

(19)日本国特許庁 ( J P )

(12) **公開特許公報** ( A ) (11)特許出願公開番号

**特開2003 - 189872**

(P2003 - 189872A)

(43)公開日 平成15年7月8日(2003.7.8)

(51) Int.Cl <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マコード ( 参考 )
C 1 2 N 15/09	ZNA	A 6 1 K 39/395	D 2 G 0 4 5
A 6 1 K 38/00			N 4 B 0 2 4
39/395		A 6 1 P 9/10	4 B 0 6 4
			101 4 B 0 6 5
A 6 1 P 9/10		43/00	105 4 C 0 8 4

審査請求 未請求 請求項の数 17 O L ( 全 43数 ) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001 - 397725(P2001 - 397725)

(22)出願日 平成13年12月27日(2001.12.27)

特許法第30条第1項適用申請有り 2001年7月7日 発行  
 の「THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY VOL  
 .276,NO.36,」に発表

(71)出願人 000185983  
 小野薬品工業株式会社  
 大阪府大阪市中央区道修町2丁目1番5号

(71)出願人 396023812  
 本庶 佑  
 京都府京都市左京区岩倉大鷲町19 - 4

(72)発明者 本庶 佑  
 京都府京都市左京区岩倉大鷲町19 - 4

(72)発明者 田代 啓  
 京都府京都市北区小山東大野町93

(74)代理人 100081086  
 弁理士 大家 邦久

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 新規なポリペプチド E S D N、その製造方法、E S D Nをコードする c D N A、その c D N A からなるベクター、そのベクターで形質転換された宿主細胞、E S D Nの抗体、E S D Nまたは抗体を含有する薬学

(57)【要約】

【構成】 新規なポリペプチド E S D N、その製造方法、E S D Nをコードする c D N A、その c D N A からなるベクター、そのベクターで形質転換された宿主細胞、E S D Nの抗体、E S D Nまたは抗体を含有する薬学的組成物、E S D Nを測定する方法、E S D Nを測定する試薬および E S D Nを用いたスクリーニング方法。

【効果】 本発明の E S D N 蛋白は、冠動脈細胞ならびに平滑筋細胞で発現され、またバルーン傷害した動脈の血管平滑筋や総頸動脈の中膜で発現されることから、循環器領域における P T C A 後の再狭窄や動脈硬化の治療に有用である。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 実質的に純粋な形である配列番号2、5または8で示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、またはそのホモログ、そのフラグメントまたはそのフラグメントのホモログからなるポリペプチド。

【請求項2】 配列番号2、5または8で示されるアミノ酸配列からなる請求項1記載のポリペプチド。

【請求項3】 請求項1または2に記載されたポリペプチドをコードするcDNA。

【請求項4】 配列番号3、6または9で示される塩基配列を有する請求項3記載のcDNA、またはその配列に選択的にハイブリダイズするフラグメントからなるcDNA。

【請求項5】 請求項3または4に記載のcDNAからなる複製または発現ベクター。

【請求項6】 請求項5記載の複製または発現ベクターで形質転換された宿主細胞。

【請求項7】 請求項1または2に記載されたポリペプチドを発現させるための条件下で請求項6記載の宿主細胞を培養することを特徴とする請求項1または2に記載のポリペプチドの製造方法。

【請求項8】 請求項1または2に記載されたポリペプチドのポリクローナルまたはモノクローナル抗体。

【請求項9】 請求項1または2に記載されたポリペプチドまたは請求項8記載の抗体および薬学的に許容される賦形剤および/または担体を含有することを特徴とする薬学的組成物。

【請求項10】 請求項1または2に記載されたポリペプチドまたは請求項8記載の抗体および薬学的に許容される賦形剤および/または担体を含有することを特徴とするPTCA後の再狭窄の治療に有効な薬学的組成物。

【請求項11】 請求項1または2に記載されたポリペプチドまたは請求項8記載の抗体および薬学的に許容される賦形剤および/または担体を含有することを特徴とする請求項10記載の動脈硬化の治療に有効な薬学的組成物。

【請求項12】 請求項1または2に記載されたポリペプチドの測定方法。

【請求項13】 請求項8記載の抗体を用いることを特徴とする請求項1または2に記載されたポリペプチドの免疫化学的測定方法。

【請求項14】 請求項12または請求項13記載の方法を用いることを特徴とする請求項1または2に記載のポリペプチドを検出する試薬。

【請求項15】 請求項12または請求項13記載の方法を用いることを特徴とするPTCA後の再狭窄を検査する試薬。

【請求項16】 請求項12または請求項13記載の方法を用いることを特徴とする動脈硬化を検査する試薬。

【請求項17】 請求項1または2に記載されたポリペプチドを用いることを特徴とする該ポリペプチドに対するアンタゴニストまたはアゴニストとしての活性を有する化合物をスクリーニングする方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、新規なポリペプチドである血管内皮細胞・平滑筋細胞由来ニューロピリン様分子(Endothelial and Smooth muscle cell-Derived Neuropilin-like molecule、以下、ESDNと省略する。)、その製造方法、ESDNをコードするcDNA、そのcDNAからなるベクター、そのベクターで形質転換された宿主細胞、ESDNの抗体、ESDNまたは抗体を含有する薬学的組成物、ESDNを測定する方法、ESDNを測定する試薬およびESDNを用いたスクリーニング方法に関する。

## 【0002】

【発明の背景】血管内皮増殖因子(VEGF)のクローニング以来、血管形成を支配する複雑な細胞外シグナル伝達ネットワークの解明が画期的になされてきた。このリガンドやFlk-1/VEGFR2やFlt-1/VEGFR1といったチロシンキナーゼのノックアウトマウスの研究が、血管形成、発生の第一ステップに関する最初の重要点であった。VEGF受容体-2(VEGFR2)は、内皮細胞形成において必要であり、またこの遺伝子の欠損は、血液細胞群あるいは組織化された血管の不足を招き発生9.5日目に胎死につながる。しかしながら、RT-PCRを用いた初期マーカーの解析により初期の造血や内皮の前駆細胞が実際にVEGFR2非存在下において造られるという報告から、VEGFR2は血球芽細胞の形成においては必要不可欠ではないが、系統のその後の増加には必要であることを示唆している。VEGF受容体-1(VEGFR1)ノックアウトマウスもまた発生9.5日目に死ぬが、それらの内皮細胞の分化は直接影響を受けていない。その代わりに、主に間充織の血球芽細胞の移行が不足していると考えられ、過密になった内皮前駆細胞が、脈管系の重篤な組織破壊を導く。VEGFノックアウトマウスもまた発生9.5日目に著しい減少を伴って死ぬが、内皮細胞の分化を欠いていない。つまり、本質的にはVEGFR1ノックアウトマウスと同様であるが、より軽度なフェノタイプを示す。この遺伝子における目立った特長は、ヘテロ接合体の遺伝子欠失でも発生11.5日目に胎死致死になることである。このことは胎生期においてVEGFに対する著しく厳格な容量依存性が存在することを示している。その他のレセプターチロシンキナーゼもまた、Tie-2やそのリガンドangiopoietin-1といったように血管内皮細胞に特異的に発現をしていて、血管形成における後期、血管新生のステップに関与している。これら遺伝子の破壊は、脈管形成には影響を及ぼさないが、血管の

モデリングに障害を与え、発生10.5日目に胎生死につながる。それらは、内皮細胞とそれを取り巻く血管平滑筋細胞(VSMC)あるいは間充織細胞間の相互作用において役割を担っている。これらの脈管特有のシステムに付け加えて、PDGF-BBあるいはTGF- $\beta$ そしてそれらのレセプターもまた内皮細胞とそれを取り巻く細胞間で同様な役割を担っている。脈管システムに対するニューロピリン-1(NP-1; neuropilin-1)の関係の同定は、この分野の新局面を紹介した。NP-1は初め発達した神経系を特異的に認識するモノクローナル抗体によって認識される抗原としてクローニングされた。そして、セマフォリン3A(semaphorin 3A; sema 3A)のレセプターとしての同定は、軸索形成において一躍注目を浴びるようになった。またその他のVEGFレセプターの探索がVEGFR2のレセプターでもあるNP-1の発見につながった。そしてそれは、一つのVEGFアイソフォーム(isoform)への結合の増加だけでなく、内皮細胞の遊走やおそらくミトシス(mitosis)も同様に促進する。このことが同定される前は、NP-1を強制発現させたキメラマウスは、肥大した脈管を形成することが示された。NP-1ノックアウトマウスは、中枢神経系においては低い血管質を呈し、また大きな脈管の異形をも示した。一方sema 3Aノックアウトマウスでは血管の異常性の存在や非存在は報告されていないが、そのフェノタイプがNP-1強制発現マウスにおいても観察された薄い心筋層を呈することは興味深い。Eph/ephrinシステムは、別の例であり、初めに神経科学において有名になった。しかし、後に現在までには唯一の動脈と静脈を識別する表面マーカーとして同定されている。それらもまた内皮細胞との接点である周囲の間充織細胞に発現を示している。これらの役割を持った分子以外にも、我々は更に多くの細胞外シグナル伝達分子が血管の分野においては存在すると想定した。そしてこの事の解明が、この複雑なシステムのさらなる理解に貢献できるであろうと考えた。

【0003】従来、ある特定のポリペプチドまたはそれをコードするcDNAを得ようとする場合、組織や細胞培養液中に目的とする生物活性を確認し、次いでポリペプチドの単離精製を経て、遺伝子をクローニングするという方法、あるいはその生物活性を指標として遺伝子を発現クローニングする方法が一般的に用いられてきた。しかし、生体内生理活性ポリペプチドは、多様な生物活性を有している場合が多いので、あるひとつの活性を指標にして遺伝子をクローニングした結果、それが既知のポリペプチドと同一であることが後になって判明するという事例が増えている。また、微量しか産生されなかったり、特別な生理条件でのみ発現する因子も多く、そのことが単離、精製および生物活性の確認を困難なものとしている。

【0004】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、これまで造血系や免疫系で働く増殖分化因子の遺伝子のクローニングを研究してきた。そして、増殖分化因子(例えば、各種サイトカイン等)のような分泌蛋白質やそのレセプターのような膜蛋白質(以下、これらをまとめて分泌蛋白質等と呼ぶ。)の大部分がそのN末端にシグナルペプチドと呼ばれる配列を有していることに着目して、シグナルペプチドをコードする遺伝子を効率的かつ選択的にクローニングする方法を鋭意検討した。その結果、動物細胞を用いて、シグナルペプチドの有無を簡単に検索できる方法(シグナルシーケンストラップ(SST)法)を見出した(特許第3,229,590号参照)。さらに同じ概念のもとに、酵母を用いてさらに大量かつ簡単にシグナルペプチドをコードする遺伝子を単離する方法(酵母SST法)も開発された(米国特許No.5,536,637)。

【0005】

【発明の開示】本発明者らは、循環器領域におけるPTCA後の再狭窄や動脈硬化での病的血管平滑筋で重要な役割を果たしている有益な新規因子(ポリペプチド)、特に分泌シグナルを有する分泌蛋白質および膜蛋白質に着目してそれを見出すべく、鋭意検討を行なった。本発明者らは、血管細胞に対して新たに修正したSSTスクリーニングを行ない、新規トランスメンブラン(transmembrane)タンパクのクローニングに成功した。本発明の蛋白ESDNは、新規のI型transmembraneタンパク質であり、ニューロピリン(neuropilin)様の特徴的ドメインを持つものである。

【0006】本発明のESDN蛋白は、後に詳述されるように、冠動脈細胞ならびに平滑筋細胞で発現され、またバルーン傷害した動脈の血管平滑筋や総頸動脈の中膜で発現されることから、循環器領域におけるPTCA後の再狭窄や動脈硬化の治療に有用であると考えられる。

