

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) **公開特許公報** (A) (11)特許出願公開番号

特開2001 - 149083

(P2001 - 149083A)

(43)公開日 平成13年6月5日(2001.6.5)

(51) Int.Cl ⁷	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 15/09	ZNA		A 6 1 K 45/00	
A 6 1 K 38/00			A 6 1 P 1/16	
				45/00
				5/00
A 6 1 P 1/16				31/00
				31/06

審査請求 未請求 請求項の数 27 O L (全 41数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2000 - 276083(P2000 - 276083)

(22)出願日 平成12年9月12日(2000.9.12)

(31)優先権主張番号 特願平11 - 262228

(32)優先日 平成11年9月16日(1999.9.16)

(33)優先権主張国 日本(JP)

(71)出願人 000002934

武田薬品工業株式会社

大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号

(72)発明者 伊藤 康明

茨城県土浦市桜ヶ丘町36番地の16

(72)発明者 大儀 和宏

茨城県つくば市梅園2丁目16番地1 ルン・
ビーニ梅園206号

(72)発明者 西 一紀

茨城県つくば市並木4丁目16番1号 ガーデ
ンヒルズ並木402号

(74)代理人 100114041

弁理士 高橋 秀一 (外 1 名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 新規ポリペプチドおよびそのDNA

(57)【要約】

【課題】新規前駆体ポリペプチドの提供。

【解決手段】新規前駆体ポリペプチドまたはその塩、該前駆体ポリペプチドをコードするDNAなど。

【効果】本発明のポリペプチド等は、例えば、日和見感染症、敗血症、薬物中毒、結核、ガン、肝臓機能障害、免疫機能障害、内分泌障害等の診断、治療、予防、本発明のポリペプチドの活性を促進もしくは阻害する化合物またはその塩のスクリーニングのための試薬に使用することができる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】配列番号：3で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはその塩。

【請求項2】配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する請求項1記載のポリペプチドまたはその塩。

【請求項3】配列番号：13で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはその塩。

【請求項4】配列番号：11で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する請求項3記載のポリペプチドまたはその塩。

【請求項5】配列番号：9で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する請求項3記載のポリペプチドまたはその塩。

【請求項6】請求項1記載のポリペプチドをコードするDNAを含有するDNA。

【請求項7】配列番号：4で表される塩基配列を含有する請求項6記載のDNA。

【請求項8】請求項6記載のDNAを含有する組換えベクター。

【請求項9】請求項8記載の組換えベクターで形質転換された形質転換体。

【請求項10】配列番号：7で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするDNAを含有するDNAを含有する組換えベクターで形質転換された形質転換体を培養し、該ポリペプチドを生成せしめることを特徴とする配列番号：7で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはその塩の製造法。

【請求項11】配列番号：7で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドが配列番号：3で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドである請求項10記載の製造法。

【請求項12】配列番号：7で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするDNAが配列番号：8で表される塩基配列を有するDNAである請求項10記載の製造法。

【請求項13】請求項3のポリペプチドをコードするDNAを含有するDNAを含有する組換えベクターで形質転換された形質転換体を培養し、該ポリペプチドを生成せしめることを特徴とする請求項3のポリペプチドまたはその塩の製造法。

【請求項14】請求項3のポリペプチドをコードするDNAが配列番号：14で表される塩基配列を有するDNAである請求項13記載の製造法。

【請求項15】請求項1もしくは請求項4記載のポリペプチドまたはその塩に蛋白質分解酵素を作用させることを特徴とする配列番号：7または配列番号：13で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有するポリペプチドまたはその塩の製造法。

【請求項16】請求項3記載のポリペプチドまたはその塩、または配列番号：7で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはその塩に対する抗体。

10 【請求項17】配列番号：7もしくは配列番号：13で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有するポリペプチドまたはその塩を用いることを特徴とする、配列番号：7もしくは配列番号：13で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有するポリペプチドまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法。

20 【請求項18】配列番号：7もしくは配列番号：13で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有するポリペプチドまたはその塩を含有してなる、配列番号：7もしくは配列番号：13で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有するポリペプチドまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キット。

30 【請求項19】請求項17記載のスクリーニング方法または請求項18記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる、配列番号：7もしくは配列番号：13で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有するポリペプチドまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩。

【請求項20】請求項17記載のスクリーニング方法または請求項18記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる、配列番号：7もしくは配列番号：13で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有するポリペプチドまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩を含有してなる医薬。

40 【請求項21】配列番号：7または配列番号13で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはその塩を含有してなる医薬。

【請求項22】配列番号：7または配列番号13で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはその塩を含有してなる日和見感染症、敗血症、薬物中毒、結核、ガン、肝臓機能障害、免疫機能障害、内分泌障害等の予防・治療剤。

50 【請求項23】請求項16記載の抗体を含有してなる診断剤。

【請求項24】N末端側からC末端側にむけて、分泌のためのシグナル配列領域、介在配列、5残基連続した塩基性アミノ酸領域、成熟ポリペプチド領域の順で各領域を有するポリペプチドまたはその塩。

【請求項25】配列番号：27で表されるアミノ酸配列（但し、配列番号7で表されるアミノ酸配列を除く）を含有するポリペプチドまたはその塩。

【請求項26】配列番号：27で表されるアミノ酸配列（但し、配列番号7で表されるアミノ酸配列を除く）を含有するポリペプチドまたはその塩を含有してなる医薬。

【請求項27】形質転換体が動物細胞である請求項10または13記載の製造法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、新規な分泌性生体防御・細胞機能調節ポリペプチドおよびそのDNAに関する。

【0002】

【従来の技術】細胞はその原核性、真核性を問わず、その固有の機構で多種多様な蛋白質を分泌している。特に多細胞生物（生体）は、その分化、増殖、恒常性の維持及び生体防御などのためにさまざまな情報を細胞間で交換しているが、そこで中心的役割を果たす各種液性因子もその多くが分泌蛋白質或いはその成熟体であり、その構造的、機能的特徴等からホルモン、神経伝達物質、サイトカイン、増殖因子、抗菌ペプチド等に分類されている。近年の組換えDNA技術と細胞培養技術の進歩により、これら分泌蛋白質をコードする遺伝子と蛋白質構造の解明が着実に進んでいる。一方でこうした因子の発見は、細胞表面に発現しているその受容体の解析を飛躍的に前進させ、さらには各細胞内での情報伝達のメカニズム解明にもつながり、その生理機能の特徴づけることになる。ヒトにおける多くの疾病、あるいは各種疾患モデル動物の病態では、こうした本来恒常性を保つべき何らかの液性因子の異常な発現、またはそれらの作用が阻害されたり、逆に亢進していることがその原因となり、結果として増悪につながる場合も多く見出される他、例えば癌において特異的に発現の亢進が認められるいわゆる腫瘍マーカー等、各種疾患の診断分野で応用可能な現象もあり、その発現制御機構は創薬研究を行う上での重要な標的にもなっている。

【0003】中でも生理活性ペプチドや抗菌ペプチドは、その知られている殆ど全てが、はじめは前駆体として生合成され、その後、蛋白質分解酵素による限定分解を経て、成熟型のペプチドへと変換される。この時、蛋白質分解酵素による限定分解は、Lys-Arg、Arg-Arg、Arg-X-X-Arg（Xは任意のアミノ酸を示す）、Lys-Lysなどの特徴的な塩基性アミノ酸対部分で起こり、ペプチドの正確な切り出しが行われている（生化学 67, 995-1009, 50

1995）。また、前駆体のN末端には、細胞外への分泌を効率よく行わせるためのシグナル配列が存在していることが特徴として挙げられる。多くの生物では、外来性の病原体に対して、先天的に備わっている防御機構が存在していることが知られているが、抗菌性ペプチドと呼ばれる物質の一群がその役割の一翼を担っている。ヒトをはじめとする各種動物の皮膚、口腔、腸管、気道など、個体が外部と接している場所では、常在性細菌がフローラ（細菌叢）を形成し、定常状態を保っていることが病原体の侵入を防ぐのに重要であり、抗菌性ペプチドはそのために重要な役割を果たしていると考えられている（アニュアル レビュー オブ イムノロジー(Annu. Rev. Immunol.) 13, 61-92, 1995)。例えばその一例として、抗菌ペプチドのディフェンシン（defensin）と嚢胞性繊維症との関係が明らかになっている。嚢胞性繊維症は、最終的には殆どの患者が肺合併症により死亡するが、その原因は、内在性抗菌ペプチドである -ディフェンシン-1（-defensin-1）の本来の作用が、周りの塩濃度の上昇のために阻害される結果、緑膿菌などの細菌感染がおこり、そこから肺炎、肺気腫、肺繊維症などに進展することが明らかになった（セル(Cell) 88, 553-560, 1997）。更に、多くのディフェンシンは、細菌に対してだけでなく、真菌（カビや酵母）、ウイルス、ガン細胞などに対しても防御的に作用することが知られている（アニュアル レビュー オブ イムノロジー(Annu. Rev. Immunol.) 11, 105-128, 1993）。このように抗菌性ペプチドは、広く外来性の病原体や内因性のガン細胞などに対して防御的に働いていることが判明してきている。1998年12月15日に公開のアミノ酸配列データベース（swiss-prot）に35アミノ酸残基からなる新しい抗菌ペプチド前駆体が登録されている（swiss-prot：アクセションナンバーP81172）。しかしながら、ペプチド前駆体の形としては極端に短く、また分泌されるために重要なシグナル配列が欠損しているなど、ペプチド前駆体としては不十分で不自然な内容であった。一方、現在、一つの生物のもつ全DNA、つまりゲノムの構造解析が、バクテリアでは既にいくつか終わり、ヒトのそれも数年で完成の見通しが立っているが、その予想される遺伝子数はヒトにおいては十萬とも言われている。確かにこれまで数多くの分泌蛋白質或いは分泌ペプチドをコードする遺伝子が単離されてきているものの、その数は全ゲノムからみればとてもそのすべてを網羅したとはいえない。個体レベルの生命現象を理解する上でその中で起こっているあらゆる細胞間の情報交換や生体防御機構が説明可能になっていかなければならないが、未だ知られていない遺伝子にコードされた機能性ペプチドが重要な生理的役割を果たしている可能性が高く、そうした物質の発見が強く望まれていた。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】本発明は新規前駆体ポ

リペプチドまたはその塩、該前駆体ポリペプチドをコードするDNA、組換えベクター、形質転換体、該ペプチドの製造法、該ペプチドまたはDNAを含有する医薬、該ペプチド前駆体に対する抗体、レセプターアゴニスト/アンタゴニストのスクリーニング方法並びにスクリーニング用キット、該スクリーニングで得られうるレセプターアゴニスト/アンタゴニスト並びにその医薬等を提供することを目的とする。

【0005】

【課題を解決するための手段】新たな生理活性ペプチドや抗菌ペプチドの単離は、細胞の分化、増殖、癌化、生体防御等のメカニズムに新たな知見を与え、ひいては個体の発生、恒常性の維持等の高次の生命現象の解明をより一層進展させることができ、また該ペプチドに対して阻害活性或いは促進活性を發揮し、種々の疾患の予防や診断、治療に役立つ新たな医薬品の開発ができる。本発明者らは、鋭意研究を重ねた結果、ヒト肝臓、活性化マクロファージなどに発現している新規な塩基配列を有するcDNAをクローニングすることに成功した。そして、本発明者らは、得られたcDNAにコードされる前駆体ポリペ

【0006】すなわち、本発明は、

(1) 配列番号：3で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはその塩、

(2) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する上記(1)記載のポリペプチドまたはその塩、

(3) 配列番号：13で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはその塩、

(4) 配列番号：11で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する上記

(3)記載のポリペプチドまたはその塩、

(5) 配列番号：9で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する上記(3)記載のポリペプチドまたはその塩、

(6) 上記(1)記載のポリペプチドをコードするDNAを含有するDNA、

(7) 配列番号：4で表される塩基配列を含有する上記(6)記載のDNA、

(8) 上記(6)記載のDNAを含有する組換えベクター、

(9) 上記(8)記載の組換えベクターで形質転換された形質転換体、

(10) 配列番号：7で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペ

チドをコードするDNAを含有するDNAを含有する組換えベクターで形質転換された形質転換体を培養し、該ポリペプチドを生成せしめることを特徴とする配列番号：7で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはその塩の製造法、

(11) 配列番号：7で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドが配列番号：3で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドである上記(10)記載の製造法、

(12) 配列番号：7で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするDNAが配列番号：8で表される塩基配列を有するDNAである上記(10)記載の製造法、

(13) 上記(3)のポリペプチドをコードするDNAを含有するDNAを含有する組換えベクターで形質転換された形質転換体を培養し、該ポリペプチドを生成せしめることを特徴とする上記(3)のポリペプチドまたはその塩の製造法、

(14) 上記(3)のポリペプチドをコードするDNAが配列番号：14で表される塩基配列を有するDNAである上記(13)記載の製造法、

(15) 上記(1)もしくは(4)記載のポリペプチドまたはその塩に蛋白質分解酵素を作用させることを特徴とする配列番号：7または配列番号：13で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有するポリペプチドまたはその塩の製造法、

(16) 上記(3)記載のポリペプチドまたはその塩、または配列番号：7で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはその塩に対する抗体、

(17) 配列番号：7もしくは配列番号：13で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有するポリペプチドまたはその塩を用いることを特徴とする、配列番号：7もしくは配列番号：13で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有するポリペプチドまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法、

(18) 配列番号：7もしくは配列番号：13で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有するポリペプチドまたはその塩を含有してなる、配列番号：7もしくは配列番号：13で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有するポリペプチドまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キット、

(19) 上記(17)記載のスクリーニング方法または上記(18)記載のスクリーニング用キットを用いて得

られうる、配列番号：7もしくは配列番号：13で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有するポリペプチドまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩、

(20) 上記(17)記載のスクリーニング方法または上記(18)記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる、配列番号：7もしくは配列番号：13で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有するポリペプチドまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩を含有してなる医薬、

(21) 配列番号：7または配列番号13で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはその塩を含有してなる医薬、

(22) 配列番号：7または配列番号13で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはその塩を含有してなる日和見感染症、敗血症、薬物中毒、結核、ガン、肝臓機能障害、免疫機能障害、内分泌障害等の予防・治療剤、

(23) 上記(16)記載の抗体を含有してなる診断剤、

(24) N末端側からC末端側にむけて、分泌のためのシグナル配列領域、介在配列、5残基連続した塩基性アミノ酸領域、成熟ポリペプチド領域の順で各領域を有するポリペプチドまたはその塩、

(25) 配列番号：27で表されるアミノ酸配列(但し、配列番号7で表されるアミノ酸配列を除く)を含有するポリペプチドまたはその塩、

(26) 配列番号：27で表されるアミノ酸配列(但し、配列番号7で表されるアミノ酸配列を除く)を含有するポリペプチドまたはその塩を含有してなる医薬、

(27) 形質転換体が動物細胞である上記(10)または(13)記載の製造法などを提供する。

さらに本発明のDNA、およびポリペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩等は、分子量マーカー、組織マーカー、染色体マッピング、遺伝病の同定、プライマー、プローブの設計等の基礎研究に利用できる可能性がある。

【0007】

【発明の実施の形態】(1)配列番号：3で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチド、(2)配列番号：11で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチド、(3)配列番号：7で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチド(4)配列番号：13で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドは、ヒトや温血動物(例えば、モルモット、ラット、マウス、ニワト

り、ウサギ、ブタ、ヒツジ、ウシ、サル等)の細胞(例えば、肝細胞、脾細胞、神経細胞、グリア細胞、脾臓細胞、骨髄細胞、メサングウム細胞、ランゲルハンス細胞、表皮細胞、上皮細胞、内皮細胞、繊維芽細胞、繊維細胞、筋細胞、脂肪細胞、免疫細胞(例、マクロファージ、T細胞、B細胞、ナチュラルキラー細胞、肥満細胞、好中球、好塩基球、好酸球、単球)、巨核球、滑膜細胞、軟骨細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、乳腺細胞、もしくは間質細胞、またはこれら細胞の前駆細胞、幹細胞もしくはガン細胞等)もしくはそれらの細胞が存在するあらゆる組織、例えば、脳、脳の各部位(例、嗅球、扁桃核、大脳基底球、海馬、視床、視床下部、大脳皮質、延髄、小脳)、脊髄、下垂体、胃、脾臓、腎臓、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆のう、骨髄、副腎、皮膚、筋肉、肺、消化管(例、大腸、小腸)、血管、心臓、胸腺、脾臓、唾液腺、末梢血、前立腺、睾丸、卵巣、胎盤、子宮、骨、軟骨、関節、骨格筋等に由来するポリペプチドであってもよく、組換えポリペプチドであってもよく、合成ポリペプチドであってもよい。本明細書において、(1)配列番号：3で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドを本発明のヒト型前駆体ポリペプチドと、(2)配列番号：11で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドを本発明のマウス型前駆体ポリペプチドと、(3)配列番号：7で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドをヒト型成熟体ポリペプチドと、(4)配列番号：13で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドを本発明のマウス型成熟体ポリペプチドと称することがある。また、(1)配列番号：21または配列番号：23で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチドを本発明のラット型前駆体ポリペプチドと、(2)配列番号：25で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチドを本発明のラット型成熟体ポリペプチドと称することもある。また、(1)本発明のヒト型前駆体ポリペプチド、本発明のマウス型前駆体ポリペプチドおよびN末端側からC末端側にむけて、分泌のためのシグナル配列領域、介在配列、5残基連続した塩基性アミノ酸領域、成熟ペプチド領域の順で各領域を有するポリペプチドを本発明の前駆体ポリペプチドと、(2)本発明のヒト型成熟体ポリペプチド、本発明のマウス型成熟体ポリペプチドおよび配列番号：27で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチドを本発明の成熟体ポリペプチドと総称することがある。さらに、本発明の前駆体ポリペプチドおよび本発明の成熟体ポリペプチドを本発明のポリペプチドと総称することがある。本発明のポリペプチドがシグナルペプチドを有している場合は、ポリペプチドを効率よく細胞外に分泌させることができる。

【0008】配列番号：7で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、配列番号：7で表されるアミノ酸配列と約60%以上、好ましくは約70%以上、さらに好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、特に好ましくは約95%以上の相同性を有するアミノ酸配列等が挙げられる。配列番号：7で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、配列番号：7で表されるアミノ酸配列とシステイン残基の1が同一であるものが好ましい。配列番号：7で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドとして具体的には、例えば、配列番号：3で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチド等が挙げられる。配列番号：3で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、配列番号：3で表されるアミノ酸配列と約60%以上、好ましくは約70%以上、さらに好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、特に好ましくは約95%以上の相同性を有するアミノ酸配列等が挙げられる。配列番号：3で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドとして具体的には、例えば、配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチド等が挙げられる。配列番号：1で表されるアミノ酸配列実質的に同一のアミノ酸配列としては、配列番号：1で表されるアミノ酸配列と約60%以上、好ましくは約70%以上、さらに好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、特に好ましくは約95%以上の相同性を有するアミノ酸配列等が挙げられる。

【0009】配列番号：13で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、配列番号：13で表されるアミノ酸配列と約60%以上、好ましくは約70%以上、さらに好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、特に好ましくは約95%以上の相同性を有するアミノ酸配列等が挙げられ、具体的には、配列番号：19、配列番号：25で表されるアミノ酸配列等が挙げられる。配列番号：13で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、配列番号：13で表されるアミノ酸配列とシステイン残基の位置が同一であるものが好ましい。配列番号：13で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドとして具体的には、例えば、配列番号：11で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチド等が挙げられる。配列番号：11で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、配列番号：11で表されるアミノ酸配列と約60%以上、好ましくは約70%以上、さらに好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、特に好ましくは約95%

以上の相同性を有するアミノ酸配列等が挙げられ、具体的には、配列番号：17、配列番号：23で表されるアミノ酸配列等が挙げられる。配列番号：11で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドとして具体的には、例えば、配列番号：9で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチド等が挙げられる。配列番号：9で表されるアミノ酸配列実質的に同一のアミノ酸配列としては、配列番号：1で表されるアミノ酸配列と約60%以上、好ましくは約70%以上、さらに好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、特に好ましくは約95%以上の相同性を有するアミノ酸配列等が挙げられ、具体的には、配列番号：15、配列番号：21で表されるアミノ酸配列等が挙げられる。

【0010】実質的に同質の性質としては、例えば、分泌され液性因子として作用すること等が挙げられる。実質的に同質とは、それらの性質が定性的に同質であることを示す。したがって、分泌作用や溶解度等の性質が同等（例、約0.1~100倍、好ましくは約0.5~10倍、より好ましくは0.5~2倍）であることが好ましいが、これらの性質の程度、ポリペプチドの分子量等の量的要素は異なってもよい。

