し、その後第二の抗体が分析物に結合し、よって不溶性の３成分複合体が形成される。例えば米国特許第4,376,110号参照。第二の抗体は検出可能部分で標識され（直接サンドウィッチアッセイ）、或いは検出可能部分で標識された抗免疫グロブリン抗体を用いて測定してもよい（間接サンドウィッチアッセイ）。例えば、サンドウィッチアッセイの一形態はＥＬＩＳＡアッセイであり、この場合の検出可能部分は酵素である。

免疫組織学のためには、腫瘍試料は新鮮でも凍結したものでもよく、パラフィンに包埋して、例えばホルマリン等の保存剤で固定してもよい。

【００７９】

Ｇ．細胞ベースアッセイ

細胞ベースアッセイ及び乾癬等の免疫関連疾患の動物モデルを、ここで同定された遺伝子とポリペプチド、並びに乾癬の発達と病原性との関係を更に理解するのに用いることができる。

異なる方法では、免疫関連疾患に関与することが知られている或る細胞型の細胞へここに記載されたｃＤＮＡを形質移入し、これらのｃＤＮＡの免疫関連疾患を刺激又は阻害する能力を分析する。適当な細胞は所望の遺伝子で形質移入し、そしてそのような機能活性をモニターすることができる。このような形質移入された株化細胞は、乾癬を阻害又は刺激するポリ－又はモノクローナル抗体又は抗体組成物の能力を試験するのに用いることができる。ここに同定した遺伝子のコード化配列で形質移入した細胞は、更に、免疫関連疾患の治療の候補薬の同定に用いることができる。

更には、安定な株化細胞が好ましいが、トランスジェニック動物から誘導された一次培地を（下記のような）、ここでの細胞ベースアッセイに使用することができる。トランスジェニック動物から連続株化細胞を誘導する技術は、この分野で良く知られている（Small等, Mol. Cell. Biol. 5, 642-648 [1985]参照）。

【００８０】

Ｈ．動物モデル

更に、インビトロにおける細胞ベースアッセイの結果は、インビボ動物モデル及び免疫関連疾患のアッセイにより証明することができる。免疫関連疾患の進行及び病因におけるここに同定される遺伝子の役割を更に理解するために、そして抗体、及び小分子アンタゴニストを含む天然ポリペプチドの他のアゴニストを含む候補治療薬の有効性を試験するために、種々の良く知られた動物モデルが使用できる。これらのモデルのインビボ性質により、ヒト患者における反応を予測できる。免疫関連疾患の動物モデルは、非組換え及び組換え（トランスジェニック）動物の両方を含む。非組換え動物モデルは、例えば、齧歯類、例えばマウスモデルを含む。このようなモデルは、標準的な技術、例えば、皮下注射、尾部静脈注射、脾臓移植、腹膜内移植、腎被膜下移植等により、細胞を同系マウスに導入することにより作製される。

移植片対宿主疾患は、免疫適格細胞が免疫抑制され又は耐性のある患者に移植された場合に生じる。ドナー細胞は宿主抗原を認識しそれに反応する。反応は生命に危険性のある重度の炎症から、下痢や体重の減少等の軽度のケースまで多様である。移植片対宿主疾患モデルはＭＨＣ抗原及び少量の移植抗原に対するＴ細胞反応性を評価する手段を提供する。適切な手順は上記のCurrent Protocols in Immunology, unit4.3.に詳細に記載されている。

皮膚同種移植片拒絶のための動物モデルは、Ｔ細胞がインビボで組織の破壊を媒介する能力を試験する手段であり、移植拒絶におけるそれらの役割の指標である。最も一般的で容認されているモデルではマウスの尾の皮膚の移植片が使用される。繰り返し実験により、皮膚同種移植片拒絶がＴ細胞、ヘルパーＴ細胞及びキラー-エフェクターＴ細胞により

媒介されるが、抗体では媒介されないことが分かった。Auchincloss, H. Jr.及びSachs, D.H., Fundamental Immunology, 2nd ed., W.E.Paul ed., Raven Press, NY, 1989, 889-992。適切な手順は上掲のCurrent Protocols in Immunology, unit4.4.に詳細に記載されている。本発明の化合物の試験に使用可能な他の移植拒絶モデルは、Tanabe, M.等, Transplantation (1994) 58:23及びTinubu, S.A.等, J. Immunol. (1994) 4330-4338により記載されている同種心臓移植片モデルである。

【００８１】

接触性過敏症は、細胞媒介免疫機能の単純な遅発型過敏インビボアッセイである。この手順において、遅発型過敏反応を生じさせる外因性ハプテンに皮膚を暴露し、反応を測定して定量する。接触過敏症は最初の感作段階に顕在化段階が続く。顕在化段階はＴリンパ球が過去に接触したことのある抗原に遭遇したときに生じる。腫れと炎症が生じ、ヒトアレルギー性接触皮膚炎の優れたモデルが作製される。適切な手順は、Current Protocols in Immunology, J.E. Coligan, A.M.Kruisbeek, D.H.Marglies, E. M.Shevach, 及びW.Strober編, John Wiley & Sons, Inc, unit4.2に詳細に記載されている。また、Grabbe, S.及びSchwarz, T. Immun. Today 19(1):37-44(1998)も参照のこと。

更に、本発明の化合物は乾癬等の免疫関連疾患の動物モデルにおいて試験することができる。ある証拠によりＴ細胞が乾癬の病原であることを示唆されているので、本発明の化合物は、Schon. M.P.等, Nat. Med. (1997) 3:183により記載されているscid／scidマウスモデルにおいて試験することができ、そのモデルではマウスは乾癬に類似した組織病理学的皮膚病巣を示す。他の適切なモデルはNickoloff, B.J.等, Am. J. Path. (1995) 146:580に記載されているようにして調製されたヒトskin／scidマウスキメラである。

【００８２】

組換え（トランスジェニック）動物モデルは、ここに同定された遺伝子のコード部分を、トランスジェニック動物作製のための標準的技術を用いて、対象とする動物のゲノムに導入することにより加工できる。トランスジェニック操作の標的として提供できる動物は、限定されないが、マウス、ラット、ウサギ、モルモット、ヒツジ、ヤギ、ブタ、及び非-ヒト霊長類、例えばヒヒ、チンパンジー及びサルを含む。これらの動物に導入遺伝子を導入するのにこの分野で知られた技術は、全核マイクロインジェクション（Hoppe及びWanger, 米国特許第4,873,191号）；胚系列へのレトロウィルス媒介遺伝子転移（例えば、Van der Putten等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 6148-615 [1985]）；胚性肝細胞での遺伝子標的化（Thompson等, Cell 56, 313-321 [1989]）；胚のエレクトロポレーション（Lo, Mol. Cel. Biol. 3, 1803-1814 [1983]）；精子媒介遺伝子転移（Lavitrano等, Cell 57, 717-73 [1989]）を含む。概説としては、例えば、米国特許第4,736,866号を参照のこと。

本発明の目的のために、トランスジェニック動物は、その一部にのみ導入遺伝子を有するもの（「モザイク動物」）を含む。導入遺伝子は、単一の導入遺伝子として、又はコンカテマー、例えば頭部と頭部又は頭部と尾部の直列型として組み込まれる。特定の細胞型への導入遺伝子の選択的導入も、例えばLasko等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 6232-636 (1992)の技術に従って可能である。

【００８３】

トランスジェニック動物における導入遺伝子の発現は、標準的技術によってモニターできる。例えば、導入遺伝子の組み込みの確認にサザンブロット分析又はＰＣＲ増幅が用いられる。次いで、ｍＲＮＡ発現のレベルは、インサイツハイブリダイゼーション、ノーザンブロット分析、ＰＣＲ、又は免疫組織化学などの技術を用いて分析できる。

例えば免疫細胞の特定の細胞への浸潤を確定するための組織学的検査によって、免疫疾患病理の兆候に関してこの動物を更に調べてもよい。本発明の化合物によるＴ細胞増殖の刺激又は阻害の程度を確定するために、この化合物で処理したトランスジェニック動物で遮断実験をも行うことができる。これらの実験では、上記に記載のようにして調製した本発明のポリペプチドと結合する遮断抗体が動物へ投与され、そして免疫機能への影響が測定される。

【００８４】
或いは、「ノックアウト」動物は、ここで同定されたポリペプチドをコードする内在性の遺伝子と、動物の胚性細胞へ導入されたそのポリペプチドをコードする改変ゲノムＤＮＡとの間の相同組換えの結果として、ここで同定されたポリペプチドをコードする欠陥又は改変遺伝子を有するものとして構築することができる。例えば、ある特定ポリペプチドをコードするｃＤＮＡは、確立されている技術によって、そのポリペプチドをコードするゲノムＤＮＡのクローニングに利用できる。ある特定のポリペプチドをコードするゲノムＤＮＡの一部は、その他の遺伝子、例えば組み込みをモニターするために利用できる選択可能なマーカーをコードする遺伝子によって置き換え又は除去できる。概して、ベクターは無変化のフランキングＤＮＡ（５'と３'末端の両方）を数キロベース含む［例えば、相同的組換えベクターについてはThomas及びCapecchi, Cell, 51:503 (1987)を参照のこと］。ベクターを胚性幹細胞へ（例えば電気穿孔法等によって）導入し、導入されたＤＮＡが内在性ＤＮＡと相同的に組換えられた細胞を選択する［例えば、Li等, Cell, 69:915 (1992)参照］。選択された細胞は次に動物（例えばマウス又はラット）の胚盤胞内に注入され、集合キメラを形成する［例えば、Bradley, Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach, E. J. Robertson, ed. (IRL, Oxford, 1987), pp. 113-152参照］。その後、キメラ性胚を適切な偽妊娠の雌性乳母に移植し、期間をおいて「ノックアウト」動物をつくり出す。胚細胞に相同的に組換えられたＤＮＡを有する子孫は標準的な技術により同定され、それらを利用して動物の全細胞が相同的に組換えられたＤＮＡを含む動物を繁殖させることができる。ノックアウト動物は、例えば腫瘍の発達を含む、ポリペプチドが不在であることによるある種の病理的状態及びその病理的状態の発達に対する防御能力によって特徴付けられる。

【００８５】
Ｉ．免疫アジュバント治療
一実施態様では、本発明の免疫刺激化合物は腫瘍（癌）治療における免疫アジュバント治療に使用することができる。Ｔ細胞がヒト腫瘍特異的抗原を認識することは十分に確立されている。遺伝子のＭＡＧＥ、ＢＡＧＥ及びＧＡＧＥファミリーによりコードされる腫瘍抗原の一グループは全ての成人の正常組織においてサイレントであるが、腫瘍、例えばメラノーマ、肺腫瘍、頭部及び頸部の腫瘍、膀胱癌においては有意の量で発現している。DeSmet. C.等, (1996) Proc. Natl. Acad. Sci.93:7149。Ｔ細胞の共刺激により、インビトロ及びインビボの双方において、腫瘍の退行及び抗腫瘍反応が誘発されることが示されている。Melero. I.等, Nature Medicine (1997) 3:682；Kwon. E.D.等, Proc. Natl. Acad. Sci.USA (1997) 94:8099；Lynch. D.H.等, Nature Medicine (1997) 3:625；Finn. O.J.及びLotze. M.T., J. Immunol. (1998) 21:114。本発明の刺激化合物はアジュバントとして単独で又は成長調節剤、細胞障害性薬又は化学療法剤と共に投与することができ、Ｔ細胞増殖／活性化及び腫瘍抗原に対する抗腫瘍反応を刺激する。成長調節剤、細胞障害性薬又は化学療法剤は既知の投与方法で使用されている従来からの量で投与することができる。本発明の化合物による免疫刺激活性により、成長調節剤、細胞障害性薬又は化学療法剤の量を減らすことができ、よって、潜在的に患者に対する毒性を低下させることができる。

【００８６】
Ｊ．候補薬ためのスクリーニングアッセイ
候補薬のスクリーニングアッセイは、ここで同定された遺伝子によってコードされているポリペプチド、或いはその生物活性断片と結合又は複合化する化合物、或いはそうでなければコードされているポリペプチドと他の細胞性タンパク質の相互作用を妨害する化合物を同定するように設計されている。このようなスクリーニングアッセイは、化学的ライブラリの高スループットスクリーニングに従うアッセイを含み、特に、小分子候補薬の同定に適している。考えられる小分子には、ペプチド、好ましくは可溶性ペプチド、（ポリ）ペプチド-免疫グロブリン融合物を含む合成有機又は無機化合物を含み、そして特に限定することなく、ヒト抗体及び抗体断片と並んで、ポリ-及びモノクローナル抗体及び抗

体断片、一本鎖抗体、抗イディオタイプ抗体、及びそのような抗体又は断片のキメラ又はヒト化異形を含む抗体を含む。このアッセイは、この分野で良く特徴付けられているタンパク質－タンパク質結合アッセイ、生物学的スクリーニングアッセイ、免疫検定及び細胞ベースのアッセイを含む種々の型式で実施される。すべてのアッセイは、候補薬とここで同定された核酸によってコードされているポリペプチドの相互作用を可能にする条件下及び十分な時間に渡って、これら二つの分子を接触させることを必要とするという点で共通である。

結合アッセイにおいて、相互作用は結合であり、形成された複合体は単離されるか、或いは反応混合物中で検出することができる。特別な実施態様では、ここに同定された遺伝子にコードされるポリペプチド又は候補薬が、共有又は非共有結合により固相、例えばマイクロタイタープレートに固定化される。非共有結合は、一般的に固体表面をポリペプチドの溶液で被覆し乾燥させることにより達成される。或いは、固定化すべきペプチドに特異的な固定化抗体、例えばモノクローナル抗体を、そのペプチドを固体表面に固着させるために用いることができる。アッセイは、固定化成分、例えば固着成分を含む被覆表面に、検出可能な標識で標識されていてもよい非固定化成分を添加することにより実施される。反応が完了したとき、未反応成分を例えば洗浄により除去し、固体表面に固着した複合体を検出する。最初の非固定化成分が検出可能な標識を有している場合、表面に固定化された標識の検出は複合体形成が起こったことを示す。最初の非固定化成分が標識を持たない場合は、複合体形成は、例えば、固定化された複合体に特異的に結合する標識抗体によって検出できる。

【００８７】

候補化合物が相互作用するが特定のタンパク質に結合しない場合、そのレセプターとの相互作用は、タンパク質－タンパク質相互作用を検出するために良く知られた方法によってアッセイすることができる。そのようなアッセイは、架橋、同時免疫沈降、及び勾配又はクロマトグラフィカラムを通す同時精製などの伝統的な手法を含む。更に、タンパク質－タンパク質相互作用は、Fields及び共同研究者等［Fiels及びSong, Nature(London) 340, 245-246 (1989)；Chien等, Proc.Natl. Acad. Sci. USA 88, 9578-9582 (1991)］に記載された酵母菌ベースの遺伝子系を用いることにより、Chevray及びNathans［Proc.Natl. Acad. Sci. USA 89, 5789-5793 (1991)］に開示されているようにモニターすることができる。酵母菌ＧＡＬ４などの多くの転写活性化剤は、二つの物理的に別個のモジュラードメインからなり、一方はＤＮＡ結合ドメインとして作用し、他方は転写活性化ドメインとして機能する。以前の文献に記載された酵母菌発現系（一般に「ツーハイブリッド系」と呼ばれる）は、この特性の長所を利用して、二つのハイブリッドタンパク質を用い、一方では標的タンパク質がＧＡＬ４のＤＮＡ結合ドメインに融合し、他方では、候補となる活性化タンパク質が活性化ドメインに融合している。ＧＡＬ１-ｌａｃＺリポーター遺伝子のＧＡＬ４活性化プロモーターの制御下での発現は、タンパク質-タンパク質相互作用を介したＧＡＬ４活性の再構成に依存する。相互作用するポリペプチドを含むコロニーは、β-ガラクトシダーゼに対する色素生産性物質で検出される。ツーハイブリッド技術を用いた二つの特定なタンパク質間のタンパク質-タンパク質相互作用を同定するための完全なキット（MATCHMAKER(商品名)）は、Clontechから商業的に入手可能である。この系は、特定のタンパク質相互作用に含まれるタンパク質ドメインのマッピング、並びにこの相互作用にとって重要なアミノ酸残基の特定にも拡張することができる。

ここで同定された遺伝子の相互作用を妨害する化合物と、試験が可能な他の細胞内又は細胞外成分を見出すために、二つの産物の相互作用と結合を可能にする条件と時間の下で、遺伝子の生産物、並びに細胞内又は細胞外成分を含有するように、反応混合物は、通常は調製される。試験化合物の結合を阻害する能力を試験するためには、反応を試験化合物が存在する場合と存在しない場合で実施する。更に、第三の反応混合物へプラシーボを添加してポジティブコントロールとしてもよい。コントロール反応において複合体の形成があり、試験化合物を含有しない反応混合物では複合体の形成がないことは、試験化合物が、試験化合物とその反応パートナーとの相互作用を妨害することを示す。

【００８８】

Ｋ．治療のための組成物及び方法

免疫関連疾患の治療に有用な組成物は、限定されないが、タンパク質、抗体、小有機分子、ペプチド、ホスホペプチド、アンチセンス及びリボザイム分子、三重螺旋分子などを含み、免疫機能、例えばＴ細胞増殖／活性化、リンホカイン放出、又は免疫細胞の浸潤を阻害する。

例えば、アンチセンスＲＮＡ及びＲＮＡ分子は、標的ｍＲＮＡにハイブリダイゼーションしてタンパク質翻訳を防止することによりｍＲＮＡの翻訳を直接阻止する。アンチセンスＤＮＡが用いられる場合、翻訳開始部位、例えば標的遺伝子ヌクレオチド配列の－１０から＋１０位置の間から誘導されるオリゴデオキシリボヌクレオチドが好ましい。

リボザイムは、ＲＮＡの特異的切断を触媒できる酵素的ＲＮＡ分子である。リボザイムは、相補的標的ＲＮＡへの配列特異的ハイブリダイゼーション、次いでヌクレオチド鎖切断的切断により作用する。潜在的ＲＮＡ標的内の特異的リボザイム切断部位は、既知の技術で同定できる。更なる詳細は、例えば、Rossi, Current Biology 4:469-471 (1994)及びＰＣＴ公報番号WO97/33551（1997年9月18日公開）を参照。

転写阻害に用いられる三重螺旋形成における核酸分子は一本鎖でデオキシヌクレオチドからなる。これらのオリゴヌクレオチドの基本組成は、フーグスチン塩基対則を介する三重螺旋形成を促進するように設計され、それは一般に二重鎖の一方の鎖上のプリン又はピリミジンのサイズ変更可能な伸展を必要とする。更なる詳細は、例えば、ＰＣＴ公報番号WO97/33551, 上掲を参照。

これらの分子は上記のスクリーニングアッセイの任意のもの又は任意の組み合わせにより、又は当業者に知られた他のスクリーニング技術により同定できる。

【００８９】

Ｌ．抗ＰＲＯ抗体

本発明は、更に抗ＰＲＯ抗体を提供するものである。抗体の例としては、ポリクローナル、モノクローナル、ヒト化、二重特異性及びヘテロコンジュゲート抗体が含まれる。

１．ポリクローナル抗体

抗ＰＲＯ抗体はポリクローナル抗体を含む。ポリクローナル抗体の調製方法は当業者に知られている。哺乳動物においてポリクローナル抗体は、例えば免疫剤、及び所望するのであればアジュバントを、一又は複数回注射することで発生させることができる。典型的には、免疫剤及び／又はアジュバントを複数回皮下又は腹腔内注射により、哺乳動物に注射する。免疫剤は、ＰＲＯポリペプチド又はその融合タンパク質を含みうる。免疫剤を免疫化された哺乳動物において免疫原性が知られているタンパク質に抱合させるのが有用である。このような免疫原タンパク質の例は、これらに限られないが、キーホールリンペットヘモシアニン、血清アルブミン、ウシサイログロブリン及び大豆トリプシンインヒビターが含まれる。使用され得るアジュバントの例には、フロイント完全アジュバント及びＭＰＬ-ＴＤＭアジュバント（モノホスホリル脂質Ａ、合成トレハロースジコリノミコラート）が含まれる。免疫化プロトコールは、過度の実験なく当業者により選択されるであろう。

【００９０】

２．モノクローナル抗体

或いは、抗ＰＲＯ抗体はモノクローナル抗体であってもよい。モノクローナル抗体は、Kohler及びMilstein, Nature, 256:495 (1975)に記載されているようなハイブリドーマ法を使用することで調製することができる。ハイブリドーマ法では、マウス、ハムスター又は他の適切な宿主動物を典型的には免疫剤により免疫化することで、免疫剤に特異的に結合する抗体を生成するか或いは生成可能なリンパ球を誘発する。或いは、リンパ球をインビトロで免疫化することもできる。

免疫剤は、典型的には対象とするＰＲＯポリペプチド又はその融合タンパク質を含む。一般にヒト由来の細胞が望まれる場合には末梢血リンパ球（「ＰＢＬ」）が使用され、或いは非ヒト哺乳動物源が望まれている場合は、脾臓細胞又はリンパ節細胞が使用される。

次いで、ポリエチレングリコール等の適当な融合剤を用いてリンパ球を不死化株化細胞と融合させ、ハイブリドーマ細胞を形成する［Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, (1986) pp. 59-103］。不死化株化細胞は、通常は、形質転換した哺乳動物細胞、特に齧歯動物、ウシ、及びヒト由来の骨髄腫細胞である。通常、ラット又はマウスの骨髄腫株化細胞が使用される。ハイブリドーマ細胞は、好ましくは、未融合の不死化細胞の生存又は成長を阻害する一又は複数の物質を含有する適切な培地で培養される。例えば、親細胞が、酵素のヒポキサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ(ＨＧＰＲＴ又はＨＰＲＴ)を欠いていると、ハイブリドーマの培地は、典型的には、ヒポキサチン、アミノプチリン及びチミジンを含み（「ＨＡＴ培地」）、この物質がＨＧＰＲＴ欠乏性細胞の増殖を阻止する。

【００９１】

好ましい不死化株化細胞は、効率的に融合し、選択された抗体生成細胞による安定した高レベルの抗体発現を支援し、ＨＡＴ培地のような培地に対して感受性である。より好ましい不死化株化細胞はマウス骨髄腫株であり、これは例えばカリフォルニア州サンディエゴのSalk Institute Cell Distribution Centerやメリーランド州ロックビルのアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションより入手可能である。ヒトモノクローナル抗体を生成するためのヒト骨髄腫及びマウス-ヒト異種骨髄腫株化細胞も開示されている［Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984)、Brodeur等, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, Marcel Dekker, Inc., New York, (1987) pp. 51-63］。

次いでハイブリドーマ細胞が培養される培養培地を、ＰＲＯに対するモノクローナル抗体の存在について検定する。好ましくは、ハイブリドーマ細胞によって生成されたモノクローナル抗体の結合特異性は免疫沈降又はラジオイムノアッセイ(ＲＩＡ)や酵素結合免疫測定法(ＥＬＩＳＡ)等のインビトロ結合検定法によって測定する。このような技術及びアッセイは、当該分野において公知である。モノクローナル抗体の結合親和性は、例えばMunson及びPollard, Anal. Biochem., 107:220 (1980)によるスキャッチャード解析法によって測定することができる。

所望のハイブリドーマ細胞が同定された後、クローンを限界希釈法によりサブクローニングし、標準的な方法で成長させることができる［Goding, 上掲］。この目的のための適当な培地には、例えば、ダルベッコの改変イーグル培地及びＲＰＭＩ-１６４０倍地が含まれる。或いは、ハイブリドーマ細胞は哺乳動物においてインビボで腹水として成長させることもできる。

サブクローンによって分泌されたモノクローナル抗体は、例えばプロテインＡ－セファロース法、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー法、ゲル電気泳動法、透析法又はアフィニティークロマトグラフィー等の従来の免疫グロブリン精製方法によって培養培地又は腹水液から単離又は精製される。

【００９２】

また、モノクローナル抗体は、組換えＤＮＡ法、例えば米国特許第4,816,567号に記載された方法により作製することができる。本発明のモノクローナル抗体をコードするＤＮＡは、常套的な方法を用いて（例えば、マウス抗体の重鎖及び軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合可能なオリゴヌクレオチドプローブを使用して）、容易に単離し配列決定することができる。本発明のハイブリドーマ細胞はそのようなＤＮＡの好ましい供給源となる。ひとたび単離されたら、ＤＮＡは発現ベクター内に配することができ、これが宿主細胞、例えばサルＣＯＳ細胞、チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞、或いは免疫グロブリンタンパク質を生成等しない骨髄腫細胞内に形質移入され、組換え宿主細胞内でモノクローナル抗体の合成をすることができる。また、ＤＮＡは、例えば相同マウス配列に換えてヒト重鎖及び軽鎖定常ドメインのコード配列を置換することにより［米国特許第4,816,567号；Morrison等, 上掲］、又は免疫グロブリンコード配列に非免疫グロブリンポリペプチドのコード配列の一部又は全部を共有結合することにより修飾することができる。このような非免疫グロブリンポリペプチドは、本発明の抗体の定常ドメインに置換でき、或いは本発明の抗体の一つの抗原結合部位の可変ドメインに置換でき、キメラ性二価抗

体を生成する。
抗体は一価抗体であってもよい。一価抗体の調製方法は当該分野においてよく知られている。例えば、一つの方法は免疫グロブリン軽鎖と修飾重鎖の組換え発現を含む。重鎖は一般的に、重鎖の架橋を防止するようにＦｃ領域の任意の点で切断される。或いは、関連するシステイン残基を他のアミノ酸残基で置換するか欠失させて架橋を防止する。
一価抗体の調製には、同じくインビトロ法が適している。抗体の消化による、その断片、特にＦａｂ断片の生成は、当該分野において知られている慣用的技術を使用して達成が可能である。
【００９３】
３．ヒト及びヒト化抗体
本発明の抗ＰＲＯ抗体は、更にヒト化抗体又はヒト抗体を含む。非ヒト（例えばマウス）抗体のヒト化形とは、キメラ免疫グロブリン、免疫グロブリン鎖或いはその断片（例えばＦｖ、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）$_2$或いは抗体の他の抗原結合サブ配列）であって、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小配列を含むものである。ヒト化抗体はレシピエントの相補性決定領域（ＣＤＲ）の残基が、マウス、ラット又はウサギのような所望の特異性、親和性及び能力を有する非ヒト種（ドナー抗体）のＣＤＲの残基によって置換されたヒト免疫グロブリン（レシピエント抗体）を含む。幾つかの例では、ヒト免疫グロブリンのＦｖフレームワーク残基は、対応する非ヒト残基によって置換されている。また、ヒト化抗体は、レシピエント抗体にも、移入されたＣＤＲもしくはフレームワーク配列にも見出されない残基を含んでいてもよい。一般に、ヒト化抗体は、全て或いはほとんど全てのＣＤＲ領域が非ヒト免疫グロブリンのものに対応し、全て或いはほとんど全てのＦＲ領域がヒト免疫グロブリンコンセンサス配列のものである、少なくとも一つ、典型的には二つの可変ドメインの実質的に全てを含む。ヒト化抗体は、最適には免疫グロブリン定常領域(Ｆｃ)、典型的にはヒトの免疫グロブリンの定常領域の少なくとも一部を含んでなる［Jones等，Nature，321:522-525 (1986)；Riechmann等，Nature，332:323-329 (1988)；及びPresta，Curr. Op Struct. Biol.，2:593-596 (1992)］。
非ヒト抗体をヒト化する方法はこの分野でよく知られている。一般的に、ヒト化抗体には非ヒト由来の一つ又は複数のアミノ酸残基が導入される。これら非ヒトアミノ酸残基は、しばしば、典型的には「移入」可変ドメインから得られる「移入」残基と称される。ヒト化は基本的に齧歯動物のＣＤＲ又はＣＤＲ配列でヒト抗体の該当する配列を置換することによりウィンター(Winter)及び共同研究者［Jonesら，Nature，321:522-525 (1986)；Riechmannら，Nature，332:323-327 (1988)；Verhoeyenら，Science，239:1534-1536 (1988)］の方法に従って、齧歯類ＣＤＲ又はＣＤＲ配列をヒト抗体の対応する配列に置換することにより実施される。よって、このような「ヒト化」抗体は、原型のヒト可変ドメインより実質的に少ない分が非ヒト種由来の対応する配列で置換されたキメラ抗体(米国特許第4,816,567号)である。実際には、ヒト化抗体は典型的には幾つかのＣＤＲ残基及び場合によっては幾つかのＦＲ残基が齧歯類抗体の類似する部位からの残基によって置換されたヒト抗体である。
【００９４】
また、ヒト抗体は、ファージ表示ライブラリ［Hoogenboom及びWinter，J. Mol. Biol.，227:381(1991)；Marks等，J. Mol. Biol.，222:381 (1991)］を含むこの分野で知られた種々の方法を用いて作製することもできる。また、Cole等及びBoerner等の方法も、ヒトモノクローナル抗体の調製に利用することができる［Cole等，Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy，Alan R. Liss. p.77 (1985)及びBoerner等，J. Immunol.，147(1):86-95 (1991)］。同様に、ヒト抗体はヒト免疫グロブリン座位をトランスジェニック動物、例えば内在性免疫グロブリン遺伝子は部分的又は完全に不活性化されたマウスに導入することにより産生することができる。投与の際に、遺伝子再配列、組立、及び抗体レパートリーを含むあらゆる観点においてヒトに見られるものに非常に類似しているヒト抗体の生産が観察される。このアプローチは、例えば米国特許第5,545,807号；同第5,545,806号；同第5,569,825号；同第5,625,126号；同第5,633,425号；同第5,661,016号、及び次の科

学文献：Marks等，Bio/Technology 10，779-783 (1992)；Lonberg等，Nature 368 856-859 (1994)；Morrison，Nature 368，812-13 (1994)；Fishwild等，Nature Biotechnology 14，845-51 (1996)；Neuberger，Nature Biotechnology 14，826 (1996)；Lonberg及びHuszar，Intern. Rev. Immunol. 13 65-93 (1995)に記載されている。

また、抗体は、上記に記載のような既知の選択及び／又は突然変異誘発法を利用して親和的に成熟している。好ましい親和性成熟抗体は、５倍、より好ましくは１０倍、更により好ましくは２０又は３０倍も成熟抗体の調製の元である出発抗体（一般的には、マウス、ヒト化又はヒト）より高い親和性を有する。

【００９５】

４．二重特異性抗体

二重特異性抗体は、少なくとも二つの異なる抗原に対して結合特異性を有するモノクローナル抗体、好ましくはヒトもしくはヒト化抗体である。本発明の場合においては、結合特異性の一方はＰＲＯに対してであり、他方は任意の他の抗原、好ましくは細胞表面タンパク質又はレセプター又はレセプターサブユニットに対してである。

二重特異性抗体を作製する方法は当該技術分野において周知である。伝統的には、二重特異性抗体の組換え生産は、二つの重鎖が異なる特異性を持つ二つの免疫グロブリン重鎖／軽鎖対の同時発現に基づく［Milstein及びCuello，Nature，305:537-539 (1983)］。免疫グロブリンの重鎖と軽鎖を無作為に取り揃えるため、これらハイブリドーマ（クアドローマ）は１０種の異なる抗体分子の潜在的混合物を生成し、その内の一種のみが正しい二重特異性構造を有する。正しい分子の精製は、アフィニティークロマトグラフィー工程によって通常達成される。同様の手順が1993年5月13日公開のWO93/08829、及びTraunecker等，EMBO J.,10:3655-3656 (1991)に開示されている。

【００９６】

所望の結合特異性（抗体-抗原結合部位）を有する抗体可変ドメインを免疫グロブリン定常ドメイン配列に融合できる。融合は、好ましくは少なくともヒンジ部、ＣＨ２及びＣＨ３領域の一部を含む免疫グロブリン重鎖定常ドメインとのものである。少なくとも一つの融合には軽鎖結合に必要な部位を含む第一の重鎖定常領域（ＣＨ１）が存在することが望ましい。免疫グロブリン重鎖融合をコードするＤＮＡ、及び望むのであれば免疫グロブリン軽鎖を、別々の発現ベクターに挿入し、適当な宿主生物に同時形質移入する。二重特異性抗体を作製するための更なる詳細については、例えばSuresh等，Methods in Enzymology，121:210 (1986)を参照されたい。

WO96/27011に記載された他の方法によれば、一対の抗体分子間の界面を操作して組換え細胞培養から回収される異種二量体の割合を最大にすることができる。好適な界面は抗体定常ドメインのＣＨ３領域の少なくとも一部を含む。この方法では、第一抗体分子の界面からの一又は複数の小さいアミノ酸側鎖がより大きな側鎖（例えばチロシン又はトリプトファン）と置き換えられる。大きな側鎖と同じ又は類似のサイズの相補的「キャビティ」を、大きなアミノ酸側鎖を小さいもの（例えばアラニン又はスレオニン）と置き換えることにより第二の抗体分子の界面に作り出す。これにより、ホモダイマーのような不要の他の最終産物に対してヘテロダイマーの収量を増大させるメカニズムが提供される。

【００９７】

二重特異性抗体は、完全長抗体又は抗体断片（例えば、Ｆ（ａｂ’）$_2$二重特異性抗体）として調製できる。抗体断片から二重特異性抗体を産生する技術もまた文献に記載されている。例えば、化学結合を使用して二重特異性抗体を調製することができる。Brennanら，Science，229:81 (1985) は原型の抗体をタンパク分解性に切断してＦ（ａｂ’）$_2$断片を産生する手順を記述している。これらの断片は、ジチオール錯体形成剤亜砒酸ナトリウムの存在下で還元して近接ジチオールを安定化させ、分子間ジスルフィド形成を防止する。産生されたＦａｂ’断片はついでチオニトロベンゾアート（ＴＮＢ）誘導体に転換される。Ｆａｂ’-ＴＮＢ誘導体の一つをついでメルカプトエチルアミンでの還元によりＦａｂ’-チオールに再転換し、他のＦａｂ’-ＴＮＢ誘導体の等モル量と混合して二重特異性抗体を形成する。作られた二重特異性抗体は酵素の選択的固定化用の薬剤として使用

することができる。

大腸菌からＦａｂ’フラグメントを直接回収でき、これは化学的に結合して二重特異性抗体を形成することができる。Shalaby等，Ｊ．Exp．Med．，175:217-225 (1992)は完全にヒト化された二重特異性抗体Ｆ（ａｂ’）$_2$分子の製造を記述している。各Ｆａｂ’フラグメントは大腸菌から別個に分泌され、インビトロで定方向化学共役を受けて二重特異性抗体を形成する。このようにして形成された二重特異性抗体は、正常なヒトＴ細胞及びＥｒｂＢ２レセプターを過剰発現する細胞に結合可能で、ヒト乳房腫瘍標的に対するヒト細胞障害性リンパ球の細胞溶解活性の誘因となる。

【００９８】

また、組換え細胞培養から直接的に二重特異性抗体断片を作製し分離する様々な方法が記述されている。例えば、二重特異性抗体はロイシンジッパーを使用して生産されている。Kostelny等，J.Immunol．148(5):1547-1553 (1992)。Ｆｏｓ及びＪｕｎタンパク質からのロイシンジッパーペプチドを遺伝子融合により二つの異なった抗体のＦａｂ’部分に結合させる。抗体ホモダイマーをヒンジ領域で還元してモノマーを形成し、ついで再酸化して抗体ヘテロダイマーを形成する。この方法はまた抗体ホモダイマーの生産に対して使用することができる。Hollinger等，Proc.Natl.Acad.Sci．USA，90:6444-6448 (1993)により記述された「ダイアボディ」技術は二重特異性抗体断片を作製する別のメカニズムを提供した。断片は、同一鎖上の二つのドメイン間の対形成を可能にするには十分に短いリンカーにより軽鎖可変ドメイン(V_L)に重鎖可変ドメイン(V_H)を結合してなる。従って、一つの断片のV_H及びV_Lドメインは他の断片の相補的V_L及びV_Hドメインと強制的に対形成させられ、二つの抗原結合部位を形成する。単鎖Ｆｖ（ｓＦｖ）ダイマーの使用により二重特異性抗体断片を製造する他の方策もまた報告されている。Gruber等，J.Immunol．152:5368 (1994)を参照されたい。二価より多い抗体も考えられる。例えば、三重特異性抗体を調製することができる。Tutt等，J.Immunol．147:60 (1991)。

例示的な二重特異性抗体は、ここに与えられたＰＲＯポリペプチドの二つの異なるエピトープに結合しうる。或いは、抗ＰＲＯポリペプチドのアームは、特定のＰＲＯポリペプチド発現細胞に細胞防御メカニズムを集中させるように、Ｔ細胞レセプター分子（例えばＣＤ２、ＣＤ３、ＣＤ２８、又はＢ７）等の白血球上のトリガー分子又はＦｃγＲＩ（ＣＤ６４）、ＦｃγＲII（ＣＤ３２）及びＦｃγＲIII（ＣＤ１６）等のＩｇＧ（ＦｃγＲ）に対するＦｃレセプターに結合するアームと結合しうる。また、二重特異性抗体は特定のＰＲＯポリペプチドを発現する細胞に細胞障害性薬を局在化させるためにも使用されうる。これらの抗体はＰＲＯ結合アーム及び細胞障害性薬又は放射性キレート化剤、例えばＥＯＴＵＢＥ、ＤＰＴＡ、ＤＯＴＡ、又はＴＥＴＡと結合するアームを有する。興味の対象となる他の二重特異性抗体はＰＲＯポリペプチドに結合し、そして更に組織因子（ＴＦ）に結合する。