【0007】本発明が提供するcDNA配列は、配列番号2で示されるヒトESDNクローンとして同定され、冠動脈初代培養内皮細胞および平滑筋細胞から作製したcDNAライブラリーより、酵母SST法を使用して得た情報をもとに単離された。配列番号3で示されるヒトESDNクローンは分泌蛋白質(ここではヒトESDN蛋白として表される。)をコードする完全なcDNA配列を含む全長鎖cDNAである。

【0008】本発明が提供するcDNA配列は、配列番号6で示されるマウスESDNクローンとして同定され、酵母SST法を使用して得た情報をもとに、マウスcDNAライブラリーより単離された。配列番号5で示されるマウスESDNクローンは分泌蛋白質(ここではマウスESDN蛋白として表される)をコードする完全なcDNA配列を含む全長鎖cDNAである。

【0009】本発明が提供する配列番号9で示されるcDNA配列は、ラットESDNクローンとして同定され、酵母SST法を使用して得た情報をもとに、ラット

cDNAライブラリーより単離された。配列番号8で示されるマウスESDNクローンは分泌蛋白質(ここではマウスESDN蛋白として表される)をコードする完全なcDNA配列を含む全鎖cDNAである。

【0010】核酸配列データベースに登録されている既知の核酸配列に対してジバンク(GenBank)およびNCBIを用いたBLASTN、FASTAおよびUNIGENEなどにより、またアミノ酸配列データベースに登録されている既知のポリペプチドのアミノ酸配列に対してBLASTP、Fly Database、SwissProtなどにより検索をした結果、本発明ポリペプチドであるラットESDNおよびそれらをコードする核酸配列と一致する配列はなかった。このことから、本発明のポリペプチドは新規な分泌蛋白質であることが判明した。

#### 【0011】

【発明の構成】本発明は、

1. 実質的に純粋な形である配列番号2、5または8で示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、またはそのホモログ、そのフラグメントまたはそのフラグメントのホモログからなるポリペプチド。

2. 配列番号2、5または8で示されるアミノ酸配列からなる前項1記載のポリペプチド、

3. 前項1または2に記載されたポリペプチドをコードするcDNA、

4. 配列番号3、6または9で示される塩基配列を有する前項3記載のcDNA、またはその配列に選択的にハイブリダイズするフラグメントからなるcDNA。

5. 前項3または4に記載のcDNAからなる複製または発現ベクター、

6. 前項5記載の複製または発現ベクターで形質転換された宿主細胞、

7. 前項1または2に記載されたポリペプチドを発現させるための条件下、前項6記載の宿主細胞を培養することを特徴とするからなる前項1または2に記載のポリペプチドの製造方法、

8. 前項1または2に記載されたポリペプチドのポリクローナルまたはモノクローナル抗体、

9. 前項1または2に記載されたポリペプチドまたは前項8記載の抗体および薬学的に許容される賦形剤および/または担体含有することを特徴とする薬学的組成物、

10. 前項1または2に記載されたポリペプチドまたは前項8記載の抗体および薬学的に許容される賦形剤および/または担体含有することを特徴とするPTCA後の再狭窄の治療に有効な薬学的組成物、

11. 前項1または2に記載されたポリペプチドまたは前項8記載の抗体および薬学的に許容される賦形剤および/または担体含有することを特徴とする前項10記載の動脈硬化の治療に有効な薬学的組成物、

12. 前項1または2に記載されたポリペプチドの測定方法、

13. 前項8記載の抗体を用いることを特徴とする前項1または2に記載されたポリペプチドの免疫化学的測定方法、

14. 前項12または13記載の方法を用いることを特徴とする前項1または2に記載されたポリペプチドを検出する試薬、

15. 前項12または13記載の方法を用いることを特徴とするPTCA後の再狭窄を検査する試薬、

16. 前項12または13記載の方法を用いることを特徴とする動脈硬化を検査する試薬、および

17. 前項1または2に記載されたポリペプチドを用いることを特徴とする、該ポリペプチドに対するアンタゴニストまたはアゴニストとしての活性を有する化合物をスクリーニングする方法

【0012】ハイブリダイズするcDNAには、上記配列の相補配列も含まれる。ハイブリダイズは、ストリンジентな条件で行なうことが好ましい。

【0013】実質的に純粋な形である配列番号2、5または8で示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドとは、一般に、生産時のポリペプチドの90%以上、例えば、95、98または99%が配列番号2、5または8で示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドであることを意味する。

【0014】配列番号2、5または8で示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドのホモログとは、一般に少なくとも20個、好ましくは少なくとも30個、例えば40、60、80または100個の連続したアミノ酸領域で、少なくとも70%、好ましくは少なくとも80または90%、より好ましくは95%以上相同性であるものであり、そのようなホモログは、以後本発明のポリペプチドとして記載される。

【0015】さらに、配列番号2、5または8で示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドのフラグメント、またはそれらのホモログのフラグメントとは、少なくとも10アミノ酸、好ましくは少なくとも15アミノ酸、例えば20、25、30、40、50または60アミノ酸部分を意味する。

【0016】配列番号3、6または9で示される塩基配列からなるcDNAに選択的にハイブリダイズするcDNAとは、一般に、少なくとも20個、好ましくは少なくとも30個、例えば40、60、80または100個の連続した塩基配列領域で、少なくとも70%、好ましくは少なくとも80または90%、より好ましくは95%以上相同性であるものであり、そのようなcDNAは、以後本発明のcDNAとして記載される。

【0017】配列番号3、6または9で示される塩基配列からなるcDNAのフラグメントとは、少なくとも10塩基、好ましくは少なくとも15塩基、例えば20、

25、30または40塩基部分を意味し、そのようなフラグメントも本発明のcDNAに含まれる。

【0018】さらに、本発明には、本発明のcDNAからなる複製または発現ベクターが含まれる。ベクターとしては、例えば、ori領域と、必要により上記cDNAの発現のためのプロモーター、プロモーターの制御因子などからなるプラスミド、ウィルスまたはファージベクターが挙げられる。ベクターはひとつまたはそれ以上の選択的マーカー遺伝子、例えばアンピシリン耐性遺伝子を含んでいてもよい。ベクターは、イン・ビトロ(in vitro)において、例えばcDNAに対応するRNAの製造、宿主細胞の形質転換に用いることができる。

【0019】さらに、本発明には、配列番号3、6または9で示される塩基配列、またはそれらのオープンリーディングフレームからなるcDNAを含む本発明のcDNAを複製または発現させるためのベクターで形質転換された宿主細胞も含まれる。細胞としては、例えば細菌、酵母、昆虫細胞または哺乳動物細胞が挙げられる。

【0020】さらに、本発明には、本発明のポリペプチドを発現させるための条件下で、本発明の宿主細胞を培養することからなる本発明のポリペプチドの製造方法も含まれる。培養は、本発明のポリペプチドが発現し、宿主細胞より製造される条件下で行なわれることが好ましい。

【0021】本発明のcDNAは、上記のようなベクターのアンチセンス領域に挿入することでアンチセンスRNAを製造することもできる。このようなアンチセンスRNAは、細胞中の本発明のポリペプチドのレベルを制御することに用いることもできる。

【0022】本発明は、本発明におけるポリペプチドのモノクローナルまたはポリクローナル抗体も含む。さらに本発明におけるポリペプチドのモノクローナルまたはポリクローナル抗体の製造方法も含む。モノクローナル抗体は、本発明のペプチドまたは、その断片を抗原として用い、通常のハイブリドーマの技術により製造することができる。ポリクローナル抗体は、宿主動物(例えば、ラットやウサギ等)に本発明のポリペプチドを接種し、免疫血清を回収する、通常の方法により製造することができる。

【0023】本発明には、本発明のポリペプチド、その抗体と薬学的に許容される賦形剤および/または担体を含有する薬学的組成物も含まれる。

【0024】本発明のポリペプチドとしては、配列番号2、5または8で示されたアミノ酸配列からなるもの以外に、その一部が欠損したもの(例えば、配列番号2中、生物活性の発現に必須な部分だけからなる成熟ポリペプチド等)、その一部が他のアミノ酸と置換したもの(例えば、物性の類似したアミノ酸に置換したもの)、および上記本発明のポリペプチドに他のアミノ酸が付加または挿入されたものも含まれる。

【0025】よく知られているように、ひとつのアミノ酸をコードするコドンは1~6種類(例えば、Metは1種類、Leuは6種類)知られている。従って、ポリペプチドのアミノ酸配列を変えることなくcDNAの塩基配列を変えることができる。

【0026】本発明のcDNAには、配列番号2、5または8で示されるポリペプチドをコードするすべての塩基配列群が含まれる。塩基配列を変えることによって、ポリペプチドの生産性が向上することがある。

【0027】配列番号3、6または9で特定されるcDNAは、配列番号2、5または8で示されるポリペプチドをコードする塩基配列群の一態様であり、天然型配列を表わす。

【0028】配列番号3、6または9で示される塩基配列からなるcDNAの作製は、以下の方法に従って行なわれる。

【0029】はじめに酵母SST法(米国特許No.5,536,637に記載)の概要について説明する。サッカロマイセス・セロヴィシエ(*Saccharomyces cerevisiae*)などの酵母がショ糖またはラフィノースをエネルギー源や炭素源として利用するためにはインベルターゼを培地中に分泌しなければならない(インベルターゼはラフィノースをショ糖とメリピオースに、ショ糖をフルクトースとグルコースに分解する酵素である。)。また数多くの既知の哺乳類のシグナルペプチドは酵母のインベルターゼを分泌させうることが知られている。

【0030】これらの知見から、酵母のインベルターゼの分泌を可能にする新規のシグナルペプチドを哺乳類のcDNAライブラリーからラフィノース培地上での酵母の生育を指標にスクリーニングする方法として本方法は開発された。

【0031】翻訳開始点ATGを削除した非分泌型のインベルターゼ遺伝子SUC2(GENBANK accession No.V01311)を酵母の発現ベクターに組み込んで酵母SST用ベクターpSUC2を作製した。発現ベクターには、AAH5プラスミド(Gammerer, *Methods in Enzymol.* 101,192-201,1983)由来の発現用プロモーター(ADHプロモーター)およびターミネーター(ADHターミネーター)が組み込まれ、酵母複製起点としては2 $\mu$ ori、酵母選択マーカーにはTRP1、大腸菌複製起点としてはColE1 ori、大腸菌薬剤耐性マーカーにはアンピシリン耐性遺伝子がそれぞれ組み込まれている。そのSUC2遺伝子の上方に哺乳類のcDNAを組み込んで、酵母SSTcDNAライブラリーを調製した。このライブラリーを分泌型インベルターゼを欠損している酵母に形質転換した。

【0032】組み込まれた哺乳類cDNAがシグナルペプチドをコードしている場合、酵母で発現されたインベルターゼに対しても分泌作用を持つと考えられ、その結果ラフィノース培地上での生育が可能となる。そこで出

現したコロニーから酵母を培養してプラスミドを調製し、インサートcDNAの塩基配列を決定することによって、新規シグナルペプチドの検索を迅速かつ容易にした。

【0033】酵母SSTcDNAライブラリーの作製は、(1)対象となる細胞よりmRNAを単離し、特定の制限酵素(酵素I)サイトを連結したランダムプライマーを用いて二本鎖cDNAを合成し、(2)酵素Iとは異なる特定の制限酵素(酵素II)サイトを含むアダプターを連結して、酵素Iで消化した後、適当なサイズで分画し、(3)酵母発現ベクター内のシグナルペプチドを削除したインペルターゼ遺伝子上流に得られたcDNA断片を連結し、形質転換する工程よりなる。

【0034】各工程を詳しく説明すると、工程(1)では、対象となる哺乳類の臓器や細胞株などより、必要により適当な刺激剤で刺激した後、公知の方法(以下、公知の方法は特に記載がなければMolecular Cloning(Sambrook, J., Fritsch, E. F.およびManiatis, T.著、Cold Spring Harbor Laboratory Pressより1989年に発行)またはCurrent Protocol in Molecular Biology(F.M.Ausubelら編、JohnWiley & Sons, Inc.より発行)に記載の方法に従って行なわれる。)に従ってmRNAの単離が行なわれる。