【0011】また、配列番号：1、配列番号：3または配列番号：7で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドとしてより具体的には、例えば、配列番号：1、配列番号：3または配列番号：7で表されるアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1~30個程度、好ましくは1~10個程度、さらに好ましくは数（1~5）個）のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、配列番号：1、配列番号：3または配列番号：7で表されるアミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは、1~30個程度、好ましくは1~10個程度、さらに好ましくは数（1~5）個）のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、配列番号：1、配列番号：3または配列番号：7で表されるアミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは、1~30個程度、好ましくは1~10個程度、さらに好ましくは数（1~5）個）のアミノ酸が挿入されたアミノ酸配列、配列番号：1、配列番号：3または配列番号：7で表されるアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1~30個程度、好ましくは1~10個程度、さらに好ましくは数（1~5）個）のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、またはそれらを組み合わせたアミノ酸配列を含有するポリペプチド等のいわゆるムテインも含まれる。

【0012】配列番号：9、配列番号：11または配列番号：13で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドとしてより具体的には、例えば、配列番号：9、配列番号：11または配

列番号：13で表されるアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数（1～5）個）のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、配列番号：9、配列番号：11または配列番号：13で表されるアミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数（1～5）個）のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、配列番号：9、配列番号：11または配列番号：13で表されるアミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数（1～5）個）のアミノ酸が挿入されたアミノ酸配列、配列番号：9、配列番号：11または配列番号：13で表されるアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数（1～5）個）のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、またはそれらを組み合わせたアミノ酸配列を含有するポリペプチド等のいわゆるムテインも含まれる。上記のようにアミノ酸配列が挿入、欠失または置換されている場合、その挿入、欠失または置換の位置としては、特に限定されない。

【0013】また、配列番号：15、配列番号：17または配列番号：19で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドとしてより具体的には、例えば、配列番号：15、配列番号：17または配列番号：19で表されるアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数（1～5）個）のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、配列番号：15、配列番号：17または配列番号：19で表されるアミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数（1～5）個）のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、配列番号：15、配列番号：17または配列番号：19で表されるアミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数（1～5）個）のアミノ酸が挿入されたアミノ酸配列、配列番号：15、配列番号：17または配列番号：19で表されるアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数（1～5）個）のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、またはそれらを組み合わせたアミノ酸配列を含有するポリペプチド等のいわゆるムテインも含まれる。上記のようにアミノ酸配列が挿入、欠失または置換されている場合、その挿入、欠失または置換の位置としては、特に限定されない。

【0014】配列番号：21、配列番号：23または配列番号：25で表されるアミノ酸配列と実質的に同一の

アミノ酸配列を含有するポリペプチドとしてより具体的には、例えば、配列番号：21、配列番号：23または配列番号：25で表されるアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数（1～5）個）のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、配列番号：21、配列番号：23または配列番号：25で表されるアミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数（1～5）個）のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、配列番号：21、配列番号：23または配列番号：25で表されるアミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数（1～5）個）のアミノ酸が挿入されたアミノ酸配列、配列番号：21、配列番号：23または配列番号：25で表されるアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数（1～5）個）のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、またはそれらを組み合わせたアミノ酸配列を含有するポリペプチド等のいわゆるムテインも含まれる。上記のようにアミノ酸配列が挿入、欠失または置換されている場合、その挿入、欠失または置換の位置としては、特に限定されない。

【0015】N末端側からC末端側にむけて、分泌のためのシグナル配列領域、介在配列、5残基連続した塩基性アミノ酸領域、成熟ポリペプチド領域の順で各領域を有するポリペプチドにおいて、「分泌のためのシグナル配列領域」とは、生合成されたポリペプチドが、小胞体を経由して分泌経路に運ばれるために必要とされるものであればどのようなアミノ酸配列を有するものであってもよいが、疎水性アミノ酸クラスターを含む10～50個、好ましくは13～40個、より好ましくは15～30個からなるシグナル配列が好ましい。「介在配列」は「分泌のためのシグナル配列領域」、「5残基連続した塩基性アミノ酸領域」および「成熟ポリペプチド領域」のアミノ酸配列以外のアミノ酸配列を有するものであればどのようなものであってもよいが、アミノ酸数が約5～300個、好ましくは約10～200個、より好ましくは約20～100個のものが用いられる。「5残基連続した塩基性アミノ酸領域」はアルギニン残基および/またはリジン残基のみからなる5残基連続したアミノ酸配列を有する領域であればどのようなものであってもよいが、好ましくはアルギニン残基を2個以上含むもの、より好ましくはアルギニン残基を3個以上含む配列を有する領域が用いられる。「成熟ポリペプチド領域」は細胞外に分泌して生理作用を示すポリペプチドであればどのようなものであってもよいが、例えば本発明の成熟型ポリペプチドなどが挙げられる。配列番号：27で表わされるアミノ酸配列において、XaalはCys以外のアミノ酸

残基(好ましくは - アミノ酸残基)を示し、具体的には、Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Ser、Thr、Met、Glu、Asp、Lys、Arg、His、Phe、Tyr、Trp、Pro、Asn、Gln等が用いられる。配列番号: 27で表わされるアミノ酸配列としては、[Asp Xaa Xaa Phe Pro Ile Cys Xaa Phe Cys Cys Xaa Cys Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Gly Xaa Cys Cys Xaa Xaa (配列番号: 30)] で表わされるアミノ酸配列が好ましく、[Asp Thr Xaa Phe Pro Ile Cys Xaa Phe Cys Cys Xaa Cys Cys Xaa Xaa Ser Xaa Cys Gly Xaa Cys Cys Xaa Thr (配列番号: 31)] で表わされるアミノ酸配列がより好ましい。

【0016】本明細書におけるポリペプチドは、ペプチド標記の慣例に従って左端がN末端(アミノ末端)、右端がC末端(カルボキシル末端)である。配列番号: 1で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをはじめとする、本発明のポリペプチドは、C末端が通常カルボキシル基(-COOH)またはカルボキシレート(-COO⁻)であるが、C末端がアミド(-CONH₂)またはエステル(-COOR)であってもよい。ここでエステルにおけるRとしては、例えば、メチル、エチル、n-プロピル、イソプロピルもしくはn-ブチル等のC₁₋₆アルキル基、例えば、シクロペンチル、シクロヘキシル等のC₃₋₈シクロアルキル基、例えば、フェニル、-ナフチル等のC₆₋₁₂アリール基、例えば、ベンジル、フェネチル等のフェニル-C₁₋₂アルキル基もしくは-ナフチルメチル等の-ナフチル-C₁₋₂アルキル基等のC₇₋₁₄アラルキル基のほか、経口用エステルとして汎用されるピバロイルオキシメチル基等が用いられる。本発明のポリペプチドがC末端以外にカルボキシル基(またはカルボキシレート)を有している場合、カルボキシル基がアミド化またはエステル化されているものも本発明のポリペプチドに含まれる。この場合のエステルとしては、例えば上記したC末端のエステル等が用いられる。さらに、本発明のポリペプチドには、N末端のアミノ酸残基(例、メチオニン残基)のアミノ基が保護基(例えば、ホルミル基、アセチル基等のC₁₋₆アルカノイル等のC₁₋₆アシル基等)で保護されているもの、生体内で切断されて生成するN末端のグルタミン残基がピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基(例えば-OH、-SH、アミノ基、イミダゾール基、インドール基、グアニジノ基等)が適当な保護基(例えば、ホルミル基、アセチル基等のC₁₋₆アルカノイル基等のC₁₋₆アシル基等)で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖ポリペプチド等の複合ポリペプチド等も含まれる。

【0017】本発明のポリペプチドまたはその塩としては、生理学的に許容される酸(例、無機酸、有機酸)や塩基(例、アルカリ金属塩)等との塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。このような塩としては、例えば、無機酸(例えば、塩酸、リン

酸、臭化水素酸、硫酸)との塩、あるいは有機酸(例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸)との塩等が用いられる。本発明のポリペプチドまたはその塩は、前述したヒトや温血動物の細胞または組織から自体公知のポリペプチド(タンパク質)の精製方法によって製造することもできるし、後述するポリペプチドをコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによっても製造することができる。また、後述のペプチド合成法に準じて製造することもできる。ヒトや哺乳動物の組織または細胞から製造する場合、ヒトや哺乳動物の組織または細胞をホモジナイズした後、酸等で抽出を行ない、該抽出液を逆相クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー等のクロマトグラフィーを組み合わせたことにより精製単離することができる。

【0018】本発明のポリペプチドまたはその塩、またはそのアミド体の合成には、通常市販のポリペプチド(タンパク質)合成用樹脂を用いることができる。そのような樹脂としては、例えば、クロロメチル樹脂、ヒドロキシメチル樹脂、ベンズヒドリルアミン樹脂、アミノメチル樹脂、4-ベンジルオキシベンジルアルコール樹脂、4-メチルベンズヒドリルアミン樹脂、PAM樹脂、4-ヒドロキシメチルメチルフェニルアセトアミドメチル樹脂、ポリアクリルアミド樹脂、4-(2',4'-ジメトキシフェニル-ヒドロキシメチル)フェノキシ樹脂、4-(2',4'-ジメトキシフェニル-Fmocアミノエチル)フェノキシ樹脂等を挙げることができる。このような樹脂を用い、-アミノ基と側鎖官能基を適当に保護したアミノ酸を、目的とするポリペプチドの配列通りに、自体公知の各種縮合方法に従い、樹脂上で縮合させる。反応の最後に樹脂からポリペプチドを切り出すと同時に各種保護基を除去し、さらに高希釈溶液中で分子内ジスルフィド結合形成反応を実施し、目的のポリペプチドまたはそれらのアミド体を取得する。上記した保護アミノ酸の縮合に関しては、ポリペプチド合成に使用できる各種活性化試薬を用いることができるが、特に、カルボジイミド類がよい。カルボジイミド類としては、DCC、N,N'-ジイソプロピルカルボジイミド、N-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド等が用いられる。これらによる活性化にはラセミ化抑制添加剤(例えば、HOBT、HOBt)とともに保護アミノ酸を直接樹脂に添加するかまたは、対称酸無水物またはHOBtエステルあるいはHOBtエステルとしてあらかじめ保護アミノ酸の活性化を行なった後に樹脂に添加することができる。

【0019】保護アミノ酸の活性化や樹脂との縮合に用いられる溶媒としては、ポリペプチド(タンパク質)縮合反応に使用しうることが知られている溶媒から適宜選択されうる。例えば、N,N-ジメチルホルムアミド、N,N-ジメチルアセトアミド、N-メチルピロリドン

等の酸アミド類、塩化メチレン、クロロホルム等のハロゲン化炭化水素類、トリフルオロエタノール等のアルコール類、ジメチルスルホキシド等のスルホキシド類、ピリジン、ジオキサン、テトラヒドロフラン等のエーテル類、アセトニトリル、プロピオニトリル等のニトリル類、酢酸メチル、酢酸エチル等のエステル類あるいはこれらの適宜の混合物等が用いられる。反応温度はポリペプチド（タンパク質）結合形成反応に使用されることが知られている範囲から適宜選択され、通常約 - 20 ~ 50 の範囲から適宜選択される。活性化されたアミノ酸誘導体は通常 1.5 ~ 4 倍過剰で用いられる。ニンヒドリン反応を用いたテストの結果、縮合が不十分な場合には保護基の脱離を行なうことなく縮合反応を繰り返すことにより十分な縮合を行なうことができる。反応を繰り返しても十分な縮合が得られないときには、無水酢酸またはアセチルイミダゾールを用いて未反応アミノ酸をアセチル化することによって、後の反応に影響を与えないようにすることができる。

【0020】原料のアミノ基の保護基としては、例えば、Z、Boc、t-ベンチルオキシカルボニル、イソボルニルオキシカルボニル、4-メトキシベンジルオキシカルボニル、Cl-Z、Br-Z、アダマンチルオキシカルボニル、トリフルオロアセチル、フタロイル、ホルミル、2-ニトロフェニルスルフェニル、ジフェニルホスフィノチオイル、Fmoc等が用いられる。

【0021】カルボキシル基は、例えば、アルキルエステル化（例えば、メチル、エチル、プロピル、ブチル、t-ブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、シクロオクチル、2-アダマンチル等の直鎖状、分枝状もしくは環状アルキルエステル化）、アラルキルエステル化（例えば、ベンジルエステル、4-ニトロベンジルエステル、4-メトキシベンジルエステル、4-クロロベンジルエステル、ベンズヒドリルエステル化）、フェナシルエステル化、ベンジルオキシカルボニルヒドラジド化、t-ブトキシカルボニルヒドラジド化、トリチルヒドラジド化等によって保護することができる。

【0022】セリンの水酸基は、例えば、エステル化またはエーテル化によって保護することができる。このエステル化に適する基としては、例えば、アセチル基等の低級（C₁₋₆）アルカノイル基、ベンゾイル基等のアロイル基、ベンジルオキシカルボニル基、エトキシカルボニル基等の炭酸から誘導される基等が用いられる。また、エーテル化に適する基としては、例えば、ベンジル基、テトラヒドロピラニル基、t-ブチル基等である。チロシンのフェノール性水酸基の保護基としては、例えば、Bzl、Cl₂-Bzl、2-ニトロベンジル、Br-Z、t-ブチル等が用いられる。ヒスチジンのイミダゾールの保護基としては、例えば、Tos、4-メトキシ-2,3,6-トリメチルベンゼンスルホニル、DNP、ベンジルオキシメチ

ル、Bum、Boc、Trt、Fmoc等が用いられる。

【0023】原料のカルボキシル基の活性化されたものとしては、例えば、対応する酸無水物、アジド、活性エステル〔アルコール（例えば、ペンタクロロフェノール、2,4,5-トリクロロフェノール、2,4-ジニトロフェノール、シアノメチルアルコール、パラニトロフェノール、HONB、N-ヒドロキシスクシミド、N-ヒドロキシフタルイミド、HOBt）とのエステル〕等が用いられる。原料のアミノ基の活性化されたものとしては、例えば、対応するリン酸アミドが用いられる。保護基の除去（脱離）方法としては、例えば、Pd-黒あるいはPd-炭素等の触媒の存在下での水素気流中での接触還元や、また、無水フッ化水素、メタンスルホン酸、トリフルオロメタンスルホン酸、トリフルオロ酢酸あるいはこれらの混合液等による酸処理や、ジイソプロピルエチルアミン、トリエチルアミン、ピペリジン、ピペラジン等による塩基処理、また液体アンモニア中ナトリウムによる還元等も用いられる。上記酸処理による脱離反応は、一般に約 - 20 ~ 40 の温度で行なわれるが、酸処理においては、例えば、アニソール、フェノール、チオアニソール、メタクレゾール、パラクレゾール、ジメチルスルフィド、1,4-ブタンジチオール、1,2-エタンジチオール等のようなカチオン捕捉剤の添加が有効である。また、ヒスチジンのイミダゾール保護基として用いられる2,4-ジニトロフェニル基はチオフェノール処理により除去され、トリプトファンインドール保護基として用いられるホルミル基は上記の1,2-エタンジチオール、1,4-ブタンジチオール等の存在下での酸処理による脱保護以外に、希水酸化ナトリウム溶液、希アンモニア等によるアルカリ処理によっても除去される。

【0024】原料の反応に関与すべきでない官能基の保護ならびに保護基、およびその保護基の脱離、反応に関与する官能基の活性化等は公知の基または公知の手段から適宜選択しうる。ポリペプチドのアミド体を得る別の方法としては、例えば、まず、カルボキシ末端アミノ酸の - カルボキシル基をアミド化して保護した後、アミノ基側にペプチド（ポリペプチド）鎖を所望の鎖長まで延ばした後、該ペプチド鎖のN末端の - アミノ基の保護基のみを除いたポリペプチドとC末端のカルボキシル基の保護基のみを除去したポリペプチドとを製造し、この両ポリペプチドを上記したような混合溶媒中で縮合させる。縮合反応の詳細については上記と同様である。縮合により得られた保護ポリペプチドを精製した後、上記方法によりすべての保護基を除去し、所望の粗ポリペプチドを得ることができる。この粗ポリペプチドは既知の各種精製手段を駆使して精製し、主要画分を凍結乾燥することで所望のポリペプチドのアミド体を得ることができる。ポリペプチドのエステル体を得るには、例えば、カルボキシ末端アミノ酸の - カルボキシル基を所望のアルコール類と縮合しアミノ酸エステルとした後、ポリ

ペプチドのアミド体と同様にして、所望のポリペプチドのエステル体を得ることができる。

【0025】本発明のポリペプチドまたはその塩は、自公知のペプチドの合成法に従って製造することができる。ペプチドの合成法としては、例えば、固相合成法、液相合成法のいずれによっても良い。すなわち、本発明の部分ペプチドを構成し得る部分ペプチドもしくはアミノ酸と残余部分とを縮合させ、生成物が保護基を有する場合は保護基を脱離することにより目的のペプチドを製造することができる。公知の縮合方法や保護基の脱離として、例えば、以下の ~ に記載された方法が挙げられる。

M. Bodanszky および M.A. Ondetti、ペプチド・シンセシス (Peptide Synthesis), Interscience Publisher, New York (1966年)

Schroeder および Luebke、ザ・ペプチド (The Peptide), Academic Press, New York (1965年)

泉屋信夫他、ペプチド合成の基礎と実験、丸善(株) (1975年)

矢島治明 および 榊原俊平、生化学実験講座 1、タンパク質の化学IV、205、(1977年)

矢島治明監修、続医薬品の開発、第14巻、ペプチド合成、広川書店

また、反応後は通常の前製法、例えば、溶媒抽出・蒸留・カラムクロマトグラフィー・液体クロマトグラフィー・再結晶等を組み合わせて本発明のポリペプチドポリペプチドを精製単離することができる。上記方法で得られるポリペプチドが遊離体である場合は、公知の方法あるいはそれに準じる方法によって適当な塩に変換することができるし、逆に塩で得られた場合は、公知の方法あるいはそれに準じる方法によって遊離体または他の塩に変換することができる。

【0026】本発明のヒト型ポリペプチドをコードするDNAとしては、前述した本発明のヒト型ポリペプチドをコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。また、ゲノムDNA、前記した細胞・組織由来のcDNA、合成DNAのいずれでもよい。ライブラリーに使用するベクターは、バクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミド等いずれであってもよい。また、前記した細胞・組織よりtotal RNAまたはmRNA画分を調製したものをを用いて直接Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (以下、RT-PCR法と略称する)によって増幅することもできる。

【0027】本発明のヒト型前駆体ポリペプチドをコードするDNAとしては、例えば、配列番号：4で表される塩基配列を含有するDNA、配列番号：4で表される塩基配列と実質的に同一の塩基配列を含有し、本発明のヒト型前駆体ポリペプチドと実質的に同質の性質(例、免疫原性等)を有するポリペプチドをコードするDN

A、または配列番号：4で表される塩基配列を有するDNAとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAを含有し、本発明のヒト型前駆体ポリペプチドと実質的に同質の性質(例、免疫原性等)を有するポリペプチドをコードするDNAの何れのものでよい。

配列番号：4で表される塩基配列を含有するDNAとしては、配列番号：4で表される塩基配列を含有するDNA、配列番号：2で表される塩基配列を含有するDNA等が用いられる。配列番号：4で表される塩基配列と実質的に同一の塩基配列を含有するDNAまたは配列番号：4で表される塩基配列を有するDNAとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAを含有するDNAとしては、例えば、配列番号：4で表される塩基配列と約80%以上、好ましくは約90%以上、さらに好ましくは約95%以上、最も好ましくは約98%以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNAが挙げられる。

【0028】本発明のヒト型成熟体ポリペプチドをコードするDNAとしては、例えば、配列番号：8で表される塩基配列を含有するDNA、配列番号：8で表される塩基配列と実質的に同一の塩基配列を含有し、本発明のヒト型成熟体ポリペプチドと実質的に同質の性質(例、免疫原性等)を有するポリペプチドをコードするDNA、または配列番号：8で表される塩基配列を有するDNAとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAを含有し、本発明のヒト型成熟体ポリペプチドと実質的に同質の性質(例、免疫原性等)を有するポリペプチドをコードするDNAの何れのものでよい。配列番号：8で表される塩基配列を含有するDNAとしては、配列番号：8で表される塩基配列を含有するDNA等が用いられる。配列番号：8で表される塩基配列と実質的に同一の塩基配列を含有するDNAまたは配列番号：8で表される塩基配列を有するDNAとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAを含有するDNAとしては、例えば、配列番号：8で表される塩基配列と約80%以上、好ましくは約90%以上、さらに好ましくは約95%以上、最も好ましくは約98%以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNAが挙げられる。

【0029】本発明のマウス型ポリペプチドをコードするDNAとしては、前述した本発明のマウス型ポリペプチドをコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。また、ゲノムDNA、前記した細胞・組織由来のcDNA、合成DNAのいずれでもよい。ライブラリーに使用するベクターは、バクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミド等いずれであってもよい。また、前記した細胞・組織よりtotal RNAまたはmRNA画分を調製したものをを用いて直接Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (以下、RT-PCR法と略称する)によって増幅する