【００９９】

５．ヘテロコンジュゲート抗体

ヘテロコンジュゲート抗体もまた本発明の範囲に入る。ヘテロコンジュゲート抗体は、二つの共有結合した抗体からなる。このような抗体は、例えば、免疫系細胞を不要な細胞に対してターゲティングさせるため［米国特許第4,676,980号］及びＨＩＶ感染の治療のために［WO91/00360；WO92/200373；EP03089］提案されている。この抗体は、架橋剤に関連したものを含む合成タンパク化学における既知の方法を使用して、インビトロで調製することができると考えられる。例えば、ジスルフィド交換反応を使用するか又はチオエーテル結合を形成することにより、免疫毒素を作製することができる。この目的に対して好適な試薬の例には、イミノチオレート及びメチル-４-メルカプトブチリミデート、及び例えば米国特許第4,676,980号に開示されたものが含まれる。

【０１００】

６．エフェクター機能の加工

本発明の抗体をエフェクター機能について改変し、例えば癌治療における抗体の有効性を向上させることが望ましい。例えば、システイン残基をＦｃ領域に導入し、それにより

、この領域に鎖間ジスルフィド結合を形成するようにしてもよい。そのようにして生成された同種二量体抗体は、向上した内部移行能力及び／又は増加した補体媒介細胞殺傷及び抗体－依存性細胞性細胞障害性（ＡＤＣＣ）を有する可能性がある。Caron等，Ｊ．Exp．Med．176: 1191-1195 (1992)及びShopes，Ｊ．Immunol．148: 2918-2922 (1992)参照。また、向上した抗腫瘍活性を持つ同種二量体抗体は、Wolff等，Cancer research 53: 2560-2565 (1993)に記載されている異種二官能性架橋を用いて調製することができる。或いは、抗体は、二つのＦｃ領域を有するように加工して、それにより補体溶解及びＡＤＣＣ能力を向上させることもできる。Stevenson等，Anti-Cancer Drug Design 3: 219-230 (1989)参照。

【０１０１】

７．免疫コンジュゲート

また、本発明は、化学治療薬、毒素（例えば、細菌、真菌、植物又は動物由来の酵素活性毒素、又はその断片）などの細胞障害性薬、或いは放射性同位体（即ち、放射性コンジュゲート）と抱合している抗体を含む免疫複合体に関する。

このような免疫複合体の生成に有用な化学治療薬を上に記載した。用いることのできる酵素活性毒素及びその断片には、ジフテリアＡ鎖、ジフテリア毒素の非結合活性断片、（緑膿菌からの）外毒素Ａ鎖、リシンＡ鎖、アブリンＡ鎖、モデクシン(modeccin)Ａ鎖、アルファ-サルシン、アレウリテス・フォーディ(Aleurites fordii)タンパク質、ジアンチン(dianthin)タンパク質、フィトラカ・アメリカーナ(Phytolaca americana)タンパク質（PAPI、PAPII、及びPAP-S）、モモルディカ・チャランチア(momordica charantia)インヒビター、クルシン(curcin)、クロチン(crotin)、サパオナリア・オフィシナリス(sapaonaria oficinalis)インヒビター、ゲロニン(gelonin)、ミトゲリン(mitogellin)、レストリクトシン(restrictocin)、フェノマイシン(phenomycin)、エノマイシン(enomycin)及びトリコテセン(tricothecene)が含まれる。放射性コンジュゲート抗体の生成には、様々な放射性ヌクレオチドが利用可能である。例としては、^{212}Ｂｉ、^{131}Ｉ、^{131}Ｉｎ、^{90}Ｙ、及び^{186}Ｒｅが含まれる。

抗体及び細胞障害性薬の複合体は、種々の二官能性タンパク質カップリング剤、例えば、Ｎ-スクシンイミジル-３-(２-ピリジルジチオール)プロピオネート（ＳＰＤＰ）、イミノチオラン（ＩＴ）、イミドエステルの二官能性誘導体（ジメチルアジピミデートＨＣＬ等）、活性エステル（ジスクシンイミジルスベレート等）、アルデヒド（グルタルアルデヒド等）、ビス-アジド化合物（ビス(ｐ-アジドベンゾイル)ヘキサンジアミン等）、ビス-ジアゾニウム誘導体（ビス-(ｐ-ジアゾニウムベンゾイル)-エチレンジアミン等）、ジイソシアネート（トリエン２，６-ジイソシアネート等）、及びビス-活性フッ素化合物（１，５-ジフルオロ-２，４-ジニトロベンゼン等）を用いて作製できる。例えば、リシン免疫毒素は、Vitettaら，Science 238:1098 (1987)に記載されているように調製することができる。カーボン-１４-標識１-イソチオシアナトベンジル-３-メチルジエチレントリアミン五酢酸（ＭＸ-ＤＴＰＡ）は、放射性ヌクレオチドの抗体への抱合のためのキレート剤の例である。WO94/11026参照。

他の実施態様では、腫瘍の予備標的化で使用するために、抗体は「レセプター」（ストレプトアビジン等）に抱合されてもよく、抗体-レセプター複合体は患者に投与され、次いで清澄化剤を用いて未結合複合体を循環から除去し、次に細胞障害性薬（例えば、放射性ヌクレオチド等）に抱合された「リガンド」（アビジン等）を投与する。

【０１０２】

８．免疫リポソーム

また、ここに開示する抗体は、免疫リポソームとして調製してもよい。抗体を含むリポソームは、Epsteinら，Proc．Natl．acad．Sci．USA，82:3688 (1985)；Hwang等，Proc．natl．Acad．Sci．USA，77:4030 (1980)；及び米国特許第4,485,045号及び第4,544,545号に記載されたような、この分野で知られた方法で調製される。向上した循環時間を持つリポソームは、米国特許第5,013,556号に開示されている。

特に有用なリポソームは、ホスファチジルコリン、コレステロール及びＰＥＧ-誘導ホ

スファチジルエタノールアミン（ＰＥＧ-ＰＥ）を含む脂質組成物での逆相蒸発法によって生成される。リポソームは、所定サイズのフィルターを通して押し出され、所望の径を有するリポソームが生成される。本発明の抗体のＦａｂ’断片は、Martin等，J. Biol. Chem. 257:286-288 (1982)に記載されているように、ジスルフィド交換反応を介してリポソームに抱合され得る。化学治療薬（ドキソルビシン等）は、場合によってはリポソーム内に包含される。Gabizon等，J. National Cancer Inst. 81(19) 1484 (1989)参照。

【０１０３】

Ｍ．製薬的組成物

本発明の活性ＰＲＯ分子（例えば、ＰＲＯポリペプチド、抗ＰＲＯ抗体、及び／又は各変異体）並びに上記に開示したスクリーニングアッセイで同定された他の分子は、免疫関連疾患の治療のために、製薬組成物の形態で投与することができる。

本発明の活性ＰＲＯ分子、好ましくはポリペプチド又は抗体の治療製剤は、所望される程度の純度を持つ活性成分を、凍結乾燥製剤又は水性溶液の形態で、最適な製薬上許容される担体、賦形剤又は安定化剤と混合することにより調製され保存される（Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. [1980]）。許容される担体、賦形剤、又は安定化剤は、用いられる用量及び濃度で受容者に非毒性であり、リン酸、クエン酸、及び他の有機酸などの緩衝液；アスコルビン酸及びメチオニンを含む酸化防止剤；防腐剤（オクタデシルジメチルベンジルアンモニウムクロライド；ヘキサメトニウムクロライド；ベンズアルコニウムクロライド；ベンズエトニウムクロライド；フェノール；ブチル又はベンジルアルコール；メチル又はプロピルパラベン等のアルキルパラベン；カテコール；レゾルシノール；シクロヘキサノール；３-ペンタノール；及びｍ-クレゾールなど）；低分子量（約１０残基未満）ポリペプチド；血清アルブミン、ゼラチン、又は免疫グロブリン等のタンパク質；ポリビニルピロリドン等の親水性ポリマー；グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン、又はリシン等のアミノ酸；グルコース、マンノース、又はデキストリンを含む単糖類、二糖類、及び他の炭水化物、ＥＤＴＡ等のキレート剤、スクロース、マンニトール、トレハロース又はソルビトールなどの糖；ナトリウムなどの塩形成対イオン；金属錯体（例えば、Ｚｎ-タンパク質錯体）及び／又はトゥイーン（TWEEN(商品名)）、プルロニクス（PLURONICS(商品名)）、及びポリエチレングリコール（ＰＥＧ）等の非イオン性界面活性剤を含む。

【０１０４】

本発明のスクリーニングアッセイによって同定された化合物は、当該分野において良く知られた技術を用いて、類似の方法で製剤化することができる。

また、リポフェクション又はリポソームを、ＰＲＯ分子を細胞に導入するために利用することができる。抗体断片が用いられる場合には、標的タンパク質の結合ドメインに特異的に結合する最小阻害断片が好ましい。例えば、抗体の可変領域配列に基づいて、標的タンパク質配列に結合する能力を保持するペプチド分子を設計することができる。このようなペプチドは、化学的に合成でき及び／又は組換えＤＮＡ技術によって生成できる。例えば、Marasco等，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 7889-7893 (1993)参照。

ここでの製剤は、治療すべき特定の徴候に必要な場合に一つ以上の活性化合物、好ましくは互いに悪影響を及ぼさない相補的活性を持つものも含んでよい。或いは、又はそれに加えて、組成物は、細胞障害性薬、サイトカイン又は成長阻害剤を含んでもよい。これらの分子は、適切には、意図する目的に有効な量の組み合わせで存在する。

また、活性ＰＲＯ分子は、例えばコアセルベーション技術により又は界面重合により調製されたマイクロカプセル、例えば、各々ヒドロキシメチルセルロース又はゼラチン-マイクロカプセル及びポリ(メタクリル酸メチル)マイクロカプセル中、コロイド状薬物送達系(例えば、リポソーム、アルブミン小球、マイクロエマルション、ナノ粒子及びナノカプセル)中、又はマイクロエマルション中に包括されていてもよい。これらの技術は、Remington's Pharmaceutical Science 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)に開示されている。

インビボ投与に使用される製剤は無菌でなければならない。これは、滅菌濾過膜を通し

た濾過により容易に達成される。

【０１０５】

ＰＲＯ分子の徐放性製剤を調製してもよい。徐放性製剤の好適な例は、抗体を含有する固体疎水性ポリマーの半透性マトリクスを含み、このマトリクスは成形された物品、例えばフィルム、又はマイクロカプセルの形状である。除放性マトリクスの例は、ポリエステル、ヒドロゲル（例えば、ポリ(２-ヒドロキシエチル-メタクリレート)又はポリ(ビニルアルコール)）、ポリラクチド（米国特許第3,773,919号）、Ｌ-グルタミン酸とγ-エチル-Ｌ-グルタマートのコポリマー、非分解性エチレン-酢酸ビニル、LUＰＲＯN DEPOT（商品名）（乳酸-グリコール酸コポリマーと酢酸リュープロリドからなる注射可能なマイクロスフェア）等の分解性乳酸-グリコール酸コポリマー、ポリ-(Ｄ)-３-ヒドロキシブチル酸を含む。エチレン-酢酸ビニル及び乳酸-グリコール酸などのポリマーは分子を１００日に亘って放出することができるが、ある種のヒドロゲルはより短時間でタンパク質を放出してしまう。カプセル化された抗体が身体内に長時間残ると、それらは３７℃の水分に露出されることにより変性又は凝集し、その結果、生物学的活性の低下及び起こりうる免疫原性の変化をもたらす。合理的な方法は、含まれる機構に依存する安定化について工夫することができる。例えば、凝集機構がチオ-ジスルフィド交換を通した分子間Ｓ-Ｓ結合形成であると発見された場合、安定化はスルフヒドリル残基の修飾、酸性溶液からの凍結乾燥、水分含有量の制御、適切な添加剤の付加、及び特異的ポリマーマトリクス組成物の開発によって達成されうる。

【０１０６】

Ｎ．治療方法

本発明のポリペプチド、抗体及び他の活性化合物は、組織への炎症細胞の浸潤によって特徴付けられるものを含む、Ｔ細胞媒介疾患のような乾癬、ＩＢＤ及び関連症状を治療するのに利用することが可能であると考えられている。

脊椎関節症は、いくつかの共通した臨床的特徴とＨＬＡ-Ｂ２７遺伝子産物の発現との共通の関連性を持つ疾患のグループである。該疾患には：Bechterew氏病(ankylosing spondylitis)、ライター症候群（反応性関節炎）、炎症性大腸疾患に関連した関節炎、乾癬に関連した脊椎炎、若年発生脊椎関節症及び未分化脊椎関節症が含まれる。顕著な特徴には、脊椎炎を伴うか伴わない仙腸関節炎；炎症非対称性関節炎；ＨＬＡ-Ｂ２７（クラスＩＭＨＣのＨＬＡ-Ｂ座位にある血清学的に定義された対立遺伝子）との関連；眼の炎症、及び他のリウマチ疾患に関連した自己抗体の不在が含まれる。疾患の誘導に対する鍵として最も関わっている細胞はＣＤ８＋Ｔリンパ球で、クラスＩ ＭＨＣ分子により提示される抗原を標的としている細胞である。ＣＤ８＋Ｔ細胞は、ＭＨＣクラスＩ分子により発現された外来ペプチドであるかのように、クラスＩ ＭＨＣ対立遺伝子ＨＬＡ-Ｂ２７に対して反応する。ＨＬＡ-Ｂ２７のエピトープが細菌性又は他の微生物の抗原性エピトープを模倣し、よってＣＤ８＋細胞の反応を誘発すると仮定されている。

【０１０７】

全身性硬化症（強皮症）は病因がよく知られていない。疾患の顕著な特徴は皮膚の硬結であり；これは活性な炎症プロセスにより誘発されると思われる。強皮症は局部的又は全身性であり：血管病巣が共通しており、微小血管系における内皮細胞傷害が全身性硬化症の発達における初期の重要な事象であり；血管傷害は免疫媒介されうる。免疫学的基準は、皮膚病巣における単核細胞浸潤の存在と、多くの患者において抗細胞核抗体の存在によって導かれる。多くの場合、ＩＣＡＭ-１が皮膚病巣の線維芽細胞の細胞表面でアップレギュレーションされ、これらの細胞とのＴ細胞の相互作用が疾患の病因においてある役割を担っていることが示唆される。関連する他の器官には：胃腸管：結果的に異常なぜん動／運動性となる平滑筋萎縮症及び線維症：腎臓：小弓形及び小葉間動脈に影響を及ぼし、結果として腎皮質の血流が低下し、タンパク尿、高窒素血尿及び高血圧になる同心性内皮下内膜増殖：骨格筋：萎縮、間質性線維症：炎症：肺：間質性肺炎及び間質性線維症：及び心臓：収縮バンド壊死、瘢痕／線維症が含まれる。

水疱性皮膚疾患、多形性紅斑及び接触性皮膚炎を含む自己免疫又は免疫媒介皮膚疾患は

自己抗体により媒介され、その発病はＴリンパ球依存性である。
乾癬はＴリンパ球媒介炎症疾患であるとされている。病巣にはＴリンパ球、マクロファージ及び抗原プロセシング細胞及びある種の好中球の浸潤が含まれる。
拒絶反応及び移植片対宿主疾患（ＧＶＨＤ）を含む移植関連疾患はＴリンパ球依存性であり；Ｔリンパ球の機能を阻害することで改善される。

【０１０８】

本発明の化合物、例えばポリペプチド又は抗体は、哺乳動物、好ましくはヒトに、周知の方法、例えば、ボーラスとして又は所定時間に渡る連続注入による静脈内投与、筋肉内、腹膜内、脳脊髄内、皮下、関節間、滑膜内、鞘内、経口、局所、又は吸入（鼻腔内、肺内の）経路などにより投与される。ポリペプチド及び抗体の静脈内又は吸入投与が好ましい。
免疫アジュバンド療法では、抗癌剤の投与のような他の治療的養生法を本発明のタンパク質、抗体又は化合物の投与と組み合わせてもよい。また、本発明の免疫アジュバンドで治療される患者は、抗癌剤（化学療法剤）又は放射線治療を受けてもよい。このような化学治療剤の調製法及び用量スケジュールは、製造者の指示に従って使用されるか、熟練した実務者により経験的に決定される。そのような化学治療に対する調製法及び用量スケジュールはまたChemotherapy Service M.C. Perry編, Williams & Wilkins, Baltimore, MD (1992)にも記載されている。化学治療剤は、免疫アジュバンドの投与に先立って、又は続いて投与してもよく、或いはそれらと同時に投与してもよい。その上に、抗エストロゲン化合物、例えばタモキシフェン等の抗エストロゲン化合物又はオナプリストンなどの抗プロゲステロン（EP 616812参照）を、これらの分子について知られた用量で与えてもよい。
また、他の免疫疾患関連又は腫瘍関連抗原に対する抗体、例えばＣＤ２０、ＣＤ１１ａ、ＣＤ１８、ＥｒｂＢ２、ＥＧＦＲ、ＥｒｂＢ３、ＥｒｂＢ４、又は血管内皮因子（ＶＥＧＦ）に結合する抗体を投与することも好ましい。或いは、又はその上に、ここで開示される同じ又は二つ以上の異なる抗原と結合する二つ以上の抗体を、患者へ同時投与してもよい。時折、患者にサイトカインを投与することも有利である。好ましい実施態様では、本発明のポリペプチドを、成長阻害剤と同時投与する。例えば、まず成長阻害剤を投与し、続いて本発明のポリペプチドを投与する。しかしながら、同時投与、又は最初に投与することも考えられる。成長阻害剤についての適切な用量は、現在用いられている量であり、成長阻害剤とＰＲＯポリペプチドとの組み合わせ（相乗）効果により減少させてもよい。

【０１０９】

免疫関連疾患の治療又は重症度の軽減のためには、本発明の化合物の適切な用量は、上記に定義したような治療される疾患の型、疾患の重篤さ及び経過、防止又は治療目的で薬剤が投与されるか否か、従前の治療、患者の臨床履歴及び薬剤に対する反応、及び主治医の裁量に依存する。薬剤は、患者に一回又は一連の治療に渡って適切に投与される。
例えば、一又はそれ以上の別々の投与或いは連続注入のどちらでも、例えば、疾患の型及び重篤さに応じて、約１μｇ／ｋｇから１５ｍｇ／ｋｇ（例えば、０．１－２０ｍｇ／ｋｇ）のポリペプチド又は抗体が、患者に投与するための最初の候補用量である。典型的な１日の用量は、上記の要因に応じて、約１μｇ／ｋｇから１００ｍｇ／ｋｇ又はそれ以上であろう。数日以上に渡る繰り返し投与のためには、状態に応じて、疾患の徴候に所望の抑制が現れるまで治療が続けられる。しかしながら、他の用量計画が有用であることもある。従来の技術及びアッセイによって、この治療の進行は容易にモニターされる。

【０１１０】

Ｏ．製造品
本発明のその他の実施態様では、上記の疾患の診断又は治療に有用な物質を含む製造品が提供される。この製造品は容器とラベルとを含んでなる。好適な容器は、例えば、ビン、バイアル、シリンジ、及び試験管を含む。容器は、ガラス又はプラスチックなどの材料から形成されてよい。容器は、状態を診断し治療するのに有効な組成物を収容し、無菌の

アクセスポートを有し得る（例えば、容器は皮下注射針で貫通可能なストッパーを有する静脈内溶液バッグ又はバイアルであってよい）。組成物中の活性剤は本発明のポリペプチド又は抗体である。容器上又は添付されるラベルは、組成物が選択した状態の診断又は治療のために使用されることを示す。製造品は更に、リン酸緩衝塩水、リンガー液及びデキストロース溶液などの製薬的に許容される緩衝液を含む第二の容器を具備してもよい。更に、他の緩衝液、希釈剤、フィルター、針、シリンジ、及び使用上の指示を付けたパッケージ挿入物を含む商業的及び使用者の見地から望ましい他の材料を含んでもよい。

【０１１１】

Ｐ．免疫関連疾患の診断及び予後

細胞表層タンパク質、例えば免疫関連疾患において過剰発現するタンパク質は、候補薬や疾患療法にとって優れた標的である。免疫関連疾患で増幅した遺伝子によってコードされている分泌タンパク質に加えて、これと同じタンパク質には、これら疾患の診断及び予後において更なる用途があることが見出されている。例えば、免疫関連疾患において増幅した遺伝子のタンパク質生産物に対する抗体は、診断上に又は予後兆候として利用できる。

例えば、抗体断片を含む抗体は、増幅又は過剰発現した遺伝子（「マーカー遺伝子産物」）によってコードされたタンパク質の発現の定性的又は定量的検出に用いることができる。抗体は、好ましくは検出可能な、例えば蛍光標識を備え、結合は光学顕微鏡、フローサイトメトリー、蛍光定量法、又はこの分野で知られた他の技術によってモニターできる。過剰発現している遺伝子が細胞表層タンパク質をコードする場合には、これらの技術は特に適している。このような結合アッセイは、上記に記載のように原則的に実施される。

マーカー遺伝子産物に結合する抗体のインサイツ検出は、例えば、免疫蛍光又は免疫電子顕微鏡によって実施できる。この目的のために、組織学的試料を患者から取り出し、好ましくは生物学的試料に抗体を被せることにより、標識抗体をそれに適用する。また、この手法によって、試験される組織におけるマーカー遺伝子産物の分布の決定を可能にする。当業者には、インサイツ検出のために広範な組織学的方法が容易に利用できることは明らかであろう。

【０１１２】

以下の実施例は例示目的のためにのみ提供されるものであって、本発明の範囲を決して限定することを意図するものではない。

本明細書で引用した全ての特許及び参考文献は、その全体を出典明示によりここに取り込む。

【０１１３】

実施例

実施例で言及されている全ての他の市販試薬は、特に示さない限りは製造者の使用説明に従い使用した。ＡＴＣＣ登録番号により以下の実施例及び明細書全体を通して特定されている細胞の供給源はアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション、マナッサス、バージニアである。

【０１１４】

実施例１：マイクロアレイ分析

乾癬患者の皮膚と健常なドナーの皮膚（つまり「正常な皮膚」）のバイオプシーを得た。乾癬患者の各々からは、乾癬組織に異なって発現するこの疾病に特異的な遺伝子を同定するため、病変部位と非病変部位から皮膚の試料を採取した。全ての乾癬皮膚試料を免疫組織化学及び上皮厚によりケラチン１６染色について分析した。ＲＮＡ単離の準備が整うまで、全ての試料を－７０℃で保存した。皮膚のバイオプシーを６００μｌのＲＬＴ緩衝液（＋ＢＭＥ）でホモジナイズし、Ｑｉａｇｅｎ（登録商標）Ｒｎｅａｓｙ　Ｍｉｎｉカラム（Ｑｉａｇｅｎ）を用いて、製造者のガイドラインに従ってオンカラムＤＮａｓｅ処理を行うことによりＲＮＡを単離した。ＲＮＡを単離した後、製造者のガイドラインに従ってＲｉｂｏＧｒｅｅｎ（登録商標）（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｐｒｏｂｅｓ）を用いることによりＲＮＡを定量化し、アガロースゲル上で完全性をチェックした。ＲＮＡ収量は、

乾癬病変皮膚では１９～５４μｇ、対応コントロールの非病変皮膚では７．７～２４μｇ、及び正常皮膚では５．４～１０μｇであった。４μｇのＲＮＡをマイクロアレイ分析用に標識し、試料を専用のジェネンテック社のマイクロアレイ及びＡｆｆｙｍｅｔｒｉｃｓマイクロアレイにかけた。乾癬皮膚において発現が上方制御されたか、又は下方制御された遺伝子を非病変皮膚と比較した。つまり、同一患者の乾癬皮膚と非病変皮膚の発現特性を比較し、また更なるコントロールである正常な健常ドナーの正常皮膚バイオプシーとの比較も行った。

本発明のＰＲＯポリペプチド及び核酸をそれらが炎症性腸疾患に果たす役割について試験するため、マイクロアアレイを用いて正常な腸組織と比較してＩＢＤに過剰発現する遺伝子を発見した。ＩＢＤ患者からバイオプシーを得た。ＩＢＤ患者の各々について、試料は疾病（潰瘍性大腸炎（ＵＣ）又はクローン病）組織と健常な腸とから採取し、発現パターンをよく比較できるようにした。ＲＮＡ単離の準備が整うまで、全ての試料を－７０℃で保存した。皮膚のバイオプシーを６００μｌのＲＬＴ緩衝液（＋ＢＭＥ）でホモジナイズし、Ｑｉａｇｅｎ（登録商標）Ｒｎｅａｓｙ　Ｍｉｎｉカラム（Ｑｉａｇｅｎ）を用いて、製造者のガイドラインに従ってオンカラムＤＮａｓｅ処理を行うことによりＲＮＡを単離した。ＲＮＡを単離した後、製造者のガイドラインに従ってＲｉｂｏＧｒｅｅｎ（登録商標）（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｐｒｏｂｅｓ）を用いることによりＲＮＡを定量化し、アガロースゲル上で完全性をチェックした。適当な量のＲＮＡをマイクロアレイ分析用に標識し、試料を専用のジェネンテック社のマイクロアレイ及びＡｆｆｙｍｅｔｒｉｃｓ（登録商標）マイクロアレイにかけた。ＵＣ又はクローン病組織において発現が上方制御された遺伝子を、正常な腸と比較した。つまり、同一患者の正常な腸の対応するバイオプシーと疾病組織とを比較した。

【０１１５】

同時刺激した場合の本発明のＰＲＯポリペプチドと関連ヌクレオチドの発現を試験する実験において、単離したＣＤ４＋Ｔ細胞の集団を産生するために用いる抗ＣＤ８、抗ＣＤ１６、抗ＣＤ１９、抗ＣＤ３６及び抗ＣＤ５６抗体を含むＲｏｓｓｅｔｔｅＳｅｐ（登録商標）プロトコル（Ｓｔｅｍ　Ｃｅｌｌ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ／バンクーバー、ＢＣ）を用いて単一のドナーからＣＤ４＋Ｔ細胞を精製した。単離されたＣＤ４＋Ｔ細胞を抗ＣＤ３抗体（増殖を刺激しない濃度で使用した）とＩＣＡＭ－１又は抗ＣＤ２８抗体を共に用いて活性化した。２４又は７２時間経過後、細胞を回収し、ＲＮＡを抽出し、Ａｆｆｉｍａｘ（登録商標）（Ａｆｆｙｍｅｔｒｉｘ　Ｉｎｃ．／サンタクララ、ＣＡ）マイクロアレイにより分析した。非刺激（休止）細胞を精製後直ちに回収し、同じ分析を行った。いずれかの時間の経過時点で発現が上方制御されていた遺伝子を、活性化細胞と休止細胞の間で比較した。

リウマチ様関節炎（ＲＡ）についてＰＲＯポリペプチドと関連核酸の発現を実験するため、遺伝子発現情報を含む専用データベース（ＧｅｎｅＥｘｐｒｅｓｓ（登録商標）、Ｇｅｎｅ　Ｌｏｇｉｃ　Ｉｎｃ．，ゲーサーズバーグ、ＭＤ）を分析し、正常組織と比較してＲＡで有意に上方制御されるポリペプチド（及びそれらがコードする核酸）を同定した。特に、ＧｅｎｅＥｘｐｒｅｓｓ（登録商標）データベースの分析は、Ｇｅｎｅ　Ｌｏｇｉｃ　Ｉｎｃ．（ゲーサーズバーグ、ＭＤ）社が販売するＧｅｎｅＥｘｐｒｅｓｓ（登録商標）データベース用のソフトウェアか、又はＧｅｎｅＥｘｐｒｅｓｓ（登録商標）データベースと共用するためにジェネンテック社において設計及び開発された専用ソフトウェアを用いて行われた。分析においてポジティブと評価するための基準には、例えば発現レベル、組織特異性、及び正常必須組織及び／又は正常増殖性組織における発現レベルなど、複数の指標を使用した。以下に列挙するのは、ＧｅｎｅＥｘｐｒｅｓｓ（登録商標）データベースの分析により決定された組織発現特性が、２５の健常な個体から採取した正常ＰＢＭＣと比べて、１２のＲＡ患者のＰＢＭＣに高い組織発現及び有意な発現の上方制御を示し、場合によっては正常必須組織及び／又は正常増殖組織において比較的低い発現レベルを示した分子である。したがって、以下に列挙する分子は、哺乳動物のＲＡの診断及び軽減の良好なポリペプチド標的である。

【０１１６】

図１ないし６４の核酸及びコードされるＰＲＯポリペプチドに関するこれら実験の結果を以下にまとめた。

ＤＮＡ２７５０６２　図１（配列番号１）　ＰＲＯ６２７８２）図２（配列番号２）

ＤＮＡ２７５０６２は、正常大腸と比較した場合、クローン病及び潰瘍性大腸炎由来の大腸試料で２分の１に下方制御された。また、ＣＤ２８又はＩＣＡＭによりＣＤ４　Ｔ細胞を活性化した後では３分の１に下方制御された。

ＤＮＡ２２６３５９　図３（配列番号３：ＰＲＯ３６８２２　）図４（配列番号４）

ＤＮＡ２２６３５９は、正常大腸と比較した場合、クローン病及び潰瘍性大腸炎由来の大腸試料で２分の１に下方制御された。また、ＣＤ２８又はＩＣＡＭによりＣＤ４　Ｔ細胞を活性化した後では３分の１に下方制御され、単球をマクロファージに分化して７日後の分化培地では４分の１に下方制御されていた。

ＤＮＡ２２６７６３　図５（配列番号５）　ＰＲＯ３７２２６　図６（配列番号６）

ＤＮＡ２２６７６３は、正常大腸と比較した場合、潰瘍性大腸炎由来の大腸試料で２倍に上方制御された。また、天然ＣＤ４　Ｔ細胞と比較して免疫記憶Ｔ細胞では２倍に上方制御され、単球をマクロファージに分化して１日後の分化培地において、又はＬＰＳにより活性化した場合、６倍に上方制御されていた。

ＤＮＡ３０４７１６　図７（配列番号７）　ＰＲＯ７１１４２　図８（配列番号８）

ＤＮＡ３０４７１６は、乾癬患者由来の非病変皮膚と比較して病変皮膚では１．５倍に上方制御され、正常大腸と比較して潰瘍性大腸炎患者由来の大腸試料では２倍に上方制御された。また、ＣＤ２８及びＩＣＡＭで活性化したＣＤ４　Ｔ細胞では２倍に上方制御され、単球をマクロファージに分化して１日後の分化培地では８倍に上方制御されており、ＬＰＳで単球を活性化した場合２倍に上方制御され、ＬＰＳで樹状細胞を活性化した場合２倍に上方制御された。

ＤＮＡ２２８０１４　図９（配列番号９）　ＰＲＯ３８４７７　図１０（配列番号１０）

ＤＮＡ２２８０１４は、正常大腸と比較した場合、潰瘍性大腸炎患者の大腸試料で２倍に上方制御され、正常ドナー由来の白血球と比較した場合、リウマチ様関節炎患者由来の白血球で２分の１に下方制御された。また、ＣＤ２８又はＩＣＡＭでＣＤ４　Ｔ細胞を活性化した場合３分の１に下方制御され、単球をマクロファージに分化して１日後の分化培地では３０００分の１に下方制御されていた。

ＤＮＡ１４３４９８　図１１（配列番号１１）　ＰＲＯ１０２７５　図１２（配列番号１２）

ＤＮＡ１４３４９８は、正常大腸と比較した場合、クローン病患者由来の大腸試料において１．５倍に上方制御された。また、ＣＤ２８又はＩＣＡＭでＣＤ４　Ｔ細胞を活性化した場合１．５倍に上方制御され、単球をマクロファージに分化して１日後の分化培地では２倍に上方制御されていた。

ＤＮＡ３２４７９２　図１３（配列番号１３）　ＰＲＯ８１４０７　図１４（配列番号１４）

ＤＮＡ３２４７９２は、正常ドナー由来の白血球と比較した場合、リウマチ様関節炎患者由来の白血球では２倍に上方制御された。また、ＣＤ２８又はＩＣＡＭでＣＤ４　Ｔ細胞を活性化した場合１．５倍に上方制御され、単球をマクロファージに分化して１日後の分化培地では１．３倍に上方制御されており、ＬＰＳで単球と樹状細胞の両方を活性化した場合２倍に上方制御された。

ＤＮＡ２８７３１９　図１５（配列番号１５）　ＰＲＯ６９５８４　図１６（配列番号１６）

ＤＮＡ２８７３１９は、正常大腸と比較した場合、潰瘍性大腸炎患者由来の大腸試料では２倍に、クローン病患者由来の大腸試料では１．５倍に上方制御された。また、ＣＤ２８又はＩＣＡＭでＣＤ４　Ｔ細胞を活性化した場合１．５倍に上方制御された。

ＤＮＡ３３３６２０　図１７（配列番号１７）　ＰＲＯ８８２６３　図１８（配列番号１

８）

ＤＮＡ３３３６２０は、乾癬患者の非病変皮膚と比較して病変皮膚で１．３倍に上方制御され、正常大腸と比較してクローン病患者由来の大腸試料で１．５倍に上方制御され、正常ドナー由来の白血球と比較してリウマチ様関節炎患者由来の白血球で１．３倍に上方制御された。また、ＩＬ１５又はＩＬ１２で活性化したＮＫ細胞で２分の１に下方制御され、単球をマクロファージに分化して１日後の分化培地では３分の１に下方制御されており、ＬＰＳにより樹状細胞を活性化した場合８倍に上方制御された。

ＤＮＡ３２４２７５　図１９（配列番号１９）　ＰＲＯ８０９５８　図２０（配列番号２０）

ＤＮＡ３２４２７５は、正常大腸と比較した場合クローン病患者由来の大腸試料で１．８倍に上方制御された。また、ＣＤ２８又はＩＣＡＭでＣＤ４　Ｔ細胞を活性化した場合２倍に上方制御された。

ＤＮＡ２２７９５２　図２１（配列番号２１）　ＰＲＯ３８４１５　図２２（配列番号２２）

ＤＮＡ２２７９５２は、正常大腸と比較した場合、潰瘍性大腸炎患者由来の大腸試料では２倍に、クローン病患者由来の大腸試料では１．２倍に上方制御された。また、ＣＤ２８又はＩＣＡＭでＣＤ４　Ｔ細胞を活性化した場合２倍に上方制御され、ＩＬ４でＢ細胞を活性化した場合２．５倍に上方制御された。

ＤＮＡ１０３５０７　図２３（配列番号２３）　ＰＲＯ４８３４　図２４（配列番号２４）

ＤＮＡ１０３５０７は、乾癬患者の非病変皮膚と比較して病変皮膚では１．３倍に上方制御され、正常大腸と比較して潰瘍性大腸炎患者由来の大腸試料では１．８倍に上方制御された。また、ＬＰＳで活性化した樹状細胞では３倍に上方制御されていた。

ＤＮＡ２２６２５６　図２５（配列番号２５）　ＰＲＯ３６７１９　図２６（配列番号２６）

ＤＮＡ２２６２５６は、乾癬患者由来の非病変皮膚と比較した場合に病変皮膚で１．３倍に上方制御され、正常大腸と比較した場合、潰瘍性大腸炎患者由来の大腸試料で１．５倍に、クローン病患者由来の大腸試料で２倍に、それぞれ上方制御された。また、ＣＤ２８又はＩＣＡＭでＣＤ４　Ｔ細胞を活性化した場合２分の１に下方制御され、単球をマクロファージに分化して１日後の分化培地において、又はＬＰＳによる活性化後は、４分の１に下方制御されていた。

ＤＮＡ３２４７９９　図２７（配列番号２７）　ＰＲＯ８１４１４　図２８（配列番号２８）

ＤＮＡ３２４７９９は、乾癬患者の非病変皮膚と比較した場合に病変皮膚で１．２倍に上方制御され、正常大腸と比較して潰瘍性大腸炎患者由来の大腸試料で１．５倍に上方制御された。また、単球をマクロファージに分化して７日後の分化培地では２分の１に下方制御され、ＬＰＳで活性化した樹状細胞で４倍に上方制御された。

ＤＮＡ２５５８３６　図２９（配列番号２９）　ＰＲＯ５０８９１　図３０（配列番号３０）

ＤＮＡ２５５８３６は、乾癬患者の非病変皮膚と比較した場合に病変皮膚で２倍に上方制御され、正常大腸と比較して潰瘍性大腸炎患者由来の大腸試料で２．２倍に上方制御された。また、ＩＬ４で活性化したＢ細胞において１．８倍に上方制御され、単球をマクロファージに分化して７日後の分化培地では２倍に下方制御され、ＬＰＳで活性化した樹状細胞で３倍に上方制御された。

ＤＮＡ３３９９７２　図３１（配列番号３１）　ＰＲＯ９１４８０　図３２（配列番号３２）

ＤＮＡ３３９９７２は、乾癬患者由来の非病変皮膚と比較した場合に病変皮膚で１．８分の１に下方制御され、正常大腸と比較してクローン病患者由来の大腸試料で１．５分の１に下方制御された。また、単球をマクロファージに分化して７日後の分化培地では２分の１に下方制御されていた。