【0035】対象となる組織としては、マウス胎児心臓が挙げられる。ランダムプライマーを用いる二本鎖cDNAの合成は公知の方法により行なわれる。

【0036】アダプターに連結される制限酵素(酵素I)サイトと次の工程(2)で用いられる制限酵素(酵素II)サイトは、互いに異なるものであれば何を用いてもよい。好ましくは、酵素IとしてXhoI、酵素IIとしてはEcoRIが用いられる。

【0037】工程(2)ではT4DNAポリメラーゼで末端を平滑化し、酵素IIアダプターを連結した後、酵素Iで消化し、アガロース電気泳動(AGE)により300~800bpのcDNAを分画する。酵素IIは、前記したように酵素Iと異なるものなら何でもよい。

【0038】工程(3)は、酵母発現用プラスミドベクターに連結されたシグナルペプチドを削除したインペルターゼの遺伝子上流に(2)で得られたcDNA断片を組み込んで大腸菌に形質転換する工程である。ここで酵母発現用プラスミドベクターとしては、種々のものが知られているが、例えば、大腸菌内でも機能するYEp24などが用いられるが、好適には前述したプラスミドpSUC2が用いられる。

【0039】形質転換のための宿主大腸菌株はすでに多くのものが知られており、好ましくはDH10Bのコンピテントセルである。また形質転換方法は公知の方法のいずれを用いてもよいが、好ましくはエレクトロポレーション法により行なわれる。形質転換体は公知の方法により培養され、酵母SST用のcDNAライブラリーが

得られる。

【0040】このcDNAライブラリーでは、すべてのクローンcDNA断片が導入されているわけではないし、またすべてが未知の(新規の)シグナルペプチドをコードする遺伝子断片とは限らない。そこで、次に該ライブラリーから未知のシグナルペプチドをコードする遺伝子断片をスクリーニングする必要がある。

【0041】遺伝子をもたない酵母、サッカロマイセス・セロヴィシエ(Saccharomyces cerevisiae)(例えば、YT455株など)またはインペルターゼ遺伝子を人為的に欠損させた株(公知の方法に従い作製可能)に、該cDNAライブラリーを導入し、シグナルペプチドをコードする配列を有する断片のスクリーニングを行なう。酵母の形質転換は公知の方法、例えば酢酸リチウム法によって行なわれる。形質転換体を選択培地で生育後、ラフィノースを炭素源とする培地に移し、生育可能なコロニーを選択し、プラスミドを回収する。ラフィノースを炭素源として酵母が生育したということは、ライブラリー中に何らかの分泌蛋白質のシグナルペプチドが組み込まれていたことを示している。

【0042】次に、単離した陽性クローンについて、塩基配列を決定し、未知の蛋白質をコードすることが明らかになったcDNAについては、それをプローブとして全長クローンを単離し、全長の塩基配列を決定することができる。これらの操作は、当業者にとってすべて公知の方法で行なわれる。

【0043】配列番号3、6または9で示される塩基配列が、一部、好ましくは全てが確定されると哺乳類に存在する本発明の蛋白質をコードするcDNAもしくは本発明蛋白質のホモログおよびサブセットをコードするcDNAを得ることができる。適当な塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを合成し、それを用いて哺乳類由来のcDNAライブラリーあるいはmRNAからPCR法により、あるいは適当な塩基配列の断片をプローブとしてハイブリダイズさせることにより、他の哺乳類cDNAライブラリーあるいは該ゲノムライブラリーから、他の哺乳類型の当該蛋白質をコードするcDNAを得ることができる。

【0044】このようにして得られたcDNAが、SSTで得られたcDNA断片の塩基配列(またはその相同配列)を含んでいるならばシグナルペプチドをコードしていることになるので、該cDNAが全長、またはほぼ全長であることは明らかである(シグナルペプチドは例外なく蛋白質のN末端に存在することから、cDNAのオープンリーディングフレームの5'末端にコードされている)。さらに公知の方法に従い、該cDNAをプローブとしてノザン(Northern)解析によって全長の確認をしてもよい。ハイブリダイズしたバンドから得られるmRNAのサイズと該cDNAのサイズを比較し、ほぼ同じであれば該cDNAはほぼ全長であると考えられる。

【0045】本発明は、開示されたタンパクの全長型並びに成熟型の両方を提供する。それらのタンパクの全長型は、配列番号2、5または8で示される塩基配列の翻訳されるアミノ酸配列で同定される。それらの成熟タンパクは、適当な哺乳類の細胞あるいはその他の宿主細胞で開示された配列番号3、6または9で示される全長DNAを適当な哺乳類の細胞あるいはその他の宿主細胞で発現させることによって得られる。成熟型のタンパクの配列は、全長型のアミノ酸配列より予測可能である(図1参照)。

【0046】配列番号3、6または9で示される塩基配列が一旦確定されると、その後は、化学合成によって、あるいは該塩基配列の断片を化学合成し、これをプローブとしてハイブリダイズさせることにより、本発明のcDNAを得ることができる。さらに、本cDNAを含有するベクターcDNAを適当な宿主に導入し、これを増殖させることによって、目的とするcDNAを必要量得ることができる。

【0047】本発明のポリペプチドを取得する方法としては、(1)生体または培養細胞から精製単離する方法、(2)ペプチド合成する方法、または(3)遺伝子組み換え技術を用いて生産する方法、などが挙げられるが、工業的には(3)に記載した方法が好ましい。

【0048】遺伝子組み換え技術を用いてポリペプチドを生産するための発現系(宿主-ベクター系)としては、例えば、細菌、酵母、昆虫細胞および哺乳動物細胞の発現系が挙げられる。

【0049】例えば、大腸菌で発現させる場合には、成熟蛋白部分をコードするcDNAの5'末端に開始コドン(ATG)を付加し、得られたcDNAを、適当なプロモーター(例えば、trpプロモーター、lacプロモーター、PLプロモーター、T7プロモーター等)の下流に接続し、大腸菌内で機能するベクター(例えば、pBR322、pUC18、pUC19等)に挿入して発現ベクターを作製する。

【0050】次に、この発現ベクターで形質転換した大腸菌(例えば、E. Coli DH1、E. Coli JM109、E. Coli HB101株等)を適当な培地で培養して、その菌体より目的とするポリペプチドを得ることができる。また、バクテリアのシグナルペプチド(例えば、pelBのシグナルペプチド)を利用すれば、ペリプラズム中に目的とするポリペプチドを分泌することもできる。さらに、他のポリペプチドとのフュージョン・プロテイン(fusion protein)を生産することもできる。

【0051】また、哺乳動物細胞で発現させる場合には、例えば、配列番号3、6または9で示される塩基配列を適当なベクター(例えば、レトロウイルスベクター、パピローマウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、SV40系ベクター等)中の適当なプロモーター(例えば、SV40プロモーター、LTRプロモーター、

ター、メタロチオネインプロモーター等)の下流に挿入して発現ベクターを作製する。次に、得られた発現ベクターで適当な哺乳動物細胞(例えば、サルCOS-1細胞、COS-7細胞、チャイニーズハムスターCHO細胞、マウスL細胞等)を形質転換し、形質転換体を適当な培地で培養することによって、分泌蛋白である本発明の蛋白は、その細胞上清中に目的とするポリペプチドとして発現される。さらに、その他のポリペプチド、例えば抗体の定常領域(Fc portion)をコードするcDNA断片と連結することによって、フュージョン・プロテイン(fusion protein)を生産することもできる。以上のようにして得られたポリペプチドは、一般的な生化学的方法によって単離精製することができる。

【0052】

【発明の効果】本発明者らは、該ポリペプチドが血管平滑筋の収縮形質よりも合成形質において発現が亢進することを確認した。そのため、該ポリペプチドを用いて循環器領域におけるPTCA後の再狭窄や動脈硬化の治療に有用であると考えられる。また、本発明のポリペプチドは、実験に於いて、細胞増殖抑制作用を示したことから、VEGFと構造が類似であることから、以下の作用を有することが考えられる。

「サイトカイン活性および細胞増殖/分化活性」本発明の蛋白は、強制発現系において細胞増殖を抑制したことから、サイトカイン活性および細胞増殖(誘導あるいは阻害)/分化活性(誘導あるいは阻害)を示す可能性、あるいはある細胞集団に他のサイトカインの産生を誘導あるいは抑制すると考えられる。

「免疫刺激/抑制活性」本発明の蛋白は、免疫刺激活性および免疫抑制活性も示すと考えられる。例えば、Tリンパ球およびBリンパ球あるいはどちらか一方の成長および増殖を制御(刺激あるいは抑制)することや、同様にNK細胞や他の集団の細胞傷害性活性に影響を与えることによって、様々な免疫不全および疾患の治療に効果を示すと考えられる。特に腫瘍血管新生によって引き起こされるリンパ行性癌転移の抑制において効果を示すと考えられる。

「虚血性血管新生抑制活性」本発明の蛋白は、糖尿病の合併症である網膜症を抑制すると考えられる。VEGFは虚血誘導によって強力な血管新生作用を持つことが知られている。糖尿病網膜症の血管新生も網膜無血管領域が形成された後に起こる虚血性血管新生である。本発明の蛋白は、ニューロピリン(neuropilin)との構造の類似性から新規のVEGF受容体として血管増殖を抑制するように働いている可能性が考えられる。このことから糖尿病網膜症において効果を示すと考えられる。

【0053】本発明の蛋白に関して記述される効果あるいは生物活性は、その蛋白の投与あるいは使用により、あるいは、その蛋白をコードするcDNAの投与あるいは使用(例えば、遺伝子療法(再生医療を含む。))やc

DNA導入に適したベクター)により、提供される。

【0054】また、該ポリペプチドのポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体を用いて、生体における該ポリペプチドの定量が行なえ、これによって該ポリペプチドと疾患との関係の研究あるいは疾患の診断等に利用することができる。ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体は該ポリペプチドあるいはその断片を抗原として用いて公知の方法により作製することができる。

【0055】また該ポリペプチドを用いることにより、例えばアフィニティーカラムを作製して、本ポリペプチドと結合する既知または未知の蛋白(リガンド)の同定、精製あるいはその遺伝子クローニングを行なうことができる。

【0056】また該ポリペプチドを用いて、例えばウエスト-ウエスタン法により、または該cDNA(好ましくは該ポリペプチドをコードするcDNA)を用いて、例えば酵母2-ハイブリッド法により該ポリペプチドと相互作用する分子の同定、遺伝子クローニングを行なうこともできる。

【0057】さらに本ポリペプチドを用いることによつて、本ポリペプチドレセプターアゴニスト、アンタゴニストおよび受容体-シグナル伝達分子間の阻害剤等のスクリーニングを行なうこともできる。

【0058】スクリーニングは、例えば、以下の方法により行なうことが出来る。すなわち、a)本発明のポリペプチド、スクリーニングすべき化合物、及び細胞を含む反応混合物を、細胞が該ペプチドにより正常に刺激される条件下に一緒にし(該反応混合物は細胞が増殖するに従い細胞中に導入される標識および該ペプチドの機能を効果的に観察させるための該ペプチド以外のペプチドを含む); ついでb)細胞の増殖の程度を測定して、該化合物が有効なアンタゴニストまたはアゴニストであるかどうかを決定する。

【0059】本発明のcDNAは、多大な有用性が期待される本発明のポリペプチドを生産する際の重要かつ必須の鋳型となるだけでなく、遺伝病の診断や治療(遺伝子欠損症の治療またはアンチセンスDNA(RNA)によって、ポリペプチドの発現を停止させることによる治療等)に利用できる。また、本発明のcDNAをプローブとしてゲノミック(genomic)DNAを分離できる。