こともできる。

【0030】本発明の Maus型前駆体ポリペプチドをコードする DNA としては、例えば、配列番号：12 で表される塩基配列を含有する DNA、配列番号：12 で表される塩基配列と実質的に同一の塩基配列を含有し、本発明の Maus型前駆体ポリペプチドと実質的に同質の性質（例、免疫原性等）を有するポリペプチドをコードする DNA、または配列番号：12 で表される塩基配列を含有する DNA とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする DNA を含有し、本発明の Maus型前駆体ポリペプチドと実質的に同質の性質（例、免疫原性等）を有するポリペプチドをコードする DNA の何れのものでもよい。配列番号：12 で表される塩基配列を含有する DNA としては、配列番号：12 で表される塩基配列を含有する DNA、配列番号：10 で表される塩基配列を含有する DNA 等が用いられる。配列番号：12 で表される塩基配列と実質的に同一の塩基配列を含有する DNA または配列番号：12 で表される塩基配列を含有する DNA とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする DNA を含有する DNA としては、例えば、配列番号：12 で表される塩基配列と約 80% 以上、好ましくは約 90% 以上、さらに好ましくは約 95% 以上、最も好ましくは約 98% 以上の相同性を有する塩基配列を含有する DNA が挙げられ、具体的には、配列番号：16、配列番号：18、配列番号：22 または配列番号：24 で表される塩基配列を含有する DNA 等が用いられる。

【0031】本発明の Maus型成熟体ポリペプチドをコードする DNA としては、例えば、配列番号：14 で表される塩基配列を含有する DNA、配列番号：14 で表される塩基配列と実質的に同一の塩基配列を含有し、本発明の Maus型成熟体ポリペプチドと実質的に同質の性質（例、免疫原性等）を有するポリペプチドをコードする DNA、または配列番号：14 で表される塩基配列を含有する DNA とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする DNA を含有し、本発明の Maus型成熟体ポリペプチドと実質的に同質の性質（例、免疫原性等）を有するポリペプチドをコードする DNA の何れのものでもよい。配列番号：14 で表される塩基配列を含有する DNA としては、配列番号：14 で表される塩基配列を含有する DNA 等が用いられる。配列番号：14 で表される塩基配列と実質的に同一の塩基配列を含有する DNA または配列番号：14 で表される塩基配列を含有する DNA とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする DNA を含有する DNA としては、例えば、配列番号：14 で表される塩基配列と約 80% 以上、好ましくは約 90% 以上、さらに好ましくは約 95% 以上、最も好ましくは約 98% 以上の相同性を有する塩基配列を含有する DNA が挙げられ、具体的には、配列番号：20、配列番号：26 で表される塩基配列を含有する DN

A 等が用いられる。

【0032】ハイブリダイゼーションは、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法、例えば、モレキュラー・クローニング (Molecular Cloning) 2nd (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法等に従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。より好ましくは、ハイストリンジェントな条件下に従って行なうことができる。ハイストリンジェントな条件とは、例えば、ナトリウム濃度が約 19 ~ 40 mM、好ましくは約 19 ~ 20 mM で、温度が約 50 ~ 70 °C、好ましくは約 60 ~ 65 °C の条件を示す。配列番号：1 で表されるアミノ酸配列を有する本発明のポリペプチドをコードする DNA としては、配列番号：2 で表される塩基配列を有する DNA 等が、配列番号：3 で表されるアミノ酸配列を有する本発明のポリペプチドをコードする DNA としては、配列番号：4 で表される塩基配列を有する DNA 等が、配列番号：5 で表されるアミノ酸配列を有する本発明のポリペプチドをコードする DNA としては、配列番号：6 で表される塩基配列を有する DNA 等が、配列番号：7 で表されるアミノ酸配列を有する本発明のポリペプチドをコードする DNA としては、配列番号：8 で表される塩基配列を有する DNA 等が、配列番号：9 で表されるアミノ酸配列を有する本発明のポリペプチドをコードする DNA としては、配列番号：10 で表される塩基配列を有する DNA 等が、配列番号：11 で表されるアミノ酸配列を有する本発明のポリペプチドをコードする DNA としては、配列番号：12 で表される塩基配列を有する DNA 等が、配列番号：13 で表されるアミノ酸配列を有する本発明のポリペプチドをコードする DNA としては、配列番号：14 で表される塩基配列を有する DNA 等が、配列番号：15 で表されるアミノ酸配列を有する本発明のポリペプチドをコードする DNA としては、配列番号：16 で表される塩基配列を有する DNA 等が、配列番号：17 で表されるアミノ酸配列を有する本発明のポリペプチドをコードする DNA としては、配列番号：18 で表される塩基配列を有する DNA 等が、配列番号：19 で表されるアミノ酸配列を有する本発明のポリペプチドをコードする DNA としては、配列番号：20 で表される塩基配列を有する DNA 等が、配列番号：21 で表されるアミノ酸配列を有する本発明のポリペプチドをコードする DNA としては、配列番号：22 で表される塩基配列を有する DNA 等が、配列番号：23 で表されるアミノ酸配列を有する本発明のポリペプチドをコードする DNA としては、配列番号：24 で表される塩基配列を有する DNA 等が、配列番号：25 で表されるアミノ酸配列を有する本発明のポリペプチドをコードする DNA としては、配列番号：26 で表される塩基配列を有する DNA 等が用いられる。

【0033】本発明のポリペプチドを完全にコードするDNAのクローニングの手段としては、本発明のポリペプチドの部分塩基配列を有する合成DNAプライマーを用いてPCR法によって増幅するか、または適当なベクターに組み込んだDNAを本発明のポリペプチドの一部あるいは全領域をコードするDNA断片もしくは合成DNAを用いて標識したものとハイブリダイゼーションによって選別することができる。ハイブリダイゼーションの方法は、例えば、モレキュラー・クローニング (Molecular Cloning) 2nd (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法等に従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。DNAの塩基配列の変換は、PCRや公知のキット、例えば、MutanTM-superExpress Km (宝酒造(株))、MutanTM-K (宝酒造(株))等を用いて、ODA-LAPCR法やGupped duplex法やKunkel法等の自体公知の方法あるいはそれらに準じる方法に従って行なうことができる。クローン化されたポリペプチドをコードするDNAは目的によりそのまま、または所望により制限酵素で消化したり、リンカーを付加したりして使用することができる。該DNAはその5'末端側に翻訳開始コドンとしてのATGを有し、また3'末端側には翻訳終止コドンとしてのTAA、TGAまたはTAGを有していてもよい。これらの翻訳開始コドンや翻訳終止コドンは、適当な合成DNAアダプターを用いて付加することもできる。本発明のポリペプチドの発現ベクターは、例えば、(イ)本発明のポリペプチドをコードするDNAから目的とするDNA断片を切り出し、(ロ)該DNA断片を適当な発現ベクター中のプロモーターの下流に連結することにより製造することができる。

【0034】ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド(例、pBR322, pBR325, pUC12, pUC13)、枯草菌由来のプラスミド(例、pUB110, pTP5, pC194)、酵母由来プラスミド(例、pSH19, pSH15)、ファージ等のバクテリオファージ、レトロウイルス、ワクシニアウイルス、パキウウイルス等の動物ウイルス等の他、pA1-11、pXT1、pRc/CMV、pRc/R5V、pcDNA1/Neo、pcDNA3.1、pRc/CMV2、pRc/R5V (Invitrogen社)等が用いられる。本発明で用いられるプロモーターとしては、遺伝子の発現に用いる宿主に対応して適切なプロモーターであればいかなるものでもよい。例えば、動物細胞を宿主として用いる場合は、SRプロモーター、SV40プロモーター、HIV・LTRプロモーター、CMVプロモーター、HSV-TKプロモーター、 γ -アクチン等が挙げられる。これらのうち、CMV (サイトメガロウイルス)プロモーター、SRプロモーター等を用いるのが好ましい。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、tr

pプロモーター、lacプロモーター、recAプロモーター、P_Lプロモーター、lppプロモーター、T7プロモーター等が、宿主がバチルス属菌である場合は、SPO1プロモーター、SPO2プロモーター、penPプロモーター等、宿主が酵母である場合は、PHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーター等が好ましい。宿主が昆虫細胞である場合は、ポリヘドリンプロモーター、P10プロモーター等が好ましい。

【0035】発現ベクターには、以上の他に、所望によりエンハンサー、スプライシングシグナル、ポリA付加シグナル、選択マーカー、SV40複製オリジン(以下、SV40oriと略称する場合がある)等を含んでいるものを用いることができる。選択マーカーとしては、例えば、ジヒドロ葉酸還元酵素(以下、dhfrと略称する場合がある)遺伝子〔メソトレキセート(MTX)耐性〕、アンピシリン耐性遺伝子(以下、Amp^rと略称する場合がある)、ネオマイシン耐性遺伝子(以下、Neo^rと略称する場合がある、Geneticin耐性)等が挙げられる。特に、dhfr遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞を用いてdhfr遺伝子を選択マーカーとして使用する場合、組換え体細胞をチミジンを含まない培地によっても選択できる。また、必要に応じて、宿主に合ったシグナル配列を、本発明のポリペプチドのN端末側に付加してもよい。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、PhoA・シグナル配列、OmpA・シグナル配列等が、宿主がバチルス属菌である場合は、 α -アミラーゼ・シグナル配列、サブチリシン・シグナル配列等が、宿主が酵母である場合は、MF₁・シグナル配列、SUC2・シグナル配列等、宿主が動物細胞である場合には、インシュリン・シグナル配列、 α -インターフェロン・シグナル配列、抗体分子・シグナル配列等がそれぞれ利用できる。このようにして構築された本発明のポリペプチドをコードするDNAを含有するベクターを用いて、形質転換体を製造することができる。

【0036】宿主としては、例えば、エシェリヒア属菌、バチルス属菌、酵母、昆虫細胞、昆虫、動物細胞等が用いられる。エシェリヒア属菌の具体例としては、例えば、エシェリヒア・コリ(Escherichia coli) K12・DH1〔プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユースエー(Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 60巻, 160(1968)〕, JM103〔ヌクイレック・アシズ・リサーチ, (Nucleic Acids Research), 9巻, 309(1981)〕, JA221〔ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー(Journal of Molecular Biology)〕, 120巻, 517(1978)〕, HB101〔ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー, 41巻, 459(1969)〕, C600〔ジェネティクス(Genetics), 39巻, 440(1954)〕等が用

いられる。バチルス属菌としては、例えば、バチルス・ズブチルス (*Bacillus subtilis*) MI 1 1 4 [ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (Journal of Biochemistry), 95巻, 87(1984)] 等が用いられる。酵母としては、例えば、サッカロマイセス セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*) AH 2 2, AH 2 2 R⁻, NA 8 7 - 1 1 A, DKD - 5 D, 2 0 B - 1 2、シゾサッカロマイセス ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*) NCYC 1 9 1 3, NCYC 2 0 3 6、ピキア パストリス (*Pichia pastoris*) KM 7 1 等が用いられる。

【0037】昆虫細胞としては、例えば、ウイルスが AcNPV の場合は、夜盗蛾の幼虫由来株化細胞 (*Spodoptera frugiperda* cell; Sf細胞)、*Trichoplusia ni* の中腸由来の MG 1 細胞、*Trichoplusia ni* の卵由来の High FiveTM細胞、*Mamestra brassicae* 由来の細胞または *Estigmene acrea* 由来の細胞等が用いられる。ウイルスが BmNPV の場合は、蚕由来株化細胞 (*Bombyx mori* N細胞; BmN細胞) 等が用いられる。該 Sf細胞としては、例えば、Sf 9細胞 (ATCC CRL1711)、Sf 2 1細胞 (以上、Vaughn, J.L.ら、イン・ヴィボ (In Vivo), 13, 213-217, (1977)) 等が用いられる。昆虫としては、例えば、カイコの幼虫等が用いられる [前田ら、ネイチャー (Nature), 315巻, 592(1985)]。動物細胞としては、例えば、サル細胞 COS - 7, Ver o, チャイニーズハムスター細胞 CHO (以下、CHO細胞と略記), dhfr 遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞 CHO (以下、CHO (dhfr⁻)細胞と略記), マウス L細胞, マウス At T - 2 0, マウスミエローマ細胞, ラット GH 3, ヒト FL細胞等が用いられる。

【0038】エシェリヒア属菌を形質転換するには、例えば、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. U S A), 69巻, 2110(1972) や ジーン (Gene), 17巻, 107(1982) 等に記載の方法に従って行なうことができる。バチルス属菌を形質転換するには、例えば、モレキュラー・アンド・ジェネラル・ジェネティクス (Molecular & General Genetics), 168巻, 111(1979) 等に記載の方法に従って行なうことができる。酵母を形質転換するには、例えば、メソッズ・イン・エンザイモロジー (Methods in Enzymology), 194巻, 182-187(1991)、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. U S A), 75巻, 1929(1978) 等に記載の方法に従って行なうことができる。昆虫細胞または昆虫を形質転換するには、例えば、バイオテクノロジー (Bio/

Technology), 6, 47-55(1988)) 等に記載の方法に従って行なうことができる。動物細胞を形質転換するには、例えば、細胞工学別冊 8 新細胞工学実験プロトコル 263-267(1995) (秀潤社発行)、ウイルス学 (Virology), 52巻, 456(1973) に記載の方法に従って行なうことができる。このようにして、ポリペプチドをコードする DNA を含有する発現ベクターで形質転換された形質転換体を得ることができる。宿主がエシェリヒア属菌、バチルス属菌である形質転換体を培養する際、培養に使用される培地としては液体培地が適当であり、その中には該形質転換体の生育に必要な炭素源、窒素源、無機物その他が含有せしめられる。炭素源としては、例えば、グルコース、デキストリン、可溶性澱粉、ショ糖等、窒素源としては、例えば、アンモニウム塩類、硝酸塩類、コーンステープ・リカー、ペプトン、カゼイン、酵母エキス、肉エキス、大豆粕、バレイショ抽出液等の無機または有機物質、無機物としては、例えば、塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウム等が挙げられる。また、酵母エキス、ビタミン類、生長促進因子等を添加してもよい。培地の pH は約 5 ~ 8 が望ましい。

【0039】エシェリヒア属菌を培養する際の培地としては、例えば、グルコース、カザミノ酸を含む M 9 培地 [ミラー (Miller), ジャーナル・オブ・エクスペリメンツ・イン・モレキュラー・ジェネティクス (Journal of Experiments in Molecular Genetics), 431-433, Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1972] が好ましい。ここに必要によりプロモーターを効率よく働かせるために、例えば、3 - インドリルアクリル酸のような薬剤を加えることができる。宿主がエシェリヒア属菌の場合、培養は通常約 15 ~ 43 時間で約 3 ~ 24 時間行ない、必要により、通気や攪拌を加えることもできる。宿主がバチルス属菌の場合、培養は通常約 30 ~ 40 時間で約 6 ~ 24 時間行ない、必要により通気や攪拌を加えることもできる。宿主が酵母である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、パークホルダー (Burkholder) 最小培地 [Bostian, K. L. ら、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. U S A), 77巻, 4505(1980)] や 0.5% カザミノ酸を含有する SD 培地 [Bitter, G. A. ら、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. U S A), 81巻, 5330(1984)] が挙げられる。培地の pH は約 5 ~ 8 に調整するのが好ましい。培養は通常約 20 ~ 35 時間で約 24 ~ 72 時間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。宿主が昆虫細胞または昆虫である形質転換体を培養する際、培地としては、Grace's Insect Medium (Grace, T.C.C., ネイチャー (Natur

e), 195, 788(1962)) に非動化した 10%ウシ血清等の添加物を適宜加えたもの等が用いられる。培地の pH は約 6.2 ~ 6.4 に調整するのが好ましい。培養は通常約 27 で約 3 ~ 5 日間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。宿主が動物細胞である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、約 5 ~ 20% の胎児牛血清を含む MEM 培地〔サイエンス (Science), 122 巻, 501(1952)〕, DMEM 培地〔ウイルス学 (Virology), 8 巻, 396(1959)〕, RPMI 1640 培地〔ジャーナル・オブ・ザ・アメリカン・メディカル・アソシエーション (The Journal of the American Medical Association) 199 巻, 519(1967)〕, 199 培地〔プロシーディング・オブ・ザ・ソサイエティ・フォー・ザ・バイオロジカル・メディシン (Proceeding of the Society for the Biological Medicine), 73 巻, 1(1950)〕等が用いられる。pH は約 6 ~ 8 であるのが好ましい。培養は通常約 30 ~ 40 で約 15 ~ 60 時間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。以上のようにして、形質転換体の細胞内、細胞膜または細胞外に本発明のポリペプチドを生成せしめることができる。

【0040】上記培養物から本発明のポリペプチドを分離精製するには、例えば、下記の方法により行なうことができる。本発明のポリペプチドを培養菌体あるいは細胞から抽出するに際しては、培養後、公知の方法で菌体あるいは細胞を集め、これを適当な緩衝液に懸濁し、超音波、リゾチームおよび/または凍結融解等によって菌体あるいは細胞を破壊したのち、遠心分離やろ過によりポリペプチドの粗抽出液を得る方法等が適宜用いられる。緩衝液の中に尿素や塩酸グアニジン等の蛋白質変性剤や、トリトン X-100TM等の界面活性剤が含まれていてもよい。培養液中にポリペプチドが分泌される場合には、培養終了後、それ自体公知の方法で菌体あるいは細胞と上清とを分離し、上清を集める。このようにして得られた培養上清、あるいは抽出液の中に含まれるポリペプチドの精製は、自体公知の分離・精製法を適切に組み合わせる方法、透析法、限外ろ過法、ゲルろ過法、および SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法等の主として分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィー等の荷電の差を利用する方法、アフィニティークロマトグラフィー等の特異的親和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィー等の疎水性の差を利用する方法、等電点電気泳動法等の等電点の差を利用する方法等が用いられる。特にシステイン残基が多く複雑な立体構造を取っている本発明の前駆体ポリペプチド及び成熟体ポリペプチドを取得する方法としては、組換え体を用いて分泌発現させ、それを精製する上記の方法は好適である。

【0041】かくして得られるポリペプチドが遊離体で得られた場合には、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法によって塩に変換することができ、逆に塩で得られた場合には自体公知の方法あるいはそれに準じる方法により、遊離体または他の塩に変換することができる。なお、組換え体が産生するポリペプチドを、精製前または精製後に適当な蛋白修飾酵素または蛋白分解酵素等を作用させることにより、任意に修飾を加えたり、ポリペプチドを部分的に除去することもできる。これらの酵素としては、例えば、トリプシン、キモトリプシン、アルギニルエンドペプチダーゼ、プロテインキナーゼ、グリコシダーゼ等が用いられる。具体的には、塩基性アミノ酸部分で切断が起こるトリプシン、アルギニルエンドペプチダーゼ、Kex2 様エンドプロテアーゼ等の蛋白質分解酵素を本発明の前駆体ポリペプチドに作用させることにより、成熟ペプチドを切り出すことが可能である。例えばトリプシンを用いる場合は、反応液の pH が 3 から 10、望ましくは 5 から 9、より望ましくは、8 付近で反応させ、反応温度は 10 から 50、望ましくは、20 から 45、より望ましくは 30 から 40 の条件で反応させる。また例えば、Kex2 様エンドプロテアーゼであるフリンを酵素に用いる場合は、ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.), 267 巻, 16094-16099 (1992 年)に記載の方法に従って行うことができる。かくして生成する本発明のポリペプチドまたはその塩の存在は、特異抗体を用いたエンザイムイムノアッセイやウエスタンブロット解析等により測定することができる。

【0042】本発明のポリペプチドまたはその塩に対する抗体は、本発明のポリペプチドまたはその塩を認識し得る抗体であれば、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体の何れであってもよい。本発明のポリペプチドまたはその塩に対する抗体は、本発明のポリペプチドを抗原として用い、自体公知の抗体または抗血清の製造法に従って製造することができる。

〔モノクローナル抗体の作製〕

(a) モノクローナル抗体産生細胞の作製

本発明のポリペプチドまたはその塩は、温血動物に対して投与により抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は通常 2 ~ 6 週毎に 1 回ずつ、計 2 ~ 10 回程度行われる。用いられる温血動物としては、例えば、サル、ウサギ、イヌ、モルモット、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギ、ニワトリが挙げられるが、マウスおよびラットが好ましく用いられる。モノクローナル抗体産生細胞の作製に際しては、抗原で免疫された温血動物、例えばマウスから抗体価の認められた個体を選択し最終免疫の 2 ~ 5 日後に