ＤＮＡ３２３９１０　図３３（配列番号３３）　ＰＲＯ８０６４８　図３４（配列番号３４）

ＤＮＡ３２３９１０は、乾癬患者由来の非病変皮膚と比較した場合に病変皮膚で４倍に上方制御され、正常ドナー由来の白血球と比較した場合にリウマチ様関節炎患者由来の白血球で１．５分の１に下方制御された。また、ＣＤ２８又はＩＣＡＭでＣＤ４　Ｔ細胞を活性化した場合１０分の１に下方制御され、単球をマクロファージに分化して７日後の分化培地では１０分の１に下方制御されており、ＬＰＳで単球を活性化した場合には２倍に上方制御された。

ＤＮＡ２２６２７２　図３５（配列番号３５）　ＰＲＯ３６７３５　図３６（配列番号３６）

ＤＮＡ２２６２７２は、乾癬患者の非病変皮膚と比較した場合に病変皮膚で１．５倍に上方制御され、正常ドナーの白血球細胞と比較してリウマチ様関節炎患者由来の白血球細胞で１．８倍に上方制御された。また、ＣＤ２８又はＩＣＡＭでＣＤ４　Ｔ細胞を活性化させた場合に１．５倍に上方制御され、単球をマクロファージに分化して１日後の分化培地では２．５分の１に下方制御されていた。

ＤＮＡ１５１７７２　図３７　（配列番号３７）　ＰＲＯ１２０５０　図３８（配列番号３８）

ＤＮＡ１５１７７２は、乾癬患者由来の非病変皮膚と比較した場合に病変皮膚で１．２倍に上方制御され、正常大腸と比較してクローン病由来の大腸試料で２倍に上方制御された。また、ＣＤ２８又はＩＣＡＭでＣＤ４　Ｔ細胞を活性化した場合２倍に上方制御され、単球をマクロファージに分化して７日後の分化培地において２倍に上方制御されており、ＬＰＳで単球及び樹状細胞を活性化した場合２．５倍に上方制御された。

ＤＮＡ３２７９８３　図３９（配列番号３９）　ＰＲＯ８３９０３　図４０（配列番号４０）

ＤＮＡ３２７９８３は、乾癬患者由来の非病変皮膚と比較した場合に病変皮膚で１．５倍に上方制御され、正常大腸と比較してクローン病由来の大腸試料で１．３倍に上方制御され、正常ドナーの白血球細胞と比較してリウマチ様関節炎患者由来の白血球細胞で１．３倍に上方制御された。また、ＣＤ２８又はＩＣＡＭでＣＤ４　Ｔ細胞を活性化した場合に１．５分の１に下方制御され、ＬＰＳで単球を活性化した場合２分の１に下方制御された。

ＤＮＡ２２７０４６　図４１（配列番号４１）　ＰＲＯ３７５０９　図４２（配列番号４２）

ＤＮＡ２２７０４６は、乾癬患者由来の非病変皮膚と比較した場合に病変皮膚で１．８分の１に下方制御され、正常大腸と比較して潰瘍性大腸炎患者及びクローン病患者双方由来の大腸試料で１．３分の１に下方制御され、正常ドナーの白血球細胞と比較してリウマチ様関節炎患者由来の白血球細胞で２分の１に下方制御された。また、ＣＤ２８又はＩＣＡＭでＣＤ４　Ｔ細胞を活性化した場合に２分の１に下方制御され、ＩＬ４で活性化した場合のＢ細胞で１．５分の１に下方制御され、単球をマクロファージに分化して７日後の分化培地において４分の１に下方制御されていた。

ＤＮＡ２２７２９７　図４３（配列番号４３）　ＰＲＯ３７７６０　図４４（配列番号４４）

ＤＮＡ２２７２９７は、乾癬患者由来の非病変皮膚と比較した場合に病変皮膚で１．５倍に上方制御され、正常ドナーの白血球細胞と比較してリウマチ様関節炎患者由来の白血球細胞で１．３倍に上方制御された。また、ＬＰＳで活性化した単球と樹状細胞の両方で１．３倍に上方制御された。

ＤＮＡ３４０４４２　図４５（配列番号４５）　ＰＲＯ９２１７３　図４６（配列番号４６）

ＤＮＡ３４０４４２は、乾癬患者由来の非病変皮膚と比較した場合に病変皮膚で１．５倍に、正常ドナーの白血球細胞と比較してリウマチ様関節炎患者由来の白血球細胞で２．５倍に、それぞれ上方制御された。また、ＣＤ２８又はＩＣＡＭでＣＤ４　Ｔ細胞を活性

化した場合に２．２分の１に下方制御され、単球をマクロファージに分化して７日後の分化培地において１２分の１に下方制御されていた。

ＤＮＡ３２４６４１　図４７（配列番号４７）　ＰＲＯ１０８４９　図４８（配列番号４８）

ＤＮＡ３２４６４１は、乾癬患者由来の非病変皮膚と比較した場合に病変皮膚で１．５分の１に下方制御され、正常大腸と比較して潰瘍性大腸炎患者及びクローン病患者由来の大腸試料で１．５倍に上方制御され、正常ドナーの白血球細胞と比較してリウマチ様関節炎患者由来の白血球細胞で２分の１に下方制御された。また、ＣＤ２８又はＩＣＡＭでＣＤ４　Ｔ細胞を活性化した場合に２分の１に下方制御され、ＩＬ１５又はＩＬ２でＮＫ細胞を活性化した場合に２分の１に下方制御され、単球をマクロファージに分化して７日後の分化培地において３分の１に下方制御されていた。

ＤＮＡ２７５２５７　図４９（配列番号４９）　ＰＲＯ６２９４３　図５０（配列番号５０）

ＤＮＡ２７５２５７は、乾癬患者由来の非病変皮膚と比較した場合に病変皮膚で４倍に上方制御され、正常ドナーの白血球細胞と比較してリウマチ様関節炎患者由来の白血球細胞で２倍に上方制御された。また、ＣＤ２８又はＩＣＡＭでＣＤ４　Ｔ細胞を活性化した場合に２分の１に下方制御され、単球をマクロファージに分化して７日後の分化培地において６分の１に下方制御され、ＬＰＳで単球を活性化した場合に４倍に上方制御された。

ＤＮＡ３３１９０９　図５１（配列番号５１）　ＰＲＯ８６７９５　図５２（配列番号５２）

ＤＮＡ３３１９０９は、乾癬患者由来の非病変皮膚と比較した場合に病変皮膚で２．５倍に上方制御され、正常大腸と比較して潰瘍性大腸炎患者由来の大腸試料で１０倍に上方制御され、正常ドナーの白血球細胞と比較してリウマチ様関節炎患者由来の白血球細胞で１．５倍に上方制御された。また、ＣＤ２８又はＩＣＡＭでＣＤ４　Ｔ細胞を活性化した場合に９分の１に下方制御され、ＩＬ１５又はＩＬ２でＮＫ細胞を活性化した場合に２分の１に下方制御され、単球をマクロファージに分化して７日後の分化培地において４分の１に下方制御されていた。

ＤＮＡ２２６１１１　図５３（配列番号５３）　ＰＲＯ３６５７４　図５４（配列番号５４）

ＤＮＡ２２６１１１は、乾癬患者由来の非病変皮膚と比較した場合に病変皮膚で２．５倍に上方制御されていた。また、単球をマクロファージに分化して７日後の分化培地において８倍に上方制御されていた。

ＤＮＡ２８７２７０　図５５（配列番号５５）　ＰＲＯ６９５４１　図５６（配列番号５６）

ＤＮＡ２８７２７０は、乾癬患者由来の非病変皮膚と比較した場合に病変皮膚で１．２倍に上方制御され、正常大腸と比較してクローン病患者由来の大腸試料で１．２倍に上方制御され、潰瘍性大腸炎患者由来の大腸試料で１．８倍に上方制御された。また、ＣＤ２８又はＩＣＡＭでＣＤ４　Ｔ細胞を活性化した場合に１．８倍に上方制御され、ＩＬ１５又はＩＬ２でＮＫ細胞を活性化した場合に２倍に上方制御された。

ＤＮＡ３２９３６９　図５７（配列番号５７）　ＰＲＯ８４９４８　図５８（配列番号５８）

ＤＮＡ３２９３６９は、乾癬患者由来の非病変皮膚と比較した場合に病変皮膚で２倍に上方制御され、正常大腸と比較してクローン病患者由来の大腸試料で１．５倍に上方制御され、正常ドナーの白血球細胞と比較してリウマチ様関節炎患者由来の白血球細胞で１．５倍に上方制御された。また、単球をマクロファージに分化して１日後の分化培地において１．５倍に上方制御されており、ＬＰＳで単球を活性化した場合に１．５倍に上方制御された。

ＤＮＡ３３０６４５　図５９（配列番号５９）　ＰＲＯ８５８１７　図６０（配列番号６０）

ＤＮＡ３３０６４５は、乾癬患者由来の非病変皮膚と比較した場合に病変皮膚で１．８

倍に上方制御され、正常ドナーの白血球細胞と比較してリウマチ様関節炎患者由来の白血球細胞で２倍に上方制御された。また、ＣＤ２８又はＩＣＡＭでＣＤ４　Ｔ細胞を活性化した場合に２．３倍に上方制御され、単球を活性化した場合に２倍に上方制御され、ＬＰＳで樹状細胞を活性化した場合に４倍に上方制御された。

ＤＮＡ２２７９０８　図６１（配列番号６１）　ＰＲＯ３８３７１　図６２（配列番号６２）

ＤＮＡ２２７９０８は、正常ドナーの白血球細胞と比較してリウマチ様関節炎患者由来の白血球細胞で２．５倍に上方制御された。また、単球をマクロファージに分化して１日後の分化培地において２．５倍に上方制御されていた。

ＤＮＡ３４０３７５　図６３　（配列番号６３）　ＰＲＯ９０９５１　図６４　（配列番号６４）

ＤＮＡ３４０３７５の発現は、クローン病と潰瘍性大腸炎試料の両方で正常大腸の１００倍に増大した。発現はＢ細胞とＴ細胞で最も大きかった。Ｂ細胞において、発現はＩＬ－４で活性化すると１．５分の１に減少した。Ｔ細胞では、発現はＣＤ２８又はＩＣＡＭで活性化した場合２分の１に減少した。

【０１１７】

実施例２：ハイブリダイゼーションプローブとしてのＰＲＯの用途

以下の方法は、ＰＲＯをコードするヌクレオチド配列のハイブリダイゼーションプローブとしての利用を示している。

ここに開示されている完全長又は成熟ＰＲＯをコードする配列を含むＤＮＡは、ヒト組織ｃＤＮＡライブラリ又はヒト組織ゲノムライブラリの相同的なＤＮＡ（ＰＲＯの天然に生じる変異体をコードするもの等）のスクリーニングのためのプローブとして用いられる。

ハイブリダイゼーション及びいずれかのライブラリＤＮＡを含有するフィルターの洗浄を、次の高緊縮性条件下において実施した。放射標識ＰＲＯ誘導プローブのフィルターへのハイブリダイゼーションを、５０％ホルムアミド、５×ＳＳＣ、０．１％ＳＤＳ、０．１％ピロリン酸ナトリウム、５０ｍＭリン酸ナトリウム、ｐＨ６．８、２×デンハード液、及び１０％デキストラン硫酸の溶液中において４２℃で２０時間に亘って実施した。フィルターの洗浄は、０．１×ＳＳＣ及び０．１％ＳＤＳ水溶液中において４２℃で実施した。

次いで、完全長天然配列をコードするＤＮＡと所望の配列同一性を有するＤＮＡを、この分野で知られている標準的技術を用いて同定することができた。

【０１１８】

実施例３：大腸菌におけるＰＲＯの発現

この実施例は、大腸菌中における組換え発現によるＰＲＯの非グリコシル化型の調製を例証する。

まず、ＰＲＯをコード化するＤＮＡ配列を選択されたＰＣＲプライマーを利用して増幅した。このプライマーは、選択された発現ベクター上の制限酵素部位に対応する制限酵素部位を含まなければならない。様々な発現ベクターを使用することができる。適したベクターの例としては、アンピシリン及びテトラサイクリン耐性に対する遺伝子を含むｐＢＲ３２２（大腸菌由来；Bolivar等, Gene, 2:95 (1977)を参照のこと）がある。ベクターを制限酵素によって消化し、脱リン酸化した。次いで、ＰＣＲ増幅配列をベクターにライゲーションした。ベクターは好ましくは抗生物質耐性遺伝子、ｔｒｐプロモーター、ポリＨｉｓリーダー（最初の６つのＳＴＩＩコドン、ポリＨｉｓリーダー、及びエンテロキナーゼ切断部位を含む）、ＰＲＯコード領域、ラムダ転写終末因子及びａｒｇＵ遺伝子をコードする配列を含む。

次いで、Sambrook等（上掲）に記載されている方法を用いて選択された大腸菌株を形質転換するために、このライゲーション混合物を利用した。形質転換体をＬＢプレート上でのその成長能力によって同定し、次いで抗生物質耐性コロニーを選択した。プラスミドＤＮＡを単離し、それを制限分析及びＤＮＡ配列決定によって確認することができた。

選択されたクローンを、抗生物質が補填されたＬＢブロスのような液体培地で一晩かけて成長させることができた。この一晩の培養を、次により大きなスケールでの培養を播種するために使用してもよい。そして細胞を所望の光学密度になるまで成長させ、その間に発現プロモーターが作用し始める。

更に数時間細胞を培養した後に、遠心分離によって細胞を収集することができる。遠心分離によって得られた細胞ペレットは、当該分野で公知の様々な薬剤を使用して可溶化でき、次いでこの溶解したＰＲＯタンパク質を、タンパク質の堅固な結合を可能にする条件下において金属キレート化カラムを用いて精製することが可能である。

【０１１９】

以下の手法を用いて、ポリ-Ｈｉｓタグ形態でＰＲＯを大腸菌で発現させてもよい。ＰＲＯをコードするＤＮＡを、選択したＰＣＲプライマーを用いて最初に増幅した。このプライマーは、選択された発現ベクターの制限酵素部位に対応する制限酵素部位、及び効率的で信頼性のある翻訳開始、金属キレートカラムでの迅速な精製、及びエンテロキナーゼでのタンパク質分解的除去を与える他の有用な配列を含む。次いで、ＰＣＲ増幅されたポリ-Ｈｉｓタグ配列を発現ベクターへライゲートさせ、これを株５２（W3110 fuhA(tonA) lon galE rpoHts(htpRts) clpP(lacIq)）に基づく大腸菌宿主の形質転換に使用した。形質転換体を、最初に５０ｍｇ／ｍｌのカルベニシリンを含有するＬＢ中で、３０℃で振盪しながら３～５のＯ．Ｄ．６００に達するまで成長させた。ついで培養液をＣＲＡＰ培地（３．５７ｇの（NH_4）$_2SO_4$、０．７１ｇのクエン酸ナトリウム・２Ｈ２Ｏ、１．０７ｇのＫＣｌ、５．３６ｇのＤｉｆｃｏ酵母抽出物、５００ｍＬ水中の５．３６ｇのSheffield hycase SF、並びに１１０ｍＭのＭＰＯＳ、ｐＨ７．３、０．５５％（ｗ／ｖ）のグルコース及び７ｍＭの$MgSO_4$の混合で調製）中にて５０～１００倍希釈し、３０℃で振盪によって約２０～３０時間成長させた。ＳＤＳ-ＰＡＧＥにより発現を確認するために試料を取り出し、細胞がペレットとなるようにバルク培地を遠心分離した。精製及びリフォールディング（再折り畳み）まで、細胞ペレットを凍結させた。

【０１２０】

０．５から１Ｌの発酵（６～１０ｇペレット）からの大腸菌ペーストを、７Ｍのグアニジン、２０ｍＭのトリス、ｐＨ８バッファー中で１０容量（ｗ／ｖ）で再懸濁させた。固体硫酸ナトリウム及びテトラチオン酸ナトリウムを添加して最終濃度を各々０．１Ｍ及び０．０２Ｍとし、溶液を４℃で終夜撹拌した。この工程により、すべてのシステイン残基が亜硫酸によりブロックされた変性タンパク質が生じる。溶液をBeckman Ultracentrifuge中で４０，０００ｒｐｍで３０分間濃縮した。上清を金属キレートカラムバッファー（６Ｍのグアニジン、２０ｍＭのトリス、ｐＨ７．４）の３－５容量で希釈し、透明にするために０．２２ミクロンフィルターを通して濾過する。透明抽出物を、金属キレートカラムバッファーで平衡化させた５ｍｌのQiagen Ｎｉ-ＮＴＡ金属キレートカラムに負荷した。カラムを５０ｍＭのイミダゾール（Calbiochem, Utrol grade）を含む添加バッファー、ｐＨ７．４で洗浄した。タンパク質を２５０ｍＭのイミダゾールを含有するバッファーで溶離した。所望のタンパク質を含有する画分をプールし、４℃で保存した。タンパク質濃度は、そのアミノ酸配列に基づいて計算した吸光係数を用いて２８０ｎｍにおけるその吸収により見積もった。

試料を２０ｍＭのトリス、ｐＨ８．６、０．３ＭのＮａＣｌ、２．５Ｍの尿素、５ｍＭのシステイン、２０ｍＭのグリシン及び１ｍＭのＥＤＴＡからなる新たに調製した再ホールド（refold）バッファー中で徐々に希釈することによって、タンパク質を再ホールドさせた。リフォールディング容量は、最終的なタンパク質濃度が５０～１００μｇ／ｍｌとなるように選択した。リフォールディング溶液を４℃で１２～３６時間ゆっくりと撹拌した。リフォールディング反応はＴＦＡを採取濃度０．４％（約３のｐＨ）で添加することにより停止させた。タンパク質をさらに精製する前に、溶液を０．２２ミクロンフィルターを通して濾過し、アセトニトリルを最終濃度２－１０％で添加した。再生したタンパク質を、Ｐｏｒｏｓ Ｒ1／Ｈ逆相カラムで、０．１％ＴＦＡの移動バッファーと１０～８０％のアセトニトリル勾配での溶離を用いてクロマトグラフにかけた。Ａ２８０吸収を持つ

画分のアリコートをＳＤＳポリアクリルアミドゲルで分析し、相同な再生タンパク質を含有する画分をプールした。一般的に、殆どの正しく再生したタンパク質種は、これらの種が最もコンパクトであり、その疎水性内面が逆相樹脂との相互作用から遮蔽されているので、アセトニトリルの最低濃度で溶離される。凝集した種は通常、より高いアセトニトリル濃度で溶離される。誤って再生したタンパク質を所望の形態から除くのに加えて、逆相工程は試料からエンドトキシンも除去する。

所望の再ホールドしたＰＲＯポリペプチドを含有する画分をプールし、溶液に向けた窒素の弱い気流を用いてアセトニトリルを除去した。タンパク質を、透析又は調製バッファーで平衡化したＧ２５Ｓｕｐｅｒｆｉｎｅ（Pharmacia）樹脂でのゲル濾過及び滅菌濾過により、０．１４Ｍの塩化ナトリウム及び４％のマンニトールを含む２０ｍＭのＨｅｐｅｓ、ｐＨ６．８に調製した。

ここで開示された多くのＰＲＯポリペプチドは、上記の方法によって成功裏に発現した。

【０１２１】

実施例４：哺乳動物細胞におけるＰＲＯの発現

この実施例は、哺乳動物細胞における組換え発現による潜在的にグリコシル化した形態のＰＲＯの調製を例証する。

発現ベクターとしてベクターｐＲＫ５（1989年3月15日公開のEP307,247参照）を用いた。場合によっては、ＰＲＯ ＤＮＡを選択した制限酵素を持つｐＲＫ５に結合させ、上記のSambrook等に記載されたようなライゲーション方法を用いてＰＲＯＤＮＡを挿入させる。得られたベクターは、ｐＲＫ５-ＰＲＯと呼ばれる。

一実施態様では、選択された宿主細胞は２９３細胞とすることができる。ヒト２９３細胞（ATCC CCL 1573）は、ウシ胎児血清及び場合によっては滋養成分及び／又は抗生物質を添加したＤＭＥＭなどの培地中で組織培養プレートにおいて成長させて集密化した。約１０μｇのｐＲＫ５-ＰＲＯＤＮＡを約１μｇのＶＡ ＲＮＡ遺伝子コード化ＤＮＡ［Thimmappaya等, Cell, 31:543 (1982))］と混合し、５００μｌの１ｍＭ トリス-ＨＣｌ、０．１ｍＭ ＥＤＴＡ、０．２２７Ｍ $CaCl_2$ に溶解させた。この混合物に、滴状の５００μｌの５０ｍＭ ＨＥＰＥＳ（ｐＨ７．３５）、２８０ｍＭ ＮａＣｌ、１．５ｍＭ $NaPO_4$ を添加し、２５℃で１０分間析出物を形成させた。析出物を懸濁し、２９３細胞に加えて３７℃で約４時間定着させた。培地を吸引し、２ｍｌのＰＢＳ中２０％グリセロールを３０秒間添加した。２９３細胞は、次いで無血清培地で洗浄し、新鮮な培地を添加し、細胞を約5日間インキュベートした。

トランスフェクションの約２４時間後、培地を除去し、培地（のみ）又は２００μＣｉ／ｍｌ ^{35}Ｓ-システイン及び２００μＣｉ／ｍｌ ^{35}Ｓ-メチオニンを含む培地で置換した。１２時間のインキュベーションの後、条件培地を収集し、スピンフィルターで濃縮し、１５％ＳＤＳゲルに添加した。処理したゲルを乾燥させ、ＰＲＯポリペプチドの存在を現す選択された時間にわたってフィルムにさらした。形質転換した細胞を含む培地に、更なるインキュベーションを施し（無血清培地で）、培地を選択されたバイオアッセイで試験した。

【０１２２】

これに換わる技術において、ＰＲＯは、Somparyac等, Proc. Natl. Acad. Sci., 12:7575 (1981)に記載されたデキストラン硫酸法を用いて２９３細胞に一過的に導入される。２９３細胞は、スピナーフラスコ内で最大密度まで成長させ、７００μｇのｐＲＫ５-ＰＲＯＤＮＡを添加する。細胞は、まずスピナーフラスコから遠心分離によって濃縮し、ＰＢＳで洗浄した。ＤＮＡ-デキストラン沈殿物を細胞ペレット上で４時間インキュベートした。細胞を２０％グリセロールで９０秒間処理し、組織培地で洗浄し、組織培地、５μｇ／ｍｌウシインシュリン及び０．１μｇ／ｍｌウシトランスフェリンを含むスピナーフラスコに再度導入した。約４日後に、条件培地を遠心分離して濾過し、細胞及び細胞片を除去した。次いで発現ＰＲＯを含む試料を、透析及び／又はカラムクロマトグラフィー等の選択した方法によって濃縮し精製することが可能である。

他の実施態様では、ＰＲＯをＣＨＯ細胞で発現させることができる。ｐＲＫ５-ＰＲＯは、$CaPO_4$又はＤＥＡＥ－デキストランなどの公知の試薬を用いてＣＨＯ細胞にトランスフェクションすることができる。上記したように、細胞培地をインキュベートし、培地を培養培地（のみ）又は^{35}Ｓ-メチオニン等の放射性標識を含む培地に置換することができる。ＰＲＯポリペプチドの存在を同定した後、培地を無血清培地に置換してもよい。好ましくは、培地を約６日間インキュベートし、次いで条件培地を収集する。次いで、発現ＰＲＯを含む培地を、任意の選択した方法によって濃縮し精製することができる。

また、エピトープタグＰＲＯは、宿主ＣＨＯ細胞において発現させてもよい。ＰＲＯはｐＲＫ５ベクターからサブクローニングしてもよい。サブクローン挿入物は、ＰＣＲを施してバキュロウィルス発現ベクター中のポリ-ｈｉｓタグ等の選択されたエピトープタグを持つ枠に融合できる。次いで、ポリ-ｈｉｓタグＰＲＯ挿入物は、安定なクローンの選択のためのＤＨＦＲ等の選択マーカーを含むＳＶ４０プロモーター／エンハンサー含有ベクターにサブクローニングできる。最後に、ＣＨＯ細胞をＳＶ４０プロモーター／エンハンサー含有ベクターで（上記のように）トランスフェクションした。発現を確認するために、上記のように標識化を行ってもよい。発現されたポリ-ｈｉｓタグＰＲＯを含む培地は、次いで濃縮し、Ni^{2+}-キレートアフィニティクロマトグラフィー等の選択された方法により精製できる。

またＰＲＯは、一過性発現法によりＣＨＯ及び／又はＣＯＳ細胞で、他の安定な発現方法によりＣＨＯ細胞で発現させてもよい。

ＣＨＯ細胞における安定な発現は以下の方法を用いて実施された。タンパク質は、それぞれのタンパク質の可溶化形態のコード配列（例えば、細胞外ドメイン）がＩｇＧ１のヒンジ、ＣＨ２及びＣＨ２ドメインを含む定常領域配列に融合したＩｇＧ作製物（イムノアドヘシン）、又はポリ-Ｈｉｓタグ形態として発現された。

【０１２３】

ＰＣＲ増幅に続いて、対応するＤＮＡを、Ausubel等, Current Protocols of Molecular Biology, Unit 3.26, John Wiley and Sons (1997)に記載されたような標準的技術を用いてＣＨＯ発現ベクターにサブクローニングした。ＣＨＯ発現ベクターは、対象とするＤＮＡの５’及び３’に適合する制限部位を有し、ｃＤＮＡの便利なシャトル化ができるように作製される。ベクターは、Lucas等, Nucl. Acids Res. 24: 9, 1774-1779 (1996)に記載されたようにＣＨＯ細胞での発現を用い、対象とするｃＤＮＡ及びジヒドロフォレートレダクターゼ（ＤＨＦＲ）の発現の制御にＳＶ４０初期プロモーター／エンハンサーを用いる。ＤＨＦＲ発現は、トランスフェクションに続くプラスミドの安定な維持のための選択を可能にする。

所望のプラスミドＤＮＡの１２マイクログラムを、市販のトランスフェクション試薬Superfect(登録商標)（Quiagen）、Dosper(登録商標)及びFugene(登録商標)（Boehringer Mannheim）を用いて約１千万のＣＨＯ細胞に導入する。細胞は、上記のLucas等に記載されているように成長させた。約3×10^7細胞を、下記のような更なる成長及び生産のためにアンプル中で凍結させた。

プラスミドＤＮＡを含むアンプルを水槽に配して解凍し、ボルテックスにより混合した。内容物を１０ｍＬの媒質を含む遠心管にピペットして、１０００ｒｐｍで５分間遠心分離した。上清を吸引して細胞を１０ｍＬの選択培地（０．２μｍ濾過ＰＳ２０、５％の０．２μｍ透析濾過ウシ胎児血清を添加）中に懸濁させた。次いで細胞を９０ｍＬの選択培地を含む１００ｍＬスピナーに分ける。１～２日後、細胞を１５０ｍＬの選択培地を満たした２５０ｍＬスピナーに移し、３７℃でインキュベートする。さらに２～３日後、２５０ｍＬ、５００ｍＬ及び２０００ｍＬのスピナーに3×10^5細胞／ｍＬで播種した。細胞培地を遠心分離により新鮮培地に交換し、生産培地に再懸濁させた。任意の適切なＣＨＯ培地を用いてもよいが、実際には1992年6月16日に発行された米国特許第5,122,469号に記載された生産培地を使用した。３Ｌの生産スピナーを1.2×10^6細胞／ｍＬで播種した。０日目に、ｐＨを測定した。１日目に、スピナーをサンプルし、濾過空気での散布を実施した。２日目に、スピナーをサンプルし、温度を３３℃に変え、３０ｍＬの５００

ｇ／Ｌのグルコース及び０．６ｍＬの１０％消泡剤（例えば３５％ポリジメチルシロキサンエマルション、Dow Corning 365 Medical Grade Emulsion）をとった。生産を通して、ｐＨは７．２近傍に調節し維持した。１０日後、又は生存率が７０％を下回るまで、細胞培地を遠心分離で収集して０．２２μｍフィルターを通して濾過した。濾過物は、４℃で貯蔵するか、即座に精製用カラムに充填した。

【０１２４】

ポリ-Ｈｉｓタグ作製物に関して、タンパク質をＮｉ-ＮＴＡカラム（Qiagen）を用いて精製した。精製の前に、イミダゾールを条件培地に５ｍＭの濃度まで添加した。条件培地を、０．３ＭのＮａＣｌ及び５ｍＭイミダゾールを含む２０ｍＭのＨｅｐｅｓ、ｐＨ７．４バッファーで平衡化した６ｍｌのＮｉ－ＮＴＡカラムへ４－５ｍｌ／分の流速によって４℃でポンプ供給した。充填後、カラムをさらに平衡バッファーで洗浄し、タンパク質を０．２５Ｍイミダゾールを含む平衡バッファーで溶離した。高度に精製されたタンパク質は、続いて１０ｍＭのHepes、０．１４ＭのＮａＣｌ及び４％のマンニトール，ｐＨ６．８を含む貯蔵バッファー中で２５ｍｌのＧ２５Superfine（Pharmacia）を用いて脱塩し、－８０℃で貯蔵した。

イムノアドヘシン（Ｆｃ含有）作製物を、以下通りに条件培地から精製した。条件培地を、２０ｍＭのリン酸ナトリウムバッファー、ｐＨ６．８で平衡化した５ｍｌのプロテインＡカラム（Pharmacia）へポンプ注入した。充填後、カラムを平衡バッファーで強く洗浄した後、１００ｍＭのクエン酸，ｐＨ３．５で溶離した。溶離したタンパク質は、１ｍｌの画分を２７５μＬの１Ｍトリスバッファー，ｐＨ９を含む管に収集することにより即座に中性化した。高度に精製されたタンパク質は、続いてポリ-Ｈｉｓタグタンパク質について上記した貯蔵バッファー中で脱塩した。均一性はＳＤＳポリアクリルアミドゲルとエドマン（Edman）分解によるＮ-末端アミノ酸配列決定により評価した。

ここに開示したＰＲＯポリペプチドの多くが上記のようにして成功裏に発現された。

【０１２５】

実施例５：酵母菌でのＰＲＯの発現

以下の方法は、酵母菌中でのＰＲＯの組換え発現を記載する。

第一に、ＡＤＨ２／ＧＡＰＤＨプロモーターからのＰＲＯの細胞内生産又は分泌のための酵母菌発現ベクターを作製する。ＰＲＯをコードするＤＮＡ及びプロモーターを選択したプラスミドの適当な制限酵素部位に挿入してＰＲＯの細胞内発現を指示する。分泌のために、ＰＲＯをコードするＤＮＡを選択したプラスミドに、ＡＤＨ２／ＧＡＰＤＨプロモーターをコードするＤＮＡ、天然ＰＲＯシグナルペプチド又は他の哺乳動物シグナルペプチド、又は、例えば酵母菌α因子又はインベルターゼ分泌シグナル／リーダー配列、及び（必要ならば）ＰＲＯの発現のためのリンカー配列とともにクローニングすることができる。

酵母菌株ＡＢ１１０等の酵母菌は、次いで上記の発現プラスミドで形質転換し、選択された発酵培地中で培養できる。形質転換した酵母菌上清は、１０％トリクロロ酢酸での沈降及びＳＤＳ－ＰＡＧＥによる分離で分析し、次いでクマシーブルー染色でゲルの染色をすることができる。

続いて組換えＰＲＯは、発酵培地から遠心分離により酵母菌細胞を除去し、次いで選択されたカートリッジフィルターを用いて培地を濃縮することによって単離及び精製できる。ＰＲＯを含む濃縮物は、選択されたカラムクロマトグラフィー樹脂を用いてさらに精製してもよい。

ここに開示したＰＲＯポリペプチドの多くが上記のようにして成功裏に発現された。

【０１２６】

実施例６：バキュロウィルス感染昆虫細胞でのＰＲＯの発現

以下の方法は、バキュロウィルス感染昆虫細胞中におけるＰＲＯの組換え発現を記載する。

ＰＲＯコードする配列を、バキュロウィルス発現ベクターに含まれるエピトープタグの上流に融合させた。このようなエピトープタグは、ポリ-ｈｉｓタグ及び免疫グロブリン

タグ（ＩｇＧのＦｃ領域など）を含む。ｐＶＬ１３９３（Navagen）などの市販されているプラスミドから誘導されるプラスミドを含む種々のプラスミドを用いることができる。簡単には、ＰＲＯ又はＰＲＯコード配列の所定部分、例えば膜貫通タンパク質の細胞外ドメインをコードする配列又はタンパク質が細胞外である場合の成熟タンパク質をコードする配列などが、５’及び３’領域に相補的なプライマーでのＰＣＲにより増幅される。５’プライマーは、隣接する（選択された）制限酵素部位を包含していてもよい。生産物は、次いで、選択された制限酵素で消化され、発現ベクターにサブクローニングされる。

組換えバキュロウィルスは、上記のプラスミド及びBaculoGold(商品名)ウィルスＤＮＡ（Pharmingen）を、Spodoptera frugiperda（「Ｓｆ９」）細胞（ＡＴＣＣ ＣＲＬ １７１１）中にリポフェクチン（GIBCO-BRLから市販）を用いて同時トランスフェクションすることにより作製される。２８℃で４～５日インキュベートした後、放出されたウィルスを収集し、更なる増幅に用いた。ウィルス感染及びタンパク質発現は、O'Reilley等, Baculovirus expression vectors: A laboratory Manual, Oxford: Oxford University Press (1994)に記載されているように実施した。

【０１２７】

次に、発現されたポリ-ｈｉｓタグＰＲＯは、例えばNi^{2+}-キレートアフィニティクロマトグラフィーにより次のように精製される。抽出は、Rupert等, Nature, 362:175-179 (1993)に記載されているように、ウィルス感染した組換えＳｆ９細胞から調製した。簡単には、Ｓｆ９細胞を洗浄し、超音波処理用バッファー（２５ｍＬのＨｅｐｅｓ、ｐＨ７．９；１２．５ｍＭの$MgCl_2$；０．１ｍＭ ＥＤＴＡ；１０％グリセロール；０．１％のＮＰ－４０；０．４ＭのＫＣｌ）中に再懸濁し、氷上で２回２０秒間超音波処理した。超音波処理物を遠心分離で透明化し、上清を負荷バッファー（５０ｍＭリン酸塩、３００ｍＭのＮａＣｌ、１０％グリセロール、ｐＨ７．８）で５０倍希釈し、０．４５μｍフィルターで濾過した。Ni^{2+}-ＮＴＡアガロースカラム（Qiagenから市販）を５ｍＬの総容積で調製し、２５ｍＬの水で洗浄し、２５ｍＬの負荷バッファーで平衡させた。濾過した細胞抽出物は、毎分０．５ｍＬでカラムに負荷した。カラムを、分画収集が始まる点であるA_{280}のベースラインまで負荷バッファーで洗浄した。次に、カラムを、結合タンパク質を非特異的に溶離する二次洗浄バッファー（５０ｍＭリン酸塩；３００ｍＭのＮａＣｌ、１０％グリセロール、ｐＨ６．０）で洗浄した。A_{280}のベースラインに再度到達した後、カラムを二次洗浄バッファー中で０から５００ｍＭイミダゾール勾配で展開した。１ｍＬの分画を収集し、ＳＤＳ-ＰＡＧＥ及び銀染色又はアルカリホスファターゼ（Qiagen）に複合したNi^{2+}-ＮＴＡでのウェスタンブロットで分析した。溶離したHis_{10}-タグＰＲＯを含む画分をプールして負荷バッファーで透析した。

あるいは、ＩｇＧタグ（又はＦｃタグ）ＰＲＯの精製は、例えば、プロテインＡ又はプロテインＧカラムクロマトグラフィーを含む公知のクロマトグラフィー技術を用いて実施できる。

ここに開示したＰＲＯポリペプチドの多くが上記のようにして成功裏に発現された。

【０１２８】

実施例７：ＰＲＯに結合する抗体の調製

この実施例は、ＰＲＯに特異的に結合できるモノクローナル抗体の調製を例示する。

モノクローナル抗体の生産のための技術は、この分野で知られており、例えば、上記のGodingに記載されている。用いられ得る免疫原は、精製ＰＲＯ、ＰＲＯを含む融合タンパク質、細胞表面に組換えＰＲＯを発現する細胞を含む。免疫原の選択は、当業者が過度の実験をすることなくなすことができる。

Ｂａｌｂ／ｃ等のマウスを、完全フロイントアジュバントに乳化して皮下又は腹腔内に１－１００マイクログラムで注入したＰＲＯ免疫原で免疫化する。あるいは、免疫原をＭＰＬ－ＴＤＭアジュバント（Ribi Immunochemical Researh, ハミルトン, モンタナ）に乳化し、動物の後足蹠に注入してもよい。免疫化したマウスは、次いで１０から１２日後に、選択したアジュバント中に乳化した付加的免疫源で追加免疫する。その後、数週間、マウスをさらなる免疫化注射で追加免疫する。抗ＰＲＯ抗体の検出のためのＥＬＩＳＡア

ッセイで試験するために、レトロオービタル出血からの血清試料をマウスから周期的に採取してもよい。

適当な抗体力価が検出された後、抗体に「ポジティブ（陽性）」な動物に、ＰＲＯ静脈内注射の最後の注入をすることができる。３から４日後、マウスを屠殺し、脾臓細胞を取り出した。次いで脾臓細胞を（３５％ポリエチレングリコールを用いて）、ＡＣＴＴから番号ＣＲＬ１５９７で入手可能なＰ３Ｘ６３ＡｇＵ．１等の選択されたマウス骨髄腫株化細胞に融合させた。融合によりハイブリドーマ細胞が生成され、次いで、ＨＡＴ（ヒポキサンチン、アミノプテリン、及びチミジン）培地を含む９６ウェル組織培養プレートに蒔き、非融合細胞、骨髄腫ハイブリッド、及び脾臓細胞ハイブリッドの増殖を阻害した。