【0060】

【医薬品への適用】前記の疾患に適応するために、本発明のポリペプチド、あるいは本発明のポリペプチドに対する抗体は通常、全身的又は局所的に、一般的には経口または非経口の形で投与される。好ましくは、経口投与、静脈内投与および脳室内投与である。

【0061】投与量は、年齢、体重、症状、治療効果、投与方法、処理時間等により異なるが、通常、成人一人あたり、一回につき、100 $\mu$ gから100mgの範囲で、一日一回から数回経口投与されるかまたは、成人一

人あたり、一回につき、10 $\mu$ gから100mgの範囲で、一日一回から数回非経口投与される。

【0062】もちろん前記したように、投与量は、種々の条件により変動するので、上記投与量より少ない量で十分な場合もあるし、また範囲を越えて必要な場合もある。

【0063】本発明化合物を投与する際には、経口投与のための固体組成物、液体組成物およびその他の組成物、非経口投与のための注射剤、外用剤、坐剤等として用いられる。

【0064】経口投与のための固体組成物には、錠剤、丸剤、カプセル剤、散剤、顆粒剤等が含まれる。カプセルには、ソフトカプセルおよびハードカプセルが含まれる。

【0065】このような固体組成物においては、一つまたはそれ以上の活性物質が、少なくとも一つの不活性な希釈剤(例えば、ラクトース、マンニトール、グルコース、ヒドロキシプロピルセルロース、微結晶セルロース、デンプン、ポリビニルピロリドン、メタケイ酸アルミン酸マグネシウム等)と混合される。組成物は、常法に従って、不活性な希釈剤以外の添加物、例えば、潤滑剤(ステアリン酸マグネシウム等)、崩壊剤(纖維素グリコール酸カルシウム等)、安定化剤(ヒト血清アルブミン、ラクトース等)、溶解補助剤(アルギニン、アスパラギン酸等)を含有していてもよい。

【0066】錠剤または丸剤は、必要により白糖、ゼラチン、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロースフタレート等の胃溶性あるいは腸溶性のフィルムで被膜してもよいし、また2以上の層で被膜してもよい。さらにゼラチンのような吸収されうる物質のカプセルも包含される。

【0067】経口投与のための液体組成物は、薬学的に許容される乳濁剤、溶液剤、懸濁剤、シロップ剤、エリキシル剤等を含み、一般に用いられる不活性な希釈剤(例えば、精製水、エタノール等)を含んでいてもよい。この様な組成物は、不活性な希釈剤以外に湿潤剤、懸濁剤のような補助剤、甘味剤、風味剤、芳香剤、防腐剤を含有していてもよい。

【0068】経口投与のためのその他の組成物としては、ひとつまたはそれ以上の活性物質を含み、それ自体公知の方法により処方されるスプレー剤が含まれる。この組成物は不活性な希釈剤以外に亜硫酸水素ナトリウムのような安定剤と等張性を与えるような安定化剤、塩化ナトリウム、クエン酸ナトリウムあるいはクエン酸のような等張剤を含有していてもよい。スプレー剤の製造方法は、例えば米国特許第2,868,691号および同第3,095,355号明細書に詳しく記載されている。

【0069】本発明による非経口投与のための注射剤としては、無菌の水溶性または非水溶性の溶液剤、懸濁剤、乳濁剤を包含する。水性または非水溶性の溶液剤、懸濁剤と

しては、一つまたはそれ以上の活性物質が、少なくとも一つの不活性な希釈剤と混合される。水性の希釈剤としては、例えば注射用蒸留水および生理食塩水が挙げられる。非水性の希釈剤としては、例えばプロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブ油のような植物油、エタノールのようなアルコール類、ポリソルベート80（登録商標）等が挙げられる。

【0070】このような組成物は、さらに防腐剤、湿潤剤、乳化剤、分散剤、安定化剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ラクトース等）、溶解補助剤（例えば、アルギニン、アスパラギン酸等）のような補助剤を含んでいてもよい。

#### 【0071】

【実施例】以下に本発明のクローンESDNに関する実施例を挙げて本発明をより具体的に説明するが、これらは本発明の範囲を制限するものではない。

【0072】実施例1：SSTによるスクリーニング  
ヒト冠動脈初代培養内皮細胞（hCAEC）および平滑筋細胞（hCASMC）（Clontech）、そしてそれらの共培養（同じ細胞数のhCAECとhCASMCを混ぜ、EGM-2-MV（商品名、BioWhittakerより購入）を用いて2日間培養）をソースとしてcDNAライブラリーを構築した（特願平10-119731号参照）。次に酵母SST法（米国特許No.5,536,637を参照）によりスクリーニングを行なった結果、共培養をソースとしたcDNAライブラリーからCUBドメインを有するESDNを得た。

【0073】実施例2：ヒト、マウス、ラットの全長cDNAクローニング

全長cDNAを得るためにマラソン・cDNA・アンプリフィケーション・キット（Marathon cDNA amplification kit）（商品名、CLONTECH社より購入）による5' -、3' - RACE（Rapid Amplification of cDNA End）法を用いて5' -、3' - 末端cDNAのクローニングを行なった。同時にヒトの塩基配列情報に基づきプライマーを設計し、RT-PCRによりラット、マウスのESDNの単離も行なった。

マウスプライマー

5' - CTGCTCCA ACTCCTCCTCCTTC - 3'（配列番号10）

5' - CTGCTTCATTCCTTTCCACCAA CCTG - 3'（配列番号11）

ラットプライマー

5' - TGTGCTGGTCATGGTCCTCACT ACTCTC - 3'（配列番号12）

5' - TGTGCTTTAAACGATGCTTTG - 3'（配列番号13）

その結果、ESDNは、ヒト、マウス、ラット間において高い相同性を有していることが明らかとなったが、何れの種においても翻訳開始点ATGを含む5'末端配列

を見出すことができなかった。この原因としてESDNの5'末端領域の高いGC含量が考えられる。そこでマウスphage genomic ライブラリー（Lambda FIXII library（商品名、Stratagene社より購入））を用いたスクリーニングを行なった。その結果、翻訳開始点（Met）を含む2個の陽性クローンを得た。そこでこのMetを含む5' - 側のプライマーを作成し、下流のエクソンを含む（genomic cloneには含まれていない）アンチセンスプライマー

Sense primer : 5' - GCACTATGCGGGCGG ATTGC - 3'（配列番号14）

antisense primer : 5' - GGATGTAAGGGTT CCACTCTCAGG - 3'（配列番号15）

と共にRT-PCRを行なったところ、ヒト、ラットのカウンターパートを得た。得られたアミノ酸シーケンスよりヒトとげっ歯類は84～5%の相同性、マウスとラットでは92%の相同性を表した。ヒト、ラットおよびマウスのESDNのアライメントを図1に示す。モチーフ検索の結果から、ESDNは、細胞外に1個のCUBドメインと1個のファクター（factor）V/VIII相同ドメインを有するタイプ（type）I膜貫通型タンパク質であることが判明した。また、この構造上の特徴からneuropilin（2個のCUB、2個のFV/VIIIドメイン、1個のMAMドメインを有する）との構造の類似性を指摘することができる。またその他の領域では、カプトガニのファクター（Factor）C、及びヒトにおける難聴の原因遺伝子の一つであるCochと4個のシステインが保存された相同性の高い領域がある。この領域はCochにおいては、DFNA9という遺伝性難聴においてこれまで発見されている4つの変異全てが局在している部分で、カプトガニのような進化系統樹で離れた生物にも見出されることから新しいドメイン構造と考えられる。図2および図3に示す。

【0074】実施例3：哺乳動物細胞を用いたヒトESDN蛋白の発現と抗ペプチド抗体による同定

ヒト全長cDNAを哺乳動物細胞用発現ベクターのオリジナルV5エピトープをフラッグ・タグ（FLAG tag）に交換し、pEF6V5-His（商品名、Invitrogen社より購入）にサブクローニングした。これらの発現ベクターは、293T細胞やCOS7細胞にセルフェクト（Cellfect）（商品名、Amersham Life Science社より購入）やりポフェクトアミン（Lipofectamine）（商品名、Life Technologies、社より購入）により細胞に導入した。なお目的の発現蛋白質の確認は、細胞のライゼイト（lysate）を作成した後、各種抗体によるウエスタンブロッティングにより検出した。

anti-FLAG M2 monoclonal antibody（商品名、Sigma社より購入）

GlyGluArgIleArgIleLysPheGlyAspGlyAspIleGluAspSerAs

p (配列番号16)を用いて作成したウサギ抗CUBポリクローナル抗体

GlnAspLysIlePheGlnGlyAsnLysAspTyrHisLysAspValArgAsnAsn (配列番号17)を用いて作成した抗FV/VIIIポリクローナル抗体

は、それぞれK L Hに連結させたポリペプチドをウサギに免疫することによって得た(Sawady Technology)。ウエスタンブロッティングは、E C L (商品名、Amersham Life Science社より購入)ルネッサンス (Renaissance) (NEN Life Science)のプロトコールに従った。その結果、発現ベクターのみを導入した細胞ライゼイト (lysate) には認められないバンドが、127、106、93 kDa付近に検出された (図6に示す)。

【0075】実施例4：シグナル配列の解析

得られたアミノ酸配列の疎水性プロット (図4に示す) から、E S D Nのシグナル配列は、通常の配列よりも長く異型性であることが判明した。そこでヒト全長cDNAを導入したCOS7細胞を4%パラホルムアルデヒドにより固定した後、一次抗体により30分間室温で反応させた。次に30分間二次抗体、テキサス・レッド・アンチマウスIgG (Texas red anti-mouse IgG) (商品名、Vector Laboratories社より購入) やFITCアンチラビットIgG (FITC-anti-rabbit IgG) (商品名、Jackson Laboratories社より購入) で反応させた後、バイオ・ラッド・コンフォーカル・レーザー・スキャニング・マイクروسコープ (Bio-Rad confocal laser scanning microscope) (商品名、model MRC-1024) により解析した。その結果、同タンパク質は、細胞表面上に発現していることが判った (図7に示す)。次にシグナル配列の切断部位の確認を試みた。マウスE S D Nの細胞外領域のC端にHis-tagを付けたmE S D N-Ex (Edns) やヒトCD5のシグナル配列：MetProMetGlySerLeuGlnProLeuAlaThrLeuTyrLeuLeuGlyMetLeuValAlaSerValLeuAla (配列番号18) に置換したmE S D N-Ex (CD5) をpCAGGS (Science 261, 600-603 (1993)) にサブクローニングした。293T細胞に導入後、培養上清に分泌された目的タンパク質を「His-probe H-15 polyclonal antibody」 (商品名、Santa Cruz社より購入) によるウエスタンブロッティングにより検出した。その結果、mE S D N-Ex (Edns) とmE S D N-Ex (CD5) の両コンストラクト (図5に示す) より同じサイズのタンパク質が確認された。ヒトCD5とマウスE S D Nのシグナル配列は、39アミノ酸 (約4 kDa) ヒトCD5の方が小さいが、得られたタンパク質のサイズが同じことから、同じ切断部位であることが予想された (図8に示す)。

【0076】実施例5：E S D N蛋白のサザン・ブロー

プロット (southern zooblot) 解析

[<sup>32</sup>P] dCTP - ラベルしたヒトE S D Nをプローブとして、哺乳類 (マウス、ラット、ウサギ、ウシ、ヒト)、アフリカツメガエル (Xenopus)、ハエ (fly)、酵母 (yeast) の種におけるサザン・ブローット (southern zooblot) 解析を行なった (37、1×SSCにより洗浄)。その結果、哺乳類においては強いバンドが確認され、E S D Nが、哺乳類において高度に保存されていることが明らかとなった。一方、アフリカツメガエル (Xenopus) では弱いバンドが確認された。なお、ショウジョウバエ (fly)、酵母 (yeast) においては、バンドは確認されなかった (図9Aに示す)。