脾臓またはリンパ節を採取し、それらに含まれる抗体産生細胞を同種または異種動物の骨髄腫細胞と融合させることにより、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを調製することができる。抗血清中の抗体価の測定は、例えば、後記の標識化ポリペプチドと抗血清とを反応させたのち、抗体に結合した標識剤の活性を測定することにより行なうことができる。融合操作は既知の方法、例えば、ケーラーとミルスタインの方法〔ネイチャー (Nature)、256、495 (1975)〕に従い実施することができる。融合促進剤としては、例えば、ポリエチレングリコール (PEG) やセンダイウィルス等が挙げられるが、好ましくはPEGが用いられる。

【0043】骨髄腫細胞としては、例えば、NS-1、P3U1、SP2/0、AP-1等の温血動物の骨髄腫細胞が挙げられるが、P3U1が好ましく用いられる。用いられる抗体産生細胞(脾臓細胞)数と骨髄腫細胞数との好ましい比率は1:1~20:1程度であり、PEG(好ましくはPEG1000~PEG6000)が10~80%程度の濃度で添加され、約20~40、好ましくは約30~37で約1~10分間インキュベートすることにより効率よく細胞融合を実施できる。モノクローナル抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングには種々の方法が使用できるが、例えば、ポリペプチド抗原を直接あるいは担体とともに吸着させた固相(例、マイクロプレート)にハイブリドーマ培養上清を添加し、次に放射性物質や酵素等で標識した抗免疫グロブリン抗体(細胞融合に用いられる細胞がマウスの場合、抗マウス免疫グロブリン抗体が用いられる)またはプロテインAを加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法、抗免疫グロブリン抗体またはプロテインAを吸着させた固相にハイブリドーマ培養上清を添加し、放射性物質や酵素等で標識したポリペプチドを加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法等が挙げられる。モノクローナル抗体の選別は、自体公知あるいはそれに準じる方法に従って行なうことができる。通常HAT(ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン)を添加した動物細胞用培地で行なうことができる。選別および育種用培地としては、ハイブリドーマが生育できるものならばどのような培地を用いても良い。例えば、約1~20%、好ましくは約10~20%の牛胎児血清を含むRPMI1640培地、約1~10%の牛胎児血清を含むGIT培地(和光純薬工業(株))あるいはハイブリドーマ培養用無血清培地(SFM-101、日水製薬(株))等を用いることができる。培養温度は、通常約20~40、好ましくは約37である。培養時間は、通常5日~3週間、好ましくは1週間~2週間である。培養は、通常5%炭酸ガス下で行なうことができる。ハイブリドーマ培養上清の抗体価は、上記の抗血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。

【0044】(b)モノクローナル抗体の精製

モノクローナル抗体の分離精製は、自体公知の方法、例えば、免疫グロブリンの分離精製法〔例、塩析法、アルコール沈殿法、等電点沈殿法、電気泳動法、イオン交換体(例、DEAE)による吸脱着法、超遠心法、ゲルろ過法、抗原結合固相あるいはプロテインAあるいはプロテインG等の活性吸着剤により抗体のみを採取し、結合を解離させて抗体を得る特異的精製法〕に従って行なうことができる。

【0045】〔ポリクローナル抗体の作製〕本発明のポリクローナル抗体は、それ自体公知あるいはそれに準じる方法に従って製造することができる。例えば、免疫抗原(ポリペプチド抗原)自体、あるいはそれとキャリアー蛋白質との複合体をつくり、上記のモノクローナル抗体の製造法と同様に温血動物に免疫を行ない、該免疫動物から本発明のポリペプチドまたはその塩に対する抗体含有物を採取して、抗体の分離精製を行なうことにより製造することができる。温血動物を免疫するために用いられる免疫抗原とキャリアー蛋白質との複合体に関し、キャリアー蛋白質の種類およびキャリアーとハプテンとの混合比は、キャリアーに架橋させて免疫したハプテンに対して抗体が効率良くできれば、どのようなものをどのような比率で架橋させてもよいが、例えば、ウシ血清アルブミンやウシサイログロブリン、ヘモシアニン等を重量比でハプテン1に対し、約0.1~2.0、好ましくは約1~5の割合でカプルさせる方法が用いられる。また、ハプテンとキャリアーのカプリングには、種々の縮合剤を用いることができるが、グルタルアルデヒドやカルボジイミド、マレイミド活性エステル、チオール基、ジチオビリジル基を含有する活性エステル試薬等が用いられる。縮合生成物は、温血動物に対して、抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は、通常約2~6週毎に1回ずつ、計約3~10回程度行なわれる。ポリクローナル抗体は、上記の方法で免疫された温血動物の血液、腹水等、好ましくは血液から採取することができる。抗血清中のポリクローナル抗体価の測定は、上記の抗血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。ポリクローナル抗体の分離精製は、上記のモノクローナル抗体の分離精製と同様の免疫グロブリンの分離精製法に従って行なうことができる。

【0046】本発明のポリペプチドをコードするDNA(以下、本発明のDNAと称することもある)に相補的な、または実質的に相補的な塩基配列を有するアンチセンスDNAとしては、本発明のDNAに相補的な、または実質的に相補的な塩基配列を有し、該DNAの発現を抑制し得る作用を有するものであれば、いずれのアンチセンスDNAであってもよい。本発明のDNAに実質的に相補的な塩基配列とは、例えば、本発明のDNAに相

補的な塩基配列（すなわち、本発明のDNAの相補鎖）の全塩基配列あるいは部分塩基配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列等が挙げられる。特に、本発明のDNAの相補鎖の全塩基配列うち、本発明のポリペプチドのN末端部位をコードする部分の塩基配列（例えば、開始コドン付近の塩基配列等）の相補鎖と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有するアンチセンスDNAが好適である。これらのアンチセンスDNAは、公知のDNA合成装置等を用いて製造することができる。

【0047】本発明のポリペプチドがシグナルペプチドを有する場合は、細胞外に効率よく分泌され、液性因子として、シグナル伝達や自己防衛等のための重要な生物活性を發揮する。本発明のポリペプチドが有していてもよいシグナルペプチド（以下、本発明のシグナルペプチドと称することがある）として、具体的には、配列番号：5で表されるアミノ酸配列アミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチド等が挙げられる。本発明のシグナルペプチドをコードするDNAとしては、例えば、配列番号：6で表される塩基配列を含有するDNA、配列番号：6で表される塩基配列と実質的に同一の塩基配列を含有し、本発明のシグナルペプチドと実質的に同質の性質（例、免疫原性等）を有するペプチドをコードするDNA、または配列番号：6で表される塩基配列を有するDNAとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAを含有し、本発明のシグナルペプチドと実質的に同質の性質（例、免疫原性等）を有するペプチドをコードするDNAの何れのものでもよい。配列番号：6で表される塩基配列を含有するDNAとしては、配列番号：6で表される塩基配列を含有するDNA等が用いられる。配列番号：6で表される塩基配列と実質的に同一の塩基配列を含有するDNAまたは配列番号：6で表される塩基配列を有するDNAとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAを含有するDNAとしては、例えば、配列番号：6で表される塩基配列と約50%以上、好ましくは約60%以上、さらに好ましくは約70%以上、最も好ましくは約80%以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNAが挙げられる。配列番号：5で表されるアミノ酸配列を有する本発明のシグナルペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：6で表される塩基配列を有するDNA等が挙げられる。

【0048】以下に、本発明のポリペプチドまたはその塩（以下、本発明のポリペプチドと略記する場合がある）、本発明のポリペプチドをコードするDNA（以下、本発明のDNAと略記する場合がある）、本発明のポリペプチドまたはその塩に対する抗体（以下、本発明の抗体と略記する場合がある）、およびアンチセンスD

NAの用途を説明する。

【0049】本発明の成熟体ペプチドは、25アミノ酸残基中、システインが8残基（32%）と多いため、たとえ一次構造（アミノ酸の並び）が成熟体ペプチドと同じペプチドを有機化学合成法により製造できたとしても、製造後にS-S結合の位置を正確にコントロールし、正しい立体構造を持ち天然型と同一の抗原性や生理活性を有する成熟型ペプチドを製造することは非常に困難である。また、正しいS-S結合位置を計算で予測することも、S-S結合に寄与すると考えられるシステイン残基の組み合わせの数が膨大であることから不可能に近い。したがって、生理活性を持った成熟型ペプチドを有機化学合成法により直接製造することは、大変困難な状況である。これに対し、本発明の前駆体ポリペプチドを經由させて、組換え体で成熟体ペプチドを製造した場合、本来の生合成経路（細胞が有する分泌経路）を經由して製造することができることから、正しい立体構造を保ち、生理活性を有する本発明の成熟型ペプチドが効率よく細胞外に分泌させることができる。また、工業的生産にかかる費用も、組換え体を用いる本発明の製造法をとることにより有機化学合成法よりも、安価に抑えることが可能となる。このような製造法として、具体的には、例えば、配列番号：3で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードする塩基配列を含有するDNAを含有するDNAを含有する組換えベクターで形質転換された形質転換体を培養し、該ポリペプチドを生成せしめる方法などが挙げられる。また、本発明の前駆体ポリペプチドに蛋白質分解酵素を作用させることによっても本発明の成熟体ペプチドを製造することができる。この場合、本発明の前駆体ポリペプチドの5残基連続した塩基性アミノ酸部分で切断が起こるように蛋白質分解酵素を作用させることにより、効率よく成熟体ペプチドを作製することが可能である。このような目的に用いられる蛋白質分解酵素としては、例えば、トリプシン、キモトリプシン、アルギニルエンドペプチダーゼ、プロテインキナーゼ、グリコシダーゼ等が用いられる。具体的には、塩基性アミノ酸部分で切断が起こるトリプシン、アルギニルエンドペプチダーゼ、Kex2様エンドプロテアーゼ等の蛋白質分解酵素を本発明の前駆体ポリペプチドに作用させることにより、成熟ペプチドを切り出すことが可能である。例えばトリプシンを用いる場合は、反応液のpHが3から10、望ましくは5から9、より望ましくは、8付近で反応させ、反応温度は10から50、望ましくは、20から45、より望ましくは30から40の条件で反応させる。また例えば、Kex2様エンドプロテアーゼであるフリンを酵素に用いる場合は、ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー（J. Biol. Chem.）、267巻、16094-16099（1992年）に記載の方法に従って行うことができ

る。

【0050】(1)本発明のポリペプチドは、組織特異的に発現しているため、組織マーカーとして使用することができる。すなわち組織の分化、病態、癌の転移等の検出のためのマーカーとして有用である。また、対応するレセプター、リガンド、結合ポリペプチド等の分取にも利用できる。さらに、自体公知のハイスルーブツスクリーニングのためのパネルにして、生物活性を調べるのに利用できる。また、染色体マッピングを行い、遺伝病の研究にも利用できる。

(2)本発明のポリペプチドが関与する各種疾病の治療・予防剤

本発明のポリペプチドは、生体内で液性因子として存在するため、本発明のポリペプチド、または本発明のDNA等に異常があったり、欠損している場合あるいは発現量が異常に減少または亢進している場合、例えば、日和見感染症、敗血症、薬物中毒、結核、ガン、肝臓機能障害、免疫機能障害、内分泌障害等の種々の疾病が発症する。したがって、本発明のポリペプチドおよび本発明のDNAは、例えば日和見感染症、敗血症、薬物中毒、結核、ガン、肝臓機能障害、免疫機能障害、内分泌障害等の種々の疾病の治療・予防剤等の医薬として使用することができる。例えば、生体内において本発明のポリペプチドが減少あるいは欠損しているために、細胞における情報伝達が十分に、あるいは正常に発揮されない患者がいる場合に、(イ)本発明のDNAを該患者に投与し、生体内で本発明のポリペプチドを発現させることによって、(ロ)細胞に本発明のDNAを挿入し、本発明のポリペプチドを発現させた後に、該細胞を患者に移植することによって、または(ハ)本発明のポリペプチドを該患者に投与すること等によって、該患者における本発明のポリペプチドの役割を十分に、あるいは正常に発揮させることができる。本発明のDNAを上記の治療・予防剤として使用する場合は、該DNAを単独あるいはレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルスアソシエートドウイルスベクター等の適当なベクターに挿入した後、常套手段に従って、ヒトまたは温血動物に投与することができる。本発明のDNAは、そのまま、あるいは摂取促進のための補助剤等の生理学的に認められる担体とともに製剤化し、遺伝子銃やハイドロゲルカテーテルのようなカテーテルによって投与することができる。本発明のポリペプチドを上記の治療・予防剤として使用する場合は、少なくとも90%、好ましくは95%以上、より好ましくは98%以上、さらに好ましくは99%以上に精製されたものを使用するのが好ましい。

【0051】本発明のポリペプチドは、例えば、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤等として経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、

または懸濁液剤等の注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、本発明のポリペプチドを生理学的に認められる担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤等とともに一般に認められた製剤実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な用量が得られるようにするものである。錠剤、カプセル剤等に混和することができる添加剤としては、例えば、ゼラチン、コーンスターチ、トラガント、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸等のような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのような香味剤等が用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、前記タイプの材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油等のような天然産出植物油等を溶解または懸濁させる等の通常の製剤実施に従って処方することができる。注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液(例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウム等)等が挙げられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール(例えば、エタノール等)、ポリアルコール(例えば、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール等)、非イオン性界面活性剤(例えば、ポリソルベート80TM、HCO-50等)等と併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油等が挙げられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコール等と併用してもよい。また、緩衝剤(例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液等)、無痛化剤(例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカイン等)、安定剤(例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコール等)、保存剤(例えば、ベンジルアルコール、フェノール等)、酸化防止剤等と配合してもよい。調製された注射液は、通常、適当なアンブルに充填される。本発明のDNAが挿入されたベクターも上記と同様に製剤化され、通常、非経口的に使用される。

【0052】このようにして得られる製剤は、安全で低毒性であるので、例えば、ヒトまたは温血動物(例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、トリ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サル等)に対して投与することができる。本発明のポリペプチドの投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルート等により差異はあるが、例えば、日和見感染症、敗血症、薬物中毒、結核、ガン、肝臓機能障害、免疫機能障害、内分泌障害の治療目的で本発明のポリペプチドを経口投与する場合、一般的に成人(60kgとして)においては、一日につき本発明のポリペプチドを約1mg~1000mg、好

ましくは約 10 ~ 500 mg、より好ましくは約 10 ~ 200 mg 投与する。非経口的に投与する場合は、本発明のポリペプチドの 1 回投与量は投与対象、対象疾患等によっても異なるが、例えば、日和見感染症、敗血症、薬物中毒、結核、ガン、肝臓機能障害、免疫機能障害、内分泌障害等の治療目的で本発明のポリペプチドを注射剤の形で成人（体重 60 kg として）に投与する場合、一日につき該ポリペプチドを約 1 ~ 1000 mg 程度、好ましくは約 1 ~ 200 mg 程度、より好ましくは約 10 ~ 100 mg 程度を患部に注射することにより投与するの

【0053】(3) 疾病に対する医薬候補化合物のスクリーニング

本発明のポリペプチドは生体内（特に肝臓、血液、尿等）で液性因子として存在するため、本発明のポリペプチドの活性を促進する化合物またはその塩は、例えば、日和見感染症、敗血症、薬物中毒、結核、ガン、肝臓機能障害、免疫機能障害、内分泌障害等々の治療・予防剤等の医薬として使用できる。一方、本発明のポリペプチドの活性を阻害する化合物またはその塩は、本発明のポリペプチドの産生過剰に起因する疾患の治療・予防剤等の医薬として使用できる。したがって、本発明のポリペプチドは、本発明のポリペプチドの活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニングのための試薬として有用である。すなわち、本発明は、本発明のポリペプチドまたはその塩の活性を促進する化合物もしくはその塩（以下、促進剤と略記する場合があります）、または本発明のポリペプチドまたはその塩の活性を阻害する化合物（以下、阻害剤と略記する場合があります）のスクリーニング方法を提供する。本発明のスクリーニング用キットは、本発明のポリペプチドまたはその塩を含有するものである。

【0054】本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩は、例えば、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液、血漿等から選ばれた化合物であり、本発明のポリペプチドの活性を促進または阻害する化合物である。該化合物の塩としては、前記した本発明のポリペプチドの塩と同様のものが用いられる。

【0055】本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物を上記の治療・予防剤として使用する場合、常套手段に従って実施することができる。例えば、前記した本発明のポリペプチドを含有する医薬と同様にして、錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤、無菌性溶液、懸濁液剤等とすることができる。このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトまたは温血

動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、トリ、ネコ、イヌ、サル等）に対して投与することができる。該化合物またはその塩の投与量は、その作用、対象疾患、投与対象、投与ルート等により差異はあるが、例えば、日和見感染症、敗血症、薬物中毒、結核、ガン、肝臓機能障害、免疫機能障害、内分泌障害等の治療の目的で本発明のポリペプチドの活性を促進する化合物を経口投与する場合、一般的に成人（体重 60 kg として）においては、一日につき該化合物を約 0.1 ~ 100 mg、好ましくは約 1.0 ~ 50 mg、より好ましくは約 1.0 ~ 20 mg 投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物の 1 回投与量は投与対象、対象疾患等によっても異なるが、例えば、日和見感染症、敗血症、薬物中毒、結核、ガン、肝臓機能障害、免疫機能障害、内分泌障害等治療の目的で本発明のポリペプチドの活性を促進する化合物を注射剤の形で通常成人（60 kg として）に投与する場合、一日につき該化合物を約 0.01 ~ 30 mg 程度、好ましくは約 0.1 ~ 20 mg 程度、より好ましくは約 0.1 ~ 10 mg 程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60 kg 当りに換算した量を投与することができる。一方、本発明のポリペプチドの活性を阻害する化合物を経口投与する場合、一般的に成人（体重 60 kg として）においては、一日につき該化合物を約 0.1 ~ 100 mg、好ましくは約 1.0 ~ 50 mg、より好ましくは約 1.0 ~ 20 mg 投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物の 1 回投与量は投与対象、対象疾患等によっても異なるが、本発明のポリペプチドの活性を阻害する化合物を注射剤の形で通常成人（60 kg として）に投与する場合、一日につき該化合物を約 0.01 ~ 30 mg 程度、好ましくは約 0.1 ~ 20 mg 程度、より好ましくは約 0.1 ~ 10 mg 程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60 kg 当りに換算した量を投与することができる。

【0056】(4) 本発明のポリペプチドまたはその塩の定量

本発明のポリペプチドに対する抗体（以下、本発明の抗体と略記する場合があります）は、本発明のポリペプチドを特異的に認識することができるので、被検液中の本発明のポリペプチドの定量、特にサンドイッチ免疫測定法による定量等に使用することができる。すなわち、本発明は、(i) 本発明の抗体と、被検液および標識化された本発明のポリペプチドとを競動的に反応させ、該抗体に結合した標識化された本発明のポリペプチドの割合を測定することを特徴とする被検液中の本発明のポリペプチドの定量法、および(ii) 被検液と担体上に不溶化した本発明の抗体および標識化された本発明の別の抗体とを同時あるいは連続的に反応させたのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することを特徴とする被検液中の本

発明のポリペプチドの定量法を提供する。

【0057】また、本発明のポリペプチドに対するモノクローナル抗体（以下、本発明のモノクローナル抗体と称する場合がある）を用いて本発明のポリペプチドの定量を行なえるほか、組織染色等による検出を行なうこともできる。これらの目的には、抗体分子そのものを用いてもよく、また、抗体分子の $F(ab')_2$ 、 Fab' 、あるいは Fab 画分を用いてもよい。本発明の抗体を用いる本発明のポリペプチドの定量法は、特に制限されるべきものではなく、被測定液中の抗原量（例えば、本発明のポリペプチド量）に対応した抗体、抗原もしくは抗体-抗原複合体の量を化学的または物理的手段により検出し、これを既知量の抗原を含む標準液を用いて作製した標準曲線より算出する測定法であれば、いずれの測定法を用いてもよい。例えば、ネフロメトリー、競合法、イムノメトリック法およびサンドイッチ法が好適に用いられるが、感度、特異性の点で、後述するサンドイッチ法を用いるのが特に好ましい。標識物質を用いる測定法に用いられる標識剤としては、例えば、放射性同位元素、酵素、蛍光物質、発光物質等が用いられる。放射性同位元素としては、例えば、 $[^{125}I]$ 、 $[^{131}I]$ 、 $[^3H]$ 、 $[^{14}C]$ 等が用いられる。上記酵素としては、安定で比活性の大きなものが好ましく、例えば、 α -ガラクトシダーゼ、 β -グルコシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、パーオキシダーゼ、リンゴ酸脱水素酵素等が用いられる。蛍光物質としては、例えば、フルオレスカミン、フルオレッセンイソチオシアネート等が用いられる。発光物質としては、例えば、ルミノール、ルミノール誘導体、ルシフェリン、ルシゲニン等が用いられる。さらに、抗体あるいは抗原と標識剤との結合にビオチン-アビジン系を用いることもできる。