ハイブリドーマ細胞は、ＰＲＯに対する反応性についてのＥＬＩＳＡでスクリーニングされる。ＰＲＯに対する所望のモノクローナル抗体を分泌する「ポジティブ（陽性）」ハイブリドーマ細胞の決定は、技術常識の範囲内である。

陽性ハイブリドーマ細胞を同系のＢａｌｂ／ｃマウスに腹腔内注入し、抗ＰＲＯモノクローナル抗体を含む腹水を生成させる。あるいは、ハイブリドーマ細胞を、組織培養フラスコ又はローラーボトルで成長させることもできる。腹水中に生成されたモノクローナル抗体の精製は、硫酸アンモニウム沈降、それに続くゲル排除クロマトグラフィーを用いて行うことができる。あるいは、抗体のプロテインＡ又はプロテインＧへの親和性に基づくアフィニティクロマトグラフィーを用いることもできる。

【０１２９】

実施例８：特異的抗体を用いたＰＲＯポリペプチドの精製

天然又は組換えＰＲＯポリペプチドは、この分野の種々の標準的なタンパク質精製方法によって精製できる。例えば、プロ-ＰＲＯポリペプチド、成熟ポリペプチド、又はプレ-ＰＲＯポリペプチドは、対象とするＰＲＯポリペプチドに特異的な抗体を用いた免疫親和性クロマトグラフィーによって精製される。一般に、免疫親和性カラムは抗ＰＲＯポリペプチド抗体を活性化クロマトグラフィー樹脂に共有結合させて作製される。

ポリクローナル免疫グロブリンは、硫酸アンモニウムでの沈殿又は固定化プロテインＡ（Pharmacia LKB Biotechnology, Piscataway, N.J.）での精製のいずれかにより免疫血清から調製される。同様に、モノクローナル抗体は、硫酸アンモニウム沈殿又は固定化プロテインＡでのクロマトグラフィーによりマウス腹水液から調製される。部分的に精製された免疫グロブリンは、ＣｎＢｒ-活性化セファロース(商品名)（Pharmacia LKB Biotechnology）等のクロマトグラフィー樹脂に共有結合される。抗体が樹脂に結合され、樹脂がブロックされ、誘導体樹脂は製造者の指示に従って洗浄される。

このような免疫親和性カラムは、可溶化形態のＰＲＯポリペプチドを含有する細胞からの画分を調製することによるＰＲＯポリペプチドの精製において利用される。この調製物は、洗浄剤の添加又はこの分野で公知の方法により微分遠心分離を介して得られる全細胞又は細胞成分画分の可溶化により誘導される。あるいは、シグナル配列を含む可溶化ＰＲＯポリペプチドは、細胞が成長する培地中に有用な量で分泌される。

可溶化ＰＲＯポリペプチド含有調製物は、免疫親和性カラムを通され、カラムはＰＲＯポリペプチドの好ましい吸着をさせる条件下（例えば、洗浄剤存在下の高イオン強度バッファー）で洗浄される。次いで、カラムは、抗体／ＰＲＯポリペプチド結合を分解する条件下（例えば、約２～３といった低ｐＨ、高濃度の尿素又はチオシアン酸イオン等のカオトロープ）で溶離され、ＰＲＯポリペプチドが収集される。

【０１３０】

実施例９：薬物スクリーニング

本発明は、ＰＲＯポリペプチド又はその結合断片を種々の薬物スクリーニング技術において使用することによる化合物のスクリーニングとって特に有用である。そのような試験に用いられるＰＲＯポリペプチド又は断片は、溶液中の自由状態でも、固体支持体に固定されても、細胞表面に担持されていても、或いは細胞内に位置していてもよい。薬剤スクリーニングの一つの方法では、ＰＲＯポリペプチド又は断片を発現する組換え核酸で安定にトランスフェクションされる真核生物又は原核生物宿主細胞を利用する。薬剤は、その

ようなトランスフェクション細胞に対して、競合的結合アッセイによってスクリーニングされる。生存可能又は固定化形態のいずれかによって、このような細胞は標準的な結合アッセイで使用できる。例えば、ＰＲＯポリペプチド又は断片と試験される試薬の間での複合体の形成を測定してよい。あるいは、試験する試薬によって生ずるＰＲＯポリペプチドとその標的細胞との間の複合体形成における減少を試験することもできる。

従って、本発明は、ＰＲＯポリペプチド関連疾患又は障害に影響を与えうる薬剤又は任意の他の試薬のスクリーニング方法を提供する。これらの方法は、その試薬をＰＲＯポリペプチド又は断片に接触させ、（ｉ）試薬とＰＲＯポリペプチド又は断片との間の複合体の存在について、又は（ｉｉ）ＰＲＯポリペプチド又は断片と細胞との間の複合体の存在について、検定することを含む。これらの競合結合アッセイでは、ＰＲＯポリペプチド又は断片が典型的には標識される。適切なインキュベーションの後、自由なＰＲＯポリペプチド又は断片を結合形態のものから分離し、自由又は未複合の標識の量が、特定の試薬がＰＲＯポリペプチドに結合する又はＰＲＯポリペプチド／細胞複合体を阻害する能力の尺度となる。

薬剤スクリーニングのための他の技術は、ポリペプチドに対して適当な結合親和性を持つ化合物についての高スループットスクリーニングを提供し、1984年9月13日に公開されたＷＯ84/03564に詳細に記載されている。簡単に述べれば、多数の異なる小型ペプチド試験化合物が、プラスチックピン等の固体支持体又は幾つかの他の表面上で合成される。ＰＲＯポリペプチドに適用すると、ペプチド試験化合物はＰＲＯポリペプチドと反応して洗浄される。結合したＰＲＯポリペプチドはこの分野で良く知られた方法により検出される。精製したＰＲＯポリペプチドは、上記の薬剤スクリーニング技術に使用するためにプレート上に直接被覆することもできる。さらに、非中和抗体は、ペプチドを捕捉し、それを固体支持体上に固定化するのに使用できる。

また、本発明は、ＰＲＯポリペプチドに結合可能な中和抗体がＰＲＯポリペプチド又はその断片について試験化合物と特異的に競合する競合薬剤スクリーニングアッセイも考慮する。この方法において、抗体は、ＰＲＯポリペプチドで、一つ又は複数の抗原決定基を持つ任意のペプチドの存在を検出するのに使用できる。

【０１３１】

実施例１０：合理的薬物設計

合理的薬物設計の目的は、対象とする生物学的活性ポリペプチド（すなわち、ＰＲＯポリペプチド）又はそれらが相互作用する小分子、例えばアゴニスト、アンタゴニスト、又はインヒビターの構造的類似物を製造することである。これらの例の任意のものが、ＰＲＯポリペプチドのより活性で安定な形態又はインビボでＰＲＯポリペプチドに機能を促進又は阻害する薬物の創作に使用できる（参考、Hodgson, Bio/Technology, 9: 19-21 (1991)）。

一つの方法において、ＰＲＯポリペプチド、又はＰＲＯポリペプチド-インヒビター複合体の三次元構造が、Ｘ線結晶学により、コンピュータモデル化により、最も典型的には二つの方法の組み合わせにより決定される。分子の構造を解明し活性部位を決定するためには、ＰＲＯポリペプチドの形状及び電荷の両方が確認されなければならない。数は少ないが、ＰＲＯポリペプチドの構造に関する有用な情報が相同タンパク質の構造に基づいたモデル化によって得られることもある。両方の場合において、関連する構造情報は、類似ＰＲＯポリペプチド様分子の設計又は効果的なインヒビターの同定に使用される。合理的な薬剤設計の有用な例は、Braxton及びWells, Biochemistry, 31:7796-7801 (1992)に示されているような向上した活性又は安定性を持つ分子、又はAthauda等, J. Biochem., 113:742-746 (1993)に示されているような天然ペプチドのインヒビター、アゴニスト、又はアンタゴニストとして作用する分子を含む。

また、上記のような機能アッセイによって選択された標的特異的な抗体を単離しその結晶構造を解明することもできる。この方法は、原理的には、それに続く薬剤設計が基礎をおくことのできるファーマコア(pharmacore)を生成する。機能的な薬理学的に活性な抗体に対する抗-イディオタイプ抗体（抗-ｉｄｓ）を生成することにより、タンパク質結晶学

をバイパスすることができる。鏡像の鏡像として、抗-ｉｄｓの結合部位は最初のレセプターの類似物であると予測できる。抗-ｉｄは、次いで、化学的又は生物学的に製造したペプチドのバンクからペプチドを同定及び単離するのに使用できる。単離されたペプチドは、ファーマコアとして機能するであろう。

本発明によって、Ｘ線結晶学などの分析実験を実施するために十分な量のＰＲＯポリペプチドが入手可能である。さらに、ここに提供したＰＲＯポリペプチドアミノ酸配列の知識は、Ｘ線結晶学に代わる又はそれに加わるコンピュータモデル化技術で用いられるガイダンスを提供する。

【０１３２】

上記の文書による明細書は、当業者による本発明の実施を十分可能にするものであると考えられる。本発明は、寄託された実施品が本発明のある態様の一つの例証として意図されているため、寄託された作製物により範囲が制限されるのではなく、機能的に均等であるあらゆる作製物は本発明の範囲内にある。本明細書中の材料の寄託は、本明細書内に記載された説明が、その最良の態様を含む本発明の任意の態様の実施を可能にするのに不十分なことを認めるものではないし、それが表す特定の例証に対して特許請求の範囲を制限するものであると解釈するべきではない。実際に、本明細書で示され記載されたものに加えて、本発明の様々な変更が、上記の説明により当業者には明白であり、添付の特許請求の範囲に含まれる。

【図面の簡単な説明】

【０１３３】

【図１】天然配列ＰＲＯ６２７８２　ｃＤＮＡのヌクレオチド配列（配列番号１）を示し、配列番号１は本明細書で「ＤＮＡ２７５０６２」と命名されたクローンである。

【図２】図１に示される配列番号１のコード配列に由来するアミノ酸配列（配列番号２）を示す。

【図３】天然配列ＰＲＯ３６８２２　ｃＤＮＡのヌクレオチド配列（配列番号３）を示し、配列番号３は本明細書で「ＤＮＡ２２６３５９」と命名されたクローンである。

【図４】図３に示される配列番号３のコード配列に由来するアミノ酸配列（配列番号４）を示す。

【図５】天然配列ＰＲＯ３７２２６　ｃＤＮＡのヌクレオチド配列（配列番号５）を示し、配列番号５は本明細書で「ＤＮＡ２２６７６３」と命名されたクローンである。

【図６】図５に示される配列番号５のコード配列に由来するアミノ酸配列（配列番号６）を示す。

【図７】天然配列ＰＲＯ７１１４２　ｃＤＮＡのヌクレオチド配列（配列番号７）を示し、配列番号７は本明細書で「ＤＮＡ３０４７１６」と命名されたクローンである。

【図８】図７に示される配列番号７のコード配列に由来するアミノ酸配列（配列番号８）を示す。

【図９】天然配列ＰＲＯ３８４７７　ｃＤＮＡのヌクレオチド配列（配列番号９）を示し、配列番号９は本明細書で「ＤＮＡ２２８０１４」と命名されたクローンである。

【図１０】図９に示される配列番号９のコード配列に由来するアミノ酸配列（配列番号１０）を示す。

【図１１】天然配列ＰＲＯ１０２７５　ｃＤＮＡのヌクレオチド配列（配列番号１１）を示し、配列番号１１は本明細書で「ＤＮＡ１４３４９８」と命名されたクローンである。

【図１２】図１１に示される配列番号１１のコード配列に由来するアミノ酸配列（配列番号１２）を示す。

【図１３Ａ】天然配列ＰＲＯ８１４０７　ｃＤＮＡのヌクレオチド配列（配列番号１３）を示し、配列番号１３は本明細書で「ＤＮＡ３２４７９２」と命名されたクローンである。

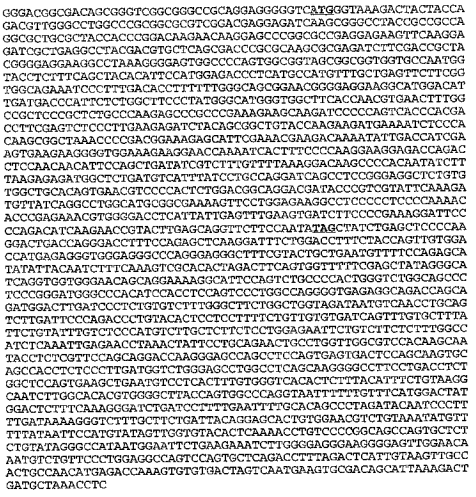
【図１３Ｂ】天然配列ＰＲＯ８１４０７　ｃＤＮＡのヌクレオチド配列（配列番号１３）を示し、配列番号１３は本明細書で「ＤＮＡ３２４７９２」と命名されたクローンである。

【図１４】図１３Ａ－Ｂに示される配列番号１３のコード配列に由来するアミノ酸配列（配列番号１４）を示す。
【図１５】天然配列ＰＲＯ６９５８４　ｃＤＮＡのヌクレオチド配列（配列番号１５）を示し、配列番号１５は本明細書で「ＤＮＡ２８７３１９」と命名されたクローンである。
【図１６】図１５に示される配列番号１５のコード配列に由来するアミノ酸配列（配列番号１６）を示す。
【図１７】天然配列ＰＲＯ８８２６３　ｃＤＮＡのヌクレオチド配列（配列番号１７）を示し、配列番号１７は本明細書で「ＤＮＡ３３３６２０」と命名されたクローンである。
【図１８】図１７に示される配列番号１７のコード配列に由来するアミノ酸配列（配列番号１８）を示す。
【図１９】天然配列ＰＲＯ８０９５８　ｃＤＮＡのヌクレオチド配列（配列番号１９）を示し、配列番号１９は本明細書で「ＤＮＡ３２４２７５」と命名されたクローンである。
【図２０】図１９に示される配列番号１９のコード配列に由来するアミノ酸配列（配列番号２０）を示す。
【図２１】天然配列ＰＲＯ３８４１５　ｃＤＮＡのヌクレオチド配列（配列番号２１）を示し、配列番号２１は本明細書で「ＤＮＡ２２７９５２」と命名されたクローンである。
【図２２】図２１に示される配列番号２１のコード配列に由来するアミノ酸配列（配列番号２２）を示す。
【図２３】天然配列ＰＲＯ４８３４　ｃＤＮＡのヌクレオチド配列（配列番号２３）を示し、配列番号２３は本明細書で「ＤＮＡ１０３５０７」と命名されたクローンである。
【図２４】図２３に示される配列番号２３のコード配列に由来するアミノ酸配列（配列番号２４）を示す。
【図２５】天然配列ＰＲＯ３６７１９　ｃＤＮＡのヌクレオチド配列（配列番号２５）を示し、配列番号２５は本明細書で「ＤＮＡ２２６２５６」と命名されたクローンである。
【図２６】図２５に示される配列番号２５のコード配列に由来するアミノ酸配列（配列番号２６）を示す。
【図２７】天然配列ＰＲＯ８１４１４　ｃＤＮＡのヌクレオチド配列（配列番号２７）を示し、配列番号２７は本明細書で「ＤＮＡ３２４７９９」と命名されたクローンである。
【図２８】図２７に示される配列番号２７のコード配列に由来するアミノ酸配列（配列番号２８）を示す。
【図２９】天然配列ＰＲＯ５０８９１　ｃＤＮＡのヌクレオチド配列（配列番号２９）を示し、配列番号２９は本明細書で「ＤＮＡ２５５８３６」と命名されたクローンである。
【図３０】図２９に示される配列番号２９のコード配列に由来するアミノ酸配列（配列番号３０）を示す。
【図３１Ａ】天然配列ＰＲＯ９１４８０　ｃＤＮＡのヌクレオチド配列（配列番号３１）を示し、配列番号３１は本明細書で「ＤＮＡ３３９９７２」と命名されたクローンである。
【図３１Ｂ】天然配列ＰＲＯ９１４８０　ｃＤＮＡのヌクレオチド配列（配列番号３１）を示し、配列番号３１は本明細書で「ＤＮＡ３３９９７２」と命名されたクローンである。
【図３２】図３１Ａ－Ｂに示される配列番号３１のコード配列に由来するアミノ酸配列（配列番号３２）を示す。
【図３３】天然配列ＰＲＯ８０６４８　ｃＤＮＡのヌクレオチド配列（配列番号３３）を示し、配列番号３３は本明細書で「ＤＮＡ３２３９１０」と命名されたクローンである。
【図３４】図３３に示される配列番号３３のコード配列に由来するアミノ酸配列（配列番号３４）を示す。
【図３５】天然配列ＰＲＯ３６７３５　ｃＤＮＡのヌクレオチド配列（配列番号３５）を示し、配列番号３５は本明細書で「ＤＮＡ２２６２７２」と命名されたクローンである。
【図３６】図３５に示される配列番号３５のコード配列に由来するアミノ酸配列（配列番号３６）を示す。

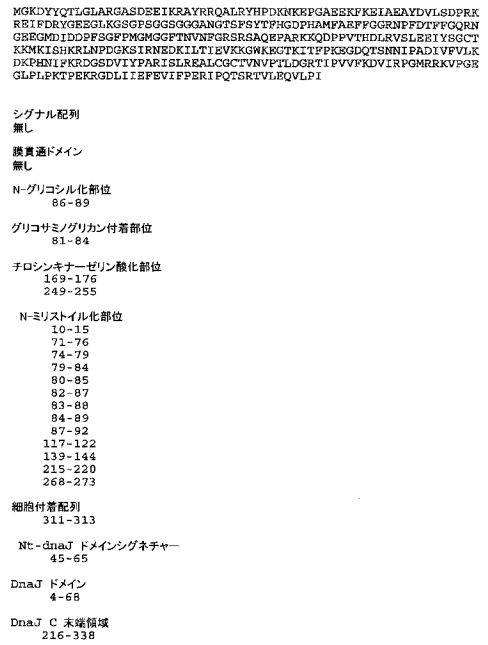
【図３７】天然配列ＰＲＯ１２０５０　ｃＤＮＡのヌクレオチド配列（配列番号３７）を示し、配列番号３７は本明細書で「ＤＮＡ１５１７７２」と命名されたクローンである。
【図３８】図３７に示される配列番号３７のコード配列に由来するアミノ酸配列（配列番号３８）を示す。
【図３９Ａ】天然配列ＰＲＯ８３９０３　ｃＤＮＡのヌクレオチド配列（配列番号３９）を示し、配列番号３９は本明細書で「ＤＮＡ３２７９８３」と命名されたクローンである。
【図３９Ｂ】天然配列ＰＲＯ８３９０３　ｃＤＮＡのヌクレオチド配列（配列番号３９）を示し、配列番号３９は本明細書で「ＤＮＡ３２７９８３」と命名されたクローンである。
【図４０】図３９Ａ－Ｂに示される配列番号３９のコード配列に由来するアミノ酸配列（配列番号４０）を示す。
【図４１Ａ】天然配列ＰＲＯ３７５０９　ｃＤＮＡのヌクレオチド配列（配列番号４１）を示し、配列番号４１は本明細書で「ＤＮＡ２２７０４６」と命名されたクローンである。
【図４１Ｂ】天然配列ＰＲＯ３７５０９　ｃＤＮＡのヌクレオチド配列（配列番号４１）を示し、配列番号４１は本明細書で「ＤＮＡ２２７０４６」と命名されたクローンである。
【図４１Ｃ】天然配列ＰＲＯ３７５０９　ｃＤＮＡのヌクレオチド配列（配列番号４１）を示し、配列番号４１は本明細書で「ＤＮＡ２２７０４６」と命名されたクローンである。
【図４２Ａ】図４１Ａ－Ｃに示される配列番号４１のコード配列に由来するアミノ酸配列（配列番号４２）を示す。
【図４２Ｂ】図４１Ａ－Ｃに示される配列番号４１のコード配列に由来するアミノ酸配列（配列番号４２）を示す。
【図４３】天然配列ＰＲＯ３７７６０　ｃＤＮＡのヌクレオチド配列（配列番号４３）を示し、配列番号４３は本明細書で「ＤＮＡ２２７２９７」と命名されたクローンである。
【図４４】図４３に示される配列番号４３のコード配列に由来するアミノ酸配列（配列番号４４）を示す。
【図４５】天然配列ＰＲＯ９２１７３　ｃＤＮＡのヌクレオチド配列（配列番号４５）を示し、配列番号４５は本明細書で「ＤＮＡ３４０４４２」と命名されたクローンである。
【図４６】図４５に示される配列番号４５のコード配列に由来するアミノ酸配列（配列番号４６）を示す。
【図４７】天然配列ＰＲＯ１０８４９　ｃＤＮＡのヌクレオチド配列（配列番号４７）を示し、配列番号４７は本明細書で「ＤＮＡ３２４６４１」と命名されたクローンである。
【図４８】図４７に示される配列番号４７のコード配列に由来するアミノ酸配列（配列番号４８）を示す。
【図４９】天然配列ＰＲＯ８３６４９　ｃＤＮＡのヌクレオチド配列（配列番号４９）を示し、配列番号４９は本明細書で「ＤＮＡ３２７６５１」と命名されたクローンである。
【図５０】図４９に示される配列番号４９のコード配列に由来するアミノ酸配列（配列番号５０）を示す。
【図５１】天然配列ＰＲＯ８６７９５　ｃＤＮＡのヌクレオチド配列（配列番号５１）を示し、配列番号５１は本明細書で「ＤＮＡ３３１９０９」と命名されたクローンである。
【図５２】図５１に示される配列番号５１のコード配列に由来するアミノ酸配列（配列番号５２）を示す。
【図５３】天然配列ＰＲＯ３６５７４　ｃＤＮＡのヌクレオチド配列（配列番号５３）を示し、配列番号５３は本明細書で「ＤＮＡ２２６１１１」と命名されたクローンである。
【図５４】図５３に示される配列番号５３のコード配列に由来するアミノ酸配列（配列番号５４）を示す。
【図５５】天然配列ＰＲＯ６９５４１　ｃＤＮＡのヌクレオチド配列（配列番号５５）を

示し、配列番号５５は本明細書で「ＤＮＡ２８７２７０」と命名されたクローンである。
【図５６】図５５に示される配列番号５５のコード配列に由来するアミノ酸配列（配列番号５６）を示す。
【図５７】天然配列ＰＲＯ８４９４８　ｃＤＮＡのヌクレオチド配列（配列番号５７）を示し、配列番号５７は本明細書で「ＤＮＡ３２９３６９」と命名されたクローンである。
【図５８】図５７に示される配列番号５７のコード配列に由来するアミノ酸配列（配列番号５８）を示す。
【図５９Ａ】天然配列ＰＲＯ８５８１７　ｃＤＮＡのヌクレオチド配列（配列番号５９）を示し、配列番号５９は本明細書で「ＤＮＡ３３０６４５」と命名されたクローンである。
【図５９Ｂ】天然配列ＰＲＯ８５８１７　ｃＤＮＡのヌクレオチド配列（配列番号５９）を示し、配列番号５９は本明細書で「ＤＮＡ３３０６４５」と命名されたクローンである。
【図６０】図５９Ａ－Ｂに示される配列番号５９のコード配列に由来するアミノ酸配列（配列番号６０）を示す。
【図６１Ａ】天然配列ＰＲＯ３８３７１　ｃＤＮＡのヌクレオチド配列（配列番号６１）を示し、配列番号６１は本明細書で「ＤＮＡ２２７９０８」と命名されたクローンである。
【図６１Ｂ】天然配列ＰＲＯ３８３７１　ｃＤＮＡのヌクレオチド配列（配列番号６１）を示し、配列番号６１は本明細書で「ＤＮＡ２２７９０８」と命名されたクローンである。
【図６２Ａ】図６１Ａ－Ｂに示される配列番号６１のコード配列に由来するアミノ酸配列（配列番号６２）を示す。
【図６２Ｂ】図６１Ａ－Ｂに示される配列番号６１のコード配列に由来するアミノ酸配列（配列番号６２）を示す。
【図６３】天然配列ＰＲＯ９０９５１　ｃＤＮＡのヌクレオチド配列（配列番号６３）を示し、配列番号６３は本明細書で「ＤＮＡ３４０３７５」と命名されたクローンである。
【図６４】図６３に示される配列番号６３のコード配列に由来するアミノ酸配列（配列番号６４）を示す。

【図１】



【図２】


MGKDYYQTLGLARGASDEEIKRAYRRQALRYHPDKNKEPGAEEKFKEIAEAYDVLSDPRK
RREIFDRYGEEGLKGSGPSGGSGGGANGTSFSYTFHGDPHAMFAEFFGGRNPFDTFFGQRN
GEEGMDIDDPFSGFPMGMGGFTNVNFGRSRSAQEPARKKQDPPVTHDLRVSLEEIYSGCT
KKMKISHKRLNPDGKSIRNEDKILTIEVKKGWKEGTKITFPKEGDQTSNNIPADIVFVLK
DKPHNIFKRDGSDVIYPARISLREALCGCTVNVPTLDGRTIPVVFKDVIRPGMRRKVPGE
GLPLPKTPEKRGDLIIEFEVIFPERIPQTSRTVLEQVLPI

シグナル配列
無し

膜貫通ドメイン
無し

N-グリコシル化部位
86-89

グリコサミノグリカン付着部位
81-84

チロシンキナーゼリン酸化部位
169-176
249-255

N-ミリストイル化部位
10-15
71-76
74-79
79-84
80-85
82-87
83-88
84-89
87-92
117-122
139-144
215-220
268-273

細胞付着配列
311-313

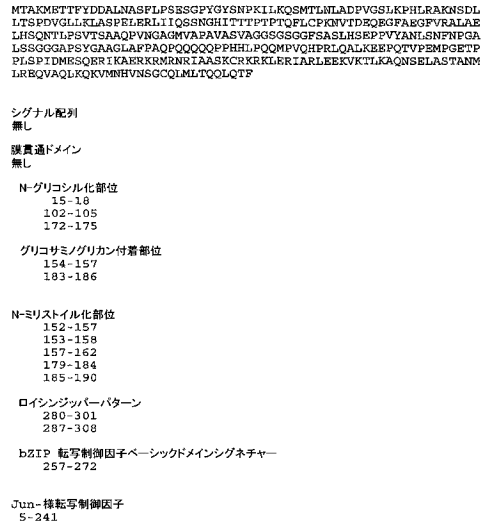
Nt-dnaJ ドメインシグネチャー
45-65

DnaJ ドメイン
4-68

DnaJ C 末端領域
216-338

【図３】

【図４】


MTAKMETTFYDDALNASPLPSESSGPYGYSNPKILKQSMTLNLADPVGSLKPHLRAKNSDL
LTSPDVGLLKLASPELERLIIQSSNGHITTTPTPTQFLCPKNVTDEQEGFAEGFVRALAE
LHSQNTLPSVTSAAQPVNGAGMVAPAVASVAGGSGSGGFSASLHSEPPVYANLSNFNPGA
LSSGGGAPSYGAAGLAFPAQPQQQQQPPHHLPQQMPVQHPRLQALKEEPQTVPEMPGETP
PLSPIDMESQRRIKAERKRMRNRIAASKCRKRKLERIARLEEKVKTLKAQNSELASTANM
LREQVAQLKQKVMNHVNSGCQLMLTQQLQTF

シグナル配列
無し

膜貫通ドメイン
無し

N-グリコシル化部位
15-18
102-105
172-175

グリコサミノグリカン付着部位
154-157
183-186

N-ミリストイル化部位
152-157
153-158
157-162
179-184
185-190

ロイシンジッパーパターン
280-301
287-308

bZIP 転写制御因子ベーシックドメインシグネチャー
257-272

Jun-様転写制御因子
5-241

bZIP 転写制御因子
250-314

【図５】

CTCGGCTCACCATGTGTCACTCTCGCAGCTGCCACCCGACCATGACCATCCTGCAGGCCC
CGACCCCGGCCCCCTCCACCATCCCGGGACCCCGGCGGGGCTCCGGTCCTGAGATCTTCA
CCTTCGACCCTCTCCCGGAGCCCGCAGCGGCCCCTGCGGGCGCCCAGCGCCTCTCGCG
GGCACGAAGCGCAGCCGCGAGGGTCTCTACCCTCGAGTGGTCCGGCGCCAGCTGCCAG
TCGAGGAACCGAACCCAGCCAAAAGGCTTCTCTTCTGCTGCTCACCATCGTCTTCTGCC
AGATCCTGATGGCTGAAGAGGGTGTGCCGGCGCCCCTGCCTCCAGAGGACGCCCCTAACG
CCGCATCCCTGGCGCCCACCCCTGTGTCCCCCGTCCTCGAGCCCTTTAATCTGACTTCGG
AGCCCTCGGACTACGCTCTGGACCTCAGCACTTTCCTCCAGCAACACCCGGCCGCCTTCTT
AACTGTGACTCCCCGCACTCCCCAAAAAGAATCCGAAAAACCACAAAGAAACACCAGGCG
TACCTGGTGCGCGAGAGCGTATCCCCAACTGGGACTTCCGAGGCAACTTGAACTCAGAAC
ACTACAGCGGAGACGCCACCCGGTGCTTGAGGCGGGACCGAGGCGCACAGAGACCGAGGC
GCATAGAGACCGAGGCACAGCCCAGCTGGGGCTAGGCCCGGTGGGAAGGAGAGCGTCGTT
AATTTATTTCTTATTGCTCCTAATTAATATTTATATGTATTTATGTACGTCCTCCTAGGT
GATGGAGATGTGTACGTAATATTTATTTTAACTTATGCAAGGGTGTGAGATGTTCCCCCT
GCTGTAAATGCAGGTCTCTTGGTATTTATTGAGCTTTGTGGGACTGGTGGAAGCAGGACA
CCTGGAACTGCGGCAAAGTAGGAGAAGAAATGGGGAGGACTCGGGTGGGGGAGGACGTCC
CGGCTGGGATGAAGTCTGGTGGTGGGTCGTAAGTTTAGGAGGTGACTGCATCCTCCAGCA
TCTCAACTCCGTCTGTCTACTGTGTGAGACTTCGGCGGACCATTAGGAATGAGATCCGTG
AGATCCTTCCATCTTCTTGAAGTCGCCTTTAGGGTGGCTACGAGGTAGAGGGGTGGGGGT
TGGTGGGCTGTCACGGAGCGACTGTCGAGATCGCCTAGTATGTTCTGTGAACACAAATAA
AATTGATTTACTGTCTGCTAAAAAAAAAAA

【図６】

MCHSRSCHPTMTILQAPTPAPSTLPGPRRGSGPEIFTFDPLPEPAAAPAGRPSASRGHRK
RSRRVLYPRVVRRQLPVEEPNPAKRLLFLLLTIVFCQILMAEEGVPAPLPPEDAPNAASL
APTEVSPVLEPFNLTSEPSDYALDLSTFLQQHPAAF

シグナル配列
無し

膜貫通ドメイン
78-98

N-グリコシル化部位

133-136

cAMP- 及び cGMP-依存性プロテインキナーゼリン酸化部位

28-31
59-62

【図７】

AGCTGAGGTGTGAGCAGCTGCCGAAGTCAGTTCCTTGTGGAGCCGGAGCTGGGCGCGGAT
TCGCCGAGGCACCGAGGCACTCAGAGGAGGTGAGAGAGCGGCGGCAGACAACAGGGGACC
CCGGGCCGGCGGCCCAGAGCCGAGCCAAGCGTGCCCGCGTGTGTCCCTGCCTGTCCGCGA
GGATGCGTGTTCGCGGGTGTGTGCTGCGTTCACAGGTGTTCTGCGGCAGGCGCCATGTC
AGAACCGGCTGGGGATGTCCGTCAGAACCCATGCGGCAGCAAGGCCTGCCGCCGCCTCTT
CGGCCCAGTGGACAGCGAGCAGCTGAGCCGCGACTGTGATGCTGCTAATGGCGGGCTGCAT
CCAGGAGGCCCGTGAGCGATGGAACTTCGACTTTGTCACCGAGACACCACTGGAGGGTGA
CTTCGCCTGGGAGCGTGTGCGGGGCTTGGCCTGCCAAGCTCTACCTTCCCACGGGGCC
CCGGCGAGGCCGGGATGAGTTGGGAGGAGGCAGGCGGCCTGGCACCTCACCTGCTCTGCT
GCAGGGGACAGCAGAGGAAGACCATGTGGACCTGTCACTGTCTTGTACCCTTGTGCCTCG
CTCAGGGGAGCAGGCTGAAGGGTCCCCAGGTGGACCTGGAGACTCTCAGGGTCGAAAACG
GCGGCAGACCAGCATGACAGATTTCTACCACTCCAAACGCCGGCTGATCTTCTCCAAGAG
GAAGCCCTAATCCGCCCACAGGAAGCCTGCAGTCCTGGAAGCGCGAGGGCCTCAAAGGCC
CGCTCTACATCTTCTGCCTTAGTCTCAGTTTGTGTGTCTTAATTATTATTTGTGTTTTAA
TTTAAACACCTCCTCATGTACATACCCTGGCCGCCCCCTGCCCCCAGCGTCCGGCATTA
GAATTATTTAAACAAAAACTAGGCGGTTGAATGAGAGGTTCCTAAGAGTGCTGGGCATTT
TTATTTTATGAAATACTATTTAAAGCCTCCTCATCCCGTGTTCTCCTTTCCTCTCTCCC
GGAGGTTGGGTGGGCCGGCTTCATGCCAGCTACTTCCTCCTCCCCACTTGTCCGCTGGGT
GGTACCTCTGGAGGGGTGTGGCTCCTTCCCATCGCTGTCACAGGCGGTTATGAAATTCA
CCCCCTTTCCTGGACACTCAGACCTGAATTCTTTTTCATTTGAGAAGTAAACAGATGGCA
CTTTGAAGGGGCCTCACCGAGTGGGGGCATCATCAAAAACTTTGGAGTCCCCTCACCTCC
TCTAAGGTTGGGCAGGGTGACCCTGAAGTGAGCACAGCCTAGGGCTGAGCTGGGGACCTG
GTACCCTCCTGGCTCTTGATACCCCCCTCTGTCTTGTGAAGGCAGGGGGAAGGTGGGGTC
CTGGAGCAGACCACCCCGCCTGCCCTCATGGCCCCTCTGACCTGCACTGGGGAGCCCGTC
TCAGTGTTGAGCCTTTCCCTCTTTGGCTCCCCTGTACCTTTGAGGAGCCCCAGCTACC
CTTCTTCTCCAGCTGGGCTCTGCAATTCCCCTCTGCTGCTGTCCCTCCCCCTTGTCTTT
CCCTTCAGTACCCTCTCAGCTCCAGGTGGCTCTGAGGTGCCTGTTCCACCCCACCCCCA
GCTCAATGGACTGGAAGGGGAGGGACACACAAGAAGAGGGCACCCTAGTTCTACCTCA
GGCAGCTCAGCAGCACGACCGCCCCTCCTCTCTAGCTGTGGGGGTGAGGGTCCCATGTGGTG
GCACAGCCCCCTTGAGTGGGGTTATCTCTGTGTTAGGGGTATATGATGGGGGAGTAGAT
CTTTCTAGGAGGGAGACACTGGCCCCTCAAATCGTCCAGCGACCTTCCTCATCCACCCCA
TCCCTCCCCAGTTCATTGCACTTTGATTAGCAGCGGAACAAGGAGTCAGACATTTTAAGA
TGGTGGCAGTAGAGGCTATGGACAGGCATGCCACGTGGGCTCATATGGGGCTGGGAGTA
GTTGTCTTTCCTGGCACTAACGTTGAGCCCCTGGAGGCACTGAAGTGCTTAGTGTACTTG
GAGTATTGGGGTCTGACCCAAACACCTTCCAGCTCCTGTAACATACTGGCCTGGACTGT
TTTCTCTCGGCTCCCCATGTGTCCTGGTTCCCGTTTCTCCACCTAGACTGTAAACCTCTC
GAGGGCAGGGACCACACCCTGTACTGTTCTGTGTCTTTCACAGCTCCTCCCACAATGCTG
AATATACAGCAGGTGCTCAATAAATGATTCTTAGTGACTTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
A

【図８】

MSEPAGDVRQNPCGSKACRRLFGPVDSEQLSRDCDALMAGCIQEARERWNFDFVTETPLE
GDFAWERVRGLGLPKLYLPTGPRRGRDELGGGRRPGTSPALLQGTAEEDHVDLSLSCTLV
PRSGEQAEGSPGGPGDSQGRKRRQTSMTDFYHSKRRLIFSKRKP