【0077】実施例6：ヒトE S D Nの遺伝子座

ヒトにおいては、2個(stSG29921、sts-D29024)の独立したSTS (sequence-tagged site) の情報からラジエーション・ハイブリッド・マップ (radiation hybrid map) のD3S1603-D3S1271、D3S1552-D3S1603近傍 (cytogenetic mapではchromosome 3q11.2に相当すると思われる部位) に遺伝子座があることが明らかとなった。このデータベースにより得られた結果を確認するために、マウスライン (Cell line) であるA9 (Neo3)、A9 (Neo12) (JCRB Cell Bank) を用いてゲノミック・サザン (genomic southern) ハイブリダイゼーションを行なった。その結果、ヒトE S D Nプローブは、マウスE S D Nも認識できるためA9 (Neo3)、A9 (Neo12) の両方においてマウスE S D Nが確認された。一方、ヒトE S D Nは、A9 (Neo3) のみにおいて検出された。このことからヒトE S D Nは、クロモソーム (chromosome) 3q11.2に相当すると思われる部位に遺伝子座があることが明らかとなった (図9Bに示す)。

【0078】実施例7：E S D N mRNAの発現部位の解析

培養ヒト細胞のノザン (Northern) 解析は、hCAEC、hCASMCそしてそれらの共培養からトータル (total) RNAをTRIzol (商品名、Life Technologies社より購入) により抽出した。ラット組織・細胞のノザン (Northern) 解析は、トータル (total) RNAをTRIzol LS (全血に対して)、TRIzol (その他の組織や培養細胞に対して) により抽出した。次にpoly(A) RNAは、「OligotexTM-dT30 Super」 (商品名、Roche Molecular Biochemicals社より購入) により精製した。次に [<sup>32</sup>P] dCTP - ラベルしたヒト、ラットE S D NやGAPDH cDNAをプローブとして用い、ノザン・プロット (Northern blot) 解析 (65、0.2×SSCにより洗浄) を行なった。その結果、hCASMC細胞において強い発現が認められた (6.4、3 kb)。一方hCAEC細胞においては、hCASMCに比べて弱い発現が認められた。なお、共培養することによる、E S D N mRNAの発現

の変化は認められなかった(図10Aに示す。)。ラット組織・細胞のノザン(Northern)解析の結果、全血細胞からESDN mRNAは確認されず、肝臓においても発現がかなり低いことが判った(図10Bに示す。)

【0079】実施例8: ヒト冠動脈平滑筋細胞を用いたESDN蛋白の発現

hCASM Cを血清(serum) 飢餓の状態のDMEM / 2mMグルタミン(glutamine)で48時間培養した。次に指定濃度のPDGF-BB、AT-III、FCS(商品名、Sigma、Life Technologies社より購入)を含む培地に置換し、刺激を行なった。トータル(total) RNAはTrizol(商品名、Life Technologies社より購入)により調製し、cDNA合成はスーパースク립ト・プレアンプリケーション・システム(SuperScript Preamplification System)(商品名、First Strand cDNA Synthesis: Life Technologies社より購入)を用いて行なった。なおmRNAは、リアルタイム定量RT-PCR(real-time quantitative RT-PCR; PE Applied Biosystems Prism Model 7700 Sequence Detection System)により測定した。フォワード(Forward)リバーズ(Reverse)プライマーの配列は以下の通りである。

ESDN forward: 5' - CCCAGCAAGGTGATGGATG - 3' (配列番号19)

ESDN reverse: 5' - CAAGAATCAGAATCTTCAATGTCAAAG - 3' (配列番号20)

ESDN probe: 5' - (6-FAM) - CCTGAGAGTGGAAACCCTTACATCCATAAAC - (TAMRA) - 3' (配列番号21)

これらの配列はヒトを基準にしているが、げっ歯動物にも適応できることを確認した。ヒトGAPDHのシーケンスは以下の通りである。

human GAPDH forward: 5' - GAAGGTGAAGGTTCGGAGTC - 3' (配列番号22)

human GAPDH reverse: 5' - GAAGATGGTGAATGGGATTTTC - 3' (配列番号23)

human GAPDH probe: 5' - (VIC) - CAAGCTTCCCGTTCTCAGCC - (TAMRA) - 3' (配列番号24)

「TaqMan Rodent GAPDH Control Reagents」(PE biosystems)をラット(rat) GAPDHの定量に用いた。ESDNとGAPDHのmRNAレベルはコピー数を意味している。そこで先方の発現レベルをGAPDHにより標準化した。このことは、スタンダードの連続希釈から作成した標準曲線によって成し遂げられた。なおスタンダードにはESDNあるいはGAPDHをpBlueScript SK(-)(商品名、Stratagene社より購入)にサブクローニングした既知量のプラスミドを準備した。結果、ESDNはPDGF-BB刺激において濃度依存的に発現が増加するが、AT-III刺激においては発現の増加が

認められなかった。またFCS刺激においてもESDNの発現増加が濃度依存的に認められたが、PDGF-BB刺激に比べてより少ない量であった(図11に示す。)

【0080】実施例9: ラットの総頸動脈におけるESDN蛋白の発現

バルーン障害後(n=5, day 0, 5, n=4, day 14)、0、5、14日後に頸動脈を採取した。トータル(total) RNAはTrizol(商品名、Life Technologies社より購入)により調製し、cDNA合成は「SuperScript Preamplification System」(商品名、First Strand cDNA Synthesis: Life Technologies社より購入)を用いて行なった。ラットESDNやGAPDHのmRNAは「real-time quantitative RT-PCR」(PE Applied Biosystems Prism Model 7700 Sequence Detection System)により測定した。その結果、5日目にESDNの増加の傾向が認められ、14日目には30%もの有意な増加が認められた。次に、このESDNの発現を免疫組織学的に解析した(図12に示す。)処置あるいは未処置ラットを麻醉下にして、予め4に冷やした生理食塩水で組織を灌流した。そして局所灌流部分を4%パラホルムアルデヒドにより固定した。頸動脈を丁寧に採取し、ドライアイス-エタノール・バス上に置いた「Tissue-Tek O.C.T. Compound」(商品名、Sakura Finetechnical社より購入)により包埋した。組織を4μmの厚さにスライスし、「avidin-biotin-alkaline phosphatase complex」(商品名、Vector Laboratories社より購入)法により免疫組織解析を行なった。アルカリリンホスファターゼ(Alkaline phosphatase)は「Vector Red」(商品名、Vector Laboratories社より購入)により発色させた。切片はメチルグリーンにより対比染色を行なった。ウサギ抗ペプチドポリクローナル抗体(一次抗体)は、5~10μg/mlの濃度で用いた。ネガティブコントロールには、正常ウサギIgG(DAKO)を同濃度で用いた。その結果、血管平滑筋の存在する大動脈や総頸動脈の中膜が染まるものの、むしろ脳・脊髄といった中枢神経系の一部(矢印)や迷走神経(アローヘッド)などの末梢神経が強く染色された(図13に示す。)。A、B、EおよびFは抗CUB抗体で染色した。C、D、GおよびHは、同じ濃度のウサギの抗IgG抗体を一次抗体として染色した(コントロール)。EおよびF中のMおよびNは、それぞれ血管中膜および血管内膜を示す。

【0081】実施例10: 293T細胞を用いたBrdUの取りこみ測定

全長ESDN、およびそのディレーション・ミュータント(deletion mutants)(hESDN-EC、hESDN-Cy)を発現ベクター「QIAfilter Plasmid Midi Kit」(商品名、QIAGEN社より購入)により調整した。そしてさらに精製するためフェノール(phenol)/

C I A Aにより2回抽出し、C I A A抽出を1回行なった。セルフェクト (CellPhect) (商品名、Amersham Life Science社より購入) を用いて293T細胞にトランスフェクトした。12時間後、メディウムを新鮮なDMEM / 10% FCSに交換し、2時間インキュベーションした。次にトリプシンにより細胞を一旦回収した後、96穴プレート2枚に播き直した。一方のプレートは、2時間のBrdUの取り込みを24時間の培養後に行なった。BrdUの取り込みは、「Cell Proliferation ELISA、BrdU」(colorimetric) (商品名、Roche Diagnostics社より購入) により測定した。もう一方のプレートは、播きこみ後2時間細胞数を「Premix WST-1 assay kit」(商品名、TaKaRa Biomedicals社より購入) により測定した。その結果、全長ESDNを発現させた細胞において、BrdUの取りこみが有意に抑制されることが明らかとなった。一方細胞外ドメインを欠いたものでは、この効果が弱められた。また細胞内ドメインを欠いたものでは全くこの効果が無くなることが確認された(図14に示す。)

【図面の簡単な説明】

【図1】 ヒト、マウスおよびラットESDNのアライメントを表わす(非常に見にくい。「A」の意味について本文との整合を要確認)。

【図2】 ESDN、ニューロピリンおよびCochにおけるドメイン構造を表わす。

【図3】 ヒト、マウス、ラットESDN、リムラスファクターC、ラットLgl-1、ヒトCoch、マウスCochおよびラットCochのLCC L部分のアライ

メントを表わす。

【図4】 ヒトおよびマウスESDNのハイドロフォビシティーを表わす。

【図5】 発現ベクターの構成を表わす。

【図6】 ヒト全長ESDNのウエスタンブロッティング解析を表わす。

【図7】 細胞膜表面でESDNが発現されている様子を表わす。

【図8】 開裂したシグナル配列のウエスタンブロッティング解析を表わす。

【図9】 AはヒトESDNのcDNAを用いたサザンブロッティングを表わす。BはヒトESDNがクロモソーム3にあることを示す。

【図10】 AおよびBは、ヒト頸動脈細胞のRNAおよびラット各臓器のRNAを用いたESDNのcDNAとのノザンブロッティング解析を示す。

【図11】 ヒト平滑筋細胞において、PDGFまたはFCS刺激によりESDNのmRNAが誘導される様子を示す。

20 【図12】 ラット頸動脈をバルーンで傷害することにより、ESDNのmRNAの発現が増加することを示す。

【図13】 ラット頸動脈をバルーンで傷害することにより、ESDNの発現が増加することを示す。

【図14】 ESDN過発現細胞においてBrdU取り込みが抑制されていることを示す。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Ono Pharmaceutical Co., LTD.  
Tasuku, Honjo  
<120> Novel Polypeptide ESDN, Production Method Thereof, cDNA encoding ESDN, Vector Comprising said cDNA, Host Cell Transformed by said Vector, Antibody against ESDN, Pharmaceutical composition Containing ESDN or Antibody, Screening method using ESDN and Immunochemical measuring method for ESDN using antibody against ESDN.  
<130> ONP3979  
<160> 24  
<170> PatentIn Ver. 2.1  
<210> 1  
<211> 2328  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens  
<220>  
<221> sig\_peptide

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(2328)

<400> 1

atg gcg agc cgg gcg gtg gtg aga gcc agg  
 cgc tgc ccg cag tgt ccc 48  
 Met Ala ~~Ser~~ Arg Ala Val Val Arg Ala Arg  
 Arg Cys Pro Gln Cys Pro  
 -65 -60 -55

caa gtc cgg gcc gcg gcc gcc gcc ccc gcc  
 tgg gcc gcg ctc ccc ctc 96  
 Gln Val Arg Ala Ala Ala Ala Ala Pro Ala  
 Trp Ala Ala Leu Pro Leu  
 -50 -45 -40 -

35  
 tcc cgc tcc ctc cct ccc tgc tcc aac tcc  
 tcc tcc ttc tcc atg cct 144  
 Ser Arg Ser Leu Pro Pro Cys Ser Asn Ser  
 Ser Ser Phe Ser Met Pro  
 -30 -25 -20

ctg ttc ctc ctg ctc tta ctt gtc ctg ctc  
 ctg ctg ctc gag gac gct 192  
 Leu Phe Leu Leu Leu Leu Val Leu Leu  
 Leu Leu Leu Glu Asp Ala  
 -15 -10 -5

gga gcc cag caa ggt gat gga tgt gga cac  
 act gta cta ggc cct gag 240  
 Gly Ala Gln Gln Gly Asp Gly Cys Gly His  
 Thr Val Leu Gly Pro Glu  
 -1 1 5 10  
 agt gga acc ctt aca tcc ata aac tac cca  
 cag acc tat ccc aac agc 288  
 Ser Gly Thr Leu Thr Ser Ile Asn Tyr Pro  
 Gln Thr Tyr Pro Asn Ser  
 15 20 25 30