【0058】抗原あるいは抗体の不溶化にあたっては、物理吸着を用いてもよく、また通常ポリペプチドあるいは酵素等を不溶化、固定化するのに用いられる化学結合を用いる方法でもよい。担体としては、アガロース、デキストラン、セルロース等の不溶性多糖類、ポリスチレン、ポリアクリルアミド、シリコン等の合成樹脂、あるいはガラス等が挙げられる。サンドイッチ法においては不溶化した本発明のモノクローナル抗体に被検液を反応させ（1次反応）、さらに標識化した別の本発明のモノクローナル抗体を反応させ（2次反応）たのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することにより被検液中の本発明のポリペプチド量を定量することができる。1次反応と2次反応は逆の順序に行っても、また、同時に行なってもよいし時間をずらして行なってもよい。標識化剤および不溶化の方法は前記のそれらに準じることができる。また、サンドイッチ法による免疫測定法において、固相用抗体あるいは標識用抗体に用いられる抗体は必ずしも1種類である必要はなく、測定感度を向上させる等の目的で2種類以上の抗体の混合物を用いてもよ

い。本発明のサンドイッチ法による本発明のポリペプチドの測定法においては、1次反応と2次反応に用いられる本発明のモノクローナル抗体は、本発明のポリペプチドの結合する部位が相異なる抗体が好ましく用いられる。すなわち、1次反応および2次反応に用いられる抗体は、例えば、2次反応で用いられる抗体が、本発明のポリペプチドのC端部を認識する場合、1次反応で用いられる抗体は、好ましくはC端部以外、例えばN端部を認識する抗体が用いられる。

【0059】本発明のモノクローナル抗体をサンドイッチ法以外の測定システム、例えば、競合法、イムノメトリック法あるいはネフロメトリー等に用いることができる。競合法では、被検液中の抗原と標識抗原とを抗体に対して競合的に反応させたのち、未反応の標識抗原（F）と、抗体と結合した標識抗原（B）とを分離し（B/F分離）、B、Fいずれかの標識量を測定し、被検液中の抗原量を定量する。本反応法には、抗体として可溶性抗体を用い、B/F分離をポリエチレングリコール、前記抗体に対する第2抗体等を用いる液相法、および、第1抗体として固相化抗体を用いるか、あるいは、第1抗体は可溶性のものを用い第2抗体として固相化抗体を用いる固相化法とが用いられる。イムノメトリック法では、被検液中の抗原と固相化抗原とを一定量の標識化抗体に対して競合反応させた後固相と液相を分離するか、あるいは、被検液中の抗原と過剰量の標識化抗体とを反応させ、次に固相化抗原を加え未反応の標識化抗体を固相に結合させたのち、固相と液相を分離する。次に、いずれかの相の標識量を測定し被検液中の抗原量を定量する。また、ネフロメトリーでは、ゲル内あるいは溶液中で抗原抗体反応の結果生じた不溶性の沈降物の量を測定する。被検液中の抗原量が僅かであり、少量の沈降物しか得られない場合にもレーザーの散乱を利用するレーザーネフロメトリー等が好適に用いられる。

【0060】これら個々の免疫学的測定法を本発明の定量方法に適用するにあたっては、特別の条件、操作等の設定は必要とされない。それぞれの方法における通常条件、操作法に当業者の通常の技術的配慮を加えて本発明のポリペプチドの測定系を構築すればよい。これらの一般的な技術手段の詳細については、総説、成書等を参照することができる。例えば、入江 寛編「ラジオイムノアッセイ」（講談社、昭和49年発行）、入江 寛編「続ラジオイムノアッセイ」（講談社、昭和54年発行）、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」（医学書院、昭和53年発行）、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」（第2版）（医学書院、昭和57年発行）、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」（第3版）（医学書院、昭和62年発行）、「Methods in ENZYMOLOGY, Vol. 70(Immunochemical Techniques(Part A))」、同書 Vol. 73(Immunochemical Techniques(Part B))」、同書 Vol. 74(Immunochemical Techniques(Part C))」、同書 Vol. 84(Immunochem

ical Techniques(Part D:Selected Immunoassays))、同書 Vol. 92(Immunochemical Techniques(Part E:Monoclonal Antibodies and General Immunoassay Methods))、同書 Vol. 121(Immunochemical Techniques(Part I:Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies))(以上、アカデミックプレス社発行)等を参照することができる。以上のようにして、本発明の抗体を用いることによって、本発明のポリペプチドを感度良く定量することができる。さらには、本発明の抗体を用いて本発明のポリペプチドの濃度を定量することによって、本発明のポリペプチドの濃度の減少が検出された場合、例えば、日和見感染症、敗血症、薬物中毒、結核、ガン、肝臓機能障害、免疫機能障害、内分泌障害等の疾病、または将来罹患する可能性が高いと診断することができる。また、本発明の抗体は、体液や組織等の被検体中に存在する本発明のポリペプチドを検出するために使用することができる。また、本発明のポリペプチドを精製するために使用する抗体カラムの作製、精製時の各分画中の本発明のポリペプチドの検出、被検細胞内における本発明のポリペプチドの挙動の分析等のために使用することができる。

【0061】(5) 遺伝子診断剤

本発明のDNAは、例えば、プローブとして使用することにより、ヒトまたは温血動物(例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、トリ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サル等)における本発明のポリペプチドをコードするDNAまたはmRNAの異常(遺伝子異常)を検出することができるので、例えば、該DNAまたはmRNAの損傷、突然変異あるいは発現低下や、該DNAまたはmRNAの増加あるいは発現過多等の遺伝子診断剤として有用である。本発明のDNAを用いる上記の遺伝子診断は、例えば、自体公知のノーザンハイブリダイゼーションやPCR-SSCP法(ゲノミクス(Genomics)、第5巻、874~879頁(1989年)、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ユエスエー(Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America)、第86巻、2766~2770頁(1989年))等により実施することができる。例えば、ノーザンハイブリダイゼーションにより発現低下が検出された場合やPCR-SSCP法によりDNAの突然変異が検出された場合は、例えば、日和見感染症、敗血症、薬物中毒、結核、ガン、肝臓機能障害、免疫機能障害、内分泌障害等の疾病である可能性が高いと診断することができる。

【0062】(6) アンチセンスDNAを含有する医薬本発明のDNAに相補的に結合し、該DNAの発現を抑制することができるアンチセンスDNAは、生体内における本発明のポリペプチドまたは本発明のDNAの機能を抑制することができるので、例えば、本発明のポリペ

プチドの発現過多に起因する疾患の治療・予防剤として使用することができる。上記アンチセンスDNAを上記の治療・予防剤として、前記した本発明のDNAを含有する各種疾病の治療・予防剤と同様に使用することができる。例えば、該アンチセンスDNAを単独あるいはレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルスアソシエーテッドウイルスベクター等の適当なベクターに挿入した後、常套手段に従って投与することができる。該アンチセンスDNAは、そのまま、あるいは摂取促進のために補助剤等の生理学的に認められる担体とともに製剤化し、遺伝子銃やヒドロゲルカテーテルのようなカテーテルによって投与できる。さらに、該アンチセンスDNAは、組織や細胞における本発明のDNAの存在やその発現状況を調べるための診断用オリゴヌクレオチドプローブとして使用することもできる。

【0063】(7) 本発明の抗体を含有する医薬本発明のポリペプチドの活性を中和する作用を有する本発明の抗体は、例えば、本発明のポリペプチドの発現過多に起因する疾患(例えば、肝臓機能障害、肝癌など)の治療・予防剤等の医薬として使用することができる。本発明の抗体を含有する上記疾患の治療・予防剤は、そのまま液剤として、または適当な剤型の医薬組成物として、ヒトまたは哺乳動物(例、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サル等)に対して経口的または非経口的に投与することができる。投与量は、投与対象、対象疾患、症状、投与ルート等によっても異なるが、例えば、本発明の抗体を1回量として、通常0.01~20mg/kg体重程度、好ましくは0.1~10mg/kg体重程度、さらに好ましくは0.1~5mg/kg体重程度を、1日1~5回程度、好ましくは1日1~3回程度、静脈注射により投与するのが好都合である。他の非経口投与および経口投与の場合もこれに準ずる量を投与することができる。症状が特に重い場合には、その症状に応じて増量してもよい。本発明の抗体は、それ自体または適当な医薬組成物として投与することができる。上記投与に用いられる医薬組成物は、上記またはその塩と薬理的に許容され得る担体、希釈剤もしくは賦形剤とを含むものである。かかる組成物は、経口または非経口投与に適する剤形として提供される。すなわち、例えば、経口投与のための組成物としては、固体または液体の剤形、具体的には錠剤(糖衣錠、フィルムコーティング錠を含む)、丸剤、顆粒剤、散剤、カプセル剤(ソフトカプセル剤を含む)、シロップ剤、乳剤、懸濁剤等があげられる。かかる組成物は自体公知の方法によって製造され、製剤分野において通常用いられる担体、希釈剤もしくは賦形剤を含有するものである。例えば、錠剤用の担体、賦形剤としては、乳糖、でんぷん、蔗糖、ステアリン酸マグネシウム等が用いられる。

【0064】非経口投与のための組成物としては、例え

ば、注射剤、坐剤等が用いられ、注射剤は静脈注射剤、皮下注射剤、皮内注射剤、筋肉注射剤、点滴注射剤等の剤形を包含する。かかる注射剤は、自体公知の方法に従って、例えば、上記抗体またはその塩を通常注射剤に用いられる無菌の水性もしくは油性液に溶解、懸濁または乳化することによって調製する。注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液等が用いられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール（例、エタノール）、ポリアルコール（例、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン界面活性剤〔例、ポリソルベート80、HCO-50 (polyoxyethylene (50 mol) adduct of hydrogenated castor oil)〕等と併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油等が用いられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコール等を併用してもよい。調製された注射液は、通常、適当なアンブルに充填される。直腸投与に用いられる坐剤は、上記抗体またはその塩を通常の坐薬用基剤に混合することによって調製される。上記の経口用または非経口用医薬組成物は、活性成分の投与量に適合するような投薬単位の剤形に調製されることが好都合である。かかる投薬単位の剤形としては、錠剤、丸剤、カプセル剤、注射剤（アンブル）、坐剤等が例示され、それぞれの投薬単位剤形当たり通常5～500mg程度、とりわけ注射剤では5～100mg程度、その他の剤形では10～250mg程度の上記抗体が含有されていることが好ましい。なお前記した各組成物は、上記抗体との配合により好ましくない相互作用を生じない限り他の活性成分を含有してもよい。

【0065】(8) DNA転移動物

本発明は、外来性の本発明のポリペプチドをコードするDNA（以下、本発明の外来性DNAと略記する）またはその変異DNA（本発明の外来性変異DNAと略記する場合がある）を有する非ヒト哺乳動物を提供する。すなわち、本発明は、(1)本発明の外来性DNAまたはその変異DNAを有する非ヒト哺乳動物、(2)非ヒト哺乳動物がゲッ歯動物である第(1)記載の動物、(3)ゲッ歯動物がマウスまたはラットである第(2)記載の動物、および(4)本発明の外来性DNAまたはその変異DNAを含有し、哺乳動物において発現しうる組換えベクターを提供するものである。本発明の外来性DNAまたはその変異DNAを有する非ヒト哺乳動物（以下、本発明のDNA転移動物と略記する）は、未受精卵、受精卵、精子およびその始原細胞を含む胚芽細胞等に対して、好ましくは、非ヒト哺乳動物の発生における胚発生の段階（さらに好ましくは、単細胞または受精卵細胞の段階でかつ一般に8細胞期以前）に、リン酸カルシウム法、電気パルス法、リポフェクション法、凝集法、マイクロインジェクション法、パーティクルガン法、DEAE-デキストラン法等により目的とするDNAを転移す

ることによって作出することができる。また、該DNA転移方法により、体細胞、生体の臓器、組織細胞等に目的とする本発明の外来性DNAを転移し、細胞培養、組織培養等に利用することもでき、さらに、これら細胞を上述の胚芽細胞と自体公知の細胞融合法により融合させることにより本発明のDNA転移動物を作成することもできる。

【0066】非ヒト哺乳動物としては、例えば、ウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、マウス、ラット等が用いられる。なかでも、病体動物モデル系の作成の面から個体発生および生物サイクルが比較的短く、また、繁殖が容易なゲッ歯動物、とりわけマウス（例えば、純系として、C57BL/6系統、DBA2系統等、交雑系として、B6C3F₁系統、BDF₁系統、B6D2F₁系統、BALB/c系統、ICR系統等）またはラット（例えば、Wistar, SD等）等が好ましい。哺乳動物において発現しうる組換えベクターにおける「哺乳動物」としては、上記の非ヒト哺乳動物の他にヒト等が挙げられる。本発明の外来性DNAとは、非ヒト哺乳動物が本来有している本発明のDNAではなく、いったん哺乳動物から単離・抽出された本発明のDNAをいう。本発明の変異DNAとしては、元の本発明のDNAの塩基配列に変異（例えば、突然変異等）が生じたもの、具体的には、塩基の付加、欠損、他の塩基への置換等が生じたDNA等が用いられ、また、異常DNAも含まれる。該異常DNAとしては、異常な本発明のポリペプチドを発現させるDNAを意味し、例えば、正常な本発明のポリペプチドの機能を抑制するポリペプチドを発現させるDNA等が用いられる。本発明の外来性DNAは、対象とする動物と同種あるいは異種のどちらの哺乳動物由来のものであってもよい。本発明のDNAを対象動物に転移させるにあたっては、該DNAを動物細胞で発現せしめるプロモーターの下流に結合したDNAコンストラクトとして用いるのが一般に有利である。例えば、本発明のヒトDNAを転移させる場合、これと相同性が高い本発明のDNAを有する各種哺乳動物（例えば、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウス等）由来のDNAを発現せしめる各種プロモーターの下流に、本発明のヒトDNAを結合したDNAコンストラクト（例、ベクター等）を対象哺乳動物の受精卵、例えば、マウス受精卵へマイクロインジェクションすることによって本発明のDNAを高発現するDNA転移哺乳動物を作成することができる。

【0067】本発明のポリペプチドの発現ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド、枯草菌由来のプラスミド、酵母由来のプラスミド、ファージ等のバクテリオファージ、モロニー白血病ウィルス等のレトロウィルス、ワクシニアウィルスまたはバキュロウィルス等の動物ウィルス等が用いられる。なかでも、大腸菌由来のプ

ラスミド、枯草菌由来のプラスミドまたは酵母由来のプラスミド等が好ましく用いられる。上記のDNA発現調節を行なうプロモーターとしては、例えば、ウイルス（例、シミアンウイルス、サイトメガロウイルス、モロニー白血ウイルス、JCウイルス、乳癌ウイルス、ポリオウイルス等）に由来するDNAのプロモーター、各種哺乳動物（ヒト、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウス等）由来のプロモーター、例えば、アルブミン、インスリンII、ウロプラキニンII、エラスターゼ、エリスロポエチン、エンドセリン、筋クレアチンキナーゼ、グリア線維性酸性タンパク質、グルタチオンS-トランスフェラーゼ、血小板由来成長因子、ケラチンK1, K10およびK14、コラーゲンI型およびII型、サイクリックAMP依存タンパク質キナーゼIサブユニット、ジストロフィン、酒石酸抵抗性アルカリフォスファターゼ、心房ナトリウム利尿性因子、内皮レセプターチロシンキナーゼ（一般にTie2と略される）、ナトリウムカリウムアデノシン3リン酸化酵素（Na, K-ATPase）、ニューロフィラメント軽鎖、メタロチオネインIおよびIIA、メタロプロティナーゼ1組織インヒビター、MHCクラスI抗原（H-2L）、H-ras、レニン、ドーパミン-水酸化酵素、甲状腺ペルオキシダーゼ（TPO）、ポリペプチド鎖延長因子1（EF-1）、アクチン、およびミオシン重鎖、ミオシン軽鎖1および2、ミエリン基礎タンパク質、チログロブリン、Thy-1、免疫グロブリン、H鎖可変部（VNP）、血清アミロイドPコンポーネント、ミオグロビン、トロポニンC、平滑筋アクチン、プレプロエンケファリンA、バソプレシン等のプロモーター等が用いられる。なかでも、全身で高発現することが可能なサイトメガロウイルスプロモーター、ヒトポリペプチド鎖延長因子1（EF-1）のプロモーター、ヒトおよびニワトリアクチンプロモーター等が好適である。

【0068】上記ベクターは、DNA転移哺乳動物において目的とするメッセンジャーRNAの転写を終結する配列（一般にターミネーターと呼ばれる）を有していることが好ましく、例えば、ウイルス由来および各種哺乳動物由来の各DNAの配列を用いることができ、好ましくは、シミアンウイルスのSV40ターミネーター等が用いられる。その他、目的とする外来性DNAをさらに高発現させる目的で各DNAのスプライシングシグナル、エンハンサー領域、真核DNAのイントロンの一部等をプロモーター領域の5'上流、プロモーター領域と翻訳領域間あるいは翻訳領域の3'下流に連結することも目的により可能である。該翻訳領域は転移動物において発現しうるDNAコンストラクトとして、前記のプロモーターの下流および所望により転写終結部位の上流に連結させる通常のDNA工学的手法により作製することができる。受精卵細胞段階における本発明の外来性DNA

の転移は、対象哺乳動物の胚芽細胞および体細胞のすべてに存在するように確保される。DNA転移後の作出動物の胚芽細胞において、本発明の外来性DNAが存在することは、作出動物の後代がすべて、その胚芽細胞および体細胞のすべてに本発明の外来性DNAを保持することを意味する。本発明の外来性DNAを受け継いだこの種の動物の子孫はその胚芽細胞および体細胞のすべてに本発明の外来性DNAを有する。

【0069】本発明の外来性正常DNAを転移させた非ヒト哺乳動物は、交配により外来性DNAを安定に保持することを確認して、該DNA保有動物として通常の飼育環境で継代飼育することが出来る。受精卵細胞段階における本発明の外来性DNAの転移は、対象哺乳動物の胚芽細胞および体細胞の全てに過剰に存在するように確保される。DNA転移後の作出動物の胚芽細胞において本発明の外来性DNAが過剰に存在することは、作出動物の子孫が全てその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の外来性DNAを過剰に有することを意味する。本発明の外来性DNAを受け継いだこの種の動物の子孫はその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の外来性DNAを過剰に有する。導入DNAを相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得し、この雌雄の動物を交配することによりすべての子孫が該DNAを過剰に有するように繁殖継代することができる。本発明の正常DNAを有する非ヒト哺乳動物は、本発明の正常DNAが高発現させられており、内在性の正常DNAの機能を促進することにより最終的に本発明のポリペプチドの機能亢進症を発症することがあり、その病態モデル動物として利用することができる。例えば、本発明の正常DNA転移動物を用いて、本発明のポリペプチドの機能亢進症や、本発明のポリペプチドが関連する疾患の病態機序の解明およびこれらの疾患の治療方法の検討を行なうことが可能である。また、本発明の外来性正常DNAを転移させた哺乳動物は、遊離した本発明のポリペプチドの増加症状を有することから、本発明のポリペプチドに関連する疾患に対する治療薬のスクリーニング試験にも利用可能である。

【0070】一方、本発明の外来性異常DNAを有する非ヒト哺乳動物は、交配により外来性DNAを安定に保持することを確認して該DNA保有動物として通常の飼育環境で継代飼育することが出来る。さらに、目的とする外来DNAを前述のプラスミドに組み込んで原料として用いることができる。プロモーターとのDNAコンストラクトは、通常のDNA工学的手法によって作製することができる。受精卵細胞段階における本発明の異常DNAの転移は、対象哺乳動物の胚芽細胞および体細胞の全てに存在するように確保される。DNA転移後の作出動物の胚芽細胞において本発明の異常DNAが存在することは、作出動物の子孫が全てその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の異常DNAを有することを意味す

る。本発明の外来性DNAを受け継いだこの種の動物の子孫は、その胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の異常DNAを有する。導入DNAを相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得し、この雌雄の動物を交配することによりすべての子孫が該DNAを有するように繁殖継代することができる。本発明の異常DNAを有する非ヒト哺乳動物は、本発明の異常DNAが高発現させられており、内在性の正常DNAの機能を阻害することにより最終的に本発明のポリペプチドの機能不活性型不応症となることがあり、その病態モデル動物として利用することができる。例えば、本発明の異常DNA転移動物を用いて、本発明のポリペプチドの機能不活性型不応症の病態機序の解明およびこの疾患を治療方法の検討を行なうことが可能である。また、具体的な利用可能性としては、本発明の異常DNA高発現動物は、本発明のポリペプチドの機能不活性型不応症における本発明の異常ポリペプチドによる正常ポリペプチドの機能阻害（dominant negative作用）を解明するモデルとなる。また、本発明の外来異常DNAを転移させた哺乳動物は、遊離した本発明のポリペプチドの増加症状を有することから、本発明のポリペプチドの機能不活性型不応症に対する治療薬スクリーニング試験にも利用可能である。