シグナル配列
無し

膜貫通ドメイン
無し

cAMP- 及び cGMP-依存性プロテインキナーゼリン酸化部位
142-145

N-ミリストイル化部位
14-19
96-101

アミド化部位
91-96
138-143

サイクリン依存性キナーゼインヒビター
15-114

【図９】

CAGCTCTCTGTCAGAATGGCCACCATGGTACCATCCGTGTTGTGGCCCAGGGCCTGCTGG
ACTCTGCTGGTCTGCTGTCTGCTGACCCCAGGTGTCCAGGGGCAGGAGTTCCTTTTGCGG
GTGGAGCCCAGAACCCTGTGCTCTCTGCTGGAGGGTCCCTGTTTGTGAACTGCAGTACT
GATTGTCCCAGCTCTGAGAAAATCGCCTTGGAGACGTCCCTATCAAAGGAGCTGGTGGCC
AGTGGCATGGGCTGGGCAGCCTTCAATCTCAGCAACGTGACTGGCAACAGTCGGATCCTC
TGCTCAGTGTACTGCAATGGCTCCCAGATAACAGGCTCCTCTAACATCACCGTGTACGGG
CTCCCGGAGCGTGTGGAGCTGGCACCCCTGCCTCCTTGGCAGCCGGTGGGCCAGAACTTC
ACCCTGCGCTGCCAAGTGGAGGGTGGGTCGCCCCGGACCAGCCTCACGGTGGTGCTGCTT
CGCTGGGAGGAGGAGCTGAGCCGGCAGCCCGCAGTGGAGGAGCCCAGCGGAGGTCACTGCC
ACTGTGCTGGCCAGCAGAGACGACCACGGAGCCCTTTCTCATGCCGCACAGAACTGGAC
ATGCAGCCCCAGGGGCTGGGACTGTTCGTGAACACCTCAGCCCCCCGCCAGCTCCGAACC
TTGTCCTGCCCGTGACCCCCCCGCGCCTCGTGGCCCCCCGGTTCTTGGAGGTGGAAACG
TCGTGGCCGGTGGACTGCACCCTAGACGGGCTTTTTCCAGCCTCAGAGGCCCAGGTCTAC
CTGGCGCTGGGGGACCAGATGCTGAATGCGACAGTCATGAACCACGGGGACACGCTAACG
GCCACAGCCACAGCCACGGCGCGCGGATCAGGAGGGTGCCCGGGAGATCGTCTGCAAC
GTGACCCTAGGGGGCGAGAGACGGGAGGCCCGGGAGAACTTGACGGTCTTTAGCTTCCTA
GGACCCATTGTGAACCTCAGCGAGCCCACCGCCCATGAGGGGTCCACAGTGACCGTGAGT
TGCATGGCTGGGGCTCGAGTCCAGGTCACGCTGGACGGAGTTCCGGCCGCGGCCCCGGGG
CAGCCAGCTCAACTTCAGCTAAATGCTACCGAGAGTGACGACGGACGCAGGTTCTTCTGC
AGTGCCACTCTCGAGGTGGACGGCGAGTTCTTGCACAGGAACAGTAGCGTCCAGCTGCGA
GTCCTGTATGGTCCCAAAATTGACCGAGCCACATGCCCCCAGCACTTGAAATGGAAAGAT
AAAACGAGACACGTCCTGCAGTGCCAAGCCAGGGGCAACCCGTACCCCGAGCTGCGGTGT
TTGAAGGAAGGCTCCAGCCGGGAGGTGCCGGTGGGGATCCCGTTCTTCGTCAACGTAACA
CATAATGGTACTTATCAGTGCCAAGCGTCCAGCTCACGAGGCAAATACACCCTGGTCGTG
GTGATGGACATTGAGGCTGGGAGCTCCCACTTTGTCCCCGTCTTCGTGGCGGTGTTACTG
ACCCTGGGCGTGGTGACTATCGTACTGGCCTTAATGTACGTCTTCAGGGAGCACCAACGG
AGCGGCAGTTACCATGTTAGGGAGGAGACGACCTATCTGCCCCTCACGTCTATGCAGCCG
ACAGAAGCAATGGGGGAAGAACCGTCCAGAGCTGAGTGACGCTGGGATCCGGGATCAAAG
TTGGCGGGGGCTTGGCTGTGCCCTCAGATTCCGCACCAATAAAGCCTTCAAACTCCCTAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

【図１０】

MATMVPSVLWPRACWTLLVCCLLTPGVQGQEFLLRVEPQNPVLSAGGSLFVNCSTDCPSS
EKIALETSLSKELVASGMGWAAFNLSNVTGNSRILCSVYCNGSQITGSSNITVYGLPERV
ELAPLPPWQPVGQNFTLRCQVEGGSPRTSLTVVLLRWEEELSRQPAVEEPAEVTATVLAS
RDDHGAPFSCRTELDMQPQGLGLFVNTSAPRQLRTFVLPVTPPRLVAPRFLEVETSWPVD
CTLDGLFPASEAQVYLALGDQMLNATVMNHGDTLTATATATARADQEGARRIVCNVTLGG
ERREARENLTVFSFLGPIVNLSEPTAHEGSTVTVSCMAGARVQVTLDGVPAAAPGQPAQL
QLNATESDDGRSFFCSATLEVDGEFLHRNSGVQLRVLYGPKIDRATCPQHLKWKDKTRHV
LQCQARGNPYPELRCLKRGSSREVPVGIPFFVNVTHNGTYQCQASSSRGKYTLVVVMDIE
AGSSHFVPVFVAVLLTLGVVTIVLALMYVFREHQRSGSYHVREESTYLPLTSMQPTEAMG
EEPSRAE

シグナル配列
1-29

膜貫通ドメイン
484-504

N-グリコシル化部位
52-55
84-87
87-90
101-104
110-113
134-137
206-209
264-267
295-298
308-311
320-323
363-366
389-392
453-456
457-460

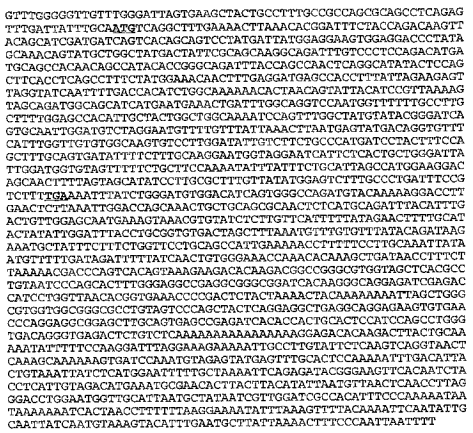
グリコサミノグリカン付着部位
76-79

N-ミリストイル化部位
77-82
102-107
132-137
144-149
185-190
202-207
245-250
329-334
348-353
458-463

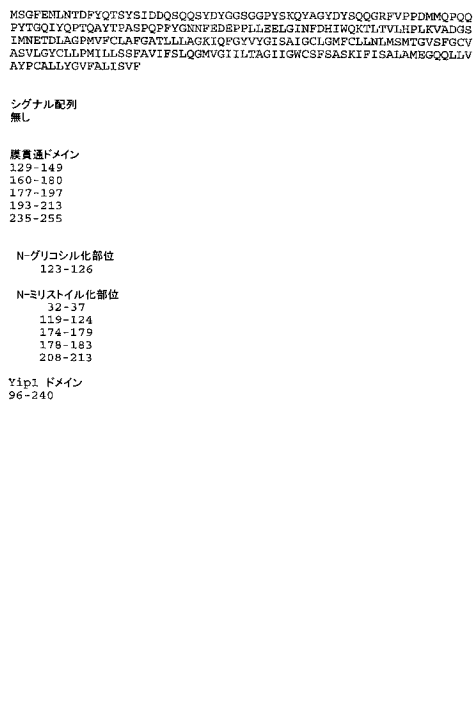
細胞接着分子（ICAM）
12-119

免疫グロブリンドメイン
132-192
329-377

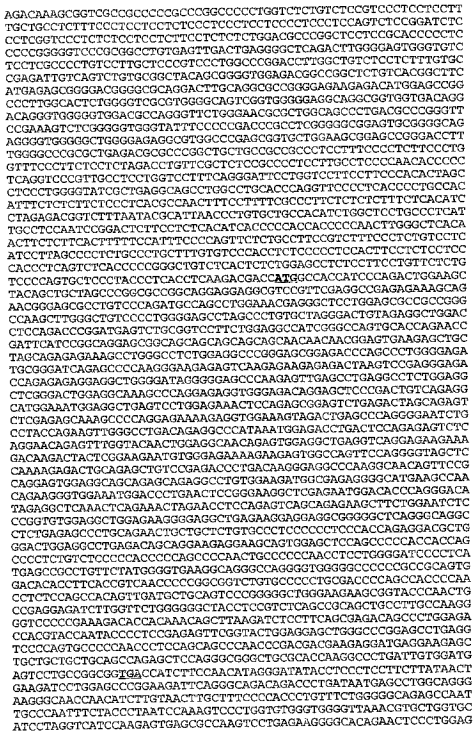
【図１１】



【図１２】

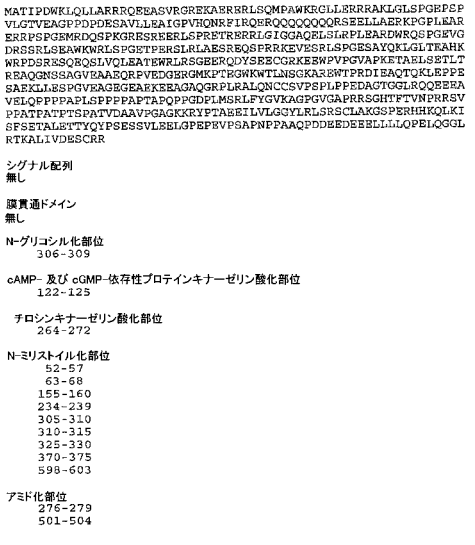


【図１３Ａ】



【図１３Ｂ】

【図１４】



【図１５】

GCGGCTCTCTGATCCAGCCCGGGAGAGGACCGAGCTGGAGGAGCTGGGTGTGGGGTGCGT
TGGGCTGGTGGGGAGGCCTAGTTTGGGTGCAAGTAGGTCTGATTGAGCTTGTGTTTGTGCT
GAAGGGACAGCCCTGGGTCTAGGGGAGAGAGTCCCTGAGTGTGAGACCCGCCTTCCCCGG
TCCCAGCCCCTCCCAGTTCCCCCAGGGACGGCCACTTCCTGGTCCCCGACGCAACCATGG
CTGAAGAACAACCGCAGGTCGAATTGTTCGTGAAGGCTGGCAGTGATGGGGCCAAGATTG
GGAACTGCCATTCTCCCAGAGACTGTTCATGGTACTGTGGCTCAAGGGAGTCACCTTCA
ATGTTACCACCGTTGACACCAAAAGGCGGACCGAGACAGTGCAGAAGCTGTGCCCAGGGG
GGCAGCTCCCATTCCTGCTGTATGGCACTGAAGTGCACACAGACACCAACAAGATTGAGG
AATTTCTGGAGGCAGTGCTGTGCCCTCCCAGGTACCCCAAGCTGGCAGCTCTGAACCCTG
AGTCCAACACAGCTGGGCTGGACATATTTGCCAAATTTTCTGCCTACATCAAGAATTCAA
ACCCAGCACTCAATGACAATCTGGAGAAGGGACTCCTGAAAGCCCTGAAGGTTTAGACA
ATTACTTAACATCCCCCCTCCCAGAAGAAGTGGATGAAACCAGTGCTGAAGATGAAGGTG
TCTCTCAGAGGAAGTTTTTGGATGGCAACGAGCTCACCCTGGCTGACTGCAACCTGTTGC
CAAAGTTACACATAGTACAGGTGGTGTGTAAGAAGTACCGGGATTCACCATCCCCGAGG
CCTTCCGGGGAGTGCATCGGPACTTGAGCAATGCCTACGCCCGGGAGAATTCGCTTCCA
CCTGTCCAGATGATGAGGAGATCGAGCTCGCCTATGAGCAAGTGGCAAAGGCCCTCAAAT
AAGCCCCTCCTGGGACTCCCTCAACCCCCTCCATTTCTCCACAAAGGCCCTGGTGGTTTT
CCACATTGCTACCCAATGGACACACTCCAAAATGGCCAGTGGGCAGGGAATCCTGGAGCA
CTTGTTCCGGGATGGTGTGGTGGAAGAGGGGATGAGGGAAAGAAATGGGGGGCCTGGGTC
AGATTTTTATTGTGGGGTGGGGTGAGTAGGACAACATATTTCAGTAATAAAATACAGAAT
AAAAATCAAGTGTTTTTAAAAAAAA

【図１６】

MAEEQPQVELPVKAGSDGAKIGNCPFSQRLPMVLWLKGVTFNVTTVDTKRRTETVQKLCP
GGQLPFLLYGTEVHTDTNKIEEFLEAVLCPPRYPKLAALNPESNTAGLDIFAKFSAYIKN
SNPALNDNLEKGLLKALKVLDNYLTSPLPEEVDETSAEDEGVSQRKFLDGNELTLADCNL
LPKLHIVQVVCKKYRGFTIPEAFRGVHRYLSNAYARBEFASTCPDDEBIELAYEQVAKAL
K

シグナル配列
　無し

膜貫通ドメイン
　22-42

N-グリコシル化部位
　42-45

cAMP- 及び cGMP-依存性プロテインキナーゼリン酸化部位
　49-52

N-ミリストイル化部位
　15-20
　18-23
　38-43
　132-137
　170-175

【図１７】

CATCAGCTTTGAAAGCCAACACATCCTCCTGAGAGGGGACAAGACAAGCAGGGATATGTG
GGCCACTGGATCTTTGCCAGACTTCCCGGCTGCAGCCAAGTTCTTAGGGTTCCGTCAGCG
CTGCATCCCCAGGAGCCTCTGCCTCAGTGAGTGTCCTCTGGAGCCCCCAAGCCTCACCCG
CCTCTGTGCCACTCTGAAGGACTGCCCGGGACCCCTGGAACTGCAATTGTCCTGTGAGTT
CCTGAGTGACCAGAGCCTGGAGACTCTACTGGACTGCTTACCTCAACTCCCTCAGCTGAG
CCTGCTGCAGCTGAGCCAGACGGGACTGTCCCCGAAAAGCCCCTTCCTGCTGGCCAACAC
CTTAAGCCTGTGTCCACGGGTAAAAAGGTGGATCTCAGGTCCCTGCACCATGCAACTTT
GCACTTCAGATCCAACGAGGAGGAGGAGGCGTGTGCTGTGCTCTCAGCAAACCTGCT
GGGCGACAGCGGACTCAGATGCCTTCTGGAATGTCTGCCGCAGGTGCCCATCTCCGGTTT
GCTGATCTGAGTCACAACAGCATTTCTCAGGAAAGTGCCCTGTACCTGCTGGAGACACT
GCCCTCCTGCCCACGTGTCCGGGAGGCCTCAGTGAACCTGGGCTCTGAGCAGAGCTTCCG
GATTCACTTCTCCAGAGAGGACCAGGCTGGGAAGACACTCAGGCTAAGTGAGTGCAGCTT
CCGGCCAGAGCACGTGTCCAGGCTGGCCACCGGCTTGAGCAAAGTCCCTGCAGCTGACGGA
GCTCACGCTGACCCAGTGCTGCCTGGGCCAGAAGCAGCTGGCCATCCTCCTGAGCTTGGT
GGGGCGACCCGCAGGGCTGTTCAGTCTCAGGGTGCAGGAAGCCGTGGGCGGACAGAGCCAG
GGTTCTCTCCCTGTTAGAAGTCTGCGCCCAGGCCTCAGGCAGTGTCGCTGAAATCAGCAT
CTCCGAGACCCAGCAGCAGCTCTGTGTCCAGCTGGAATTTCCTCGCCAGGAAGAGAATCC
AGAAGCTGTGGCACTCAGGTTGGCTCACTGTGACCTTGGAGCCCACCACAGCCTTCTTGT
CGGCAGCTGATGGAGACATGTGCCAGGCTGCAGCAGCTCAGCTTGTCTCAGGTTAACCT
CTGTGAGGACGATGATGCCAGTTCCCTGCTGCTGCAGAGCCTCCTGCTGTCCCTCTCTGA
GCTGAAGACATTTCGGCTGACCTCCAGCTGTGTGAGCACCGAGGGCCTCGCCCACCTGGC
ATCTGGTCTGGGCCACTGCCACCACTTGGAGGAGCTGGACTTGTCTAACAATCAATTTGA
TGAGGAGGGCACCAAGGCGCTGATGAGGGCCCTTGAGGGGAAATGGATGCTAAAGAGGCT
GGACCTCAGTCACCTTCTGCTGAACAGCTCCACCTTGGCCTTGCTTACTCACAGACTAAG
CCAGATGACCTGCCTGCAGAGCCTCAGACTGAACAGGAACAGTATCGGTGATGTCGGTTG
CTGCCACCTTTCTGAGGCTCTCAGGGCTGCCACCAGCCTAGAGGAGCTGGACTTGAGCCA
CAACCAGATTGGAGACGCTGGTGTCCAGCACTTAGCTACCATCCTGCCTGGGCTGCCAGA
GCTCAGGAAGATAGACCTCTCAGGGAATAGCATCAGCTCAGCCGGGGGAGTGCAGTTGGC
AGAGTCTCTCTGTTCTTGCAGCGCGTGGAGGAGTTGATGCTTGGCTGCAATGCCCTGGG
GGATCCCACAGCCCTGGGGCTGGCTCAGGAGCTGCCCCAGCACCTGAGGGTCTACACCT
ACCATTCAGCCATCTGGGCCCAGGTGGGGCCCTGAGCCTGGCCCAGGCCCTGGATGGATT
CCCCCATTTGGAAGAGATCAGCTTGGCGGAAAACAACCTGGCTGGAGGGGTCCTGCGTTT
CTGTATGGAGCTCCCGCTGCTCAGACAGATAGACCTGGTTTCCTGTAAGATTGACAACCA
GACTGCCAAGCTCCTCACCTCCAGCTTCACGAGCTGCCCTGCCCTGGAAGTAATCTTGCT
GTCCTGGAATCTCCTCGGGGATGAGGCAGCTGCCGAGCTGGCCCAGGTGCTGCCGCAGAT
GGGCCGGCTGAAGAGAGTGGACCCGGAGAAGAATCAGATCACAGCTTTGGGGGCCTGGCT
CCTGGCTGAAGGACTGGCCCAGGGGTCTAGCATCCAAGTCATCCGCCTCTGGAATAACCC
CATTCCCTGCGACATGGCCCAGCACCTGAAGAGCCAGGAGCCCAGGCTGGACTTTGCCTT
CTTTGACAACCAGCCCCAGCCCCTTGGGGTACTTGATGGCCCCCTCAAGACCTTTGGAA
TCCAGCCAAGTGATGCACCCAAATGATCCACCTTTCGCCCACTGGGATAAATGACTCTAGG
AAAGAAGAGCTCGGCAGGCGCTCTGCACTCCACCAGGAGGAAGGATACGTGTGTCCT
GCTGCAGTCCTCAGGGAGAACTTTTTTGGGAACCAGGAGCTGGGTCTGGACAAAGGAGTA
CCCTGCATTACGTGGGATATGTGTGATCAATTGGGGACATGCGACACACAATGAGGGTGT
CATGACAATGCATGACACGTACGGTTATATGTGGCAGTGTGACCCCTTGACATGTGGCGT
TACATGAAAGTCAGTGTGGCACGTGTTCTGTGGCATGGGTGCTGGCATCCCAAGTGGCAG
GATACATGATTGTTGGTCTATATATGACACATGACAAATGTCCATGTCACAGGACTCATG
GCTGGCCAGATGACCTCAGGCTGGCCCAAGATCTAATTTATTAATTTTAAAGCAAATAC
ATATTTATAGATTGTGTGTATGGAGCAGCTAAGTCAGGAAAAGTCTTCCGCCCGAGCTGG
GAGGGGAGAGTGTCCATGCACTGACCAGTCCAGGGGCTCAAGGGCCAGGGCTCTGGAACA
AGCCAGGGACTCAGCCATTAAGTCCCCTCCTGCCTCAATCCTCAGCCTACCCATCTATAA
ACTTGATGACTCCTCCCTTACTTACATACTAGCTTCCAAGGACAGGTGGAGGTAGGGCCA
GCCTGGCGGGAGTGGAGAAGCCCAGTCTGTCCTATGTAAGGGACAAGCCAGGTCTAATG
GTACTGGGTAGGGGGCACTGCCAAGACAATAAGCTAGGCTACTGGGTCCAGCTACTACTT
TGGTGGGATTCAGGTGAGTCTCCATGCACTTCACATGTTACCCAGTGTTCTTGTTACTTC
CAAGGAGAACCAAGAATGGCTCTGTCACACTCGAAGCCAGGTTTGATCAATAAACACAAT
GGTATTCC

【図１８】

MWATGSLPDFPAAAKFLGFRQRCIPRSLCLSECPLEPPSLTRLCATLKDCPGPLELQLSC
EFLSDQSLETLLDCLPQLPQLSLLQLSQTGLSPKSPFLLANTLSLCPRVKKVDLRSLHHA
TLHFRSNKEEEGVCCGLSANLLGDSGLRCLLECLPQVPISGLLDLSHNSISQESALYLLE
TLPSCPRVREASVNLGSEQSFRIHFSRERDQAGKTLRLSECSPRPEHVSRLATGLSKSLQL
TSLNLTQCCLQQKQLALLSSIVGRPAGLPSLRVQEPWADRARVLSLLEVCRAQASGSVAET
SISETQQQLCVQLEFPRQEENPEAVALRIAHCDLGNHSLLVGQLMETCARLQQLSLSQV
NLCEDDDASSLLLQSLLLSLSELKTFRLTSSCVSTEGLAHLASGLGHCHHLEELDLSNNQ
FDEEGTKALMRALEGKWMLKRLDLSHLLLNSSTLALLTHRLSQMTCLQSLRLNRNSIGDV
GCCHLSRALRAATSLEELDLSHNQIGDAGVQHLATILPGLPELRKIDLSGNSISSAGGVQ
LAESLVLCRRLEELMLGCNALGDPTALGLAQELPQHLRVLHLPFSHLGPGGALSLAQALD
GFPHLEEISLAENNLAGGVLRPCMELPLLRQIDLVSCKIDNQTAKLLTSSPTSCPALEVI
LLSWNLLGDEAAAELAQVLPQMGRLKRVDPEKNQITALGAWLLAEGLAQGSSIQVIRLWN
NPIPCDMAQHLKSQEPRLDFAFFDNQPQAPWGT

シグナル配列
無し

膜貫通ドメイン

654-674
694-714

N-グリコシル化部位
　450-453
　644-644

グリコサミノグリカン付着部位
　403-406

N-ミリストイル化部位

　132-137
　136-141
　196-201
　233-238
　335-340
　404-409
　530-535
　538-543
　590-595
　706-711

ロイシンジッパーパターン
　84-105

ロイシンリッチ反復
80-107
239-262
410-434
438-462
466-493
494-521
522-546
550-578
604-627
628-655
656-680
712-732

【図１９】

ATAGGGTCAGTGGGCCGCTTGGCGGTGTCGTTGCGGTACCAGGTCCGCGTGAGGGGTTCG
GGGGTTCTGGGCAGGCACAATGGCGTCTCGAGCAGGCCCGCGAGCGGCCGGCACCGACGG
CAGCGACTTTCAGCACCGGGAGCGCGTCGCCATGCACTACCAGATGAGTGTGACTCTCAA
GTATGAAATCAAGAAGCTGATCTACGTACATCTGGTCATATGGCTGCTGCTGGTTGCTAA
GATGAGCGTGGGACACCTGAGGCTCTTGTCACATGATCAGGTGGCCATGCCCTATCAGTG
GGAATACCCGTATTTGCTGAGCATTTTGCCCTCTCTCTTGGGCCTTCTCTCCTTTCCCCG
CAACAACATTAGCTACCTGGTGCTCTCCATGATCAGCATGGGACTCTTTTCCATCGCTCC
ACTCATTTATGGCAGCATGGAGATGTTCCCTGCTGCACAGCAGCTCTACCGCCATGGCAA
GGCCTACCGTTTCCTCTTTGGTTTTCTGCCGTTTCCATCATGTACCTGGTGTTGGTGTT
GGCAGTGCAAGTGCATGCCTGGCAGTTGTACTACAGCAAGAAGCTCCTAGACTCTTGGTT
CACCAGCACACAGGAGAAGAAGCATAAATGAAGCCTCTTTGGGGTGAAGCCTGGACATCC
CATCGAATGAAAGGACACTAGTACAGCGGTTCCAAAATCCCTTCTGGTGATTTTAGCAGC
TGTGATGTTGGTACCTGGTGCAGACCAGGCCAAAGTTCTGGAAAGCTCCTTTTGCCATCT
GCTGAGTGGCAAAACTATAATTATTCTCGGTTGGCTAGAACTGGCTGACCAACAGCTA
TGAACAAATTTCAGCTGTTTGAGTTGAACTTTGAGGTTTTTCTTTAAGAATGAGCTTC
GTCCTTGCCTCTACTCGGTCATTCTCCCATTTCCATCCATTACCCCTTAGCCATTGAGA
CTAAAGGAAATAGGGAATAAATCAAATTACTTCATCTCTAGGTCACGGGTCAGGAAACAT
TTGGGCAGCTGCTCCCTTGGCAGGCTGTGGTCTCCTCTGCAAAGCATTTTAATTAAAAAC
CTCAATAAAGA

【図２０】

MASRAGPRAAGTDGSDFQHRERVAMKYQMSVTLKYSIKKLIYVHLVIWLLLVAKMSVGHL
RLLSHDQVAMPYQWEYPYLLSILPSLLGLLSFPRNNISYLVLSMISMGLFSIAPLIYGSM
EMFPAAQQLYRHGKAYRFLFGFSAVSIMYLVLVLAVQVHAWQLYYSKKLLDSWFTSTQEK
KHK

シグナル配列
無し

膜貫通ドメイン
　38-58
　77-97
　99-119
138-158

N-グリコシル化部位
　96-99

N-ミリストイル化部位
　11-16

【図２１】

GACGTGAACGGTCGTTGCAGAGATTGCGGGCGGCTGAGACGCCGCCTGCCTGGCACCTAG
GAGCGCAGCGGAGCCCCGACACCGCCGCCGCCGCCATGGAGTCCGAGACCGAACCCGAGC
CCGTCACGCTCCTGGTGAAGAGCCCCAACCAGCGCCACCGCGACTTGGAGCTGAGTGGCG
ACCGCGGCTGGAGTGTGGGCCACCTCAAGGCCCACCTGAGCCGGTCTACCCCGAGCGTC
CGCGTCCAGAGGACCAGAGTTAATTATTCTGGGAAGCTGTTGTGGATCACCAATGTGC
TCAGGGACTTGCTTCCAAAGCAGGAAAAACGGCATGTTTTGATCTGGTGTGCAATGTGA
AGAGTCCTTCAAAAATGCCAGAAATCAACGCCAAGGTGGCTGAATCCACAGAGGAGCCTG
CTGGTTCTAATCGGGGACAGTATCCTGAGGATTCCTCAAGTGATGGTTTAAGGCAAAGGG
AAGTTCTTCGGAACCTTTCTTCCCCTGGATGGGAAAACATCTCAAGGCCTGAAGCTGCCC
AGCAGGCATTCCAAGGCCTGGGTCCTGGTTTCTCCGGTTACACACCCTATGGGTGGCTTC
AGCTTTCCTGGTTCCAGCAGATATATGCACGACAGTACTACATGCAATATTTAGCAGCCA
CTGCTGCATCAGGGGCTTTTGTTCCACCACCAAGTGCACAAGAGATACCTGTGGTCTCTG
CACCTGCTCCAGCCCCTATTCACAACCAGTTTCCAGCTGAAAACCAGCCTGCCAATCAGA
ATGCTGCTCCTCAAGTGGTTGTTAATCCTGGAGCCAATCAAAATTTGCGGATGAATGCAC
AAGGTGGCCCTATTGTGGAAGAAGATGATGAAATAAATCGAGATTGGTTGGATTGGACCT
ATTCAGCAGCTACATTTTCTGTTTTTCTCAGTATCCTCTACTTCTACTCCTCCCTGAGCA
GATTCCTCATGGTCATGGGGGCCACCGTTGTTATGTACCTGCATCACGTTGGGTGGTTTC
CATTTAGACCGAGGCCGGTTCAGAACTTCCCAAATGATGGTCCTCCTCCTGACGTTGTAA
ATCAGGACCCCAACAATAACTTACAGGAAGGCACTGATCCTGAAACTGAAGACCCCAACC
ACCTCCCTCCAGACAGGGATGTACTAGATGGCGAGCAGACCAGCCCCTCCTTTATGAGCA
CAGCATGGCTTGTCTTCAAGACTTTCTTTGCCTCTCTTCTTCCAGAAGGCCCCCCAGCCA
TCGCAAACTGATGGTGTTTGTGCTGTAGCTGTTGGAGGCTTTGACAGGAATGGACTGGAT
CACCTGACTCCAGCTAGATTGCCTCTCCTGGACATGGCAATGATGAGTTTTTAAAAAACA
GTGTGGATGATGATATGCTTTTGTGAGCAAGCAAAAGCAGAAACGTGAAGCCGTGATACA
AATTGGTGAACAAAAAATGCCCAAGGCTTCTCATGTCTTTATTCTGAAGAGCTTTAATAT
ATACTCTATGTAGTTTATAAAGCACTGTACGTAGAAGGCCTTAGGTGTTGCATGTCTATG
CTTGAGGAACTTTTCCAAATGTGTGTCTGCATGTGTGTTTGTACATAGAAGTCATAGA
TGCAGAAGTGGTTCTGCTGGTACGATTTGATTCCTGTTGGAATGTTTAAATTACACTAAG
TGTACTACTTTATATAATCAATGAAATTGCTAGACATGTTTTAGCAGGACTTTTCTAGGA
AAGACTTATGTATAATTGCTTTTTAAAATGCAGTGCTTTACTTTAAACTAAGGGGAACTT
TGCGGAGGTGAAAACCTTTGCTGGGTTTTCTGTTCAATAAAGTTTTACTATGAATGACCC
TGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

【図２２】

MESETEPEPVTLLVKSPNQRHRDLELSGDRGWSVGHLKAHLSRVYPERPRPEDQRLIYSG
KLLLDHQCLRDLLPKQSKRHVLHLVCNVKSPSKMPEINAKVARSTEEPAGSNRGQYPEDS
SSDGLRQREVLRNLSSPGWENISRPEAAQQAFQGLGPGFSGYTPYGWLQLSWPQQIYARQ
YYMQYLAATAASGAFVPPPSAQEIPVTSAPAPAPIHNQFPAENQPANQNAAPQVVVNPGA
NQNLRMNAQGGPIVEEDDELNRDWLDWTYSAATFSVFLSILYFYSSLSRFLMVMGATVVM
YLHHVGWFPFKPRPRPVQNFPNDGPPPDVVNQDPNNNLQEGTDPETEDPNHLPPDRDVLDGE
QTSPSPFMSTAWLVFKTFFASLLPEGPPAIAN

シグナル配列

膜貫通ドメイン
278-298

N-グリコシル化部位
133-136
141-144

チロシンキナーゼリン酸化部位
262-269

N-ミリストイル化部位
110-115
154-159
239-244

ユビキチンファミリー
10-89

【図２３】

CGAGATGCGGGTCATGGCGCCCCGAACCCTCATCCTGCTGCTCTCGGGAGCCCTGGCCCT
GACCGAGACCTGGGCCTGCTCCCACTCCATGAGGTATTTCGACACCGCCGTGTCCCGGCC
CGGCCGCGGAGAGCCCCGCTTCATCTCAGTGGGCTACGTGGACGACACGCAGTTCGTGCG
GTTCGACAGCGACGCCGCGAAGTCCGAGAGGGGAGCCCCGGCGCCGTGGGTGGAGCAGGA
GGGGCCGGAGTATTGGGACCGGGAGACACAGAAGTACAAGCGCCAGGCACAGGCTGACCG
AGTGAACCTGCGGAAACTGCGCGGCTACTACAACCAGAGCGAGGACGGGTCTCACACCCT
CCAGTGGATGTATGGCTGCGACCTGGGGCCCGACGGGCGCCTCCTCCGCGGGTATGACCA
GTCCGCCTACGACGGCAAGGATTACATCGCCCTGAACGAGGACCTGCGCTCCTGGACCGC
CGCGGACACGGCGGCTCAGATCACCCAGCGCAAGTGGGAGGCGGCCCGTGAGGCGGAGCA
GTGGAGAGCCTACCTGGAGGGCACGTGCGTGGAGTGGCTCCGCAGATACCTGGAGAACGG
GAAGGAGACGCTGCAGCGCGCGGAACACCCAAAGACACACGTGACCCACCATCCCGTCTC
TGACCATGAGGCCACCCTGAGGTGCTGGGCCCTGGGCTTCTACCCTGCGGAGATCACACT
GACCTGGCAGCGGGATGGCGAGGACCAAACTCAGGACACCGAGCTTGTGGAGACCAGGCC
AGCAGGAGATGGAACCTTCCAGAAGTGGGCAGCTGTGGTGGTGCCTTCTGGAGAAGAGCA
GAGATACACGTGCCATGTGCAGCACGAGGGGCTGCCAGAGCCCCTCACCCTGAGATGGGA
GCCATCTTCCCAGCCCACCATCCCCATCGTGGGCATCGTTGCTGGCCTGGCTGTCCTGGC
TGTCCTAGCTGTCCTAGGAGCTGTGATGGCTGTTGTGATGTCTAGGAGGAAGAGCTCAGG
TGGAAAAGGAGGGAGCTGCTCTCAGGCTGCGTCCAGCAACAGTGCCCAGGGCTCTGATGA
GTCTCTCATCGCTTGTAAAGCCTGAGACAGCT

【図２４】

MRVMAPRTLILLLLSGALALTETWACSHSMRYFDTAVSRPGRGEPRFISVGYVDDTQFVRF
DSDAASPRGEPRAPWVEQEGPEYWDRETQKYKRQAQADRVNLRKLRGYYNQSEDGSHTLQ
WMYGCDLGPDGRLLRGYDQSAYDGKDYIALNEDLRSWTAADTAAQITQRKWEAARAAEQW
RAYLEGTCVEWLRRYLENGKETLQRAEHPKTHVTHHPVSDHEATLRCWALGFYPAEITLT
WQRDGEDQTQDTELVETRPAGDGTFQKWAAVVVPSGEEQRYTCHVQHEGLPEPLTLRWEP
SSQPTIPIVGIVAGLAVLAVLAVLGAVMAVVMCRRKSSGGKGGSCSQAASSNSAQGSDES
LIACKA

シグナル配列
1-24

膜貫通ドメイン
308-328

N-グリコシル化部位
110-113

cAMP- 及び cGMP-依存性プロテインキナーゼリン酸化部位
334-337
335-338

チロシンキナーゼリン酸化部位
135-142

N-ミリストイル化部位
310-315
325-330
339-344
342-347
356-361

微小体C末端ターゲティングシグナル
364-367

免疫グロブリン及び主要組織適合性複合体プロテインシグネチャー
281-287

クラスI組織適合性抗原
25-203

免疫グロブリンドメイン
220-285

【図２５】

ACTCCCAACGAGCGCCCAAGAAGAAAATGGCCATAAGTGGAGTCCCTGTGCTAGGATTTT
TCATCATAGCTGTGCTGATGAGCGCTCAGGAATCATGGGCTATCAAAGAAGAACATGTGA
TCATCCAGGCCGAGTTCTATCTGAATCCTGACCAATCAGGCGAGTTTATGTTTGACTTTG
ATGGTGATGAGATTTTCCATGTGGATATGGCAAAGAAGGAGACGGTCTGGCGGCTTGAAG
AATTTGGACGATTTGCCAGCTTTGAGGCTCAAGGTGCATTGGCCAACATAGCTGTGGACA
AAGCCAACCTGGAAATCATGACAAAGCGCTCCAACTATACTCCGATCACCAATGTACCTC
CAGAGGTAACTGTGCTCACGAACAGCCCTGTGGAACTGAGAGAGCCCAACGTCCTCATCT
GTTTCATCGACAAGTTCACCCCACCAGTGGTCAATGTCACGTGGCTTCGAAATGGAAAAC
CTGTCACCACAGGAGTGTCAGAGACAGTCTTCCTGCCCAGGGAAGACCACCTTTTCCGCA
AGTTCCACTATCTCCCCTTCCTGCCCTCAACTGAGGACGTTTACGACTGCAGGGTGGAGC
ACTGGGGCTTGGATGAGCCTCTTCTCAAGCACTGGGAGTTTGATGCTCCAAGCCCTCTCC
CAGAGACTACAGAGAACGTGGTGTGTGCCTGGGCCTGACTGTGGGTCTGGTGGGCATCA
TTATTGGGACCATCTTCATCATCAAGGGACTGCGCAAAAGCAATGCAGCAGAACGCAGGG
GGCCTCTGTAAGGCACATGGAGGTGATGATGTTTCTTAGAGAGAAGATCACTGAAGAAAC
TTCTGCTTTAATGACTTTACAAAGCTGGCAATATTACAATCCTTGACCTCAGTGAAAGCA
GTCATCTTCAGCGTTTTCCAGCCCTATAGCCACCCCAAGTGTGGTTATGCCTCCTCGATT
GCTCCGTACTCTAACATCTAGCTGGCTTTCCCTGTCTATTGCCTTTTCCTGTATCTATTT
TCCTCTATTTCCTATCATTTTATTATCACCATGCAATGCCTCTGGAATAAAACATACAGG
AGTCTGTCTCTGCTATGGAATGCCCCATGGGGCTCTCTTGTGTACTTATTGTTTAAGGTT
TCCTCAAACTGTGATTTTTCTGAACACAATAAACTATTTTGATGATCTTGGGTGGAAAA

【図２６】

MAISGVPVLGFFIIAVLMSAQESWAIKEEHVIIQAEFYLNPDQSGEFMFDFDGDEIFHVD
MAKKETVWRLEEFGRFASFEAQGALANIAVDKANLEIMTKRSNYTPITNVPPEVTVLTNS
PVELRRPNVLICFIDKPTPPVVNVTWLRNGKPVTTGVSETVFLPREDHLFRKFHYLPFLP
STEDVYDCRVEHWGLDEPLLKHWEFDAPSPLPETTENVVCALGLTVGLVGIIIGTIFIIK
GVRKSNAAERRGPL