~~lys Gly Arg Gln tgg tgg leu leu Phe Met~~  
~~Met Gly Glu Arg Val Arg~~  
 T85 Val Cys Glu Trp 000 Ile Arg Val Lys 105 1  
 Met Gly Glu Arg Val Arg  
 gga cgc gga ttt t35 gcc tca tac tct g40 45  
 ata gaa aaa gga gac cta ga57att gaa gat  
 60y gaa 60y Phe leu Ala Se38Tyr Ser Val  
 Ile Asp Phe Gly Asp Phe Asp Ile Glu Asp  
 Ser Asp Ser Cys H15 Phe 120 125  
 50 55 60

aat aac tgg aag gac aat gaa gga aat gga  
 gtg gga gaa gag gaa aqa 622  
 A5e Tyr Cys Arg Asp Tyr A5a 6ey A5a Phe  
 Val Ser Arg Thr Phe Ser

aca att cct cat gga tat aga gat tcc tcg  
 cca ttg tgc atg gct ggt 720  
 Thr Ile Pro His Gly Tyr Arg Asp Ser Ser  
 Pro Leu Cys Met Ala Gly  
 160 165 170

gtg cat gca gga gta gtg tca aac acg ttg  
 ggc ggc caa atc agt gtt 768  
 Val His Ala Gly Val Val Ser Asn Thr Leu  
 Gly Gly Gln Ile Ser Val  
 175 180 185 1  
 90

gta att agt aaa ggt att ccc tat tat gaa  
 agt tct ttg gct aac aac 816  
 Val Ile Ser Lys Gly Ile Pro Tyr Tyr Glu  
 Ser Ser Leu Ala Asn Asn  
 195 200 205

gtc aca ~~24~~ gtg gtg gga cac tta tct aca  
 agt ctt ttt aca ttt aag 864  
~~ggg taa gag aac agt cgg aaa cca aaa~~  
~~gac agg cag aaa aca cys~~ 1008  
 Gly Gln Glu ~~240~~ Ser Trp Lys Pro ~~245~~ Lys 220  
 Ala Arg Leu Lys Lys Pro  
~~255~~ agt gga tgt tat ~~260~~ aca ctg ggg atg 265 2  
~~260~~ tct ggt gtg atc gcg 912  
~~gga gag ccy cgg tyr ccy ttt gca atc gat~~  
~~gaa sac cag vgg tta aaa~~ 1056  
 Gly Pro ~~225~~ Trp Ala Ala Phe ~~230~~ Thr Asp 235  
 Glu Tyr Gln Trp Leu Gln  
 gat cct caa ata ~~275~~ gca tca tct gtg ~~280~~ 285  
 gag tgg act gac cac aca 960  
~~asp gaa cty aac aag gaa gag aca aaa aca~~  
~~gga atp aha asp aca gga~~ 1104  
 Ile ~~240~~ Leu Asn Lys Glu ~~245~~ Lys Ile Thr 250  
 Gly Ile Ile Thr Thr Gly  
 290 295 300

tcc acc atg gtg gag cac aat tac tat gtg  
 tct gcc tac aga atc ctg 1152  
 Ser Thr Met Val Glu His Asn Tyr Tyr Val  
 Ser Ala Tyr Arg Ile Leu  
 305 310 315

tac agt gat gat ggg cag aaa tgg act gtg  
 tac aga gag cct ggt gtg 1200  
 Tyr Ser Asp Asp Gly Gln Lys Trp Thr Val  
 Tyr Arg Glu Pro Gly Val  
 320 325 330

gag caa gat aag ata ttt caa gga aac aaa  
 gat tat cac cag gat gtg 1248  
 Glu Gln Asp Lys Ile Phe Gln Gly Asn Lys

25

400

405

410

ata gcc aaa ggt cgt gcc cca aaa ttt acg  
caa cca cta caa cct cgc 1488

Ile Ala Lys Gly Arg Ala Pro Lys Phe Thr  
Gln Pro Leu Gln Pro Arg

415

420

425

4

30

agt agc aat gaa ttt cct gca cag aca gaa  
caa aca act gcc agt cct 1536

Ser Ser Asn Glu Phe Pro Ala Gln Thr Glu  
Gln Thr Thr Ala Ser Pro

435

440

445

gat atc aga aat act acc gta act cca aat  
gta acc aaa gat gta gcg 1584

Asp Ile Arg Asn Thr Thr Val Thr Pro Asn  
Val Thr Lys Asp Val Ala

450

455

460

ctg gct gca gtt ctt gtc cct gtg ctg gtc  
atg gtc ctc act act ctc 1632

Leu Ala Ala Val Leu Val Pro Val Leu Val  
Met Val Leu Thr Thr Leu

465

470

475

att ctc ata tta gtg tgt gct tgg cac tgg  
aga aac aga aag aaa aaa 1680

Ile Leu Ile Leu Val Cys Ala Trp His Trp  
Arg Asn Arg Lys Lys Lys

480

485

490

Leu Val Gly Gly Ile Val Gly Thr Leu His  
~~600~~ ~~600~~ ~~600~~ ~~600~~ ~~600~~ ~~600~~ tta cct tac tgg

~~600~~ gca ggt tgg tgg 565728

570

Thr Glu Gly Thr Tyr Asp Leu Pro Tyr Trp  
~~600~~ ~~600~~ ~~600~~ ~~600~~ ~~600~~ ~~600~~ gca ggc tat gca

~~600~~ cta gat cct tac ~~600~~ 1968

505

5

Pro Glu Glu Gly Lys Glu Ala Gly Tyr Ala  
~~600~~ ~~600~~ ~~600~~ ~~600~~ ~~600~~ ctt cct gca aaa

~~600~~ gtg gac cat gag ~~600~~ 1776

585

5

Pro Gly Met Lys Gln Phe Leu Pro Ala Lys  
~~600~~ ~~600~~ ~~600~~ ~~600~~ ~~600~~ ~~600~~ tat cat gcc tat

~~600~~ gct gaa cca ctc ~~600~~ att 2016

520

525

Ser Pro Gly Gln Glu Val Tyr His Ala Tyr  
~~600~~ ~~600~~ ~~600~~ ~~600~~ ~~600~~ ~~600~~ agc agc gaa gtt

~~600~~ aat cac ctg agt ~~600~~ aga 1824

600

605

Thr Pro Val Arg Tyr Ser Ser Ser Glu Val  
~~600~~ ~~600~~ ~~600~~ ~~600~~ ~~600~~ ~~600~~ acc cca atc atc

~~600~~ atg gac atg ~~600~~ ggg cac 2064

535

540

Thr Gly Pro Glu Tyr Ala Thr Pro Ile Ile  
~~600~~ ~~600~~ ~~600~~ ~~600~~ ~~600~~ ~~600~~ cag gct gac tct

~~600~~ gca gag tat ~~600~~ cag cca 1872

615

620

Arg Thr Asp Ser Cys Ser Ser Ala Gln Ala  
 Gln Tyr Asp Thr Pro Lys  
 655 660 665 6  
 70  
 gct ggg aag cca ggt cta cct gcc cca gac  
 gaa ttg gtg tac cag gtg 2256  
 Ala Gly Lys Pro Gly Leu Pro Ala Pro Asp  
 Glu Leu Val Tyr Gln Val  
 675 680 685  
  
 cca cag agc aca caa gaa gta tca gga gca  
 gga agg ~~gaa~~ ggg gaa tgt 2304  
 Pro Gln Ser Thr Gln Glu Val Ser Gly Ala  
 Gly Arg Asp Gly Glu Cys  
 <210> 2 690 695 700  
 <211> 775  
~~gaa~~gttTtt aaa gaa atc ctt tga  
 <213> Homo sapiens 2328  
~~Ala~~Val Phe Lys Glu Ile Leu  
 Met Ala ~~305~~ Arg Ala Val Val ~~710~~ Ala Arg  
 Arg Cys Pro Gln Cys Pro  
 1 5 10 15  
  
 Gln Val Arg Ala Ala Ala Ala Ala Pro Ala  
 Trp Ala Ala Leu Pro Leu  
 20 25 30  
  
 Ser Arg Ser Leu Pro Pro Cys Ser Asn Ser  
 Ser Ser Phe Ser Met Pro  
 35 40 45  
  
 Leu Phe Leu Leu Leu Leu Leu Val Leu Leu  
 Leu Leu Leu Glu Asp Ala  
 50 55 60  
  
 Gly Ala Gln Gln Gly Asp Gly Cys Gly His  
 Thr Val Leu Gly Pro Glu  
 65 70 75 80  
  
 Ser Gly Thr Leu Thr Ser Ile Asn Tyr Pro  
 Gln Thr Tyr Pro Asn Ser  
 85 90 95  
  
 Thr Val Cys Glu Trp Glu Ile Arg Val Lys  
 Met Gly Glu ~~180~~ Val Arg 185 190  
 100 105 110  
  
 Ile Thr Cys Leu Asp Thr Ala Ser Asn Phe  
~~Leu~~ Gly Phe Gly ~~Rsp~~ ~~See~~ Asp Ile Glu Asp  
 Ser Asp ~~305~~ Cys His Phe 200 205  
 115 120 125  
  
 Lys Tyr Cys Pro Ala Gly Cys Leu Leu Pro  
~~Rsp~~ ~~Tyr~~ ~~Glu~~ ~~Arg~~ ~~See~~ ~~Gly~~ Asn Gly Ile Gly  
 Val ~~300~~ Arg Thr Glu Ile 215 220

225	230	235	2
40			
Val His Ala Gly Val Val Ser Asn Thr Leu			
Gly Gly Gln Ile Ser Val			
	245	250	255
Val Ile Ser Lys Gly Ile Pro Tyr Tyr Glu			
Ser Ser Leu Ala Asn Asn			
	260	265	270
Val Thr Ser Val Val Gly His Leu Ser Thr			
Ser Leu Phe Thr Phe Lys			
	275	280	285
Thr Ser Gly Cys Tyr Gly Thr Leu Gly Met			
Glu Ser Gly Val Ile Ala			
	290	295	300
Asp Pro Gln Ile Thr Ala Ser Ser Val Leu			
Glu Trp Thr Asp His Thr			
305	310	315	3
20			
Gly Gln Glu Asn Ser Trp Lys Pro Lys Lys			
Ala Arg Lys Lys Pro			
	325	330	335
Arg Asn Asn Phe Leu Pro Pro Ile Ile Ala			
Arg Phe Phe Arg Ala Ala Phe Ala Thr Asp			
Glu Tyr Gln Leu Gln		425	430
	340	345	350
Pro Thr Gln Trp Gln Gln Lys Ile Ala Met			
Lys Met Glu Asn Lys Gly Lys Lys Ile Thr			
Gly Ile Thr Thr Gly	435	440	445
	355	360	365
Cys Gln Phe Ile Pro Lys Gly Arg Pro Pro			
Ser Leu Met Val Thr Phe Asn Tyr Tyr Val			
Ser Tyr Arg Ile Leu	450	455	460
	370	375	380
Pro Pro Arg Asn Ser Asn Asp Leu Lys Asn			
Thr Ser Asp Asp Thr Gly Lys Trp Thr Val			
Arg Glu Pro Gly	465	470	475
	385	390	395
400e Ala Lys Gly Arg Ala Pro Lys Phe Thr			
Gln Thr Asp Gly Phe Arg Gln Gly Asn Lys			
Asp Tyr His Gln Val	485	490	495
	405	410	415
Ser Ser Asn Glu Phe Pro Ala Gln Thr Glu			
Gln Thr Thr Ala Ser Pro			
	500	505	510
Asp Ile Arg Asn Thr Thr Val Thr Pro Asn			
Val Thr Lys Asp Val Ala			
	515	520	525