【0071】また、上記2種類の本発明のDNA転移動物のその他の利用可能性として、例えば、

組織培養のための細胞源としての使用、

本発明のDNA転移動物の組織中のDNAもしくはRNAを直接分析するか、またはDNAにより発現されたポリペプチド組織を分析することによる、本発明のポリペプチドにより特異的に発現あるいは活性化するポリペプチドとの関連性についての解析、

DNAを有する組織の細胞を標準組織培養技術により培養し、これらを使用して、一般に培養困難な組織からの細胞の機能の研究、

上記記載の細胞を用いることによる細胞の機能を高めるような薬剤のスクリーニング、および

本発明の変異ポリペプチドを単離精製およびその抗体作製等が考えられる。

さらに、本発明のDNA転移動物を用いて、本発明のポリペプチドの機能不活性型不応症等を含む、本発明のポリペプチドに関連する疾患の臨床症状を調べることができ、また、本発明のポリペプチドに関連する疾患モデルの各臓器におけるより詳細な病理学的所見が得られ、新しい治療方法の開発、さらには、該疾患による二次的疾患の研究および治療に貢献することができる。また、本発明のDNA転移動物から各臓器を取り出し、細切後、トリプシン等のポリペプチド（タンパク質）分解酵素により、遊離したDNA転移細胞の取得、その培養またはその培養細胞の系統化を行なうことが可能である。さらに、本発明のポリペプチド産生細胞の特定化、アポトーシス、分化あるいは増殖との関連性、またはそれらにお

けるシグナル伝達機構を調べ、それらの異常を調べることができ、本発明のポリペプチドおよびその作用解明のための有効な研究材料となる。さらに、本発明のDNA転移動物を用いて、本発明のポリペプチドの機能不活性型不応症を含む、本発明のポリペプチドに関連する疾患の治療薬の開発を行なうために、上述の検査法および定量法を用いて、有効で迅速な該疾患治療薬のスクリーニング法を提供することが可能となる。また、本発明のDNA転移動物または本発明の外来性DNA発現ベクターを用いて、本発明のポリペプチドが関連する疾患のDNA治療法を検討、開発することが可能である。

【0072】(9)ノックアウト動物

本発明は、本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞および本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物を提供する。すなわち、本発明は、(1)本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞、

(2)該DNAがレポーター遺伝子（例、大腸菌由来の - ガラクトシダーゼ遺伝子）を導入することにより不活性化された第(1)項記載の胚幹細胞、(3)ネオマイシン耐性である第(1)項記載の胚幹細胞、(4)非ヒト哺乳動物がゲッ歯動物である第(1)項記載の胚幹細胞、(5)ゲッ歯動物がマウスである第(4)項記載の胚幹細胞、(6)本発明のDNAが不活性化された該DNA発現不全非ヒト哺乳動物、(7)該DNAがレポーター遺伝子（例、大腸菌由来の - ガラクトシダーゼ遺伝子）を導入することにより不活性化され、該レポーター遺伝子が本発明のDNAに対するプロモーターの制御下で発現しうる第(6)項記載の非ヒト哺乳動物、(8)非ヒト哺乳動物がゲッ歯動物である第(6)項記載の非ヒト哺乳動物、(9)ゲッ歯動物がマウスである第(8)項記載の非ヒト哺乳動物、および(10)第(7)項記載の動物に、試験化合物を投与し、レポーター遺伝子の発現を検出することを特徴とする本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

【0073】本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞とは、該非ヒト哺乳動物が有する本発明のDNAに人為的に変異を加えることにより、DNAの発現能を抑制するか、もしくは該DNAがコードしている本発明のポリペプチドの活性を実質的に喪失させることにより、DNAが実質的に本発明のポリペプチドの発現能を有さない（以下、本発明のノックアウトDNAと称することがある）非ヒト哺乳動物の胚幹細胞（以下、ES細胞と略記する）をいう。非ヒト哺乳動物としては、前記と同様のものが用いられる。本発明のDNAに人為的に変異を加える方法としては、例えば、遺伝子工学的手法により該DNA配列の一部または全部の削除、他DNAを挿入または置換させることによって行なうことができる。これらの変異により、例えば、コドンの読み取り枠をずらしたり、プロモーターあるいはエキソン

の機能を破壊することにより本発明のノックアウトDNAを作製すればよい。本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞（以下、本発明のDNA不活性化ES細胞または本発明のノックアウトES細胞と略記する）の具体例としては、例えば、目的とする非ヒト哺乳動物が有する本発明のDNAを単離し、そのエキソン部分にネオマイシン耐性遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子を代表とする薬剤耐性遺伝子、あるいはlacZ（-ガラクトシダーゼ遺伝子）、cat（クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子）を代表とするレポーター遺伝子等を挿入することによりエキソンの機能を破壊するか、あるいはエキソン間のイントロン部分に遺伝子の転写を終結させるDNA配列（例えば、polyA付加シグナル等）を挿入し、完全なメッセージRNAを合成できなくすることによって、結果的に遺伝子を破壊するように構築したDNA配列を有するDNA鎖（以下、ターゲティングベクターと略記する）を、例えば相同組換え法により該動物の染色体に導入し、得られたES細胞について本発明のDNA上あるいはその近傍のDNA配列をプローブとしたサザンハイブリダイゼーション解析あるいはターゲティングベクター上のDNA配列とターゲティングベクター作製に使用した本発明のDNA以外の近傍領域のDNA配列をプライマーとしたPCR法により解析し、本発明のノックアウトES細胞を選別することにより得ることができる。

【0074】また、相同組換え法等により本発明のDNAを不活化させる元のES細胞としては、例えば、前述のような既に樹立されたものを用いてもよく、また公知EvansとKaufmaの方法に準じて新しく樹立したものでもよい。例えば、マウスのES細胞の場合、現在、一般的には129系のES細胞が使用されているが、免疫学的背景がはっきりしていないので、これに代わる純系で免疫学的に遺伝的背景が明らかなES細胞を取得する等の目的で例えば、C57BL/6マウスやC57BL/6の採卵数の少なさをDBA/2との交雑により改善したBDF₁マウス（C57BL/6とDBA/2とのF₁）を用いて樹立したのも等も良好に用いる。BDF₁マウスは、採卵数が多く、かつ、卵が丈夫であるという利点に加えて、C57BL/6マウスを背景に持つので、これを用いて得られたES細胞は病態モデルマウスを作出したとき、C57BL/6マウスと戻し交配（バッククロス）することでその遺伝的背景をC57BL/6マウスに代えることが可能である点で有利に用い得る。また、ES細胞を樹立する場合、一般には受精後3.5日目の胚盤胞を使用するが、これ以外に8細胞期胚を採卵し胚盤胞まで培養して用いることにより効率よく多数の初期胚を取得することができる。また、雌雄いずれのES細胞を用いてもよいが、通常雄のES細胞の方が生殖系列キメラを作出するのに都合が良い。また、煩雑な培

養の手間を削減するためにもできるだけ早く雌雄の判別を行なうことが望ましい。ES細胞の雌雄の判定方法としては、例えば、PCR法によりY染色体上の性決定領域の遺伝子を増幅、検出する方法が、その1例として挙げることができる。この方法を使用すれば、従来、核型分析をするのに約10⁶個の細胞数を要していたのに対して、1コロニー程度のES細胞数（約50個）で済むので、培養初期におけるES細胞の第一次セクションを雌雄の判別で行なうことが可能であり、早期に雄細胞の選定を可能にしたことにより培養初期の手間は大幅に削減できる。

【0075】また、第二次セクションとしては、例えば、G-バンディング法による染色体数の確認等により行うことができる。得られるES細胞の染色体数は正常数の100%が望ましいが、樹立の際の物理的操作等の関係上困難な場合は、ES細胞の遺伝子をノックアウトした後、正常細胞（例えば、マウスでは染色体数が2n=40である細胞）に再びクローニングすることが望ましい。このようにして得られた胚幹細胞株は、通常その増殖性は大変良いが、個体発生できる能力を失いやすいので、注意深く継代培養することが必要である。例えば、STO繊維芽細胞のような適当なフィーダー細胞上でLIF（1-10000U/ml）存在下に炭酸ガス培養器内（好ましくは、約5%炭酸ガス、約95%空気または約5%酸素、約5%炭酸ガス、約90%空気）で約37℃で培養する等の方法で培養し、継代時には、例えば、トリプシン/EDTA溶液（通常約0.001-0.5%トリプシン/約0.1-5mMEDTA、好ましくは約0.1%トリプシン/約1mMEDTA）処理により単細胞化し、新たに用意したフィーダー細胞上に播種する方法等がとられる。このような継代は、通常1-3日毎に行なうが、この際に細胞の観察を行い、形態的に異常な細胞が見受けられた場合はその培養細胞は放棄することが望まれる。ES細胞は、適当な条件により、高密度に至るまで単層培養するか、または細胞集塊を形成するまで浮遊培養することにより、頭頂筋、内臓筋、心筋等の種々のタイプの細胞に分化させることが可能であり〔M. J. EvansおよびM. H. Kaufman, ネイチャー（Nature）第292巻、154頁、1981年；G. R. Martin プロシーディングス・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・ユーエスエー（Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.）第78巻、7634頁、1981年；T. C. Doetschmanら、ジャーナル・オブ・エンブリオロジー・アンド・エクスペリメンタル・モルフォロジー、第87巻、27頁、1985年〕、本発明のES細胞を分化させて得られる本発明のDNA発現不全細胞は、インビトロにおける本発明のポリペプチドの細胞生物学的検討において有用である。本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、該動物のmRNA量を公知方法を用いて測定して間接的にその発現量を比較することにより、正常動物と区別することが可

能である。該非ヒト哺乳動物としては、前記と同様のものが用いられる。

【0076】本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、例えば、前述のようにして作製したターゲッティングベクターをマウス胚幹細胞またはマウス卵細胞に導入し、導入によりターゲッティングベクターの本発明のDNAが不活性化されたDNA配列が遺伝子相同組換えにより、マウス胚幹細胞またはマウス卵細胞の染色体上の本発明のDNAと入れ換わる相同組換えをさせることにより、本発明のDNAをノックアウトさせることができる。本発明のDNAがノックアウトされた細胞は、本発明のDNA上またはその近傍のDNA配列をプローブとしたサザンハイブリダイゼーション解析またはターゲッティングベクター上のDNA配列と、ターゲッティングベクターに使用したマウス由来の本発明のDNA以外の近傍領域のDNA配列とをプライマーとしたPCR法による解析で判定することができる。非ヒト哺乳動物胚幹細胞を用いた場合は、遺伝子相同組換えにより、本発明のDNAが不活性化された細胞株をクローニングし、その細胞を適当な時期、例えば、8細胞期の非ヒト哺乳動物胚または胚盤胞に注入し、作製したキメラ胚を偽妊娠させた該非ヒト哺乳動物の子宮に移植する。作出された動物は正常な本発明のDNA座をもつ細胞と人為的に変異した本発明のDNA座をもつ細胞との両者から構成されるキメラ動物である。該キメラ動物の生殖細胞の一部が変異した本発明のDNA座をもつ場合、このようなキメラ個体と正常個体を交配することにより得られた個体群より、全ての組織が人為的に変異を加えた本発明のDNA座をもつ細胞で構成された個体を、例えば、コートカラーの判定等により選別することにより得られる。このようにして得られた個体は、通常、本発明のポリペプチドのヘテロ発現不全個体であり、本発明のポリペプチドのヘテロ発現不全個体同志を交配し、それらの産仔から本発明のポリペプチドのホモ発現不全個体を得ることができる。卵細胞を使用する場合は、例えば、卵細胞核内にマイクロインジェクション法でDNA溶液を注入することによりターゲッティングベクターを染色体内に導入したトランスジェニック非ヒト哺乳動物を得ることができ、これらのトランスジェニック非ヒト哺乳動物に比べて、遺伝子相同組換えにより本発明のDNA座に変異のあるものを選択することにより得られる。

【0077】このようにして本発明のDNAがノックアウトされている個体は、交配により得られた動物個体も該DNAがノックアウトされていることを確認して通常の飼育環境で飼育継代を行なうことができる。さらに、生殖系列の取得および保持についても常法に従えばよい。すなわち、該不活化DNAの保有する雌雄の動物を交配することにより、該不活化DNAを相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得しうる。得られたホモザイゴート動物は、母親動物に対して、正常個体1、

ホモザイゴート複数になるような状態で飼育することにより効率的に得ることができる。ヘテロザイゴート動物の雌雄を交配することにより、該不活化DNAを有するホモザイゴートおよびヘテロザイゴート動物を繁殖継代する。本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞は、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物を作出する上で、非常に有用である。また、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、本発明のポリペプチドにより誘導され得る種々の生物活性を欠失するため、本発明のポリペプチドの生物活性の不活性化を原因とする疾病のモデルとなり得るので、これらの疾病の原因究明および治療法の検討に有用である。

【0078】(9a)本発明のDNAの欠損や損傷等に起因する疾病に対して治療・予防効果を有する化合物のスクリーニング方法

本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、本発明のDNAの欠損や損傷等に起因する疾病(日和見感染症、敗血症、薬物中毒、結核、ガン、肝臓機能障害、免疫機能障害、内分泌障害等)に対して治療・予防効果を有する化合物のスクリーニングに用いることができる。すなわち、本発明は、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物に試験化合物を投与し、該動物の変化を観察・測定することを特徴とする、本発明のDNAの欠損や損傷等に起因する疾病に対して治療・予防効果を有する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。該スクリーニング方法において用いられる本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物としては、前記と同様のものが挙げられる。試験化合物としては、例えば、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液、血漿等が挙げられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。具体的には、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物を、試験化合物で処理し、無処理の対照動物と比較し、該動物の各器官、組織、疾病の症状等の変化を指標として試験化合物の治療・予防効果を試験することができる。試験動物を試験化合物で処理する方法としては、例えば、経口投与、静脈注射等が用いられ、試験動物の症状、試験化合物の性質等にあわせて適宜選択することができる。また、試験化合物の投与量は、投与方法、試験化合物の性質等にあわせて適宜選択することができる。例えば、肝臓機能障害に対して治療・予防効果を有する化合物をスクリーニングする場合、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物に毒物負荷処置を行ない、毒物負荷処置前または処置後に試験化合物を投与し、該動物の解毒作用および体重変化等を経時的に測定する。

【0079】本発明のスクリーニング方法を用いて得られる化合物は、上記した試験化合物から選ばれた化合物であり、本発明のポリペプチドの欠損や損傷等によって引き起こされる疾患(日和見感染症、敗血症、薬物中

毒、結核、ガン、肝臓機能障害、免疫機能障害、内分泌障害等) に対して治療・予防効果を有するので、該疾患に対する安全で低毒性な治療・予防剤等の医薬として使用することができる。さらに、上記スクリーニングで得られた化合物から誘導される化合物も同様に用いることができる。該スクリーニング方法で得られた化合物は塩を形成していてもよく、該化合物の塩としては、生理学的に許容される酸(例、無機酸、有機酸)や塩基(例アルカリ金属)等との塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。この様な塩としては、例えば、無機酸(例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸)との塩、あるいは有機酸(例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸)との塩等が用いられる。該スクリーニング方法で得られた化合物またはその塩を含有する医薬は、前記した本発明のポリペプチドを含有する医薬と同様にして製造することができる。このようにして得られる製剤は、安全で低毒性であるので、例えば、ヒトまたは哺乳動物(例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サル等)に対して投与することができる。該化合物またはその塩の投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルート等により差異はあるが、例えば、炎症性疾患の治療目的で該化合物を経口投与する場合、一般的に成人(体重60kgとして)においては、一日につき該化合物を約0.1~100mg、好ましくは約1.0~50mg、より好ましくは約1.0~20mg投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物の1回投与量は投与対象、対象疾患等によっても異なるが、例えば、日和見感染症、敗血症、薬物中毒、結核、ガン、肝臓機能障害、免疫機能障害、内分泌障害等の治療目的で該化合物を注射剤の形で通常成人(60kgとして)に投与する場合、一日につき該化合物を約0.01~30mg程度、好ましくは約0.1~20mg程度、より好ましくは約0.1~10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kg当たり換算した量を投与することができる。

【0080】(9b)本発明のDNAに対するプロモーターの活性を促進または阻害する化合物をスクリーニング方法

本発明は、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物に、試験化合物を投与し、レポーター遺伝子の発現を検出することを特徴とする本発明のDNAに対するプロモーターの活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。上記スクリーニング方法において、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物としては、前記した本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物の中でも、本発明のDNAがレポーター遺伝子を導入することにより不活性化され、該レポーター遺伝子が本発

明のDNAに対するプロモーターの制御下で発現しうるものが用いられる。試験化合物としては、前記と同様のものが挙げられる。レポーター遺伝子としては、前記と同様のものが用いられ、 β -ガラクトシダーゼ遺伝子(LacZ)、可溶性アルカリフォスファターゼ遺伝子またはルシフェラーゼ遺伝子等が好適である。本発明のDNAをレポーター遺伝子で置換された本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物では、レポーター遺伝子が本発明のDNAに対するプロモーターの支配下に存在するので、レポーター遺伝子がコードする物質の発現をトレースすることにより、プロモーターの活性を検出することができる。

【0081】例えば、本発明のポリペプチドをコードするDNA領域の一部を大腸菌由来の β -ガラクトシダーゼ遺伝子(LacZ)で置換している場合、本来、本発明のポリペプチドの発現する組織で、本発明のポリペプチドの代わりに β -ガラクトシダーゼが発現する。従って、例えば、5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル-D-ガラクトピラノシド(X-gal)のような β -ガラクトシダーゼの基質となる試薬を用いて染色することにより、簡便に本発明のポリペプチドの動物生体内における発現状態を観察することができる。具体的には、本発明のポリペプチド欠損マウスまたはその組織切片をグルタルアルデヒド等で固定し、リン酸緩衝生理食塩液(PBS)で洗浄後、X-galを含む染色液で、室温または37℃付近で、約30分ないし1時間反応させた後、組織標本を1mMEDTA/PBS溶液で洗浄することによって、 β -ガラクトシダーゼ反応を停止させ、呈色を観察すればよい。また、常法に従い、LacZをコードするmRNAを検出してもよい。

【0082】上記スクリーニング方法を用いて得られる化合物またはその塩は、上記した試験化合物から選ばれた化合物であり、本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進または阻害する化合物である。該スクリーニング方法で得られた化合物は塩を形成していてもよく、該化合物の塩としては、生理学的に許容される酸(例、無機酸)や塩基(例、有機酸)等との塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。この様な塩としては、例えば、無機酸(例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸)との塩、あるいは有機酸(例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸)との塩等が用いられる。本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進する化合物またはその塩は、本発明のポリペプチドの発現を促進し、該ポリペプチドの機能を促進することができるので、例えば、日和見感染症、敗血症、薬物中毒、結核、ガン、肝臓機能障害、免疫機能障害、内分泌障害等の疾病に対する安全で低毒性な治療・予防剤等の医薬として有用である。さらに、上

記スクリーニングで得られた化合物から誘導される化合物も同様に用いることができる。

【0083】該スクリーニング方法で得られた化合物またはその塩を含有する医薬は、前記した本発明のポリペプチドまたはその塩を含有する医薬と同様にして製造することができる。このようにして得られる製剤は、安全で低毒性であるので、例えば、ヒトまたは哺乳動物（例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サル等）に対して投与することができる。該化合物またはその塩の投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルート等により差異はあるが、例えば、日和見感染症、敗血症、薬物中毒、結核、ガン、肝臓機能障害、免疫機能障害、内分泌障害等の治療目的で本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進する化合物を経口投与する場合、一般的に成人（体重60kgとして）においては、一日につき該化合物を約0.1~100mg、好ましくは約1.0~50mg、より好ましくは約1.0~20mg投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物の1回投与量は投与対象、対象疾患等によっても異なるが、例えば、日和見感染症、敗血症、薬物中毒、結核、ガン、肝臓機能障害、免疫機能障害、内分泌障害等の治療目的で本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進する化合物を注射剤の形で通常成人（60kgとして）に投与する場合、一日につき該化合物を約0.01~30mg程度、好ましくは約0.1~20mg程度、より好ましくは約0.1~10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kg当りに換算した量を投与することができる。一方、例えば、本発明のDNAに対するプロモーター活性を阻害する化合物を経口投与する場合、一般的に成人（体重60kgとして）においては、一日につき該化合物を約0.1~100mg、好ましくは約1.0~50mg、より好ましくは約1.0~20mg投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物の1回投与量は投与対象、対象疾患等によっても異なるが、本発明のDNAに対するプロモーター活性を阻害する化合物を注射剤の形で通常成人（60kgとして）に投与する場合、一日につき該化合物を約0.01~30mg程度、好ましくは約0.1~20mg程度、より好ましくは約0.1~10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kg当りに換算した量を投与することができる。