シグナル配列
1-25

膜貫通ドメイン
218-238

N-グリコシル化部位
143-146

cAMP- 及び cGMP-依存性プロテインキナーゼリン酸化部位
63-66

N-ミリストイル化部位
83-88
156-161
223-228
230-235
241-246

免疫グロブリン及び主要組織適合性複合体プロテインシグネチャー
186-192

クラスII組織適合性抗原
29-109

免疫グロブリンドメイン
125-190

【図２７】

ATGGCGCCCCGAAGCCTCCTCCTGCTGCTCTCAGGGGCCCTGGCCCTGACCGATACTTGG
GCGGGCTCCCACTCCTTGAGGTATTTCAGCACCGCTGTGTCGCGGCCCGGCCGCGGGGAG
CCCCGCTACATCGCCGTGGAGTACGTAGACGACGCGAATTCCTGCGGTTCGACAGCGAC
GCCGCGATTCCGAGGATGGAGCCGCCGGGAGCCGTGGGTGGAGCAAGAGGGCCGCAGTAT
TGGGAGTGGACCACAGGGTACGCCAAGGCCAACGCACAGACTGACCGAGTGGCCCTGAGG
AACCTGCTCCGCCGCTACAACCAGAGCGAGGCTGGGTCTCACACCCTCCAGGGAATGAAT
GGCTGCGACATGGGGCCCGACGGACGCCTCCTCCGCGGTATCACCAGCACGCGTACGAC
GGCAAGGATTACATCTCCCTGAACGAGGACCTGCGCTCCTGGACCGCGGCGGACACCGTG
GCTCAGATCACCCAGCGCTTCTATGAGGCAGAGGAATATGCAGAGGAGTTCAGGACCTAC
CTGGAGGGCGAGTGCCTGGAGTTGCTCCGCAGATACTTGGAGAATGGGAAGGAGACGCTA
CAGCGCGCAGATCCTCCAAAGGCACACGTTGCCCACCACCCCATCTCTGACCATGAGGCC
ACCCTGAGGTGCTGGGCCCTGGGCTTCTACCCTGCGGAGATCACGCTGACCTGGCAGCGG
GATGGGGAGGAACAGACCCAGGACACAGAGCTTGTGGAGACCAGGCCTGCAGGGGATGGA
ACCTTCCAGAAGTGGGCCGCTGTGGTGGTGCCTTCTGGAGAGGAACAGAGATACACATGC
CATGTGCAGCACGAGGGGCTGCCCCAGCCCCTCATCCCTAGATGGGAGCAGTCTCCCCAG
CCCACCATCCCCATCGTGGGCATCGTTGCTGGCCTTCTTGTCCTTGGAGCTGTGGTCACT
GGAGCTGTGGTCGCTGCTGTGATGTGGAGGAAGAAGAGCTCAGATAGAAACAGAGGGAGC
TACTCTCAGGCTGCAGTCACTGACAGTGCCCAGGGCTCTGGGGTGTCTCTCACAGCTAAT
AAAGTGTGAGACAGCTTCCTTGTGTGGGACTGAGAAGCAAGATATCAATGTAGCAGAATT
GCACTTGTGCCTCACGAACATACATAAAATTTTAAAAATAAAGAATAAA

【図２８】

MAPRSLLLLLSGALALTDTWAGSHSLRYFSTAVSRPGRGEPRYIAVEYVDDTQFLRFDSD
AAIPRMEPREPWVEQEGPQYWEWTTGYAKANAQTDRVALRNLLRRYNQSEAGSHTLQGMN
GCDMGPDGRLLRGYHQHAYDGKDYISLNEDLRSWTAADTVAQITQRFYEAEEYAEEFRTY
LEGECLELLRRYLENGKETLQRADPPKAHVAHHPISDHEATLRCWALGFYPAEITLTWQR
DGEEQTQDTELVETRPAGDGTFQKWAAVVVPSGEEQRYTCHVQHEGLPQPLILRWEQSPQ
PTIPIVGIVAGLVVLGAVVTGAVVAAVMWRKKSSDRNRGSYSQAAVTDSAQGSGVSLTAN
KV

シグナル配列
1-17

膜貫通ドメイン
304-324

N-グリコシル化部位
107-110

cAMP- 及び cGMP-依存性プロテインキナーゼリン酸化部位
330-333
331-334

チロシンキナーゼリン酸化部位
166-173

N-ミリストイル化部位
118-123
307-312
316-321
321-326
352-357
354-359

微小体C末端ターゲティングシグナル
360-363

クリスタリンβ及びγ「Greek Key」モチーフシグネチャー
131-146

免疫グロブリン及び主要組織適合性複合体プロテインシグネチャー
278-284

クラスI組織適合性抗原、ドメイン
22-200

免疫グロブリンドメイン
217-282

【図２９】

CAAGGATGGTGGTCATGGCGCCCCGAACCCTCTTCCTGCTGCTCTCGGGGGCCCTGACCC
TGACCGAGACCTGGGCGGGCTCCCACTCCATGAGGTATTTCAGCGCCGCCGTGTCCCGGC
CCGGCCGCGGGGAGCCCCGCTTCATCGCCATGGGCTACGTGGACGACACGCAGTTCGTGC
GGTTCGACAGCGACTCGGCGTGTCCGAGGATGGAGCCGCGGGCGCCGTGGGTGGAGCAGG
AGGGGCCGGAGTATTGGGAAGAGGAGACACGGAACACCAAGGCCCACGCACAGACTGACA
GAATGAACCTGCAGACCCTGCGCGGCTACTACAACCAGAGCGAGGCCAGTTCTCACACCC
TCCAGTGGATGATTGGCTGCGACCTGGGGTCCGACGGACGCCTCCTCCGCGGGTATGAAC
AGTATGCCTACGATGGCAAGGATTACCTCGCCCTGAACGAGGACCTGCGCTCCTGGACCG
CAGCGGACACTGCGGCTCAGATCTCCAAGCGGAAGTGTGAGGCGGCCAATGTGGCTGAAC
AAAGGAGAGCCTACCTGGAGGGCACGTGCGTGGAGTGGCTCCACAGATACCTGGAGAACG
GGAAGGAGATGCTGCAGCGCGCGGACCCCCCCAAGACACACGTGACCCACCACCCTGTCT
TTGACTATGAGGCCACCCTGAGGTGCTGGGCCCTGGGCTTCTACCCTGCGGAGATCATAC
TGACCTGGCAGCGGGATGGGGAGGACCAGACCCAGGACGTGGAGCTCGTGGAGACCAGGC
CTGCAGGGGATGGAACCTTCCAGAAGTGGGCAGCTGTGGTGGTGCCTTCTGGAGAGGAGC
AGAGATACACGTGCCATGTGCAGCATGAGGGGCTGCCGGAGCCCCTCATGCTGAGATGGA
AGCAGTCTTCCCTGCCCACCATCCCCATCATGGGTATCGTTGCTGGCCTGGTTGTCCTTG
CAGCTGTAGTCACTGGAGCTGCGGTCGCTGCTGTGATGTGGAGAAAGAAGAGCTCAGATT
GAAAGGAGGGAGCTACTCTCAGGCTGCAATGTGAAACAGCTGCCCTGTGTGGGACTGAG
TGGCAAGTCCCTTTGTGACTTCAAGAACCCTGACTTCTCTTTGTGCAGAGACCAGCCCAC
CCCTGTGCCCACCATGACCCTCTTCCTCATGCTGAACTGCATTCCTTCCCCAATCACCTT
TCCTGTTCCAGAAAAGGGGCTGGGATGTCTCCGTCTCGTCTCAAATTTGTGGTCCACTG
AGCTATAACTTACTTCTGTATTAAAATTAGAATCTGAGTAT

【図３０】

MVVMAPRTLFLLLSGALTLTETWAGSHSMRYFSAAVSRPGRGEPRFIAMGYVDDTQFVRF
DSDSACPRMEPRAPWVEQEGPEYWEEETRNTKAHAQTDRMNLQTLRGYYNQSEASSHTLQ
WMIGCDLGSDGRLLRGYEQYAYDGKDYLALNEDLRSWTAADTAAQISKRKCEAANVAEQR
RAYLEGTCVEWLHRYLENGKEMLQRADPPKTHVTHHPVFDYEATLRCWALGFYPAEIILT
WQRDGEDQTQDVELVETRPAGDGTFQKWAAVVVPSGEEQRYTCHVQHEGLPEPLMLRWKQ
SSLPTIPIMGIVAGLVVLAAVVTGAAVAAVLWRKKSSD

シグナル配列
1-24

膜貫通ドメイン
306-326

N-グリコシル化部位
110-113

cAMP- 及び cGMP-依存性プロテインキナーゼリン酸化部位
333-336
334-337

チロシンキナーゼリン酸化部位
135-142

N-ミリストイル化部位
124-129
310-315
324-239

免疫グロブリン及び主要組織適合性複合体プロテインシグネチャー
281-287

クラスI組織適合性抗原
25-203

免疫グロブリンドメイン
220-285

【図３１Ａ】

GTAAGAGTCGAGGCCTGAGTCGCAGTAGAAGCCGAAGTAGGGGGCGCAGCAAAGACCGGG
ATCCAAATAGGAATGTTGAGCACAGGGAAAGATCGAAGTTTAAGAGTGAAAGGAATGACC
TGGAGAGTTCCTATGTGCCTGTGTCTGCACCACCTCCAAACTCTTCTGAGCAGTATTCCT
CTGGGGCACAGTCTATTCCCAGCACTGTTACTGTGATCGCACCTGCTCACCACTCTGAAA
ACACAACTGAGAGTTGGTCTAATTACTATAACAATCATAGCTCTTCCAATTCTTTTGGTC
GAAACCTACCACCAAAGAGGCGATGCAGAGATTATGATGAAAGAGGATTTTGTGTACTTG
GTGACCTTTGTCAGTTTGATCATGGAAATGATCCCCTAGTTGTTGATGAAGTTGCTCTGC
CAAGTATGATTCCTTTCCCACCCCCTCCTCCTGGGCTTCCTCCTCCACCACCTCCTGGAA
TGTTAATGCTCCAATGCCAGTTCCAGGCCCAGCCCGGGCCCAGGTCCAGGCCAGGCCC
CGGCCCAGGTCCAGGTCCTGGCCATAGTATGAGACTTCCTGTTCCCCAAGGACATGGTC
AGCCTCCACCATCCGTTGTGCTTCCCATACCAAGACCACCTATAACACAATCAAGCTTGA
TAAACAGCCGTGACCAGCCTGGGACAAGTGCAGTGCCCAATCTTGCATCAGTGGGAACAA
GACTACCTCCTCCTTTACCCCAGAACCTCCTTTACACAGTATCAGAACGACAGCCCATGT
ACTCTCGTGAACATGGTGCTGCTGCATCTGAGCGACTTCAGTTGGGGACACCGCCTCCTC
TGTTGGCAGCTCGTTTGGTGCCACCTCGAAACCTCATGGGATCCTCCATTGGATACCATA
CCTCAGTCTCCAGCCCTACCCCTCTGGTTCCAGATACATATGAACCAGATGGTTACAACC
CAGAAGCTCCTAGTATTACTAGTTCTGGTAGATCTCAGTACAGACAGTTCTTTTCAAGAA
CTCAGACACAGCGTCCCAATCTGATTGGCCTAACATCTGGAGATATGGATGTAAATCCAA
GAGCTGCTAACATTGTGATCCAGACTGAACCACCAGTTCCTGTTTCGATTAATAGCAACA
TAACCAGAGTAGTTCTTGAACCAGATAGCTCTAGAAAGAGCTATGAGTGGTTTGGAGGGC
CACTCACAAAGAAACCTTGGCTGGGAAAGCAAGGAAATAACAATCAAAATAAACCAGGGT
TCTTACGAAAGAATCAGTATACAAACACCAAATTAGAAGTCAAGAAAATCCCTCAGGAAT
TGAACAACATTACCAAGCTCAATGAACACTTCAGCAAATTTGGAACTATTGTTAATATCC
AGGTTGCTTTTAAGGGTGACCCAGAAGCAGCCCTAATCCAATATCTTACCAATGAGGAGG
CCAGGAAAGCCATTTCTAGCACAGAAGCAGTTCTAAACAACCGATTCATTCGAGTCTTGT
GGCATAGGGAAAATAATGAGCAACCGACACTACAGTCCTCAGCACAGCTGCTCCTGCAAC
AACAGCAAACACTTAGTCACCTCTCACAGCAGCACCATCACCTGCCACAGCATCTACATC
AGCAGCAGGTGCTAGTGGCCCAGTCTGCTCCTTCAACAGTGCACGGAGGTATCCAGAAGA
TGATGAGCAAACCACAGACATCAGGTGCATATGTTCTTAACAAAGTTCCTGTTAAACATC
GTCTTGGACATGCAGTGGTAACAGAGTGATGCATCACATTGTTGAATCAGTCTGGTGTG
GTGCTGGAGAAGATTGCCAGATATTTTCAACTCCAGCCATCCAAAAATGATTTACAGCT
CCTCAAACTTAAAGACACCTTCAAAGCTCTGTTCAGGGTCTAAATCTCATGATGTTCAAG
AAGTGCTTAAAAAAAAACAGGAAGCAATGAAGTTACAACAAGATATGAGGAAAAAAGAC
AGGAAGTGTTAGAAAAGCAAATAGAATGCCAAAAGATGTTAATATCCAAGTTAGAAAAAA
ACAAAAACATGAAACCAGAAGAAAGAGCAAATATAATGAAGACTTTGAAAGAGCTTGGAG
AGAAGATCTCACAATTAAAAGATGAATTAAAAACATCTTCTGCAGTCTCCACACCATCTA
AAGTGAAGACAAAAACGGAGGCCCAGAAGGAGTTATTAGATACTGAACTGGACCTCCACA
AGAGGCTGTCCTCAGGAGAAGACACCACAGAATTACGGAAAAAACTCAGTCAGTTACAGG
TTGAGGCTGCACGGTTAGGTATTTTACCTGTGGGTCGAGGAAAGACCATGTCCTCTCAAG
GTCGAGGAAGAGGCCGAGGGCGTGGAGGAAGAGGAAGGGGCTCACTAAATCACATGGTGG
TGGACCATCGTCCCAAAGCACTAACAGTTGGAGGATTCATTGAGAGAAGAAAAGAAGACT
TGCTTCAGCATTTCTCAACCGCAAACCAAGGGCCAAAATTAAAGACCGTCGGCTACAGA
TATCATGGCACAAGCCCAAGGTACCATCTATATCCACTGAGACTGAAGAAGAAGAAGTCA
AGGAGGAGGAAACAGAAACCTCAGATTTGTTTTTGCCTGATGATGACGATGAAGATGAAG
ATGAATATGAGTCTCGCTCATGGCGAAGATGAAATCTGATGCTAGCTGTATAATTTTTAG
GAATATTGTTTAGAAGAACAACTTTTAAAAATTATTTAAAAGAAGTCAATGAGCCAAAAA
AAATTTTTTTATTTTTCTTTCAACACAGTAGGTTCAAGAACAGCAAGTTTGCTATTTAA
ACACATCTCATAACTGTACATGATATTAAAGCACCAAAGGCCTAGTGACTTTTACACAGT
TGTGAAGATCCACAGCAATGACATGGATAATCTCTAGAGCCTTATTTTCCACACCACCTT
TTTTTTGTTGCTGTTGGTGTTGGATTATGATGTAAATGACAGGGTGTTCAGAAATTTTAT
TTTGGATTATAATCTACTGATAAAATTTAATTAAATGTCAAAATCACCTGTAATCTTTTA
ACTCTCAGTTGTTATGGATGGGTCATCAGACAGTAGGAAATATTTGTAATTAAAATACCC
TTTTGCTTTCAAGAGTGGTCTTGGAAGAAAATATGTTTATTTTAATTTTAATTTTTTTT
TTTTTTACTTTGGAGGAGCCCAATTGTATTCAGTCTAAATTTGTTTTTCATGGTTTTT
ATGTGTGGTAGTACTAGTTCAGTGAAAATCACAACAAACTGTGTGTTCTTAAATGCTACA
GCAATGGTAGCTAGCTCTATAGTATTTCCATTCTCTTGTCATATGAACTCCTGGACTTTT

【図３１Ｂ】

CCTGCTACTGATTCTTAGTTTGCTTTGATATTTAGTGAGCGCTGGTTCGGCTGGTCTTTT
TAAAAATTTTTATAACTCAGAATGTAAAAGGCTTCCACCTATTGCCCCTTTCTCGTCCCC
CTTTTCTTCTCTTGCCTTTCTATTAATAGGCCTGACTTAGTCATCATTGATATAAGTGG
TTCATTTGGGCAACCGCAGGCAGTCTCCAATAAAAGGTTCAAACCAGCACCTGGATAAAT
AAGTGATGTTTTGATGAGAATGATGGAAGGATTTTGGGGAGAAGAGAATCACCAGCTTTA
TTTTTTCCCTCTTTGAAGCTTCAGTTCAGTATAGTTACACAGAAGGGTTTAAAAATGTC
TGAAATTCTTTTCCTAAATTTAAACCATGATGGTGAGGTGACTGGGGGGTGGGGGGTGGA
GGTGGGAGGGGGTTGAGGGCTGAGTATGCTAGTAATAAATGGGAGTCATATATGACTTTG
TTCAGATGACCTTATTTTTTCATAATTTTGTAGCTTGTTGCTATCCATGAACATACGCAT
CCCTCAGTAGACAGTTTCCTTACTGTGTGTCATTTTACTGTACACTGTATAGAGTAGAG
TATCTGTTAAGTAAAATATATATGTAAATTTATGTCTTCGTGTTCTGAATGTTAGATGGA
AAAGCAGAGGAGCAACACTACACTGTACTGACCCCTCGGAAAATAAAATGATTAATGTAC
CTAGGCTGTCACTTTTTCAAGATATACACATCTGTGTTTTTATATATGTGTGGTATGAA
AATTTGAAACCTCCTGTTGTCTCCAAAAGGGTCTTGGTGACCACTATATCAAGGATTTTG
TTTGCTGAGGTAAAGACAATTTCTCAATATAGAAACTATTCACTAAGAACTTAAAACCAT
CAGGATTCTAGATTTACTTAGCTATAAGAAGTTAAATCCCACGTTCTGATAATCTTTATT
CTTCTACATGTTTTCCTGGAATGATGTGTCAAACCAGGGTCATTTTTAAGTTCATATAAT
TTTCTTTCATAATAATGAGGACTTCCTTTTTCTAGGTTATTGTTATATTTCTAGTAACAC
TGAAGGTAAAATAAGCTTATAAAAGAAGGAAAACATCAGAATGGTGTATCTAGAATACAC
AATCTTGCTCCTTACTCCTCCATCATCTCTAATGAAATTTTTCTTGATGTCTGTGGCTCA
GTCAGTATATATTTTGAAAGATTCATTGTGGTGAATATTTGAGTCCTGACAGTTTAAAC
GTGATAGAGGGAACAAAGGATTTATATATTTTTTGTACAAGTTTTTCTTAAACTGTAT
AATTTTGTAAATAATTGTTTCGGGTTTTTTTTTGTGTACTAAAACTACCAGCGTATAGA
TTTCAATAAGAATTGTTGTATTTTGTGTATTTGGAAACTGAAAATTACAGTAAATAAATGG
AACTCTAAGAAAAATTCAGTAGACAGTTCAACAGAATGAGATTCCTTTTCATATGATTT
TTTTGACCTCAAAATGGACATCTTATTTCACTCTCAGTAAAAAGTTGAAAATTTGACTTT
TTAGTATTGGGGGCAGAAGATAGAAGTGTGTTAAAGTGAAAAACAGTTTTTTCAGTAAGG
TTTGAGGCCCTTTCTATAAGTTTTCAGTACACCTTAAACAGGACTAAAAATACTTTAAAA
GTGTGCTTTCAAAGAATTTTAAAACATGTTTGACTCAAAGATGAATTTGAAGTGAGTTAA
TTATAATACTGGAAAACTTCAGGTTAGCATAAAATAGTTTATATATATCCCCTGCCCCCT
TTGGGATTTACTTCCACCATCAAATCTTCAACTGTTAGAATTTCACTTAAAAGTGAATAA
CTGCCATACATGTTTCTTGGCATCTTCATTTACAGAAATACATACAGCATCTAAAGCA
AGTTCTGTCCCTCTTAATGTGTATGACATCTTTTTAAGTAGCTGATCAGCAATAATAGCC
ACCAGTTGACTAGGTCAGCCTGATATACTAGTGGATCACTGTCCAAGATAAAAAGGTAAC
CCCAAGTATTGCAAAATTTCCCTCAATTTCTTTATGTAACATTGAAGAAATGTTGTTACC
AGCTAAGATGATAAATTGGAAAACAGTCTTGTTAAGGTGAAAGGGGTCCTTGGTGATGGA
TCATTATTTCAAAAAGAAAAAAATCATGTGAAAAGGAATAGTGGTTCCTCTTGATGTAT
AGTATGCCTGTATTATAGTTTTTACAAAATTGTGAACTTGTGTAATAGTATAATAGGAGA
TATTGTTGAATTTCTAACTGTTTATACATTTAAATTCATATATGTAATGTTTGTTTTATC
AATTACAATCTGAATTTCTAAGAAGCATGTTGACTTTTGCAATAAAGATGCAATATGGAA
TGGTTCACAATTGG

【図３２】

MIPPPPPPPPGLPPPPPPPGMLMPPMPGPGPGPGPGPGPGPGPGPHSMRLPVPQGHGQP
PPSVVLPIPRPPITQSSLINSRDQPGTSAVPNLASVGTRLPPPLPQNLLYTVSERQPMYS
RRHGAAASERLQLGTPPPLLAARLVPPRNLMGSSIGYHTSVSSPTPLVPDTYEPDGYNPE
APSITSSGRSQYRQFFSRTQTQRPNLIGLTSGDMDVNPRAANIVIQTEPPVPVSTNSNIT
RVVLEPDSRKRAMSGLEGPLTKKPWLGKQGNNNQNKPGPLRKNQYTNTKLEVKKIPQELN
NITKLNEHFSKPGTIVNIQVAFKGDPEAALIQYLTNEEARKAISSTEAVLNNRFIRVLWH
RENNEQPTLQSSAQLLLQQQQTLSHLSQQHHHLPQHLHQQQVLVAQSAPSTVHGGIQKMM
SKPQTSGAYVLNKVPVKHRLGHAGGNQSDASHLLNQSGGAGEDCQIFSTPGHPKMIYSSS
NLKTPSKLCSGSKSHDVQEVLKKKQEAMKLQQDMRKKRQEVLSKQIECQKMLISKLEKNK
NMKPEERANIMKTLKELGEKISQLKDELKTSSAVSTPSKVKTKTEAQKELLDTELDLHKR
LSSGEDTTELRKKLSQLQVEAARLGILPVGRGKTMSSQGRGRGRGRGRGSLNHMVVD
HRPKALTVGGFIEREKEDLLQHFSTANQGFKFKDRRLQISWHKPKVPSISTETEEEVKE
EETETSDLFLPDDDDEDEYESRSWRR

シグナル配列
無し

膜貫通ドメイン
無し

N-グリコシル化部位
238-241
301-304
446-449
455-458

cAMP- 及び cGMP-依存性プロテインキナーゼリン酸化部位
599-602
612-615

N-ミリストイル化部位
124-129
152-157
208-213
313-318
444-449

【図３３】

AAACACTCTGTGTGGCTCCTCGGCTTTGGGACAGAGTGCAAGACGATTGACTTGCAAAATG
TCGCAGCTGGAACGCAACATAGAGACCATCATCAACACCTTCCACCAATACTCTGTGAAG
CTGGGGCACCCAGACACCCTGAACCAGGGGGAATTCAAAGAGCTGGTGCGAAAAGATCTG
CAAAATTTTCTCAAGAAGGAGAATAAGAATGAAAAGGTCATAGAACACATCATGGAGGAC
CTGGACACAAATGCAGACAAGCAGCTGAGCTTCGAGGAGTTCATCATGCTGATGGCGAGG
CTAACCTGGGCCTCCCACGAGAAGATGCACGAGGGTGACGAGGGCCCTGGCCACCACCAT
AAGCCAGGCCTCGGGGAGGGCACCCCCTAAGACCACAGTGGCCAAGATCACAGTGGCCAC
GGCCATGGCCACAGTCATGGTGGCCACGGCCACAGGCCACTAATCAGGAGGCCAGGCCAC
CCTGCCTCTACCCAACCAGGGCCCCGGGGCCTGTTATGTCAAACTGTCTTGGCTGTGGGG
CTAGGGGCTGGGGCCAAATAAAGTCTCTTCCTCCAA

【図３４】

MTCKMSQLERNIETIINTFHQYSVKLGHPDTLNQGEPKELVRKDLQNPLKKENKNEKVIE
HIMEDLDTNADKQLSFEEFIMLMARLTWASHEKMHEGDEGPGHHHKPGLGEGTP

シグナル配列
無し

膜貫通ドメイン
無し

N-ミリストイル化部位
108-113

S-100/ICaBP 型カルシウム結合ドメイン
8-51

EF hand
58-86

【図３５】

AAGAGGAAGCGCTGGCAGACAATGCGACCCGACCGCGCTGAGGCTCCAGGACCGCCCGCC
ATGGCTGCAGGAGGTCCGGCGCGGGGTCTGCGGCCCCGGTCTCCTCCACATCCTCCGTT
CCCCTGGCTGCTCTCAACATGCGAGTGCGGGCCCGCCTGTCTCTTGAACGTGCGG
ACACGGGTGGCCGCCGACTGGACCGCGCTGCGCGGAGGAGATGGACTTTGAGTACTTGGAG
ATCCGGCAACTGGAGACACAAGCGGACCCCACTGGCAGGCTGCTGGACGCCTGGCAGGGA
CGCCCTGGCGCCTCTGTAGGCCGACTGCTCGAGCTGCTTACCAAGCTGGGCCGCGACGAC
GTGCTGCTGGAGCTGGGACCCAGCATTGAGGAGGATTGCCAAAAGTATATCTTGAAGCAG
CAGCAGGAGGAGGCTGAGAAGCCTTTACAGGTGGCCGCTGTAGACAGCAGTGTCCCACGG
ACAGCAGAGCTGGCGGGCATCACCACACTTGATGACCCCCTGGGGCATATGCCTGAGCGT
TTCGATGCCTTCATCTGCTATTGCCCCAGCGACATCCAGTTTGTGCAGGAGATGATCCGG
CAACTGGAACAGACAAACTATCGACTGAAGTTGTGTGTGTCTGACCGCGATGTCCTGCCT
GGCACCTGTGTCTGGTCTATTGCTAGTGAGCTCATCGAAAAGAGGTGCCGCCGGATGGTG
GTGGTTGTCTCTGATGATTACCTGCAGAGCAAGGAATGTGACTTCCAGACCAAATTTGCA
CTCAGCCTCTCTCCAGGTGCCCATCAGAAGCGACTGATCCCCATCAACTACAAGGCAATG
AAGAAAGAGTTCCCCAGCATCCTGAGGTTCATCACTGTCTGCGACTACACCAACCCCTGC
ACCAAATCTTGGTTCTGGACTCGCCTTGCCAAGGCCTTGTCCCTGCCCTGA

【図３６】

MAAGGPGAGSAAPVSSTSSLPLAALNMRVRRRLSLFLNVRTQVAADWTALAEEMDFEYLE
IRQLETQADPTGRLLDAWQGRPGASVGRLLELLTKLGRDDVLLELGPSIEEDCQKYLLKQ
QQEEAEKPLQVAAVDSSVPRTASLAGITTLDDPLGHMPERFDAFICYCPSDIQFVQEMIR
QLEQTNYRLKLCVSDRDVLPGTCVWSIASELIEKRCRRMVVVVSDDYLQSKECDFQTKFA
LSLSPGAHQKRLIPIKYKAMKKEFPSILRFITVCDYTNPCTKSWFWTRLAKALSLP

シグナル配列
1-45

膜貫通ドメイン
無し

cAMP- 及び cGMP-依存性プロテインキナーゼリン酸化部位
31-34

チロシンキナーゼリン酸化部位
180-187

N-ミリストイル化部位
4-9
7-12
83-88

成長因子及びサイトカインレセプターファミリーシグネチャー1
192-205

TIR ドメイン
163-292

デスドメイン
33-109

【図３７】

GAATTCGGCACGAGTGCCCAGCTCCTGCTGTAATTAGCTCCACGTGTACCCCCTTCATTC
CCTCCCTCCCACCGAGCCATCCCTGACCCAGGAACTTTCCGCAGACTCGCCGCCATCTGG
GAGTGAAGCAACATGGATGCAGTCAGCCAAGTCCCCATGGAAGTCGTGCTTCCCAAGCAC
ATCCTGGATATCTGGGTTATTGTCCTCATCATCCTGGCCACCATTGTCATCATGACCTCG
TTGTTGCTGTGCCCAGCCACTGCAGTAATCATCTATCGCATGCGGACTCATCCGATCCTT
AGTGGGGCTGTTTGAGAGCCTCCCAAGAGGGCCGGGTGAGGGATGAGGACAGGCATCCTA
TCCCCAGCCTCTTCCTGTCTTCAGAAAAGCAGCAGGAGGGACTTTGGGGCATGGACCTGA
GTTCTGGTTTTGATTCTGCCACGAGCCAGCTGTGTGAATTTGGTCAAGGGACCTAACTCT
CTGAGTTCCAGGTTCCTTATCTTTCAAATGGGGATGGTGATCCCTGCCCTTTCTACCTCA
TAGGGATGTGAGAACCACCTGACTTAGTGGATGTGAAAGCTGTTTGTGATCAGTAAAGCT
ACCACAGATATAAGGGTGTTATGCTGAATCCTGAGAAGCTTTCAAGAACCAGAGAACCTG
ATTGCTGATGATGGCCTTTAAAGGTGGTGAGGGAGATACTGGGGGCAGAGCAGACTTTGCC
AGTGCCCCTCAGGTCAAACCAAGCCAAGAGCACCCTGTCCCATTCCAAGGGGCCAGCAG
CACTTTGGCCCAAAGTATTTTCTTTAAGGTGCCATTCCTTCATGTTTTCTCAGTTTGGAG
GGTGATGGGTAGAGCTTTCCAGAACCTTCTCCATTCCAGAATCTCTGCCCCTGTGTAATC
TGAAGGAAGGCTGTGCCATCTTTGGGCACTGCCAAGGAGTTGGGGTGATGGGCTTCTTT
CTGCACTGGAGTCTCACATCTGTTAGCTTTGACACTCAAGCAATGTTGGAAAATGCAGGG
TGACTGAGTTCCCTGCCCAGCTTTCGGGATCTCTGGCCCCCATCCCCTTGTGTGTGTCCC
TCTGCCCAGCTCCTGCTGTAATTAGCTCCACGTGTACCCCCTTCACTCCCTCCCACCAGC
TCTGCAGCCAGCCTATGGCAATTATATTTTAAGAGGTGTTCCCAGGACTTTTGGGACCTA
CTAAAACAATGATGGTTATTTTAGATGTGATGATTTATATTTATGTAGAGATATTTCTGG
ACCACTCAAGCTCTTCGATACCAAATCAGGAGCATCTTGGGATTTATTAAATTATGTAA
GAAGATAGCACAGATATCGGGATATTATTGTGTGAAAATGCTGCTTTTACTTTGATGTGA
TCTCATTGATGTACACAACCAAGTTCCAATAAAGTGCTAGAATGTGAAAAAAAAAAAAAA
AAAACTGCGAGGGGGGGACCCGTAACCCTAATCGACCTTAATGAGTGTA

【図３８】

MDAVSQVPMEVVLPKHILDIWVIVLIILATIVIMTSLLLCPATAVIIYRMRTHPILSGAV

シグナル配列
1-44

膜貫通ドメイン
無し

【図３９Ａ】

CTGGAGCAGCTGAAACCGGTTTGAGCGTGGCTGCTTCCTGCCGCTCGACGCCGCGGCAGG
CCGCCTGGGGGAGCGCTGGCGAGGCACGGACGGCGGGCGCCCGGTACCTCTGCCCCGCGGT
CCTCGCTCTCGGGCCGGGCGGCGGCGACGCGGACCTGCGGACTAGCGAACCCGGAGCACG
ACATCATAAAATAAATCCATCAGAATGACACCTTCTCAGGTTGCCTTTGAAATAAGAGGA
ACTCTTTTACCAGGAGAAGTTTTTGCGATATGTGGAAGCTGTGATGCTTTGGGAAACTGG
AATCCTCAAAATGCTGTGGCTCTTCTTCCAGAGAATGACACAGGTGAAAGCATGCTATGG
AAAGCAACCATTGTACTCAGTAGAGGAGTATCAGTTCAGTATCGCTACTTCAAAGGGTAC
TTTTTAGAACCAAAGACTATCGGTGGTCCATGTCAAGTGATAGTTCACAAGTGGGAGACT
CATCTACAACCACGATCAATAACCCCTTTAGAAAGCGAAATTATTATTGACGATGGACAA
TTTGGAATCCACAATGGTGTTGAAACTCTGGATTCTGGATGGCTGACATGTCAGACTGAA
ATAAGATTACGTTTGCATTATTCTGAAAAACCTCCTGTGTCAATAACCAAGAAAAATTA
AAAAAATCTAGATTTAGGGTGAAGCTGACACTAGAAGCCTGGAGGAAGATGACGATGAT
AGGGTATCTCCCACTGTACTCACAAATGTCCAATAGCTTGGAGATATCCTTAATAAGC
GACAATGAGTTCAAGTGCAGGCATTCACAGCCGGAGTGTGGTTATGGCTTGCAGCCTGAT
CGTTGGACAGAGTACAGCATACAGACGATGGAACCAGATAACCTGGAACTAATCTTTGAT
TTTTTCGAAGAAGATCTCAGTGAGCACGTAGTTCAGGGTGATGCCCTTCCTGGACATGTG
GGTACAGCTTGTCTCTTATCATCCACCATTGCTGAGAGTGGAAAGAGTGCTGGAATTCTT
ACTCTTCCCATCATGAGCAGAAATTCCCGGAAAACAATAGGCAAAGTGAGAGTTGACTAT
ATAATTATTAAGCCATTACCAGGATACAGTTGTGACATGAAATCTTCATTTTCCAAGTAT
TGGAAGCCAAGAATACCATTGGATGTTGGCCATCGAGGTGCAGGAAACTCTACAACGACT
GCCCAGCTGGCTAAAGTTCAAGAAAATACTATTGCTTCTTTAAGAAATGCTGCTAGTCAT
GGTGCAGCCTTTGTAGAATTTGACGTACACCTTTCAAAGGACTTTGTGCCCGTGGTATAT
CATGATCTTACCTGTTGTTTGACTATGAAAAGAAATTTGATGCTGATCCAGTTGAATTA
TTTGAATTCCAGTAAAGAATTAACATTTGACCAACTCCAGTTGTTAAAGCTCACTCAT
GTGACTGCACTGAAATCTAAGGATCGGAAAGAATCTGTGGTTCAGGAGGAAAATCTCTTT
TCAGAAAATCAGCCATTTCCTTCTCTTAAGATGGTTTTAGAGTCTTTGCCAGAAGATGTA
GGGTTTAACATTGAAATAAAATGGATCTGCCAGCAAAGGGATGGAATGTGGGATGGTAAC
TTATCAACATATTTTGACATGAATCTGTTTTTGGATATAATTTTAAAAACTGTTTTAGAA
AATTCTGGGAAGAGGAGAATAGTAGTTTTCTTCATTGATGCAGATATTTGCACAATGGTT
CGGCAAAAGCAGAACAAATATCCGATACTATTTTTAACTCAAGGAAAATCTGAGATTTAT
CCTGAACTCATGGACCTCAGATCTCGGACAACCCCATTGCAATGAGCTTTGCACAGTTT
GAAAATCTACTGGGGATAAATGTACATACTGAAGACTTGCTCAGAACTCATCCTATATT
CAAGAGGCAAAGCTAAGGGACTAGTCATATCTGCTGGGGTGATGATACCAATGATCCT
GAAAACAGAAGCAAATTGAAGGAACTTGGAGTTAATGGTCTAATTTATGATAGGATATAT
GATTGGATGCCTGAACAACCAAATATATTCCAAGTGGAGCAATTGGAACGCCTGAAGCAG
GAATTGCCAGAGCTTAAGAGCTGTTTGTTGTCCCACTGTTAGCCGCTTTGTTCCCTCATCT
TTGTGTGGGGAGTCTGATATCCATGTGGATGCCAACGGCATTGATAACGTGGAGAATGCT
TAGTTTTATTGCACAGAGGTCATTTTGGGGGCGTGCACCGCTGTTCTGGGTATTCATTT
TTCATCACTGAGCATTGTTGATCTATGCCTTTTGGGCTTCTCAGTTCAATGAAGCAATAA
TGAAGTATTTAACTCTTTCACTACAGTTCTTGCAAGTATGCTATTTAAATTACTTGGCCA
GGTATAATTGCCAGTCAGTCTCTTTATAGTGAGAAAATTTATTGGTTAGTAATATAAATA
TTTTAAACTAAATATATAAATCTATAATGTTAAACATATGTTCATTAAAAGCATAGCACT
TTGAAATTAACTATATAAATAGCTCATATTTACACTTACAGCTTTTCATTTGATCAGGTC
TGAAATCTTTAGCACTTAGGAAATGCTATGCATAATTATACCTGACCATGAAAAAAA
TAAGTACTTCAAATGCATGCATTTGCACTGGTGATTCCAACTGCACAAATCTTTGTGCCA
TCTTGTATATAGGTATTTTTTACATGGGTTGACATGCACACAACACCATTTTCATTCAGT
ATGAACCTTGAGGCTGCTGCCATTTTCCACTTAACCAAACCAGCCTGAAGGTGAACCTC
GAAACTTGTTTCATAAATCTTTCAAAAGTTGTTTTACATCAATGTTAAAATTTCAAAATG
CTGCAGGGTAATTTAATGTATAAAATATTAGTAAGAAAAAGTATGTATTGCATACTTAGT
AGAATAGATCACAACATACAAATTCAATTCAGTGCATGCTTTAGGTGTTAAGCATGAGAT
TGTACATGTTTACTGTTAGGTCCTTGCATCTGTGGTGCTAGGTGAGTATGAGAAGATGTC
AAGGACTGGACGTATTTTGTTGCCTAAAAAAAAAAGGCTGTTGTAGGCGTTTTAAATAT
GCTTATTTTGTGTGTCTCTCACTACCTATTACACACTGTTGCTTTGTGGTTTGTTTGT
ATGTGCGTGTGTTATACAGTAGTTAAATTTCCATGCAGAAAATAAATGTCCTGAATTCT
CATATTAGTATTCTTTATTTGTATATCATGCAGTGTAATTTATTTAGAAATGTAGGTCTTAC
TAAATGTATATGCATGTATTTCAGATTATACTAGGATTTCTTGGATTAGAAGCTGATTGT
GTTAACTGTAACTTAAAGAATGAATGTTAAATAAAATGATACAGATTTATTTTCTTCATT