gagcaagata agatatttca aggaaacaaa gatt  
atcacc aggatgtgcg taataacttt 1260  
ttgccaccaa ttattgcacg ttttattaga gtga  
atccta cccaatggca gcagaaaatt 1320  
gccatgaaaa tggagctgct cggatgicag tita  
ttccta aaggtcgtcc tccaaaactt 1380  
actcaacctc cacctcctcg gaacagcaat gacc  
tcaaaa aactacagc cctccaaaa 1440  
atagccaaag gtcgtgccc aaaatttacg caac  
cactac aacctcgag tagcaatgaa 1500  
tttctgcac agacagaaca aacaactgcc agtc  
ctgata tcagaaatac taccgtaact 1560  
ccaaatgtaa ccaaagatgt agcgtggct gcag  
ttcttg tccctgtgct ggtcatggtc 1620  
ctcactactc tcattctcat attagtgtgt gctt  
ggcact ggaacag aaagaaaaa 1680  
actgaaggca cctatgactt accttactgg gacc  
ctggaagggtatgggggaaaggaaatgagctc 1740  
ctag  
ctgggaaccttcacagcaaaagctcctggc 1800  
gagg  
aggactgaggctcctcagcagcagcgg 1860  
cagt  
gaggtaaatccgaaagagtgggaagagaa 1920  
acca  
ggctgactggaggctggacgatgtaggg 1980  
cagg  
tggctcagcagcacaaggtaggaggaaat 2040  
ggta  
ggctcaggaaggatggggacatgagat 2100  
tita  
aaggaaagagctggaagaagc aggctat 2160  
gacc  
ctggaactcattacaactc accagggcag 1980  
gaaagt 2210 atgcctatgc tgaaccactc ccaa  
ctggaagg 2220  
aactcctctggmasctggagg gcacccca actt  
eaggctg gtcagccctc cacatccact 2100

<221> sig\_peptide

<222> (1)..(198)

<220>

<221> mat\_peptide

<222> (199)..(2310)

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(2310)

<400> 4

atg gcg agc cgg gcg ccg ctg aga gcc gcg  
cgc agc ccc cag ggt ccc 48  
Met Ala Ser Arg Ala Pro Leu Arg Ala Ala  
Arg Ser Pro Gln Gly Pro  
-65 -60 -55

gga ggc ccg gcc gcg ccc gcc gcc acc ggc  
cgg gcc gcg ctg ccc agc 96  
Met Gly Phe Phe Phe Phe Phe Phe Leu Gly  
Met Asp Ala Gly Phe Ser  
-50 -15 -45 -10 -40 -5 -

35

gaa ggt ggt gga cgt gga cat act gga cga  
ggc cct gag agt ggg act 240

Gln Gly Asp Gly Cys Gly His Thr Val Leu  
 Gly Pro Glu Ser Gly Thr  
 -1 1 5 10  
 ctt aca tcc atc aac tac cca cat acc tat  
 cct aac agc act gtg tgt 288  
 Leu Thr Ser Ile Asn Tyr Pro His Thr Tyr  
 Pro Asn Ser Thr Val Cys  
 15 20 25 30

gaa tgg gag att cga gtc agg acg gga gaa  
 agg att cgc atc aaa ttc 336  
 Glu Trp Glu Ile Arg Val Arg Thr Gly Glu  
 Arg Ile Arg Ile Lys Phe  
 35 40 45  
 ggt gac ttt gac att gaa gat tct gat tat  
 tgt cac ctt aat tac ctg 384  
 Gly Asp Phe Asp Ile Glu Asp Ser Asp Tyr  
 Cys His Leu Asn Tyr Leu  
 50 55 60  
 aaa atc ttt aat gga att gga gtc agc aga  
 acg gaa ata ggc aaa tac 432  
 Lys Ile Phe Asn Gly Ile Gly Val Ser Arg  
 Thr Glu Ile Gly Lys Tyr  
 65 70 75  
 tgt ggt ctg ggt tta caa atg aat cag tca  
 att gag tcc aaa ggc agt 480  
 Cys Gly Leu Gly Leu Gln Met Asn Gln Ser  
 Ile Glu Ser Lys Gly Ser  
 cca ggc tgt ctt ttg ctt ttt gct gaa 90  
 gaa ggc gga ggc atg ccc atg ggt gga acc  
 gag gca gcy ggg cga gga Pr528he Ala Glu  
 Gle Ser Thy Val Leu Phe Met Ser Gly Thr  
 His Ala 145 Gly Arg Gly 150 155  
 95 100 105 1  
 cat gga tac aga gat tct tca cca ttg tgt  
 atg gcg gga acc cac gca gtt 20  
 gag gcy tya atg asp Sgt Se578ro Leu Cys  
 Phe Ala Glu Ser His Ser Val Ile Asp Lys  
 Glu 160 Leu Ile Thr Cys 165 170  
 115 120 125  
 gga gta gtg tca aac gtg ctg ggt ggc caa  
 atg ggc act gtg act agc ttg 168  
 gag val ggt seg aac vgt Le624ly Gly Gln  
 Leu Ser Thr Val Ser Ser Phe Leu Glu Pro  
 175 Phe Ser Lys Tyr 185 1  
 90 130 135 140  
 aaa ggg acc cca tat tat gaa agc tct ttg  
 gcc aac aat gtc act tcc 816  
 Lys Gly Thr Pro Tyr Tyr Glu Ser Ser Leu  
 Ala Asn Asn Val Thr Ser  
 195 200 205  
 acg gtg gga tac tta tct gca agt ctg ttt

Asn Ser Trp Thr Ala Glu Lys Ala Arg Leu  
 Arg Lys Pro Gly Pro Pro  
 255 260 265 2

70  
 tgg gct gct ttt gcc act gat gag cat cag  
 tgg ctg cag ata gac ctt 1056  
 Trp Ala Ala Phe Ala Thr Asp Glu His Gln  
 Trp Leu Gln Ile Asp Leu  
 275 280 285  
 290 295 300

aac aag gag aag aag ata aca ggt atc gta  
~~aca gaa ggg agt aac aag gta~~ gta gcc tac  
~~aga ggc ctg lys ggc gaa~~ Thr Ile Val  
 Thr Gln Gly Ser Tyr Met Val Ser Ala Tyr  
 Arg Val Leu Tyr Ser Asp  
 305 310 315

gat ggg cag aga tgg act gtg tac aga gaa  
 cct ggt gtg gac cag gac 1200  
 Asp Gly Gln Arg Trp Thr Val Tyr Arg Glu  
 Pro Gly Val Asp Gln Asp  
 320 325 330

aag ata ttt caa gga aac aaa gat tat cac  
 aag gat gtt cgt aat aac 1248  
 Lys Ile Phe Gln Gly Asn Lys Asp Tyr His  
 Lys Asp Val Arg Asn Asn  
 335 340 345 3

50  
 ttt ttg cca cca att att gca cgt ttc att  
 aga gtg aac cct gtc cag 1296  
 Phe Leu Pro Pro Ile Ile Ala Arg Phe Ile  
 Arg Val Asn Pro Val Gln  
 355 360 365

tgg caa cag aaa att gcc atg aaa gtg gaa  
 ctg ctc gga tgt cag ttt 1344  
 Trp Gln Gln Lys Ile Ala Met Lys Val Glu  
 Leu Leu Gly Cys Gln Phe  
 370 375 380

Thr Val Thr Pro Ser Val Thr Lys Asp Val  
~~aca ccc aca ggc ccc~~ cca aag ctt act  
 cca cct cct ~~ggg~~ aac ggc 1392 455 460  
 Thr Leu Lys Gly Arg Leu Pro Lys Leu Thr  
~~gta ccc gta atg ggc gta~~ gcc ctc acc aca  
 ctc atc ~~ccc~~ att cta gtg 16320 395

Val Pro Val Leu Val Met Ala Leu Thr Thr  
~~aca aac ccc aca~~ aca gct cgt ccc  
 aaa cta ~~ggg~~ aaa ggt cgt 14400 475

Asn Asn Leu Arg Asn Thr Thr Ala Arg Pro  
~~lys gaa ggc ggc~~ aac agg aag aag  
 aaa ~~gaa~~ gaa ggc gcc tat 405680 410  
 Cys Ala Trp His Trp Arg Asn Arg Lys Lys



33

20

25

30

Ala Gly Cys Cys Pro Leu Pro Pro Gly Arg  
Asn Ser Ser Ser Arg Pro

35

40

45

Arg Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu  
Gln Asp Ala Gly Gly Gln

50

55

60

Gln Gly Asp Gly Cys Gly His Thr Val Leu  
Gly Pro Glu Ser Gly Thr

65

70

75

80

Leu Thr Ser Ile Asn Tyr Pro His Thr Tyr  
Pro Asn Ser Thr Val Cys

85

90

95

Glu Trp Glu Ile Arg Val Arg Thr Gly Glu  
Arg Ile Arg Ile Lys Phe

100

105

110

Gly Asp Phe Asp Ile Glu Asp Ser Asp Tyr  
Cys His Leu Asn Tyr Leu

115

120

125

Lys Ile Phe Asn Gly Ile Gly Val Ser Arg  
Thr Glu Ile Gly Lys Tyr

130

135

140

Cys Gly Leu Gly Leu Gln Met Asn Gln Ser  
Lys Gly Ser Phe Tyr Cys Ser Glu Ser Ser Leu

145

150

155

160

165

170

1

Glu Val Thr Val Leu Phe Met Ser Gly Thr  
His Ala Gly Tyr Arg Gly Ala Ser Leu Phe

175

180

185

190

195

175

275

280

285

Phe Leu Ala Ser Tyr Ser Val Ile Asp Lys  
Gly Asp Gly Thr Leu Gly Met Glu Ser Gly

200

205

210

215

185

190

290

295

300

Leu Asp Thr Val Ser Asn Phe Leu Glu Pro  
Gly Phe Ser Ser Ser Gly Leu Glu Trp Thr

205

210

215

200

205

205

305

310

315

3

200 Ala Gly Cys Leu Leu Pro Phe Ala Glu  
Asp Ser Tyr Thr Ala Thr Lys Ala Arg Leu

210

215

215

215

220

325

330

335

His Gly Tyr Arg Asp Ser Ser Pro Leu Cys  
Met Ala Gly Phe Ala Thr Asp Glu His Gln

Lys Ile Phe Gln Gly Asn Lys Asp Tyr His  
 Lys Asp Val Arg Asn Asn  
 405 410 415

Phe Leu Pro Pro Ile Ile Ala Arg Phe Ile  
 Arg Val Asn Pro Val Gln  
 420 425 430

Trp Gln Gln Lys Ile Ala Met Lys Val Glu  
 Leu Leu Gly Cys Gln Phe  
 435 440 445  
 34

Thr Leu Lys Gly Arg Leu Pro Lys Leu Thr  
 Pro Pro Pro Arg ~~Asn~~ Gly 490 495  
 450 455 460

Pro Val Gln Pro Ala Glu Thr Thr Thr Thr  
~~Pro Asp Leu Arg Asn Thr~~ Thr Ala Arg Pro  
 Lys Leu Gly ~~500~~ Gly Arg 505 510  
 465 470 475 4

~~Thr~~ Val Thr Pro Ser Val Thr Lys Asp Val  
 Ala ~~Leu~~ ~~Arg~~ ~~Val~~ ~~Glu~~ Val Leu Gln Pro  
 Arg Ser ~~515~~ Asn Glu Leu 520 525

Val Pro Val Leu Val Met Ala Leu Thr Thr  
 Leu Ile Leu Ile Leu Val  
 530 535 540