【0084】このように、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、本発明のDNAに対するプロモーターの活性を促進または阻害する化合物またはその塩をスクリーニングする上で極めて有用であり、本発明のDNA発現不全に起因する各種疾患の原因究明または予防・治療薬の開発に大きく貢献することができる。さらに、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子は、マウスやヒトにおいて、特に肝臓で極めて大量に発現していることが

ら、該遺伝子のプロモーター配列は、目的タンパク質（任意の有用遺伝子産物等）を非ヒト温血動物の肝臓で大量に発現させるためのプロモーターとして好都合である。非ヒト温血動物としては、例えば上述の温血動物として例示したものと同様のもの等があげられる。すなわち、本発明は、配列番号：1で表されるアミノ酸配列を含有することを特徴とするポリペプチドをコードする遺伝子のプロモーター領域の下流（3'末端側）に目的タンパク質（任意の有用遺伝子産物等）を連結し、非ヒト動物に導入することによる目的タンパク質（任意の有用遺伝子産物等）を非ヒト温血動物の肝臓優位に発現させる方法を提供する。該目的タンパク質（任意の有用遺伝子産物等）としては、例えば、サイトカイン（例、インターロイキン、インターフェロン、ケモカイン、造血因子）、増殖因子（例、EGF (epidermal growth factor) またはそれと実質的に同一の活性を有する物質（例えば、EGF、ハレグリン (HER2リガンド) 等）、インシュリンまたはそれと実質的に同一の活性を有する物質（例えば、インシュリン、IGF (insulin-like growth factor) - 1、IGF - 2等）、FGF (fibroblast growth factor) またはそれと実質的に同一の活性を有するもの（例えば、aFGF、bFGF、KGF (Keratinocyte Growth Factor)、HGF (Hepatocyte Growth Factor)、FGF-10等）、その他の細胞増殖因子（例えば、CSF (colony stimulating factor)、EPO (erythropoietin)、IL-2 (interleukin - 2)、NGF (nerve growth factor)、PDGF (platelet-derived growth factor)、TGF (transforming growth factor) 等）、ホルモン（例、黄体形成ホルモン放出ホルモン (LH - RH)、成長ホルモン、成長ホルモン放出ホルモン (GH - RH)、プロラクチン、メラノサイト刺激ホルモン、甲状腺ホルモン放出ホルモン、甲状腺刺激ホルモン、黄体形成ホルモン、黄体ホルモン、卵巣刺激ホルモン、ガストリン、モチリン、ソマトスタチン、セクレチン、グルカゴン、PACAP、VIP等）、消化酵素（例、アミラーゼ、ペプシノーゲン、リパーゼ等）、病原体に対する抗体（例、病原性サルモネラ菌等の病原性細菌に対する抗体、インフルエンザ等の病原性ウイルスに対する抗体、エキノコックス等の寄生虫に対する抗体等）、抗菌ポリペプチド（例、セクロピン、ヒスタチン、インドリシジン、プロテグリン、ディフェンシン、リゾチーム等）等の有用遺伝子産物等があげられる。上記の目的タンパク質のうち、

サイトカインを肝臓特異的に発現させることによって、例えば、非ヒト温血動物の免疫活性の増強、調節等が達成でき、

抗菌ペプチドを肝臓に発現させることによって、例えば、非ヒト温血動物の各種感染症に対する抵抗力の増強が達成できる。

【0085】以下に、配列番号：1で表されるアミノ酸配列を含有することを特徴とするポリペプチドをコード

する遺伝子のプロモータ - 領域の下流 (3' 末端側) に目的タンパク質 (任意の有用遺伝子産物等) をコードする DNA または RNA を連結し、非ヒト動物に導入することによる目的タンパク質 (任意の有用遺伝子産物等) を非ヒト温血動物の肝臓特異的に発現させる方法についてより具体的に記載する。まず、配列番号: 1 で表されるアミノ酸配列を含有することを特徴とするポリペプチドをコードする遺伝子のプロモータ - は、コロニーハイブリダイゼーション、ブランクハイブリダイゼーションや PCR 等の自体公知の方法 (例えば、モレキュラー・クローニング (Molecular Cloning) 2nd (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法等) によって得ることができる。また、プロモーター活性を有する領域の同定は、レポーターアッセイ等の自体公知の方法 (例えば、アナリティカル バイオケミストリー (Analytical Biochemistry), 188 巻, 245 頁 (1990年) に記載の方法等) によって得ることができる。次に上記の方法によって得られるプロモータ - の下流 (3' 末端側) に目的タンパク質 (任意の有用遺伝子産物等) を連結するためには、T4 DNA リガーゼを用いてプラスミドを構築するための自体公知の方法 (例えば、モレキュラー・クローニング (Molecular Cloning) 2nd (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法等) によって目的を達成する事が出来る。プロモータ - の下流 (3' 末端側) に目的タンパク質 (任意の有用遺伝子産物等) をコードする DNA を連結したものを非ヒト温血動物に導入するためには、エレクトロポレーションを用いる方法、遺伝子銃を用いる方法、レトロウイルスベクターを*

Gly	または	G	: グリシン
Ala	または	A	: アラニン
Val	または	V	: バリン
Leu	または	L	: ロイシン
Ile	または	I	: イソロイシン
Ser	または	S	: セリン
Thr	または	T	: スレオニン
Cys	または	C	: システイン
Met	または	M	: メチオニン
Glu	または	E	: グルタミン酸
Asp	または	D	: アスパラギン酸
Lys	または	K	: リジン
Arg	または	R	: アルギニン
His	または	H	: ヒスチジン
Phe	または	F	: フェニルアラニン
Tyr	または	Y	: チロシン
Trp	または	W	: トリプトファン
Pro	または	P	: プロリン
Asn	または	N	: アスパラギン
Gln	または	Q	: グルタミン
pGlu			: ピログルタミン酸

*用いる方法 (例えば、ブラッド セルズ (Blood Cells), 17 巻, 407 頁 (1991年) に記載の方法等)、アデノウイルスベクターを用いる方法 (例えば、パソロジー (Pathology), 30 巻, 335 頁 (1998年) に記載の方法等) 等がある。

【0086】本明細書および図面において、塩基やアミノ酸等を略号で表示する場合、IUPAC - IUB Commission on Biochemical Nomenclature による略号あるいは当該分野における慣用略号に基づくものであり、その例を下記する。またアミノ酸に関し光学異性体があり得る場合は、特に明示しなければ L 体を示すものとする。

DNA	: デオキシリボ核酸
cDNA	: 相補的デオキシリボ核酸
A	: アデニン
T	: チミン
G	: グアニン
C	: シトシン
RNA	: リボ核酸
mRNA	: メッセンジャーリボ核酸
dATP	: デオキシアデノシン三リン酸
dTTP	: デオキシチミジン三リン酸
dGTP	: デオキシグアノシン三リン酸
dCTP	: デオキシシチジン三リン酸
ATP	: アデノシン三リン酸
EDTA	: エチレンジアミン四酢酸
SDS	: ドデシル硫酸ナトリウム

【0087】

X a a 55 : システイン以外の任意のアミノ酸 56

【0088】また、本明細書中で繁用される置換基、保* *護基および試薬を下記の記号で表記する。

Me : メチル基
 Et : エチル基
 Bu : ブチル基
 Ph : フェニル基
 TC : チアゾリジン - 4 (R) - カルボキサミド基
 Tos : p - トルエンスルフォニル
 CHO : ホルミル
 Bzl : ベンジル
 Cl₂ - Bzl : 2 , 6 - ジクロロベンジル
 Bom : ベンジルオキシメチル
 Z : ベンジルオキシカルボニル
 Cl - Z : 2 - クロロベンジルオキシカルボニル
 Br - Z : 2 - ブロモベンジルオキシカルボニル
 Boc : t - ブトキシカルボニル
 DNP : ジニトロフェニル
 Trt : トリチル
 Bum : t - ブトキシメチル
 Fmoc : N - 9 - フルオレニルメトキシカルボニル
 HOBt : 1 - ヒドロキシベンズトリアゾール
 HOObt : 3 , 4 - ジヒドロ - 3 - ヒドロキシ - 4 - オキソ -
 1 , 2 , 3 - ベンゾトリアジン
 HONB : 1-ヒドロキシ-5-ノルボルネン-2,3-ジカルボ

キシミド

【0089】本願明細書の配列表の配列番号は、N以下のシグナル配列番号、カルボニル配列番号、9で表されるアミノ酸配列を有するマウス型前駆体ポリペプチドをコードするDNAの塩基配列を示す。

[配列番号：1] 本発明のヒト型前駆体ポリペプチドのアミノ酸配列を示す。

[配列番号：2] 配列番号：1で表されるアミノ酸配列を有するヒト型前駆体ポリペプチドをコードするDNAの塩基配列を示す。

[配列番号：3] 本発明のヒト型前駆体ポリペプチドのアミノ酸配列を示す。

[配列番号：4] 配列番号：3で表されるアミノ酸配列を有するヒト型前駆体ポリペプチドをコードするDNAの塩基配列を示す。

[配列番号：5] 配列番号：1で表されるアミノ酸配列を有するヒト型前駆体ポリペプチドに含まれるシグナル配列のアミノ酸配列を示す。

[配列番号：6] 配列番号：5で表されるアミノ酸配列を有するシグナル配列をコードするDNAの塩基配列を示す。

[配列番号：7] 本発明のヒト型成熟体ポリペプチドのアミノ酸配列を示す。

[配列番号：8] 配列番号：7で表されるアミノ酸配列を有するヒト型成熟体ポリペプチドをコードするDNAの塩基配列を示す。

[配列番号：9] 本発明のマウス型前駆体ポリペプチドのアミノ酸配列を示す。

[配列番号：9] 配列番号：9で表されるアミノ酸配列を有するマウス型前駆体ポリペプチドをコードするDNAの塩基配列を示す。

[配列番号：11] 本発明のマウス型前駆体ポリペプチドのアミノ酸配列を示す。

[配列番号：12] 配列番号：11で表されるアミノ酸配列を有するマウス型前駆体ポリペプチドをコードするDNAの塩基配列を示す。

[配列番号：13] 本発明のマウス型成熟体ポリペプチドのアミノ酸配列を示す。

[配列番号：14] 配列番号：13で表されるアミノ酸配列を有するマウス型成熟体ポリペプチドをコードするDNAの塩基配列を示す。

[配列番号：15] 本発明のマウス型前駆体ポリペプチドのアミノ酸配列を示す。

[配列番号：16] 配列番号：15で表されるアミノ酸配列を有するマウス型前駆体ポリペプチドをコードするDNAの塩基配列を示す。

[配列番号：17] 本発明のマウス型前駆体ポリペプチドのアミノ酸配列を示す。

[配列番号：18] 配列番号：17で表されるアミノ酸配列を有するマウス型前駆体ポリペプチドをコードするDNAの塩基配列を示す。

[配列番号：19] 本発明のマウス型成熟体ポリペプチドのアミノ酸配列を示す。

[配列番号：20] 配列番号：19で表されるアミノ酸配列を有するマウス型成熟体ポリペプチドをコードするDNAの塩基配列を示す。

[配列番号：21] 本発明のラット型前駆体ポリペプチドのアミノ酸配列を示す。

[配列番号：22] 配列番号：21で表されるアミノ酸配列を有するラット型前駆体ポリペプチドをコードするDNAの塩基配列を示す。

[配列番号：23] 本発明のラット型前駆体ポリペプチドのアミノ酸配列を示す。

[配列番号：24] 配列番号：23で表されるアミノ酸配列を有するラット型前駆体ポリペプチドをコードするDNAの塩基配列を示す。

[配列番号：25] 本発明のラット型成熟体ポリペプチドのアミノ酸配列を示す。

[配列番号：26] 配列番号：25で表されるアミノ酸配列を有するマウス型成熟体ポリペプチドをコードするDNAの塩基配列を示す。

[配列番号：27] 本発明の成熟体ポリペプチドのアミノ酸配列を示す。

[配列番号：28] 実施例2で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

[配列番号：29] 実施例2で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

[配列番号：30] 本発明の成熟体ポリペプチドのアミノ酸配列を示す。

[配列番号：31] 本発明の成熟体ポリペプチドのアミノ酸配列を示す。

[配列番号：32] 実施例5で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

[配列番号：33] 実施例5で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

[配列番号：34] 実施例5で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

【0090】後述の実施例2で得られた形質転換体エシエリヒア コリ (Escherichia coli) XL10-Gold/pDRL84vHは、平成11年8月2日から通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所 (NIBH) に寄託番号FERMBP-6810として、平成11年7月21日から財団法人・発酵研究所 (IFO) に寄託番号IFO16298として寄託されている。

【実施例】以下に、実施例を挙げて本発明を具体的に説明するが、本発明はそれらに限定されるものではない。なお、大腸菌を用いての遺伝子操作は、モレキュラー・クローニング (Molecular cloning) に記載されている方法に従った。

【0091】実施例1 遺伝子情報データベースからのヒト型前駆体ポリペプチドの発見
公開されている遺伝子情報データベースの中から、同一のオープンリーディングフレーム (ORF) の中に、分

泌のためのシグナル配列、及び塩基性アミノ酸対 (Arg-Arg, Lys-Argなど) の両方が存在する配列を検索した結果、ヒト遺伝子配列の中から、19番染色体由来の配列が見出された。本遺伝子配列を含むmRNAが実際に転写されているかどうか、また、予想されるORFが正しいかどうかを確認するため、スミスラインピーチャム (SB) 社から供給されているESTデータベースの中から、同一の配列を持つクローンを検索した。その結果、HGS:416104、HGS:699764などが存在することを見出し、本遺伝子産物が実際に転写されていることが確認された。また、ESTの配列としても塩基配列が明らかになったことから、新規な前駆体ポリペプチドであることが明確となった。

【0092】実施例2 ヒト型前駆体ポリペプチドをコードするcDNAのクローニング

ヒト肝臓由来 poly(A)⁺ RNA を用いて RT-PCR を行うことによりヒト型前駆体ポリペプチドをコードするcDNAのクローニングを行った。ヒト肝臓由来poly(A)⁺RNA (Clontech社)1μgを制限酵素部位に続くpoly(T)を持つanchoredプライマー、SuperscriptII MMLV 逆転写酵素(Gibco-BRL社)を用いて1st. strand cDNA を合成後、ヒトゲノム配列より推定したヒト型前駆体ポリペプチドのORF前後のプライマー、5' CAGTGGGACAGCCAGACAGACGG 3' (配列番号：28)、および5' CAGGCAGGTAGGTTCTACGTCTT 3' (配列番号：29)を用いて RT-PCR を行い、ヒト型前駆体ポリペプチドのORFを含む297 bpのcDNA断片を得た (図1)。このcDNA断片には22または24アミノ酸残基の典型的なシグナル配列を含む84アミノ酸からなるヒト型前駆体ポリペプチドがコードされていた。このDNA断片をpCR2.1-TOP0に導入しpDRL84vHを得た。プラスミドpDRL84vHを大腸菌 (Escherichia coli) XL10-Gold 株に導入して、形質転換体大腸菌 (Escherichia coli) XL10-Gold/pDRL84vHを得た。

【0093】実施例3 発現部位の解析
実施例2に記載の挿入DNA断片 (EcoRI-EcoRI 0.3kb断片) 20ngと[⁻³²P]dCTP (Amersham: 6000Ci/mmol) 5μlを用いてMultiprime DNA labeling system (Amersham: RPN.1601Y)の方法でDNAプローブを作製した。このプローブを用いて、ヒトマルチティッシュノーザンブロット (CLONTECH社: #7759-1、#7760-1) 及び、ヒトRNAマスターブロット (CLONTECH社: #7770-1) に対してハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイズ及び洗浄の条件は、添付のマニュアルに従い、検出は、BAS-2000 (フジフィルム) を用いて行った。その結果、本クローンのmRNAは、肝臓 (成人及び胎児) に特異的に多く発現していることが判明し、臓器特異的に発現していることが明らかとなった。また、mRNAの大きさは、約0.6kbであった。

【0094】実施例4 マウス型ポリペプチド及びラット型ポリペプチド

ヒトペプチド前駆体のアミノ酸配列(配列番号:1)及び塩基配列(配列番号:2)を質問配列(query sequence)にして公開データベースに対してblastを用いてホモロジー検索を行って結果、ヒト型成熟体ポリペプチドに対応するマウス型及びラット型の成熟体ポリペプチドの配列が以下のように明らかとなった。

マウス型成熟体ポリペプチド1(配列番号:13):

Asp Thr Asn Phe Pro Ile Cys Ile Phe Cys Cys Lys Cys Cys Asn Asn Ser Gln Cys Gly Ile Cys Cys Lys Thr

マウス型成熟体ポリペプチド2(配列番号:19):

Asp Ile Asn Phe Pro Ile Cys Arg Phe Cys Cys Gln Cys Cys Asn Lys Pro Ser Cys Gly Ile Cys Cys Glu Glu

ラット型成熟体ポリペプチド(配列番号:25):

Asp Thr Asn Phe Pro Ile Cys Leu Phe Cys Cys Lys Cys Cys Lys Asn Ser Ser Cys Gly Leu Cys Cys Ile Thr

また、上記の成熟体ポリペプチドは動物種を問わず、前駆体の中の塩基性アミノ酸(ArgとLys)が5つ並んでいる切り出し配列の後でプロセッシングを受け、成熟ペプチドが切り出されることが明らかとなった。さらに、成熟体ペプチドの中に8個所あるシステイン残基の位置が、配列番号:27で表されるアミノ酸配列中の位置に保存されて存在していることが明らかとなった。

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Cys Cys Xaa Cys Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Cys Cys Xaa Xaa

(配列番号:27)

【0095】実施例5 ヒト型ポリペプチドの発現ベクターの構築

ヒト型ポリペプチドを動物細胞中で発現させるための発現ベクターは、ヒト型前駆体ポリペプチドをコードする ORF を含む DNA 断片を、動物細胞用発現ベクター pCA

N618に挿入することにより構築した。まず、実施例2に記載の挿入DNA断片(EcoRI-EcoRI 0.3kb断片)を鋳型にして、翻訳開始コドンの直前に制限酵素 EcoRI 認識部位がくるように設計した合成 DNA [5'-TCGGAATTCCGATGGCACTGAGCTCCCAGATCTGG-3':(配列番号:32)]と、ヒト型ポリペプチドのC末端に制限酵素XhoI

認識部位がくるように設計した合成 DNA [5'-ACGCTCGAGCTACGTCTTGCGAGCACATCCACA-3':(配列番号:33)]を用いてPCRを行った。PCR反応にはPremix Taq

(Ex Taq Version)(Takara)を用い、96 30秒の後、94 30秒、68 2分を25回の後、72 7分の伸長反応を行ってヒト型前駆体ポリペプチドのORFを含む約0.29kbのDNA断片を得た。また、ヒト型前駆体ポリペプチドのC末端にFLAG配列(Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Lys)を付加したORFを取得するために、前述の合成 DNA [5'-TCGGAATTCACGATGGCACTGAGCTCCCAGATCTGG-3':(配列番号:32)]とヒト型ポリペプチドのC

末端にFLAG配列と制限酵素XhoI 認識部位がくるように設計した合成DNA [5'-ACGCTCGAGTTACTTGTTCATCGTCGCTTGTAGTCCGTCTTGCGAGCACATCCCACTT-3':(配列番号:50

34)]を用いてPCRを行った。PCR反応にはPremix Taq (Ex Taq Version)(Takara)を用い、96 30秒の後、94 30秒、68 2分を25回の後、72 7分の伸長反応を行い、約0.3kbのDNA断片を得た。これらのDNA断片を制限酵素EcoRI及びXhoIで切断し、pCAN618のEcoRI/SaII部位に挿入してヒト型ポリペプチドの動物細胞での発現ベクター pCAN84vH及びpCAN84vH-FLAG(FLAG付き)を得た。

【0096】実施例6 ヒト型ポリペプチドのCOS7細胞での発現

COS7細胞 1.2×10^5 細胞を6穴プレートを用いて、10%牛胎児血清(FBS)を含むダルベッコ変法最小培地(DMEM)で24時間培養し、この細胞に上記の発現プラスミド(pCAN84vH-FLAG)1 μ gをEffectene(QIAGEN)を用いて導入した。導入24時間後新しい培地に交換し、さらに6時間後FBSを含まないDMEM(GibcoBR)に換えて48時間培養した後、遠心分離で培養上清と細胞をそれぞれ得た。細胞抽出液を得るには、細胞を生理食塩を含むリン酸緩衝液(PBS)で2回洗浄後、SDSサンプル用緩衝液を加えて溶解抽出した。培養上清を濃縮するには、COS7細胞の培養上清に終濃度1Mになるように酢酸を加え、1M酢酸で平衡化させたSep-Pak C18カラム(Waters)に通し、1M酢酸で洗浄後、80%アセトニトリル、0.05%TFAで溶出した。溶出液を減圧下乾燥させ、SDSサンプル用緩衝液で再溶解した。このサンプル及び上記の細胞抽出液を16%SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(Peptide-PAGE;TEFCO)で分離し、セミドライプロット法でPVDF膜(Amersham)に転写した。次にPVDF膜をブロックエース(雪印乳業)で1時間室温で処理し、0.05%Tween 20を含むPBS(PBS-T)中で抗FLAGモノクローナル抗体(10 μ g/ml;Kodak)と1時間反応させた。PBS-Tで2回洗浄後、更にPBS-T中で、西洋ワサビ過酸化酵素標識抗マウスIgGヤギ抗体(Amersham;5000倍希釈)と1時間反応させた。PBS-Tで5回洗浄後、ECLplus発色キット(Amersham)及びECL film(Amersham)を用いて発現産物を検出した結果、培養上清中に遺伝子産物が分泌されていることが確認された。分子量マーカーとの比較から、FLAG配列が付加した成熟体ペプチド(約3.8kDa)が培養上清中に分泌されていることが判明した。

【0097】実施例7 ヒト型ポリペプチドのCHO細胞での発現

チャイニーズハムスター卵巣細胞(Chinese Hamster Ovary Cell, CHO-K1)を10%牛胎児血清(FBS)を含むダルベッコ変法最小培地(DMEM)で培養し、上記の発現プラスミド(pCAN84vH)1 μ gをEffectene(QIAGEN)を用いて導入する。その後、同培養液に200 μ g/mlのG418を含む培地で培養し、生き残ってくる細胞(発現プラスミドが導入された形質転換細胞)を選択する。得られたG418に耐性のCHO細胞を上記培養液または一

61

過性に牛胎児血清 (FBS) を含まないダルベッコ変法最小培地 (DMEM) で培養し、遺伝子産物 (ヒト型ポリペプチド) が生産されている培養上清を取得する。

【0098】

【発明の効果】本発明のポリペプチドおよびそれをコードするDNAは、例えば、日和見感染症、敗血症、薬物中毒、結核、ガン、肝臓機能障害、免疫機能障害、内分泌障害等の診断、治療、予防に使用することができる。また、本発明のポリペプチドは、本発明のポリペプチドの活性を促進もしくは阻害する化合物またはその塩のスクリーニングのための試薬として有用である。さらに、

<110> Takeda Chemical Industries, Ltd.