【図３９Ｂ】

ACAAAATGAAATTTCAAGAAGGTGTTACTTTTGTAGAATGGTTTTATAATATGACAAGAA
ATTTTAATATAGTGTCTACCCTAAAGGGATGGCTTATTTGCATCTACCTTTTACTGCATG
TTTTTCACAAGGCAGTTTATTCATATATTGACATATTTTGGTAGTAGCTGAGAACCTAAG
ACTTGAAATTATACATTGTGTAGTATTTTTTAAGCTAAGCAATGCAATTTTGGTCAGATC
TTATTTGTGTGAAGATAGGCTCTGAAATCCTATGGTATTGCGTTTGTAACGTTGATATTA
ATGCAAAATAGTTTAGGAAATGGAGTCTTCTGCAAGGGTTCTGTATACTTTTCCCACATT
GTATGAGATTTTCCAAAATTTGGTGTGAATTGGGCACTTTTGGAAAACTCCTGAAAAAG
AATTAGTTTCCTTCATCTGCAGACCTTTGTCCAATACGGTTACCATTTCTTTATAGTAAC
TCGATTAGCCATATATGTTTGTTTCTAGTCCTGCTCCTTTGCTCCTCTCCTATGCCTTCC
CAGTGCTGGCTCCATTTCGAAGACTCAAGGACAGAGGGGAAGCAGATCATAAAGAGAAAA
AGGAGACAGAAGAAAGGATGAAGGAAGGAGGTCATGGGGAGTGTGGCTTCTGAGCAGTTT
AGTTGCTGGGGAGAGCAGACAGTCACTGCCTACAATACAGACAGAACCTTCCTGCTCACT
TTCTGTCCTATCTCTTCCTGACCTTATGAACCAGTGTTAGTAGATGATTAAAACATGACA
AGCAATGGCTCCTTATTTCACAGGACTAAGTCCGGGCCTTCGTATCACTAGCTGTTGCC
TTTTACACCCTGCTTCAGCCACCCTGTCCCTGTCATTGGCCCTGGACTTCCTCTCTGTGC
CCGTGTGTCCTCTGCCTGGGAGCCCTCTCCCTCCCATAGTCACTTTCTCTCTGCCAAACTC
ATTTCTTCTTGTGCCCAAGACCTCTCTCCTGAGCCCCTGTGGAAACTTCAGGAAGGATGA
ATCCGTCTTTGTGCTCCACGGCTCGTACCTTGATCAGGCTGTGCATCACAGTAATTCCGT
TCTAGGTAGGCAGAGTTGATCTTTGTCTCATCTGCCAGGCTGCGGCTCTTCAAGGGCAG
GGACCTTGTCATAGTCATTTTATTTTCACAGTGCTTGGAACATGGTGGAAAATGAATGT
TGGAATTATTGGAGTAATATAATTTGTATCAAATGTCCTTTTGAATTAAGAGATTTAGTT
ATGTTTACTAAGAATGTAAACTTTGAATTGGTTTGCATTTTAACAATTAGGATGGTTTAT
TGATGTGAATTTTGAAATGTAGAGGTATAATGTTAAATTATTTATACTTTATGGAAATC
AAGTGAAATGTTTGAAAAAATGCCGCCATTATCCTCTGGTATTTTCTACTCTCTGGAATT
ATGTGCTGTAAATGATCGGCTGTAAATGTGAGGCACACCACCCACCCCTGTGTGGAAAGT
GTTGTGGCGCTTCCTGCCACCCACCCACCTCTCTGCCGTTGCTCCTTGTGACACTTGTCT
GTCGTCTCCCATCCAAACTCCAAGCTTACAGCTACCTCAGTACTGCTTTGCTTGTCTGAA
ACACCTCCTTTGCCTTCCTTCAGTGTCCCGCTCAGGTGCAGCCTCCTCCCTAAAGCTCAT
CTCAGCTTTTGATCTGAATGATGATGGAAACATGCAGACAGCCTCTCAGTCTTACTATTT
AATGTTGTAGCTGGGAAAAAACCCAGAGAGGTTAACTGATATACTGGGTTGGGACTAGGA
TGTGGGTTTTGTGACTCTGAATCCCATGTCTCAAACTACGCTGCCTTCCGAAGTCTGGC
ATTTGTTAGCTCATGCTTCCTTGTAGTCCAGCTTCTTATGTGCCTGTTATATTCTCCAGT
AAGATTGTAAGCCCCTTAAGGGCAGGGACGTCTTTGCATCTCTAGCACTGCTATAGTGTT
CTATCCTTAGTTATGAACTAGATAAATAAATGGTGGTGGCAAC

【図４０】

MKSIRMTPSQVAPEIRGTLLPGEVFAICGSCDALGNWNPQNAVALLPENDTGESMLWKAT
IVLSRGVSVQYRYFKGYFLEPRTIGGPCQVIVHKWETHLQPRSITPLESHIIIDDQQPGI
HNGVETLDSGWLTCQTEIRLRLHYSEKPPVSITFKKLLKKSRPFVKLTLRGLEEDDDDRVS
PTVLHKMSNSLRISLISDNEPKCRHSQPECGYGLQPDRWTEYSIQTMEPDNLELIFDFPFE
EDLSEHVVQGDALPGHVGTACLLSSTIAESGKSAGILTLPIMSRNSRRTIGKVRVDYIII
KPLPGYSCDMKSSFSKYWKPRIPLDVGHRGAGNSTTAQLAKVQENTIASLRNAASHGAA
PVEPDVHLSKDFVPVVYHDLTCCLTMKKKFDADPVELFEIPVKELTFDQLQLLKLTHVTA
LKSKDRKESVVQEENSFSENQPPFSLKMVLESLPEDVGPNIEIKWICQQRDGMWDGNLST
YFDMNLFLDIILKTVLENSGKRRIVFSSSFDADICTMVRQKQNKYPILFLTQGKSEIYPEL
MDLRSRTTPIAMSFAQFENLLGINVHTEDLLRNPSYIQEAKAKGLVIFCWGDDTNDPENR
RKLKELGVNGLIYDRIYDWMPEQPNIFQVEQLERLKQELPELKSCLCPTVSRFVPSSLCG
ESDIHVDANGIDNVENA

シグナル配列
無し

膜貫通ドメイン
無し

N-グリコシル化部位
1-4
49-52
333-336
477-480

cAMP- 及び cGMP-依存性プロテインキナーゼリン酸化部位
426-429

N-ミリストイル化部位
29-34
119-124
330-335
332-337
472-477
476-481

アミド化部位
499-502

グリセロホスホリジエステルホスホジエステラーゼ
328-620

デンプン結合ドメイン
8-115

【図４１Ａ】

GTACTCTCGCGGTATTTGTCCCGACTCTCGCGGGGTTTAGCGTGGCATTGGGAGGCCCGG
CCTGGGGGAGGAGACGGCGTTCCGTTAGCGGCGTTGGGGTTTGGCTGCAGTGGCAGTGCT
TTCTCTTCTGCTCACGGGGACCCGCTCAGGCTGGAGGCCAGCCAGCTCTTGCCGCCACCT
CGGTCGCGATGGGGGCGCAGGACCGGCCGCAGTGCCACTTCGACATCGAGATCAACCGGG
AGCCGGTTGGTCGCATTATGTTTCAGCTCTTCTCAGACATATGTCCAAAAACATGCAAAA
ACTTCCTTTGCTTGTGCTCAGGAGAGAAAGGCCTTGGGAAAACAACTGGGAAGAAGTTAT
GTTATAAAGGTTCTACGTTCCATCGTGTGGTTAAAAACTTTATGATTCAGGGTGGGGACT
TCAGTGAAGGTAATGGAAAAGGTGGAGAATCAATTTATGGTGGATATTTTAAAGATGAAA
ACTTTATTCTCAAACATGACAGAGCGTTCCTTTTACAATGGCAAATCGAGGGAAACATA
CCAATGGTTCCCAGTTTTTCATTACCACAAAGCCTGCTCCACACCTGGATGGGGTGCATG
TAGTCTTTGGACTGGTTATTTCTGGTTTTGAAGTAATCGAACAAATTGAAAATCTGAAGA
CCGATGCTGCAAGCAGACCATATGCAGATGTGCGAGTTATTGACTGTGGAGTACTTGCCA
CAAAATCAATAAAAGATGTTTTTGAGAAAAAAAGGAAGAAACCAACTCATTCAGAAGGCT
CGGATTCCTCTTCCAATTCCTCCTCTTCTTCAGAATCATCTTCAGAAAGTGAACTTGAAC
ATGAGAGAAGCAGAAGGAGGAAACATAAGAGGAGGCCAAAAGTTAAACGTTCTAAAAAGA
GGCGAAAGGAAGCAAGCAGTTCAGAAGAGCCAAGGAATAAACATGCAATGAACCCAAAAG
GTCACTCTGAGAGGAGTGATACCAATGAAAAAAGGTCAGTTGATTCCAGTGCTAAAAGGG
AAAAACCTGTGGTCCGCCCAGAAGAGATTCCTCCAGTGCCTGAGAACCGATTTTTACTGA
GAAGAGATGCTGTTGTTCTTACTGCAGAACCTGAACCGAAGATTCCTGATGTTCCACCCA
TTGTAAGTGATCAGAAACCATCTGTATCAAAGTCTGGACGGAAGATTAAGGAAGGGGCA
CAATTCGCTATCACACACCTCCAAGATCAAGATCCTGTTCTGAGTCAGATGATGATGACA
GCAGTGAAACTCCTCCTCACTGGAAAGAGGAAATGCAGAGATTAAGAGCATATAGACCAC
CTAGTGGAGAAAAATGGAGTAAAGGAGATAAGTTAAGTGACCCCTGTTCAAGCCGATGGG
ATGAAAGAAGCTTGTCTCAGAGATCCAGATCATGGTCCTATAATGGATATTATTCAGACC
TTAGTACAGCAAGACACTCTGGCCACCATAAAAAACGCAGAAAAGAAAAAAAGGTTAAGC
ATAAAAAGAAAGGGAAAAAGCAGAAACACTGCAGAAGACACAAACAAACAAAGAAGAGAA
GGATTCTTATACCGTCTGACATAGAATCCTCAAAATCTTCCACTCGAAGAATGAAATCCT
CTTGTGATAGAGAAAGGAGTTCTCGTTCTTCCTCATTGTCATCTCATCACTCATCAAAGA
GAGACTGGTCTAAATCTGATAAGGATGTCCAGAGCTCTTTAACCCATTCCAGCAGAGACT
CATACAGATCAAAGTCACTCACAGTCTTATTCTAGAGGAAGCTCAAGACTAAGGACTG
CGTCAAAGTCCTCATCACATTCTCGAAGTAGATCAAAGTCCAGATCTAGTTCCAAGTCTG
GGCACCGAAAGAGAGCATCAAAATCACCAAGAAAAACAGCTTCTCAGTTAAGTGAAAATA
AACCAGTTAAAACAGAACCTTTAAGAGCAACCATGGCACAAAATGAAAATGTAGTAGTAC
AACCAGTTGTAGCAGAAAATATTCCTGTAATACCACTGAGTGACAGTCCCCCCCCTTCAA
GATGGAAGCCTGGACAGAAACCTTGGAAGCCCTCTTATGAGCGAATTCAGGAAATGAAAG
CTAAAACAACCCATTTGCTACCCATCCAAAGCACTTACAGTTTAGCAAATATTAAAGAGA
CTGGTAGCTCATCATCCTACCATAAAAGAGAAAAAAATTCGGAAAGTGATCAGAGCACTT
ATTCAAAATACAGTGATAGAAGTTCAGAAAGCTCACCAAGGTCAAGGAGCAGATCTTCTA
GGAGTAGATCTTATTCCAGATCATATACAAGATCACGTAGTCTAGCTAGTTCACATTCAA
GGTCTAGGTCTCCATCATCTAGATCTCATTCACGAAATAAATACAGTGATCATTCACAGT
GTAGTAGATCCATCTTCATATACTTCTATTAGCAGTGATGATGTGAAGCGCAGCTAAGAGA
GACTTAGATCCAGTGGGAAAAAAATAGCGTTTCACATAAAAGCATCAGCAGCCTGTG
AAAAGACACTTCACAGTAAATATGTCAAAGGTAGAGACAGGTCTTCATGTGTGAGAAAGT
ATAGCGAGAGCAGATCATCTTTAGATTATTCTTCAGACAGTCAAGTGTTCAGG
CCACACAGTCAGCCCAGGAAAAAGAGAAGCAGGGCCAAATGGAAAGAACACATAATAAAC
AAGAAAAAAACAGAGGTGAAGAAAATCCAAGTCTGAACGGGAATGCCCTCATTCAAAAA
AAAGAACTTGAAAGAGAATCTTTCTGATCACCTTAGAAATGGCAGTAAGCCCAAAAGGA
AGAATTATGCTGGTAGTAAATGGGACTCTGAGTCAAATTCAGAACGAGATGTCACTAAAA
ACAGTAAAAATGACTCCCATCCATCCTCTGACAAGGAAGAAGGTGAGGCCACATCCGATT
CTGAATCAGAGGTTAGTGAAATTCACATCAAAGTCAAACCCACAACCAAGTCGTCCACAA
ATACTTCACTGCCTGATGATAATGGTGCTTGGAAATCAAGCAAACAGCGCACATCAACTT
CTGACTCTGAGGGGTCCTGTTCCAATTCGGAAAACATAGGGGAAAGCCACAAAAGCACA
AACATGGGTCAAGGAAATCTTAAAGAGAGACACCAAAAAAGTGAAAGAGAAATTGA
AAGGGAAAAAGACAAAAGCATAGGCTCCAAAACGAAGCAAGCATTTCACTGGCAGC
CTCCACTAGAATTTGGTGAAGAGGAGGAGGAGATGATGACAAGCAAGTTACTCAGG
AATCAAAAGAGAAAAAAGTTTCTGAAAACAATGAAACCATAAAAGATAATATTCTAAAAA
CTGAGAAATCCAGTGAAGAGGACCTTTCAGGTAAACATGATACAGTGACTGTTTCATCAG

【図４１Ｂ】

ATCTTGATCAGTTTACTAAAGATGATAGTAAACTCAGTATTTCTCCCACAGCTTTAAATA
CTGAGGAAAATGTGGCCTGTTTACAAAACATTCAGCACGTTGAAGAAAGTGTTCCCAATG
GAGTGGAAGATGTGCTTCAAACAGATGACAACATGGAGATCTGCACTCCTGATAGGAGTT
CCCCAGCAAAGTAGAGGAGACTTCCCCTCTAGGAAATGCACGGCTTGATACCCAGATA
TAAACATTGTTTTGAAGCAGGATATGGCAACGGAACATCCTCAGCAGAGGTAGTAAACC
AGGAAAGCAGCATGTCCGAAAGTAAAGTGTTGGTAAGTGGGAAACAGGACAGCAGCT
CTGCTAGCTTGGCTAGTGCTGGAGAAAGTACCGGGAAGAAGGAGGTGGCTGAGAAGAGCC
AGATCAACCTCATTGATAAGAAATGGAAGCCCCTGCAAGGTGTGGGGAACCTGGCAGCAC
CTAATGCTGCCACATCCAGTGCTGTGGAAGTTAAGGTGTTGACCACTGTGCCTGAAATGA
AACCACAAGGCTTGAGAATAGAAATTAAAAGCAAAAATAAAGTTCGGCCTGGGTCTCTCT
TTGATGAAGTAAGAAAGACAGCACGCTTAAACCTAGACCAAGAAATCAGGAGAGTTCAA
GTGATGAGCAGACGCCTAGTCGGGATGATGATAGCCAGTCCAGGAGTCCAAGTAGATCTC
GAAGTAAATCTGAAACCAAATCAAGACACAGAACAAGGTCTGTCTCCTATAGTCACTCAA
GAAGTCGATCGAGAAGTTCCACATCATCTTATCGATCAAGAAGCTACTCTAGAAGTCGGA
GCAGAGGATGGTACAGCAGAGGCCGAACCAGAAGCCGGAGCAGTTCCTACCGGAGTTACA
AAAGTCACAGGACGTCCAGCAGGAGCAGATCCAGGAGCAGCTCATATGATCCCTACAGTC
GATCCAGGTCCTACACCTACGATAGCTACTATAGCAGGAGTCGGAGTCGAGTGAAGTAGAGCC
AGAGAAGTGACAGTTACCACGAGCAGAAGTTATAATGGCGGTCCAGGAGTTGTAGAT
CTTATGGCTGTGACAGTGAAAGTGACCGAAGTTACTCTCATCACCGGAGCCCCAGTGAGA
GCAGCAGATACAGTTGAAAACGTCCGGATACAAATTATATCTTATTTGTAAATATCTGGC
AACTTAGCTTAAGAAATGTAATGACAGTCTGTTGTTCTATTTCAATATCAGAGGTGAATT
TCAAAAATAGACACTTCTTAATTGTTACTGGTTCATTTACATGTGGGGAGAAGAATTTAA
AATACAGATATGTCTCCTAAAAATATTTTTATGCCACATTTTACAGTAGCCAACTATGGA
AATGAATTTCATTTTCTTGAATCAAGAAATCGTGAAATTTATCTATGTATAATTTGCAAT
ATTATTTTAAGTCTATTTCACTCTATCTTACGTATCCCTTAGAATACAGATTCTTTTTGC
CTGTTTTTCCAGTTTTAGCATATATGCTGCCAAGCATAGAACTGTGAAGGAGAACTGTTA
AAGGCGGCCAAATATTTATATACTGATTACATAGAGTCTTGTACATATGTGCTCTAAAAA
CAAACCACCCAGAATTGATACTGTTGGTAACCAGGAGTATAAGGCAGTGGCTCTGGGGTT
CTTAATTCATTCCTAACTTCTTTGTATACTTCACAGGATTAGGAAAGTGGTCATCATACAT
CCCACACAGTCTGTATTACTTCAGGCTTGTGGGCAAGGTTAGGAAGAATCAATCAGCCTT
AACTATAAATACCTGCACTGTCTCTGAGGACTTACTATTTTATGTTCTTTTAATCAATA
CCGATCAGAAGTTTAGGTTATAAAAACAATTCTACTTCATGCTTTGGTGCTTGGTAATTT
TTGGTGCGTCTTTAAGCATTACTCTTATATATCATATATTAAAATACCATAAAAATGAAA
TTCAGACAAAATCACTGGCACCAAAAATGGTTTATTCTGAGCTGTCTTCACTTTGACTAT
TTGGGGGGCTTCTCTCAAGTACAGATGTGGGTTGGGGTCCCCTGGAGCAGGCAGGATTGG
CAGTAAGAGATATTGGCCACTCAAGTCTACTGTGTGTGTGCCTCTGGAAGAGTGAAGA
ATGGACTTCAAAAGTAACATCAAAAATCTAACTGCCACCATCCTGGAGACATTTTGCAGG
GCTTTCCTTTCAAGTCTTTCAAGTACAGGATATTACCACAACAGCAGCTGAACTGTTGTA
ACCAGCATGTTTTTCCTATTTCCACTGTGACGTGACCTCAAGCAGTGACTGCGTGACC
TGACCGGGTGCAAGACAGGGAAAGGGATAGAGGGTATAGCATAAATTACATATTT
TCATGGCTTGGGTGGTTCCTCCAAAAATAATTGGACCTGTAAAAACTAGTGTGTGTGTG
TGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGGTTTTTTTTTTTAATCTTTACTTTGAATTTGTTCCC
CAAGTGTACTTAATCACCTTAGTGCCAGTTTAATCCAGTTATGCAGAAGAAATTCATATT
GGTTGCCTGATGTAGAGCTCAGCACCACCCTACCACAGGCCTTGTCTGGTGTATTTGGGA
AGTGGAAAAGAGCCCTCAGTTGGAGGGAGCTGACAACCCTTGGTGGAGGAGGGTGCCCT
TGAATGTATTAAAACTATCACCCAAAGAAGGTATGAAAACAGGGTAAGGTGGTCAGTTGT
TTGCCAGGTCAATAGACAGAAAGTACATTAGAAAACAGGACTTAGGCCAAACAAACAATA
CTGGATACTGAATACAAAACAGTATGATTTATATTAAAGGTTCCAAAGGTTGCCTGCAA
AGGAGAATATTACTACTAGTCAGCAGGAAAAAAATGCATTCAGAACCCAAGCAGAAACTG
CCAAATGTAATTAGGTAAGAAAAGTTACCCTTGGGCAGTGTATTAGTTTCTATTGCTG
TGTGACAAATTACCCCAAATTTAGCAGTTTAAAAACAATACCATAGCAGTTCTGTAGC
TCATGAGTCTGGCACAGTGTGGCTGGATTCTCTGCTCAGGGTCTTAAAGGCTGAAATAAG
GGTTGGCAGGACAACATTCCTTCATGGAGGCTCTGGGGAAGAATCTGCTTCTAAGTTCAT
TCAGGTTGTTGGCGGAATTCAGTTCTTTGCTGGCTCTCAGCTGGAGGCCCCTCTCTCACC
TCAAGGCTGCCTGCATTCCTTCTTATGTGGTCCCCTCCAGCTTCAAACCAGCCTTCCTGC
TCTTTCTCATGCTTCATATCTCTCTCCGGTCCTCCTGTTTTAGGGGCATATGATTAGCTC

【図４１Ｃ】

AAGCCCACAGATATATTTTAAGGTTGATTGTGCGATAGAACATAATTGCAGGAGTACTGT
CTCATTCATCATAATTCACGGGTTCTGGAGATTAGCTCATTGAAAGTGGGAGGGGCATTT
TCAAATTCTGCCTACCACAGGCAATAACTGCCCATCTCAGCTGTAGGTGGAATTTTTACC
CAGAAAAGATAGGCCCTAGAAGCCTCATTTCTTTTCTCCATGGAAAAGGACAGCCCTCTG
CTGCAGCGTCAACTTGTGTGTTTACTGACAGAGTGAACTACAGAAATAGCTTTTCTTCC
TAAAGGGGATTGTTCTACATTTTGAAGTTATTTTTAATAAAATTGAATTATGTTGT

【図４２Ａ】

MGAQDRPQCHFDIEINRERPVGRIMFQLFSDICPKTCKNFLCLCSGEKGLGKTTGKKLCYK
GSTFHRVVKNFMIQGGDFSRGNGKGGESIYGGYFKDENFILKHDRAFLLSMANRGKHTNG
SQFFITTKPAPHLDGVHVVFGLVIEGFEVIKQIENLKTDAASRPYADVRVIDCGVLATKS
IKDVFSKKRKKPTHSRGGSDSSSNSSSSSESSSESELEHERSRRRKHKRRPKVKRSKKRRK
EASSSSEPRNKHAMNPKGHSERSDTNEKRSVDSSAKRKEPVVRPEEIPPVPENRFLLRRD
MPVVTARPEPKIPDVAPIVSDQKPSVSKSGRKIKGRGTIRYHTPPRSRSCSESDDDDSSE
TPPHWKEMQRLRAYRPPSGEKWSKGDKLSDPCSSRWDERSLSQRSRSWSYNGYYSDLST
ARHSGHHKRRKEKKVKHHKKGKKQKHCRRHKQTKKRRILIPSDIRSSKSSTRRMKSSCD
RERSSRSSSLSSHHSSKRDWSKSDKDVQSSLTHSSRDSYRSKSHSQSYSRGSSRSRTASK
SSSHSRSRSKSRSSSKSGHRKRASKSPRKTASQLSENKPVKTEPLRATMAQNRNVVVQPV
VAENIPVIPLSDSPPPSRWKPGQKPWKPSYERIQRMKAKTTHLLPIQSTYSLANIKETGS
SSSYHKREKNSESDQSTYSKYSDRSSESSPRSRSRSSRSRSYSRSYTRSRSLASSHSRSR
SPSSSRSHSRNKYSDHSQCSRSSSYTSISSDDGSRRAKRRLRSSGKKNSVSHKKHSSSSSEKT
LHSKYVKGRDRSSCVRKYSESRSSLDYSDSHSQESVQATQSAQKEKQQGMERTHNKQEK
NRGSEKSKSKSKSRECPHSKKRTLKENLSDHLRNGSKPKRKNYAGSKWDSESNSRRDVTKNSK
NDSHPSSDKEKGRATSDSESRSEVSEIHIKVKPTTKSSTNTSLPDDNGAWKSSKQRTSTSDS
EGSCSNSENNRGKPQKHKHGSKENLKRETKKVKEKLKGKKDKKHKAPKRKQAPHWQPPL
EPGEEEEEEIDDKQVTQESKEKKVSENNSTIKDNILKTEKSSEEDLSGKHDTVTVSSDLD
QFTKDDSKLSISPTALNTEENVACLQNIQHVEESVPNGVEDVLQTDDNMEICTPDRSSPA
KVEETSPLGNARLDTPDINIVLKQDMATEHPQAEVVKQESSMSESKVLGEVGKQDSSSAS
LASAGESTGKKEVAEKSQINLIDKKWKPLQGVGNLAAPNAATSSAVEVKVLTTVPEMKPQ
GLRIEIKSKNKVRPGSLFDEVRKTARLNRRPRNQESSDEQTPSRDDDSQSRSPSRSRSK
SETKSRHRTRSVSYSHSRSRSRSSTSSYSRSRSYSRSRSRGWYSRGRTRSRSSSVRSYKSH
RTSSRSRSRSSSSYDPHSRSRSYTYDSYYSRSRSRSRSQRSDSYHRGRSYNRSRSCRSYG
SDSESDRSYSHRRSPSESSRYS

シグナル配列
無し

膜貫通ドメイン
無し

N-グリコシル化部位
119-122
203-206
864-867
871-874
901-904
938-941
1048-1051

cAMP- 及び cGMP-依存性プロテインキナーゼリン酸化部位
190-193
561-564
764-767
771-774
796-799
857-860
1042-1045

チロシンキナーゼリン酸化部位
84-90
1453-1461

【図４２Ｂ】

N-ミリストイル化部位
48-53
75-80
81-86
141-146
174-179
197-202
531-536
659-664
946-951
962-967
980-985

アミド化部位
53-56
329-332
441-444
751-754
762-765
998-1001
1208-1211

ATP/GTP-結合部位モチーフA(P-ループ)
45-52

サイクロフィリン型ペプチジル－プロリルシス－トランスイソメラーゼシグネチャー
59-76

サイクロフィリン型ペプチジル－プロリルシス－トランスイソメラーゼ
8-177

【図４３】

ATGAAAGATCCAAGTCGCAGCAGTACTAGCCCAAGCATCATCAATGAAGATGTGATTATT
AACGGTCATTCTCATGAAGATGACAATCCATTTGCAGAGTACATGTGGATGGAAAATGAA
GAAGAATTCAACAGACAAATAGAAGAGGAGTTATGGGAAGAAGAATTTATTGAACGCTGT
TTCCAAGAAATGCTGGAAGAGGAAGAAGCATGAATGGTTTATCCAGCGTCGAGATCTC
CCACAAACTATGGACCAAATCCAAGACCAGTTTAATGACCTTGTTATCAGTGATGGCTCT
TCTCTGGAAGATCTTGTGGTCAAGAGCAATCTGAATCCAAATGCAACCGGAGTTTGTTCCT
GGGGTGAAGTACGGAAATATTTGA

【図４４】

MKDPSRSSTSPSIINEDVIINGHSHEDDNPFAEYMWMENEEEFNRQIEEELWEEEFIERC
PQEMLEEEEEHEWFIPARDLPQTMDQIQDQFNDLVISDGSSLEDLVVKSNLNPNATEFVP
GVKYGNI

シグナル配列
無し

膜貫通ドメイン
無し

N-グリコシル化部位
114-117

N-ミリストイル化部位
121-126

【図４５】

AAGTCAGCACCGACCCAAACAAGCAGGAAACAGGAAATGTTCACGTTTCAGAGAGGCTGC
AGCCCGGCGGCAGCATCCTGAGCGCGCCTCTGCCGAGGCGAGCGGACATGCAGGCTCCCCG
CGCAGCCCTAGTCTTCGCCCTGGTGATCGCGCTCGTTCCCGTCGGCCGGGGTAATTATGA
GGAATTAGAAAACTCAGGAGATACAACTGTGGAATCTGAAAGACCAAATAAAGTGACTAT
TCCAAGCACATTTGCTGCAGTGACCATCAAAGAAACATTAAATGCAAATATAAATTCTAC
CAACTTTGCTCCGGATGAAAATCAGTTAGAGTTTATACTGATGGTGTTAATCCCATTGAT
TTTATTGGTCCTCTTACTTTATCCGTGGTATTCCTGCAACATACTATAAAAGAAAAAG
AACTAAACAAGAACCTTCTAGCCAAGGATCTCAGAGTGCTTTACAGACATATGAACTGGG
AAGTGAAAACGTGAAAGTCCCTATTTTTGAGGAAGATACACCCTCTGTTATGGAAATTGA
AATGGAAGAGCTTGATAAATGGATGAACAGCATGAATAGAAATGCCGACTTTGAATGTTT
ACCTACCTTGAAGGAAGAGAAGGAATCAATCACAACCCAAGTGACAGTGACAGTCAATCC
CTGAATGGCGCTCATGTTTTCCAAGAGAAGCAGCCCTGAGGGAGTCTGCTGAGGCTGCC
AACAGAGGATGAAGAGGATACAAATTTAATTAATTCAAATCAACATAGACACAAGAACC
TTTTGCTGTTTCTTCCAACGCCCACTCTTCCTAATGATGGCATCACTTGCACTTGGAAGA
ATGTGCAATTGAGAAGTACTAGGAAAAGGCCTGGCTGCCATCCATCGCTGCCTCTGAGGG
TGGAGAAGGAGGCGGGTGATGTGCTCACTTCTGATCAACATGTGTTGCCTCCTCTCAGCC
AACTTCTAGCTCACTGCACTCACTCTGGTCATGATAAATGTTCGTCACCTTTCTGCTTCA
TTCCTTAGGGCCTAAATCAGGAAGCTGTTTTATCGATGGTTTCCTTTTGGGTCAGTAACC
AGCTTTGGATAATTTCCTCTGATTATTCAAGTCGTGGGACAGGTAAACTACATTCAGCAG
GAACTTTTCTCGAGGAGTGTATGTCATGGAAAAGACACCAAACACAGCAAGTATTTAA
TGAATACACCATCCCAGGGGGTCAGTAAGCTCTGCCTGCCAAGAAGACACAGTGAGAGGG
GTCCACAGTCCATGATGAGGTGGCGTTTGGTACTTGTAGACCCTAGCATGGCCAGGTCTG
GTCACCCTTAAGAACTTCTCAGAGAAACTAGGAATCTTCAGTGAAAGAACTAATGTTCTC
CTCAGCTGAAATTCCCTTGCTTGTCAGCATTTCTGCAAAGCTCACACTTGTTTCACCATA
CCTCCCTTGGATGTGACATGTAGGTAGGAAGTATGTGCAGGTGGGAGTCATCTGTCAGCC
TTCTATGTTTCAGAGATCCTGAAGGTGGTTTGAAACAAACAGAAGAGGAGCAGGAAATAT
CCGTGCCTGTGGCAGATCTCACTCATCATGCTTAGCATTCTCTCCCGCCAAGCTGGGATA
AGCCTCATGTCCTAACACAGCACAACAGGAGGTCTCTGTCAGTCCATCAGAGATGACATT
CTATGTGATATTTTTGACATCCTTGTGCTAAAAGCAATGGCACAAAATGGAAAAGGGCCT
ATTGACCACACCTACTCCAGTAAAATTGTTCTTCATTTATTCCTTAATTTCTTAAATCTG
ACCCCTTTAAAGCAATCTAGCAAATTGAGAATCCTCAGCTCTCCTTGGATACCTGATATT
TTATTTCAAGAAAGAGACAAGAAGAAGAAAATTTTATTTATTTTACTACCCACATATAAAC
CGAAGGGAGATGGACTACCCAACATTTGCTGCTCAATTTTGTGTCTTGTGCTTGAAAG
TCTGCCCTAATGCATAACAAAAACTACTTGTCTCCTACCTTTTGGGATCCCTTTAACAAG
TATTTGCCTTCTGAACTACGTGGATAATTTCAAAGGCAGAGTTCCAGACCAGAGAGGTCT
TTCCATACAATGAAAGCTATAACTAGCTGGTTGTGTTTAACCACTGCTATCACGCTATCC
TGGGACTGCATAGAACTTTGACAAAAGACAGACTTCATGGTACACAACTTCAACAGATTT
TCTGTCATATTCTCACCAGCACATCTGAATGAGGCTTTGTGTTTTCCTTGCTCTCTTGCA
TGTTCCTTTTCAACTCATGGCCCACAGTGACTCTCAGAGATTTATGCCAAAATTGCATAC
AATTGTTTTCTGAATCATAACTTGTCTATTTTCTGCCTATGTGTGCTACTTTCAGTTTG
TTTCTCATCAACATTTGACTCTCAGAGAGACCTCCATTTGCCCCTTCTCTCTTTAGGT
ATCTAAGATCTTGAACACCTGGACCTTTACATTTGATCCAACCCTATCAAATAATGAAC
TTCTCAGAGAGGCATCTGGGTCCTGGAACTTCATGTTGATGAAGTCATATTATATAATA
TGATAAAAATATTCTCATGCAGTATTTTAAATAATTTCAAATTCTAGAAGAAGCAAATTT
CAGCGACATGTCATTGAGTTTTTATTTGGTAAAGCTATAATTGTGCAGTGTACAAAGCAC
TTTTTAAAAAGATAGTTTATTCTGTCAGGGTATATGAAGTTAGTATACAGCCAGAACAGC
CAAGCCTCAATTCTTGTACCTTGTGTCTTTTTATTACTGTTTAATCAATAGATATCATAT
GTTTATGACAGTTCAAGAATTGTTTTTAAACCCAAACTTAATTTTATGTTTCAGACTAT
TGTTAGAAAAACAAAACAAAAAACAAAAAAACCCTCACTAATTTGCCCTAATTGGATAGG
GCAATCAGGACAAAATCTGACTTTCGAATATTTAAAAGATATGTAAGTTTGATTGCATTT
TCGTACATTTTAAGCAAACTAGGTTAACAACAACATAGCCTAGTCAAACTTCTCAGGAAA
CTTGTTTTAATAAATATGTAAAAAT

【図４６】

MQAPRAALVFALVIALVPVGRGNYEELENSGDTTVESERPNKVTIPSTFAAVTIKSTLNA
NINSTNFAPDENQLEFILMVLIPLILLVLLLSVVFLATYYKRKRTKQEPSSQGSQSALQ
TYELGSENVKVPIFEEDTPSVMEIEMEELDKWMNSMNRNADFECLPTLKEEKESNHNPSD
SES

シグナル配列
1-22

膜貫通ドメイン
76-96

N-グリコシル化部位

63-66

cAMP- 及び cGMP-依存性プロテインキナーゼリン酸化部位

103-106

N-ミリストイル化部位

114-119

【図４７】

CTCCGCCCTCTCCCACTCTCTCTTTCCGGTGTGGAGTCTGGAGACGACGTGCAGAAATGG
CACCTCGAAAGGGGAAGGAAAAGAAGGAAGAACAGGTCATCAGCCTCGGACCTCAGGTGG
CTGAAGGAGAGAAATGTATTTGGTGTCTGCCATATCTTTGCATCCTTCAATGACACTTTG
TCCATGTCACTGATCTTTCTGGCAAGGAAACCATCTGCCGTCTGACTGGTGGGATGAAGG
TAAAGGCAGACCGAGATGAATCCTCACCATATGCTGCTATGTTGGCTGCCCAGGATGTGG
CCCAGAGGTGCAAGGAGCTGGGTATCACCGCCCTACACATCAAACTCCGGGCCACAGGAG
GAATAGGACCAAGACCCCTGGACCTGGGGCCCAGTCGGCCCTCAGAGCCCTTGCCCGCT
CGGGTATGAAGATCGGGCGGATTGAGGATGTCACCCCCATCCCCTCTGACAGCACTCGCA
GGAAGGGGGGTCGCCGTGGTCGCCGTCTGTGGAACAAGATTCCTCAAAATATTTTCTGTTA
ATAAATTGCCTTCATGTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

【図４８】

MAPRKGKEKKEEQVISLGPQVAEGENVFGVCHIFASFNDTFVHVTDLSGKETICRVTGGM
KVKADRDESSPYAAMLAAQDVAQRCKELGITALHIKLRATGGNRTKTPGPGAQSALRALA
RSGMKIGRIEDVTPIPSDSTRRKGGRRGRRL

シグナル配列
無し

膜貫通ドメイン
無し

N-グリコシル化部位
38-41
103-106

N-ミリストイル化部位
101-106
111-116
123-128
144-149

アミド化部位
144-147
147-150

リボソームタンパク質S11シグネチャー
131-138

リボソームタンパク質S11
29-147

【図４９】

ACCACTGCTGGCTTTTTGCTGTAGCTCCACATTCCTGTGCATTGAGGGGTTAACATTAGG
CTGGGAAGATGACAAAACTTGAAGAGCATCTGGAGGGAATTGTCAATATCTTCCACCAAT
ACTCAGTTCGGAAGGGGCATTTTGACACCCTCTCTAAGGGTGAGCTGAAGCAGCTGCTTA
CAAAGGAGCTTGCAAACACCATCAAGAATATCAAAGATAAAGCTGTCATTGATGAAATAT
TCCAAGGCCTGGATGCTAATCAAGATGAACAGGTCGACTTTCAAGAATTCATATCCCTGG
TAGCCATTGCGCTGAAGGCTGCCCATTACCACACCCACAAAGAGTAGGTATCTCTGAA
GGCTTTTTACCCAGCAATGTCCTCAATGAGGGTCTTTTCTTTCCCTCACCAAAACCCAGC
CTTGCCCGTGGGGAGTAAGAGTTAATAAACACACTCACGAAAAGTT

【図５０】

MTKLEEHLEGIVNIFHQYSVRKGHFDTLSKGELKQLLTKELANTIKNIKDKAVIDEIFQG
LDANQDEQVDFQEFISLVAIALKAAHYHTHKE

シグナル配列
無し

膜貫通ドメイン
無し

N-ミリストイル化部位
60-65

S-100/ICaBP型カルシウム結合ドメイン
4-47

【図５１】

CTCTTGTCAGCTGTCTTTCAGAAGACCTGGTGGGGKAAGTCCGTGGGCATCATGTTGACC
GAGCTGGAGAAAGCCTTGAACTCTATCATCGACGTCTACCACAAGTACTCCCTGATAAAG
GGGAATTTCCATGCCGTCTACAGGGATGACCTGAAGAAATTGCTAGAGACCGAGTGTCCT
CAGTATATCAGGAAAAGGGTGCAGACGTCTGGTTCAAAGAGTTGGATATCAACACTGAT
GGTGCAGTTAACTTCCAGGAGTTCCTCATTCTGGTGATAAAGATGGGCTGGCAGCCCACA
AAAAAAGCCATGAAGAAAGCCACAAAGAGTAGCTGAGTTACTGCCCAGAGGCTGGGCCCC
TGACATGTACCTGCAGAATAATAAAGTCATCAATACCTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

【図５２】

MLYELEKALNSIIDVYHKYSLIKGNFHAVYRDDLKKLLETECPQYIRKKGADVWFKELDI
NTDGAVNFQEFLILVIKMGWQPTKKAMKKATKSS

シグナル配列
無し

膜貫通ドメイン
無し

cAMP- 及び cGMP-依存性プロテインキナーゼリン酸化部位
88-91

N-ミリストイル化部位
24-29

S-100/ICaBP型カルシウム結合ドメイン
5-48

EF hand
50-78

【図５３】

TTTCTTTGCGTAACCAATACTGGAAGGCATTTAAAGGACCTCTGCCGCCTCAGACCTTGC
AGTTAACTCCGCCCTGACCCACCCTTCCCGATGCAGTCCCTGATGCAGGCTCCCCTCCTG
ATCGCCCCTGGGCTTGCTTCTCGCGACCCCTGCGCAAGCCCACCTGAAAAAGCCATCCCAG
CTCAGTAGCTTTTCCTGGGATAACTGTGATGAAGGGAAGGACCCTGCGGTGATCAGAAGC
CTGACTCTGGAGCCTGACCCCATCGTCGTTCCTGGAAATGTGACCCTCAGTGTCGTGGGC
AGCACCAGTGTCCCCCTGAGTTCTCCTCTGAAGGTGGATTTAGTTTTGGAGAAGGAGGTG
GCTGGCCTCTGGATCAAGATCCCATGCACAGACTACATTGGCAGCTGTACCTTTGAACAC
TTCTGTGATGTGCTTGACATGTTAATTCCTACTGGGGAGCCCTGCCCAGAGCCCCTGCGT
ACCTATGGGCTTCCTTGCCACTGTCCCTTCAAAGAAGGAACCTACTCACTGCCCAAGAGC
GAATTCGTTGTGCCTGACCTGGAGCTGCCCAGTTGGCTCACCACCGGGAACTACCGCATA
GAGAGCGTCCTGAGCAGCAGTGGGAAGCGTCTGGGCTGCATCAAGATCGCTGCCTCTCTA
AAGGGCATATAGCATGGCATCTGCCACAGCAGAATGGAGCGGTGTGAGGAAGGTCCCTTT
TCCTCTGTTTTGTGTTTGCCAAGGCCAAACTCCCACTCTCTGCCCCCCTTTAATCCCCTT
TCTACAGTGAGTCCACTACCCTCACTGAAAATCATTTTGTACCACTTACATTTTAGGCTG
GGGCAAGCAGCCCTGACCTAAGGGAGAATGAGTTGGACAGTCCTTGATAGCCCAGGGCAT
CTGCTGGGCTGACCACGTTACTCATCCCCGTTAACATTCTCTCTAAAGAGCCTCGTTCAT
TTCCAAAGCAGTTAAGGAATGGGAACAGAGTGTTTTAGGACCTGAAGAATCTTTATGACT
CTCTCTCTTTCTCTCTTTTTTTT

【図５４】

MQSLMQAPLLIALGLLLATPAQAHLKKPSQLSSFSWDNCDRGKDPAVIRSLTLEPDPIVV
PGNVTLSVVGSTSVPLSSPLKVDLVLEKEVAGLWIKIPCTDYIGSCTFEHFCDVLDMLIP
TGEPCPEPLRTYGLPCHCPFKEGTYSLPKSEFVVPDLELPSWLTTGNYRIESVLSSSGKR
LGCIKIAASLKGI

シグナル配列
1-23

膜貫通ドメイン
無し

N-グリコシル化部位
63-66

cAMP- 及び cGMP-依存性プロテインキナーゼリン酸化部位
26-29

N-ミリストイル化部位
14-19

アミド化部位
177-180

【図５５】

ATGACGGTGGGCAAGAGCAGCAAGATGCTGCAGCATATTGATTACAGGATGAGGTGCATC
CTGCAGGACGGCCGGATCTTCATTGGCACCTTCAAGCTTTTGACAAGCACATGAATTTG
ATCCTCTGTGACTGTGATGAGTTCAGAAAGATCAAGCCAAAGAACTCCAAACAAGCAGAA
AGGGAAGAGAAGCGAGTCCTCGGTCTGGTGCTGCTGCGAGGGGAGAATCTGGTCTCAATG
ACAGTAGAGGACCTCTTCCCAAAGATACTGGTATTGCTCGAGTTCCACTTGCTGGAGCT
GCCGGGGGCCCAGGGATCGGCAGGGCTGCTGGCAGAGGAATCCCAGCTGGGGTTCCCATG
CCCCAGGCTCCTGCAGGACTTGCTGGGCCAGTCCGTGGGGTTGGCGGGCCATCCCAACAG
GTGATGACCCCACAAGGAAGAGGTACTGTTGCAGCCGCTGCAGCTGCTGCCACAGCCAGT
ATTGCCGGGGCTCCAACCCAGTACCCACCTGGCCGTGGGGGTCCTCCCCCACCTATGGGC
CGAGGAGCACCCCCTCCAGGCATGATGGGCCCACCTCCTGGTATGAGACCTCCTATGGGT
CCCCCAATGGGGATCCCCCCCTGGAAGAGGGACTCCAATGGGCATGCCCCCTCCGGGAATG
CGGCCTCCTCCCCCTGGGATGCGAGGCCTTCTTTGA

【図５６】

MTVGKSSKMLQHIDYRMRCILQDGRIFIGTFKAFDKHMNLILCDCDEFRKIKPKNSKQAR
REEKRVLGLVLLRGENLVSMTVEGPPPKDTGIARVPLAGAAGGPGIGRAAGRGIPAGVPM
PQAPAGLAGPVRGVGGPSQQVMTPQGRGTVAAAAAATASIAGAPTQYPPGRGGPPPPMG
RGAPPPGMMGPPPGMRPPMGPPMGIPPGRGTPMGMPPPGMRPPPPGMRGLL

シグナル配列
無し

膜貫通ドメイン
無し

N-ミリストイル化部位

29-34
105-110
113-118
148-153
204-209
210-215

Sm タンパク質
7-82

【図５７】

TCCTTTGGTGCCTTGTGACCAGGGCCCTGATGGTTCATTAGATGGAGCCTTCGAGTCTTA
GGGAGTTGCCGCAGGGTCCCCACAGCGGCTCCCGACGGTTGTGAACCAGCATCCATCTCC
CACGGATTCCGGCAACCCGCCTGGCCCTGGACGTGTCTCAACTGGCCCGGCGTGAGGGGCC
GCCCCGGAAATGACGCGCTGCCCCGCTGGCCAAGCGGAAGTGGAGATGGCGGAGCTGTAC
GTGAAGCCGGGCAACAAGGAACGCGGCTGGAACGACCCGCCGCAGTTCTCATACGGGCTG
CAGACCCAGGCCGGCGGACCCAGGCGCTCGCTGCTTACCAAGAGGGTAGCCGCACCCCAG
GATGGATCCCCCAGAGTCCCCGCATCAGAGACTTCTCCTGGGCCTCCCCCAATGGGGCCT
CCACCTCCTTCAAGTAAGGCTCCCAGGTCCCCACCTGTGGGGAGTGGTCCTGCCTCTGGC
GTGGAGCCCACAAGTTTCCCAGTCGAGTCTGAGGCTCGACTGATGGAGGATGTGCTGAGA
CCTTTGGAACAGGCATTGGAAGACTGCCGTGGCCACACAAGGAAGCAGGTATGTGATGAC
ATCAGCCGACGCCTGGCACTGCTGCAGGAACAGTGGGCTGGAGGAAAGTTGTCAATACCT
GTAAAGAAGAGAATGGCTCTACTGGTGCAAGAGCTTTCAAGCCACCGGTGGGACGCAGCA
GATGACATCCACCGCTCCCTCATGGTTGACCATGTGACTGAGGTCAGTCAGTGGATGGTA
GGAGTTAAAAGATTAATTGCAGAAAAGAGGAGTCTGTTTTCAGAGGAGGCAGCCAATGAA
GAGAAATCTGCAGCCACAGCTGAGAAGAACCATACCATACCAGGCTTCCAGCAGGCTTCA
TAATCCTCGGTTCCCCAGACT

【図５８】

MTRCPAGQAEVEMAELYVKPGNKERGWNDPPQFSYGLQTQAGGPRRSLLTKRVAAPQDGS
PRVPASETSPGPPPMGPPPPSSKAPRSPPVGSGPASGVEPTSPPVESEARLMEDVLRPLE
QALEDCRGHTRKQVCDDISRRLALLQEQWAGGKLSIPVKKRMALLVQELSSHRWDAADDI
HRSLMVDHVTEVSQWMVGVKRLIAEKRSLPSEEAANEEKSAATAEKNHTIPGFQQAS

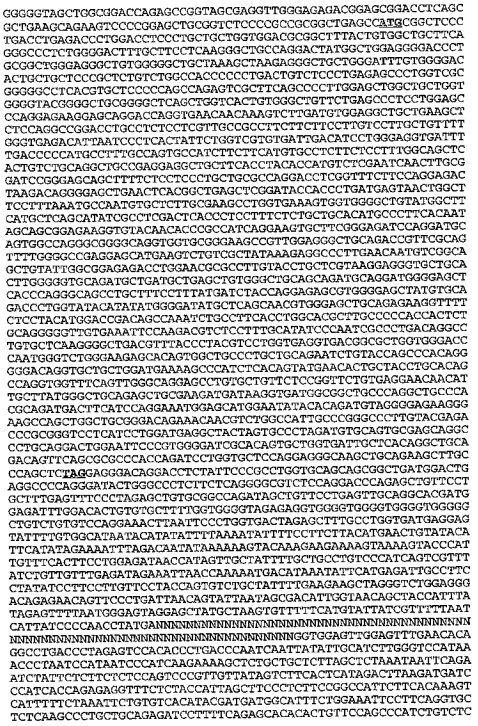
シグナル配列
無し

膜貫通ドメイン
無し

N-グリコシル化部位
227-230

N-ミリストイル化部位
91-94
97-100
151-154

【図５９Ａ】



【図５９Ｂ】

【図６０】

MRLPDLRPWTSLLLVDAALLWLLQGPLGTLLPQGLPGLWLEGTLRLGGLWGLLKLRGLLG
FVGTLLLPLCLATPLTVSLRALVAGASRAPPARVASAPWSWLLVGYGAAGLSWSLWAVLS
PPGAQEKEQDQVNNKVLMWRLLKLSRPDLPLLVAAFFFLVLAVLGETLIPHYSGRVIDIL
GGDFDPHAFASAIFFMCLFSFGSSLSAGCRGGCFTYTMSRINLRIREQLFSSLLRQDLGF
FQETKTGELNSRLSSDTTLMSNWLPLNANVLLRSLVKVVGLYGFMLSISPRLTLLSLLHM
PFTIAAEKVYNTRHQEVLREIQDAVARAGQVVREAVGGLQTVRSFGAEEHEVCRYKEALE
QCRQLYWRRDLERALYLLVRRVLHLGVQMLMLSCGLQQMQDGELTQGSLLSFMIYQQSVG
SYVQTLVYIYGDMLSNVGAAEKVFSYMDRQPNLPSPGTLAPTTLQGVVKFQDVSFAYPNR
PDRPVLKGLTFTLRPGEVTALVGPNGSGKSTVAALQNLYQPTGGQVLLDEKPISQYEHC
YLHSQVVSVGQEPVLFSGSVRNNIAYGLQSCEDDKVMAAAQAAHADDFIQEMEHGIYTDV
GEKGSQLSAGQKQRLAIARALVRDPKVLILDEATSALDVQCEQALQDWNSRGDRTVLVIA
HRLQTVQRAHQILVLQEGKLQKLAQL

シグナル配列
無し
膜貫通ドメイン
5-25
46-66
62-82
98-118
146-166
185-205

N-グリコシル化部位
505-508

チロシンキナーゼリン酸化部位
368-376

N-ミリストイル化部位
47-52
110-115
202-207
208-213
211-216
337-342
407-412
488-493
506-511
558-563
567-572
604-609

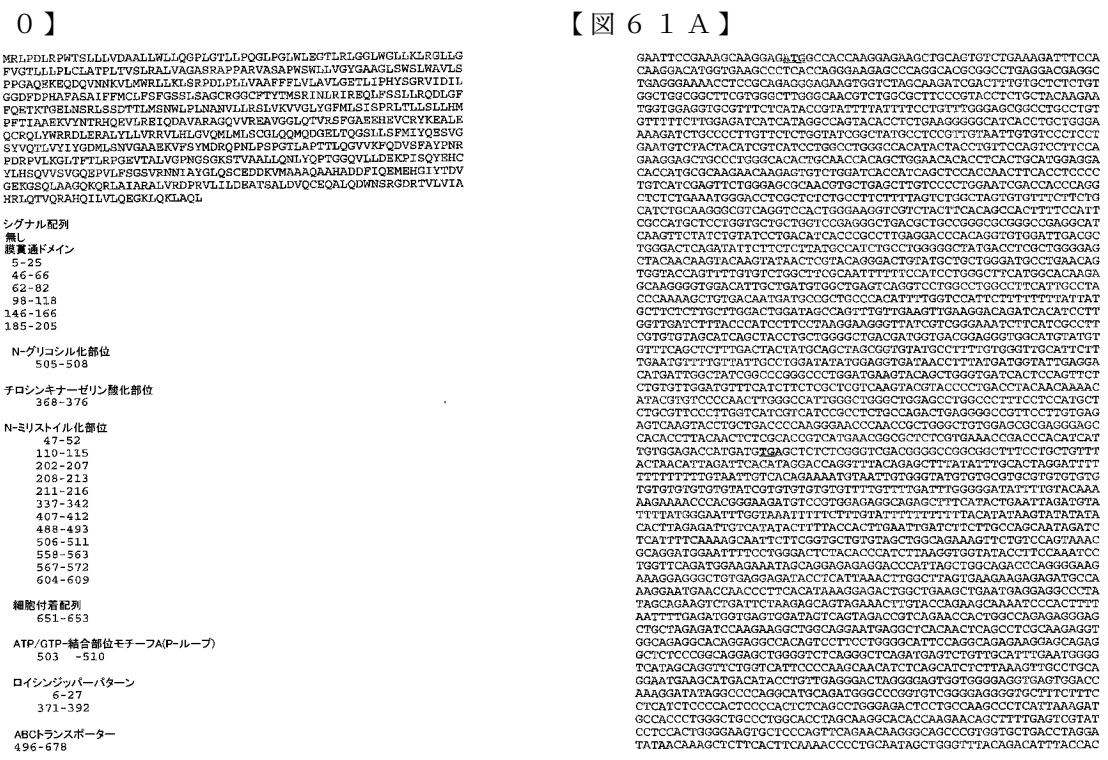
細胞付着配列
651-653

ATP/GTP-結合部位モチーフA(P-ループ)
503 -510

ロイシンジッパーパターン
6-27
371-392

ABCトランスポーター
496-678

【図６１Ａ】



【図６１Ｂ】

```
CTGGGGACCCAAAAGAGAAGGCCTAGGAGAGTTTTCTAGAAGGTTGGGATTGTCAGGGTC
CTGGCCCCCCAGAACTGGCTTGATCAAGGGCCTTATGTGGAGCAGAGGTTGTCTCTGAAC
CAGGAGAGAAGGTACTATACCTTTCAAATCCCCAGGGCAGACACACCCCCACCCAGCCCC
TATTTGGACCTAAACTGTGCCATTTGAACAGTCACTTCCAAGCTCAGTCTAAATGAAACC
GAAACGTGACCACGCACAAAGGCAGTCACTGCTCGAGGGGTGCAGACCGCAGAATTTTCA
CAGCAGGGGCTCTTGGAACTCTGGAAACCCCCTTCTTAAATTTGGGAGGAGGAGTATGCC
TTTGGTGTCCCCCTCCAAGGGCAATTCTGAACCCCATCTTTGGCAGGCATACATATTTC
ACTGTTTCCAAAGCTATCTACTCTGCCAAACAACACCCAGTCCTATTCCAAACTCTCAAC
GATTCTATCTTGTTCCTGTTTTCTATGTATTTATGGTTGCCGTTTGTGTCTGATTTGAT
TTACTGTTTTTTCCCTGATTTTATGGAGTAGCATTGTGACCTGTTTTCCTTTGTCTTAT
ATAACTTTAGTAAACTAACCACTGTCAATGATTGAGGGCAGGTGGCACGTGGGGAAGAGG
GCGGAATTC
```

【図６２Ａ】

```
MATKEKLQCLKDFHKDMVKPSPGKSPGTRPRDEAEGKPPQRSKWSSKIDFVLSVAGGFVG
LGNVWRFPYLCYKNGGGAFLIPYFIFLFGSGLPVFFLEIIIGQYTSEGGITCWEKICPLF
SGIGYASVVIVSLLNVYYIVILAWATYYLPQSFQKELPWAHCNHSWNTPHCMEDTMRKNK
SVWITISSTNFTSPVIEFWERNVLSLSPGIDHPGSLKWDLALCLLLVWLVCPFCICKGVR
STGKVVYPTATFPFAMLLVILLVRGLTLPGAGRGIKFYLYPDITRLEDPQVWIDAGTQIFF
SYAICLGAMTSLGSYNKYKYNSYRDCMLLGCLNSGTSFVSGFAIFSILGFMAQEQGVDIA
DVAESGPGLAFIAYPKAVTMMPLPTFWSILFFIMLLLLGLDSQFVEVEGQITSLVDLYPS
FLRKGYRREIFIAFVCSISYLLGLTMVTEGGMYVFQLFDYYAASGVCLLWVAFFECFVIA
WIYGGDNLYDGIEDMIGYRPGPWMKYSWVITPVLCVGCFIFSLVKYVPLTYNKTYVSPTW
AIGLGWSLALSSMLCVPLVIVIRLCQTEGPFLVRVKYLLTPREPNRWAVEREGATPYNSR
TVMNGALVKPTHIIVETMM
```

シグナル配列
無し

膜貫通ドメイン
47-67
71-91
87-107
122-142
216-236
249-269
291-311
327-347
382-402
426-446
463-483
505-525
544-564

N-グリコシル化部位
163-166
179-182
190-193
532-535

グリコサミノグリカン付着部位
121-124
365-368

N-ミリストイル化部位
56-61
102-107
108-113
122-127
238-243
269-274
307-312
330-335
356-361
409-414
543-548

【図６２Ｂ】

ナトリウム：神経伝達物質共輸送体ファミリーシグネチャー1
65-79

ナトリウム：神経伝達物質共輸送体ファミリーシグネチャー2
148-168

ナトリウム：神経伝達物質共輸送体ファミリー
41-581

【図６３】

```
GCTCTAGCCGGCCGTCTGGTGGCCCGAGGTGGCGGCGGGCTGGGCGCGGGGCGCGAGTGAG
CGGCGCCTGCACGAGCTACGTGAGCGCAGAGCAGGAGGTGGTGCGCGGCTTCAGCTGCCC
GCGGCCGGGGGGCGAGGCGGCCGCTGTCTTCTGCTGCGGCTTCCGCGACCACAAGTACTG
CTGCGACGACCGCACAGCTTCTTCCCCTACGAGCACAGCTACATGTGGTGGCTCAGCAT
TGGCGCTCTCATAGGCCTGTCCGTAGCAGCAGTGGTTCTTCTCGCGTTCATTGTTACCGC
CTGTGTGCTCTGCTACCTGTTCATCAGCTCTAAGCCCCACACAAAGTTGGACCTGGGCTT
GAGCTTACAGACAGCAGGCCCTGAGGAGGTTTCTCCTGACTGCCAAGGTGTGAACACAGG
CATGGCGGCAGAAGTGCCAAAAGTGAGCCCTCTCCAGCAGAGTTACTCCTGCTTGAACCC
GCAGCTGGAGAGCAATGAGGGGCAGGCTGTGAACTCCAAACGCCTCCTCCATCATTGCTT
CATGGCCACAGTGACCACCAGTGACATTCCAGGCAGCCCTGAGGAAGCCTCTGTACCCAA
CCCTGACCTATGTGGACCAGTCCCATAAACAT
```

【図６４】

```
MSGACTSYVSAEQEVVRGFSCPRPGGEAAAVFCCGFRDHKYCCDDPHSFFPYEHSYMWWL
SIGALIGLSVAAVVLLAFIVTACVLCYLFISSKPHTKLDLGLSLQTAGPEEVSPDCQGVN
TGMAAEVPKVSPLQQSYSCLNPQLESNEGQAVNSKRLLHHCFMATVTTSDIPGSPEEASV
PNPDLCGPVP
```

シグナル配列
無し

膜貫通ドメイン
61-81

N-ミリストイル化部位

3-8
25-30
63-68
57-73
118-123
149-154

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int ional Application No
PCT/US2004/007862

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C07K14/47 C12N15/12 G01N33/53 A61K39/00 A61K48/00

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C07K C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
EPO-Internal, Sequence Search, WPI Data, PAJ, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE Geneseq 'Online! 9 May 2001 (2001-05-09), "Human HDJ1." XP002307511 retrieved from EBI accession no. GSP:AAB72675 Database accession no. AAB72675 see abstract & WO 01/12238 A (BENZER SEYMOUR ; CALIFORNIA INST OF TECHN (US); KAZEMI ESFARJANI PARSA) 22 February 2001 (2001-02-22) -/--	1-20

[X] Further documents are listed in the continuation of box C.

[X] Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
25 November 2004	01.04.05

Name and mailing address of the ISA	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL – 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Grosskopf, R

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2004)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/US2004/007862

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE Geneseq 'Online! 18 February 2002 (2002-02-18), "Novel human diagnostic protein #18516." XP002307512 retrieved from EBI accession no. GSP:ABG18525 Database accession no. ABG18525 see abstract & WO 01/75067 A (HYSEQ INC ; LIU CHENGHUA (US); TANG Y TOM (US); DRMANAC RODOJE T (US)) 11 October 2001 (2001-10-11)	1-20
X	DATABASE Geneseq 'Online! 15 July 2002 (2002-07-15), "Human heat shock protein 40." XP002307513 retrieved from EBI accession no. GSP:AAU80168 Database accession no. AAU80168 see abstract & WO 02/19965 A (COTTEN MATTHEW ; BOEHRINGER INGELHEIM INT (DE); PANGANIBAN ANTONITO (U) 14 March 2002 (2002-03-14)	1-20
X	WO 03/004646 A (O'MAHONY DANIEL J ; BRAYDEN DAVID (IE); BYRNE DARAGH (IE)) 16 January 2003 (2003-01-16) see SEQ ID NO: 134; claims	1-20
X	RAABE T AND MANLEY J L: "A human homologue of the Escherichia coli DnaJ heat-shock protein" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, vol. 19, no. 23, 1991, page 6645, XP002079436 ISSN: 0305-1048 see the whole document	1-20
P,X	DATABASE EPO Proteins 'Online! 24 May 2004 (2004-05-24), "Sequence 154 from Patent WO2004038020." XP002307514 retrieved from EBI accession no. EPOP:CQ812402 Database accession no. CQ812402 see abstract & WO 2004/038020 A (DEUTSCHES KREBSFORSCH ; POUSTKA ANNEMARIE (DE); WITTIG RAINER (DE); MO) 6 May 2004 (2004-05-06)	1-20

-/--

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (January 2004)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/US2004/007862

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	DATABASE Geneseq 'Online! 1 July 2004 (2004-07-01), "Antipsoriatic protein sequence #26." XP002307515 retrieved from EBI accession no. GSP:ADN03658 Database accession no. ADN03658 see abstract & WO 2004/028479 A (WILLIAMS P MICKEY ; GENENTECH INC (US); JACKMAN JANET (US); WU THOMAS) 8 April 2004 (2004-04-08) -----	1-22

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (January 2004)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2004/007862

Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

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

1. [X] Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210

2. [X] Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:

see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210

3. [ ] Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

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

see additional sheet

1. [ ] As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.

2. [ ] As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. [ ] As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. [X] No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

1-31 (all partially)

Remark on Protest

[ ] The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

[ ] No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No. PCT/US2004 /007862

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

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

Invention 1: Claims 1-31 (all partially)

Claims relating to a nucleic acid having SEQ ID NO: 1, the corresponding polypeptide having SEQ ID NO: 2, vectors and host cells comprising said nucleic acid, antibodies directed against said polypeptide and methods using said nucleic acids, proteins or antibodies

---

Invention 2-32: Claims 1-31 (all partially)

Claims relating to nucleic acids having SEQ ID NOs: 3 to 61 (odd numbers), the corresponding polypeptides having SEQ ID NOs: 4 to 62 (even numbers), vectors and host cells comprising said nucleic acids, antibodies directed against ~~said polypeptides and methods using said nucleic acids~~, proteins or antibodies

---

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No. PCT/US2004 /007862

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box II.1

Although claims 20, 23, 26 and 29 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
Although claims 21-22, 24-25, 27-28 and 30-31 are directed to a diagnostic method practised on the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

Continuation of Box II.2

Calims 14 to 17 insofar as they relate to agonists or antagonists fo the claimed proteins have not been searched since said agonists/antagonists are not characterised by any (suitable) technical features which would allow a meaningful search.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure. If the application proceeds into the regional phase before the EPO, the applicant is reminded that a search may be carried out during examination before the EPO (see EPO Guideline C-VI, 8.5), should the problems which led to the Article 17(2) declaration be overcome.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/US2004/007862

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 0112238	A	22-02-2001	AU	6910800 A	13-03-2001
			WO	0112238 A1	22-02-2001
			US	2003204859 A1	30-10-2003
			US	6815575 B1	09-11-2004
WO 0175067	A	11-10-2001	AU	3486501 A	14-08-2001
			AU	3995501 A	12-09-2001
			AU	4925101 A	15-10-2001
			AU	4972801 A	15-10-2001
			AU	5119401 A	15-10-2001
			AU	5521401 A	15-10-2001
			CA	2399681 A1	09-08-2001
			CA	2404501 A1	11-10-2001
			CA	2404555 A1	11-10-2001
			EP	1254266 A1	06-11-2002
			EP	1268762 A1	02-01-2003
			EP	1268510 A2	02-01-2003
			JP	2004502403 T	29-01-2004
			JP	2004500120 T	08-01-2004
			WO	0157266 A1	09-08-2001
			WO	0164839 A2	07-09-2001
			WO	0175067 A2	11-10-2001
			WO	0175064 A2	11-10-2001
			WO	0174836 A1	11-10-2001
			WO	0175093 A1	11-10-2001
			US	2004048249 A1	11-03-2004
			US	2003092112 A1	15-05-2003
			US	2003087370 A1	08-05-2003
			US	2003096279 A1	22-05-2003
			US	2003235883 A1	25-12-2003
			US	6436703 B1	20-08-2002
			US	2002061567 A1	23-05-2002
			US	2003180722 A1	25-09-2003
			US	2002146757 A1	10-10-2002
WO 0219965	A	14-03-2002	AU	9062901 A	22-03-2002
			WO	0219965 A2	14-03-2002
WO 03004646	A	16-01-2003	CA	2443644 A1	16-01-2003
			EP	1419252 A2	19-05-2004
			WO	03004646 A2	16-01-2003
			US	2003211476 A1	13-11-2003
			CA	2451741 A1	16-01-2003
			EP	1432729 A2	30-06-2004
			WO	03004517 A2	16-01-2003
			US	2003096354 A1	22-05-2003
WO 2004038020	A	06-05-2004	EP	1369482 A1	10-12-2003
			WO	2004038020 A1	06-05-2004
WO 2004028479	A	08-04-2004	WO	2004028479 A2	08-04-2004

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (January 2004)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		FI			テーマコード（参考）
C12N 1/19	***(2006.01)***	C12N	1/19		4C084
C12N 1/21	***(2006.01)***	C12N	1/21		4C085
C12N 5/10	***(2006.01)***	C12N	5/00	B	4C086
C12P 21/02	***(2006.01)***	C12P	21/02	C	4H045
C12Q 1/68	***(2006.01)***	C12Q	1/68	A	
A61K 38/00	***(2006.01)***	A61K	37/02		
A61K 45/00	***(2006.01)***	A61K	45/00		
A61K 39/395	***(2006.01)***	A61K	39/395	D	
A61K 48/00	***(2006.01)***	A61K	39/395	U	
A61K 31/711	***(2006.01)***	A61K	48/00		
A61P 17/06	***(2006.01)***	A61K	31/711		
A61P 1/04	***(2006.01)***	A61P	17/06		
A61P 19/02	***(2006.01)***	A61P	1/04		
A61P 29/00	***(2006.01)***	A61P	19/02		
A61P 37/00	***(2006.01)***	A61P	29/00	101	
A61P 37/08	***(2006.01)***	A61P	37/00		
A61P 17/02	***(2006.01)***	A61P	37/08		
A61P 43/00	***(2006.01)***	A61P	17/02		
G01N 33/50	***(2006.01)***	A61P	29/00		
G01N 33/15	***(2006.01)***	A61P	43/00	111	
C12P 21/08	*(2006.01)*	G01N	33/50	Z	
		G01N	33/15	Z	
		C12P	21/08		

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

(72)発明者 ボーダリー，サラ
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９４０２５，メンロ パーク，カミノ デ ロス ロブレス １９５１
(72)発明者 クラーク，ヒラリー
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９４１３１，サン フランシスコ，ノエ ストリート １５０４
(72)発明者 フォン，シャーマン
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９４５０２，アラメダ，ベイシンサイド ウェイ １９
(72)発明者 ガーニー，オースティン，エル.
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９４００２，ベルモント，デビー レーン １
(72)発明者 ウィリアムズ，ピー.，ミッキー
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９４０１９，ハーフ ムーン ベイ，アルト アベニュー ５０９

Fターム(参考) 2G045 AA35 CB01 FB02
4B024 AA01 AA11 BA80 CA04 DA02 DA06 DA12 EA04 GA11 HA14
4B063 QA01 QA19 QQ43 QQ52 QQ53 QR32 QR48 QR51 QR56 QS33

QS34
4B064 AG27 CA20 CC24 DA01 DA13
4B065 AA26X AA72X AA90X AA93X AB01 BA02 CA24 CA44 CA46
4C084 AA02 AA06 AA07 AA13 AA17 BA01 BA22 CA25 DA58 NA14
ZA661 ZA681 ZA891 ZA961 ZB011 ZB051 ZB081 ZB111 ZB131 ZB151
ZC021 ZC411
4C085 AA13 AA14 BB11 CC03 DD62 EE01
4C086 AA01 AA02 AA03 AA04 EA16 MA01 MA04 NA14 ZA66 ZA68
ZA89 ZA96 ZB01 ZB05 ZB08 ZB11 ZB13 ZB15 ZC02 ZC41
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA40 DA76 EA20 EA50
FA74 GA26

专利名称(译)	用于治疗免疫相关疾病的新型组合物和方法		
公开(公告)号	JP2006521810A	公开(公告)日	2006-09-28
申请号	JP2006507201	申请日	2004-03-10
[标]申请(专利权)人(译)	健泰科生物技术公司		
申请(专利权)人(译)	Genentech公司		
[标]发明人	ボールドウィンダリル ボーダリーサラ クラークヒラリー フォンシャーマン ガーニーオースティンエル ウィリアムズピーミッキー		
发明人	ボールドウィン,ダリル ボーダリー,サラ クラーク,ヒラリー フォン,シャーマン ガーニー,オースティン,エル. ウィリアムズ,ピー.,ミッキー		
IPC分类号	C12N15/09 C07K14/47 C07K16/18 C07K16/46 C07K19/00 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12P21/02 C12Q1/68 A61K38/00 A61K45/00 A61K39/395 A61K48/00 A61K31/711 A61P17/06 A61P1/04 A61P19/02 A61P29/00 A61P37/00 A61P37/08 A61P17/02 A61P43/00 G01N33/50 G01N33/15 C12P21/08 A61K39/00 C12N C12N15/12 G01N33/53		
CPC分类号	A61K38/00 A61P1/04 A61P17/02 A61P17/06 A61P19/02 A61P29/00 A61P37/00 A61P37/08 A61P43/00 C07K14/47 C07K14/4713		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K14/47 C07K16/18 C07K16/46 C07K19/00 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.B C12P21/02.C C12Q1/68.A A61K37/02 A61K45/00 A61K39/395.D A61K39/395.U A61K48/00 A61K31/711 A61P17/06 A61P1/04 A61P19/02 A61P29/00.101 A61P37/00 A61P37/08 A61P17/02 A61P29/00 A61P43/00.111 G01N33/50.Z G01N33/15.Z C12P21/08		
F-TERM分类号	2G045/AA35 2G045/CB01 2G045/FB02 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA80 4B024/CA04 4B024/DA02 4B024/DA06 4B024/DA12 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA14 4B063/QA01 4B063/QA19 4B063/QQ43 4B063/QQ52 4B063/QQ53 4B063/QR32 4B063/QR48 4B063/QR51 4B063/QR56 4B063/QS33 4B063/QS34 4B064/AG27 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA26X 4B065/AA72X 4B065/AA90X 4B065/AA93X 4B065/AB01 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA06 4C084/AA07 4C084/AA13 4C084/AA17 4C084/BA01 4C084/BA22 4C084/CA25 4C084/DA58 4C084/NA14 4C084/ZA661 4C084/ZA681 4C084/ZA891 4C084/ZA961 4C084/ZB011 4C084/ZB051 4C084/ZB081 4C084/ZB111 4C084/ZB131 4C084/ZB151 4C084/ZC021 4C084/ZC411 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BB11 4C085/CC03 4C085/DD62 4C085/EE01 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/AA03 4C086/AA04 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/ZA66 4C086/ZA68 4C086/ZA89 4C086/ZA96 4C086/ZB01 4C086/ZB05 4C086/ZB08 4C086/ZB11 4C086/ZB13 4C086/ZB15 4C086/ZC02 4C086/ZC41 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74 4H045/GA26		
优先权	60/454025 2003-03-11 US		
其他公开文献	JP2006521810A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及含有新型蛋白质的组合物，以及使用这些组合物诊断和治疗
免疫相关疾病的方法。