<120> Novel Protein and its DNA

<150> JP 11-262228

<151> 1999-09-16

<160> 34

<210> 1

<211> 84

<212> PRT

<213> Human

<400> 1

Met Ala Leu Ser Ser Gln Ile Trp Ala Ala
Cys Leu Leu Leu Leu Leu

1 5 10 15

Leu Leu Ala Ser Leu Thr Ser Gly Ser Val
Phe Pro Gln Gln Thr Gly

20 25 30

Gln Leu Ala Glu Leu Gln Pro Gln Asp Arg
Ala Gly Ala Arg Ala Ser

35 40 45

Trp Met Pro Met Phe Gln Arg Arg Arg Arg
Arg Asp Thr His Phe Pro

50 55 60

Ile Cys Ile Phe Cys Cys Gly Cys Cys His
Arg Ser Lys Cys Gly Met

65 70 75 80

Cys Cys Lys Thr

84

<210> 2

<211> 297

<212> DNA

<213> Human

<400> 2

CAGTGGGACA GCCAGACAGA CGGCACGATG GCAC
TGAGCT CCCAGATCTG GGCCGCTTGC 60

CTCCTGCTCC TCCTCCTCCT CGCCAGCCTG ACCA
GTGGCT CTGTTTTCCC ACAACAGACG 120

GGACAACCTTG CAGAGCTGCA ACCCCAGGAC AGAG
CTGGAG CCAGGGCCAG CTGGATGCC 180

ATGTTCCAGA GGCGAAGGAG GCGAGACACC CACT
TCCCA TCTGCATTTT CTGCTGCGGC 240

62

本発明のポリペプチドに対する抗体は、本発明のポリペプチドを特異的に認識することができるので、被検液中の本発明のポリペプチドの検出、定量、中和等に使用することができる。さらに本発明のプロモーターを使用することにより、タンパク質 (任意の有用遺伝子産物等) を非ヒト温血動物の肝臓で優位に (好ましくは特異的に) しかも大量に発現させることが可能になるので、遺伝子治療の分野に貢献することができる。

【0099】

【配列表】

Asp Arg Ala Gly Ala Arg Ala Ser Trp Met
 Pro Met Phe Gln Arg Arg
 20 25 30
 Arg Arg Arg Asp Thr His Phe Pro Ile Cys
 Ile Phe Cys Cys Gly Cys
 35 40 45
 Cys His Arg Ser Lys Cys Gly Met Cys Cys
 Lys Thr
 50 55 60
 <210> 4
 <211> 180
 <212> DNA
 <213> Human
 <400> 4
 TCTGTTTTCC CACAACAGAC GGGACAACCTT GCAG
 AGCTGC AACCCAGGA CAGAGCTGGA 60
 GCCAGGGCCA GCTGGATGCC CATGTTCCAG AGGC
 GAAGGA GCGAGACAC CCACTTCCCC 120
 ATCTGCATTT TCTGCTGCGG CTGCTGTCAT CGAT
 CAAAGT GTGGGATGTG CTGCAAGACG 180
 <210> 5
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Human
 <400> 5
 Met Ala Leu Ser Ser Gln Ile Trp Ala Ala
 Cys Leu Leu Leu Leu Leu
 1 5 10 15
 Leu Leu Ala Ser Leu Thr Ser Gly
 20 24
 <210> 6
 <211> 72
 <212> DNA
 <213> Human
 <400> 6
 ATGGCACTGA GCTCCCAGAT CTGGGCCGCT TGCC
 TCCTGC TCCTCCTCCT CCTCGCCAGC 60
 CTGACCAGTG GC
 72
 <210> 7
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Human
 <400> 7
 Asp Thr His Phe Pro Ile Cys Ile Phe Cys
 Cys Gly Cys Cys His Arg
 5 10 15
 Ser Lys Cys Gly Met Cys Cys Lys Thr
 20 25
 <210> 8
 <211> 75
 <212> DNA
 <213> Human

<400> 9
 Met Met Ala Leu Ser Thr Arg Thr Gln Ala
 Ala Cys Leu Leu Leu Leu
 1 5 10 15
 Leu Leu Ala Ser Leu Ser Ser Thr Thr Tyr
 Leu His Gln Gln Met Arg
 20 25 30
 Gln Thr Thr Glu Leu Gln Pro Leu His Gly
 Glu Glu Ser Arg Ala Asp
 35 40 45
 Ile Ala Ile Pro Met Gln Lys Arg Arg Lys
 Arg Asp Thr Asn Phe Pro
 50 55 60
 Ile Cys Ile Phe Cys Cys Lys Cys Cys Asn
 Asn Ser Gln Cys Gly Ile
 65 70 75 80

Cys Cys Lys Thr
 84

<210> 10

<211> 252

<212> DNA

<213> Mouse

<400> 10

ATGATGGCAC TCAGCACTCG GACCCAGGCT GCCT
 GTCTCC TGCTTCTCCT CCTTGCCAGC 60
 CTGAGCAGCA CCACCTATCT CCATCAACAG ATGA
 GACAGA CTACAGAGCT GCAGCCTTTG 120
 CACGGGGAAG AAAGCAGGGC AGACATTGCG ATAC
 CAATGC AGAAGAGAAG GAAGAGAGAC 180
 ACCAACTTCC CCATCTGCAT CTTCTGCTGT AAAT
 GCTGTA ACAATTCCCA GTGTGGTATC 240
 TGTTGCAAAA CA

252

<210> 11

<211> 60

<212> PRT

<213> Mouse

<400> 11

Thr Tyr Leu His Gln Gln Met Arg Gln Thr
 Thr Glu Leu Gln Pro Leu
 1 5 10 15
 His Gly Glu Glu Ser Arg Ala Asp Ile Ala
 Ile Pro Met Gln Lys Arg
 20 25 30
 Arg Lys Arg Asp Thr Asn Phe Pro Ile Cys
 Ile Phe Cys Cys Lys Cys
 35 40 45
 Cys Asn Asn Ser Gln Cys Gly Ile Cys Cys
 Lys Thr
 50 55 60

<210> 12

<211> 180

5 10 15
 Ser Gln Cys Gly Ile Cys Cys Lys Thr
 20 25
 <210> 14
 <211> 75
 <212> DNA
 <213> Mouse
 <400> 14
 GACACCAACT TCCCATCTG CATCTTCTGC TGTA
 AATGCT GTAACAATC CCAGTGTGGT 60
 ATCTGTTGCA AAACA
 75
 <210> 15
 <211> 84
 <212> PRT
 <213> Mouse
 <400> 15
 Met Met Ala Leu Ser Thr Arg Thr Gln Ala
 Ala Cys Leu Leu Leu Leu
 1 5 10 15
 Leu Leu Ala Ser Leu Ser Ser Thr Thr Tyr
 Leu Gln Gln Gln Met Arg
 20 25 30
 Gln Thr Thr Glu Leu Gln Pro Leu His Gly
 Glu Glu Ser Arg Ala Asp
 35 40 45
 Ile Ala Ile Pro Met Gln Lys Arg Arg Lys
 Arg Asp Ile Asn Phe Pro
 50 55 60
 Ile Cys Arg Phe Cys Cys Gln Cys Cys Asn
 Lys Pro Ser Cys Gly Ile
 65 70 75 80
 Cys Cys Glu Glu
 84
 <210> 16
 <211> 252
 <212> DNA
 <213> Mouse
 <400> 16
 ATGATGGCAC TCAGCACTCG GACCCAGGCT GCCT
 GTCTCC TGCTTCTCCT CTTGCCAGC 60
 CTGAGCAGCA CCACCTATCT CCAGCAACAG ATGA
 GACAGA CTACAGAGCT GCAGCCTTTG 120
 CACGGGAAG AAAGCAGGGC AGACATTGCG ATCC
 CAATGC AGAAGAGAAG GAAGAGAGAC 180
 ATCAACTTCC CCATCTGCAG ATTCTGCTGT CAGT
 GCTGTA ACAAACCCTC CTGTGGTATC 240
 TGTTGTGAAG AA
 252
 <210> 17
 <211> 60
 <212> PRT

TGTTGCATAA CA

252

<210> 23

<211> 60

<212> PRT

<213> Rat

<400> 23

Tyr Leu Arg Gln Gln Thr Arg Gln Thr Thr

Ala Leu Gln Pro Trp His

1

5

10

15

Gly Ala Glu Ser Lys Thr Asp Asp Ser Ala

Leu Leu Met Leu Lys Arg

20

25

30

Arg Lys Arg Asp Thr Asn Phe Pro Ile Cys

Leu Phe Cys Cys Lys Cys

35

40

45

Cys Lys Asn Ser Ser Cys Gly Leu Cys Cys

Ile Thr

50

55

60

<210> 24

<211> 180

<212> DNA

<213> Rat

<400> 24

TATCTCCGGC AACAGACGAG ACAGACTACG GCTC

TGCAGC CTTGGCATGG GGCAGAAAGC 60

AAGACTGATG ACAGTGGCT GCTGATGCTG AAGC

GAAGGA AGCGAGACAC CAACTTCCCC 120

ATATGCCTCT TCTGCTGTAA ATGCTGTAAG AATT

CCTCCT GTGGTCTCTG TTGCATAACA 180

<210> 25

<211> 25

<212> PRT

<213> Rat

<400> 25

Asp Thr Asn Phe Pro Ile Cys Leu Phe Cys

Cys Lys Cys Cys Lys Asn

5

10

15

Ser Ser Cys Gly Leu Cys Cys Ile Thr

20

25

<210> 26

<211> 75

<212> DNA

<213> Rat

<400> 26

GACACCAACT TCCCATATG CCTCTTCTGC TGTA

AATGCT GTAAGAATTC CTCCTGTGGT 60

CTCTGTTGCA TAACA

75

<210> 27

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<223>

<400> 33

ACGCTCGAGC TACGTCTTGC AGCACATCCC ACA

33

<210> 34

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 34

ACGCTCGAGC TACTTGTCAT CGTCGTCCTT GTAG

64

【図面の簡単な説明】CCGTC TTGCAGCACA TCCCACACTT 60

【図1】本発明のヒト型前駆体ポリペプチドの塩基配列及びアミノ酸配列を示す。

【図2】ヒト型成熟体ポリペプチド、マウス型成熟体ポ

リペプチド(2種)、ラット型成熟体ポリペプチドのアミノ酸配列を示す。

【図3】実施例5で用いたプラスミドpCAN618の制限酵素地図を示す。

【図1】

```

      10      20      30      40      50
5' CAGTGGGACAGCCAGACAGAGCGCACG ATG GCA CTG AGC TCC CAG ATC TGG GCC
      Met Ala Leu Ser Ser Gln Ile Trp Ala
      1
      60      70      80      90      100
GCT TGC CTC CTG CTC CTC CTC CTC GCC AGC CTG ACC AGT GGC TCT GTT TTC
Ala Cys Leu Leu Leu Leu Leu Leu Ala Ser Leu Thr Ser Gly Ser Val Phe
      10      20
110      120      130      140      150      160
CCA CAA CAG ACG GGA CAA CTT GCA GAG CTG CAA CCC CAG GAC AGA GCT GGA GCC
Pro Gln Gln Thr Gly Gln Leu Ala Glu Leu Gln Pro Gln Asp Arg Ala Gly Ala
      30      40
      170      180      190      200      210
AGG GCC AGC TGG ATG CCC ATG TTC CAG AGG CGA AGG AGG CGA GAC ACC CAC TTC
Arg Ala Ser Trp Met Pro Met Phe Gln Arg Arg Arg Arg Arg Asp Thr His Phe
      50      60
      220      230      240      250      260      270
CCC ATC TGC ATT TTC TGC TGC GGC TGC TGT CAT CGA TCA AAG TGT GGG ATG TGC
Pro Ile Cys Ile Phe Cys Cys Gly Cys Cys His Arg Ser Lys Cys Gly Met Cys
      70      80
      280      290      297
TGC AAG ACG TAG AAC CTA CCT GCC CTG 3'
Cys Lys Thr ***

```

84

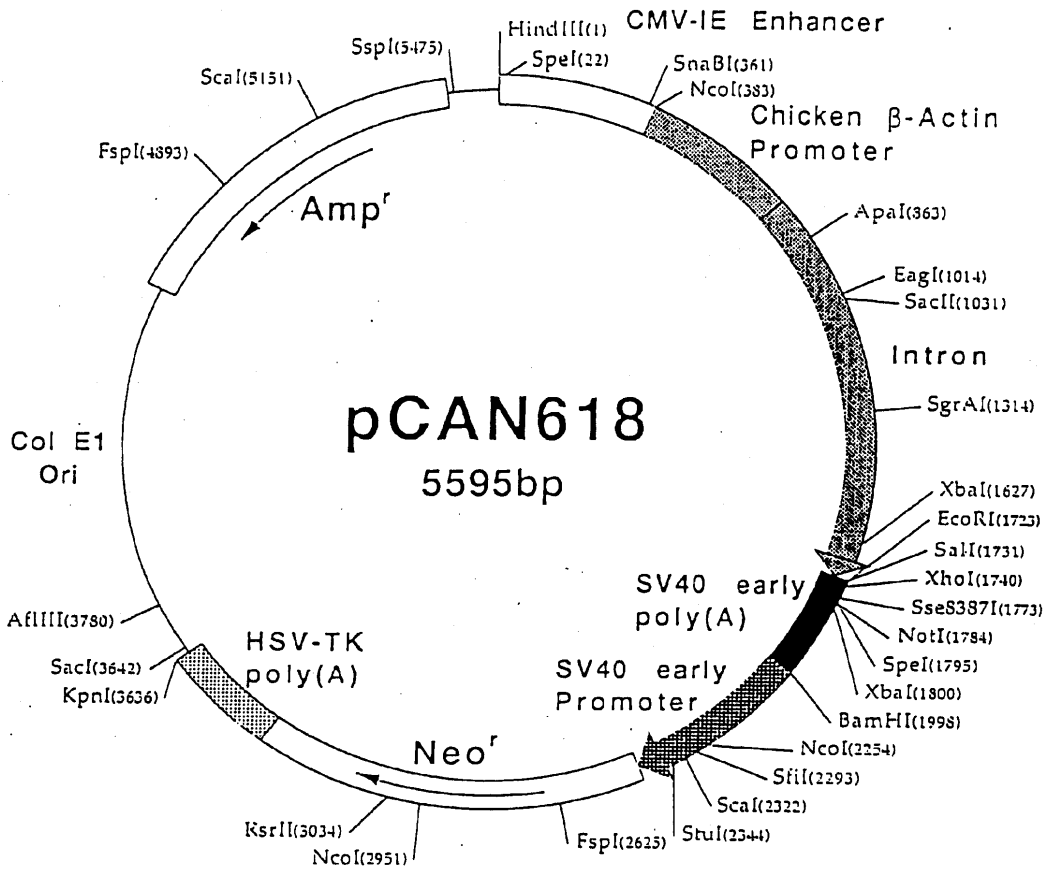
【図2】

```

ヒト型ペプチド      D T H F P I C I F C C G C C H R S K C G M C C K T
マウス型ペプチド1  D T N F P I C I F C C K C C N N S Q C G I C C K T
マウス型ペプチド2  D I N F P I C R F C C Q C C N K P S C G I C C E E
ラット型ペプチド   D T N F P I C L F C C K C C K N S S C G L C C I T

```

【図3】



フロントページの続き

(51) Int.Cl.⁷

識別記号

F I

テ-マコード(参考)

A 6 1 P 31/00
 31/06
 35/00
 37/02
 39/02
 C 0 7 K 14/47
 16/18
 C 1 2 N 1/15
 1/19
 1/21
 5/10
 C 1 2 P 21/02
 21/08
 G 0 1 N 33/15
 33/50
 33/53

A 6 1 P 35/00
 37/02
 39/02
 C 0 7 K 14/47
 16/18
 C 1 2 N 1/15
 1/19
 1/21
 C 1 2 P 21/02
 21/08
 G 0 1 N 33/15
 33/50
 33/53
 C 1 2 N 15/00
 A 6 1 K 37/02
 C 1 2 N 5/00

C
 Z
 Z
 T
 D
 Z N A A
 A

(72)発明者 田中 秀幸
茨城県つくば市春日1丁目7番地9 武田
春日ハイツ1302号

专利名称(译)	新型多肽及其DNA		
公开(公告)号	JP2001149083A	公开(公告)日	2001-06-05
申请号	JP2000276083	申请日	2000-09-12
申请(专利权)人(译)	武田化学工业有限公司		
[标]发明人	伊藤康明 大儀和宏 西一紀 田中秀幸		
发明人	伊藤 康明 大儀 和宏 西 一紀 田中 秀幸		
IPC分类号	G01N33/50 A61K38/00 A61K45/00 A61P1/16 A61P5/00 A61P31/00 A61P31/06 A61P35/00 A61P37/02 A61P39/02 C07K14/47 C07K16/18 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12P21/02 C12P21/08 G01N33/15 G01N33/53		
FI分类号	A61K45/00 A61P1/16 A61P5/00 A61P31/00 A61P31/06 A61P35/00 A61P37/02 A61P39/02 C07K14/47 C07K16/18 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02.C C12P21/08 G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/50.T G01N33/53.D C12N15/00.ZNA.A A61K37/02 C12N5/00.A A61K38/00 A61K38/16 A61K38/17 C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A C12N5/00.101 C12N5/10		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/AA34 2G045/AA40 2G045/BB20 2G045/CB01 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/DA77 2G045/FB02 2G045/FB03 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA80 4B024/CA04 4B024/DA02 4B024/DA05 4B024/EA04 4B024/GA11 4B064/AG01 4B064/AG27 4B064/CA01 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA01X 4B065/AA57X 4B065/AA87X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA01 4C084/AA02 4C084/AA06 4C084/AA07 4C084/BA01 4C084/BA19 4C084/CA18 4C084/NA14 4C084/ZA752 4C084/ZB072 4C084/ZB261 4C084/ZB262 4C084/ZB322 4C084/ZC022 4C084/ZC372 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/FA74		
优先权	1999262228 1999-09-16 JP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种新的前体多肽。新的前体多肽或其盐，编码前体多肽的DNA等。本发明的多肽等可用于诊断，治疗，预防机会性感染，败血症，药物中毒，结核，癌症，肝功能障碍，免疫功能障碍，内分泌紊乱等，预防本发明的多肽它可以用作筛选促进或抑制活性的化合物或其盐的试剂。