Cys Ala Trp His Trp Arg Asn Arg Lys Lys  
 Lys Thr Glu Gly Ala Tyr  
 545 550 555 5  
 60

Asp Leu Pro His Trp Asp Arg Ala Gly Trp  
 Trp Lys Gly Met Lys Gln  
 565 570 575

Leu Leu Pro Ala Lys Ser Val Asp His Glu  
 Glu Thr Pro Val Arg Tyr  
 580 585 590

Ser Thr Ser Glu Val Ser His Leu Ser Ala  
 Arg Glu Val Thr Thr Val  
 595 600 605

Leu Gln Ala Asp Ser Ala Glu Tyr Ala Gln  
~~Leu Ser Val Gly Arg Glu~~ Tyr Asp Thr Pro  
 Lys ~~610~~ Gly Lys Ser Ala 615 620  
 725 730 735

Val Gly Thr Leu His Gln Arg Ser Thr Phe  
~~Arg Phe Thr Glu Gly Lys~~ Val Tyr Gln Val  
~~625~~ Gln Ser Thr Gln ~~630~~ 635 6  
 40 740 745 750

Glu Ala Gly Tyr Ala Asp Leu Asp Pro Tyr  
~~Leu Ser Thr Met Gly Arg~~ Asp Glu Lys Phe



<213> Rattus rattus

<220>

36

<221> sig\_peptide

<222> (1)..(198)

<220>

<221> mat\_peptide

<222> (199)..(2310)

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(2310)

<400> 7

atg gcg agc cgg gcg ccg ctg aga gcc gcg  
cgc agc ccg cag gat ccc 48

Met Ala Ser Arg Ala Pro Leu Arg Ala Ala  
Arg Ser Pro Gln Asp Pro

-65 -60 -55

gga ggc cgg gcc gcg ccc gcc gcc acc ggc  
cgg gcc ccg ctg ccc agc 96

Gly Gly Arg Ala Ala Pro Ala Ala Thr Gly  
Arg Ala Pro Leu Pro Ser

-50 -45 -40 -

35

gcc ggc tgg tgt ccc ctc cct cct ggc cgc  
aac tcc tcc tcc agg cct 144

Ala Gly Trp Cys Pro Leu Pro Pro Gly Arg  
Asn Ser Ser Ser Arg Pro

-30 -25 -20

cgg ctg ctc ctt cta ctg ctc cta ctg ctc  
ccg gac gct gga gcc cag 192

Arg Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu  
Pro Asp Ala Gly Ala Gln

-15 35 -10 40 -5 45

ggc gac ttt gac att gaa gat tct gat tat  
agg ggc gat gga tgc ggg caa cct gta cta

Gly Asp His Asp Gln Ala Asp Ser Asp Tyr  
Cys Gly Asp Asp Cys Gly His Thr Val Leu

Gly Pro Glu Ser Gly Thr 55 60

aaa atc ttt aat gga att gga gtc agc aga 10

atc gaa acc ggc aag tac cca cct acc tat  
cys aac His Asp Gly Gln Val Ser Arg

Leu Thr Ser Gly Asp Tyr Pro His Thr Tyr  
Pro Asn Ser Thr Val Cys 70 75

tgc ggt ctg ggt tta caa atg aat cag tca 25 30

att gag tcc aaa ggc agt 480

Gln Gly His His Cys Gln Met Asp Gln Gln  
Asp Ala Gln Lys Asp Ser 336

Lys Thr Glu Ile Arg Val Leu Thr Gly Glu 90

Gag Ala Asp Gly Cys Phe atg agt gga atc  
cat gct tct ggt cga gga 528

	115		120		125				
ttg gat act gta tct aat ttt ttg gaa cct gag ttc agt aag tac tgc									624
Leu Asp Thr Val Ser Asn Phe Leu Glu Pro Glu Phe Ser Lys Tyr Cys									
	130		135		140				
cca gct ggc tgt ctg ctg cct ttt gct gaa ata tct gga acg att cct									672
Pro Ala Gly Cys Leu Leu Pro Phe Ala Glu Ile Ser Gly Thr Ile Pro									
	145		150		155				
cat gga tat aga gat tct tca ccg ctg tgt atg gct gga atc cat gca									720
His Gly Tyr Arg Asp Ser Ser Pro Leu Cys Met Ala Gly Ile His Ala									
	160		165		170				
gga gta gtg tca gat gtg ctg ggt ggc caa atc agc gtt gtg att agc									768
Gly Val Val Ser Asp Val Leu Gly Gly Gln Ile Ser Val Val Ile Ser									
1 7 5					1 8 0				
	1 8 5					1 9 0			
aaa ggc acc cca tat tac gaa agt tct									
ttg gcc aac aat gtc act tcc									816
Lys Gly Thr Pro Tyr Tyr Glu Ser Ser									
Leu Ala Asn Asn Val Thr Ser									
					1 9 5				
2 0 0					2 0 5				
atg gtg gga tac tta tct acg agt ctg									
ttt aca ttt aag aca agt ggt									864
Met Val Gly Tyr Leu Ser Thr Ser Leu									
Phe Thr Phe Lys Thr Ser Gly									
					2 1 0				2 1 5
					2 2 0				
tgc tat ggg act cta ggg atg gag tca									
ggt gtg atc gcc gat ccc cag									912
Cys Tyr Gly Thr Leu Gly Met Glu Ser									
Gly Val Ile Ala Asp Pro Gln									
	2 2 5								2 3 0
					2 3 5				
ata aca gca tca tct gta ctg gag tgg									
act gac cac atg ggg cag gag									960
Ile Thr Ala Ser Ser Val Leu Glu Trp									
Thr Asp His Met Gly Gln Glu									
	2 4 0								2 4 5
					2 5 0				
aac agc tgg aaa ccc gag aag gcc agg									
ctg aga aaa ccg ggg cct ccc									1008
Asn Ser Trp Lys Pro Glu Lys Ala Arg									
Leu Arg Lys Pro Gly Pro Pro									
	2 5 5				2 6 0				
					2 6 5				
tgg gct gct ttt gcc act gat gag cat									
cag tgg ctg caa att gac ctt									1056
Trp Ala Ala Phe Ala Thr Asp Glu His									
Gln Trp Leu Gln Ile Asp Leu									
					2 7 5				
2 8 0					2 8 5				

```

aat aag gag aag aag ata aca ggc atc
gta acc act gga tct acc ctg 1104
Asn Lys Glu Lys Lys Ile Thr Gly Ile
Val Thr Thr Gly Ser Thr Leu
290 295
300
ata gag cac aat tac tat gtg tct gcc
tac aga gtt ctg tac agt gac 1152
Ile Glu His Asn Tyr Tyr Val Ser Ala
Tyr Arg Val Leu Tyr Ser Asp
305 310
315
gat ggg cag aaa tgg act gtg tac aga
gag cct ggt gcg gct cag gac 1200
Asp Gly Gln Lys Trp Thr Val Tyr Arg
Glu Pro Gly Ala Ala Gln Asp
320 325
330
aag ata ttt caa gga aac aaa gat tat
cac aag gat gtt cgt aat aac 1248
Lys Ile Phe Gln Gly Asn Lys Asp Tyr
His Lys Asp Val Arg Asn Asn
335 340
345 350
ttt ttg cca cca att att gca cgt ttc
att aga gtg aac cct gtc cag 1296
Phe Leu Pro Pro Ile Ile Ala Arg Phe
Ile Arg Val Asn Pro Val Gln
355
360 365
tgg caa cag aaa att gcc atg aaa gtg
gaa ttg ctg gga tgt cag ttc 1344
Trp Gln Gln Lys Ile Ala Met Lys Val
Glu Leu Leu Gly Cys Gln Phe
370 375
380
act ctg aaa ggt cgc ctt cca aag ctt
act caa cct ccc cca cct cgg 1392
Thr Leu Lys Gly Arg Leu Pro Lys Leu
Thr Gln Pro Pro Pro Pro Arg
385 390
395
aac agc aat aac ctc aaa aac act aca
gtt cat ccc aaa cta ggt cgt 1440
Asn Ser Asn Asn Leu Lys Asn Thr Thr
Val His Pro Lys Leu Gly Arg
400 405
410
gcc cct aaa ttt act caa gca ctc caa
cca cga agt agg aat gac ctt 1488

```

Ala	Pro	Lys	Phe	Thr	Gln	Ala	Leu	Gln
Pro	Arg	Ser	Arg	Asn	Asp	Leu		
415					420			
	425					430		
cct	ctg	ctg	ccg	gcc	cag	aca	act	gcc
act	cct	gat	gtc	aaa	aac	acg		1536
Pro	Leu	Leu	Pro	Ala	Gln	Thr	Thr	Ala
Thr	Pro	Asp	Val	Lys	Asn	Thr		
				435				
440					445			
act	gtg	act	ccc	agt	gtg	acc	aaa	gat
gtt	gca	ctg	gcc	gcc	gtt	ctg		1584
Thr	Val	Thr	Pro	Ser	Val	Thr	Lys	Asp
Val	Ala	Leu	Ala	Ala	Val	Leu		
			450					455
				460				
gtt	cct	gtg	ctg	gtc	atg	gcc	ctc	acc
aca	ctc	atc	ctc	att	cta	gtg		1632
Val	Pro	Val	Leu	Val	Met	Ala	Leu	Thr
Thr	Leu	Ile	Leu	Ile	Leu	Val		
		465					470	
			475					
tgt	gct	tgg	cat	tgg	aga	aac	aga	aag
aaa	aaa	gcc	gaa	ggc	acc	tat		1680
Cys	Ala	Trp	His	Trp	Arg	Asn	Arg	Lys
Lys	Lys	Ala	Glu	Gly	Thr	Tyr		
	480					485		
		490						
gat	tta	ccc	cac	tgg	gat	cgg	gca	ggc
tgg	tgg	aaa	gga	gtg	aag	cag		1728
Asp	Leu	Pro	His	Trp	Asp	Arg	Ala	Gly
Trp	Trp	Lys	Gly	Val	Lys	Gln		
495					500			
	505					510		
ctt	ctc	cct	gcc	aaa	tcg	gtg	gaa	cac
gag	gag	acg	cca	gtg	cgc	tac		1776
Leu	Leu	Pro	Ala	Lys	Ser	Val	Glu	His
Glu	Glu	Thr	Pro	Val	Arg	Tyr		
				515				
520					525			
agc	aac	agt	gaa	gtt	agt	cac	ctg	agc
ccg	agg	gaa	gtc	acg	aca	gtg		1824
Ser	Asn	Ser	Glu	Val	Ser	His	Leu	Ser
Pro	Arg	Glu	Val	Thr	Thr	Val		
			530					535
				540				
ctg	caa	gct	gat	tct	gca	gaa	tac	gca
cag	ccc	ctc	gtg	gga	gga	att		1872
Leu	Gln	Ala	Asp	Ser	Ala	Glu	Tyr	Ala
Gln	Pro	Leu	Val	Gly	Gly	Ile		



```

gca tca gga gca gga agg gat gag aaa
ttt gat gct ttt aaa gaa acc 2304
Ala Ser Gly Ala Gly Arg Asp Glu Lys
Phe Asp Ala Phe Lys Glu Thr
690 695
700
ctt tga 2310

Leu
<210> 8
<211> 769
<212> PRT
<213> Rattus rattus
<400> 8
Met Ala Ser Arg Ala Pro Leu Arg Ala
Ala Arg Ser Pro Gln Asp Pro
1 5
10 15
Gly Gly Arg Ala Ala Pro Ala Ala Thr
Gly Arg Ala Pro Leu Pro Ser
20 25
30
Ala Gly Trp Cys Pro Leu Pro Pro Gly
Arg Asn Ser Ser Ser Arg Pro
35 40
45
Arg Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu
Leu Pro Asp Ala Gly Ala Gln
50 55
60
Lys Gly Asp Gly Cys Gly His Thr Val
Leu Gly Pro Glu Ser Gly Thr
65 70
75 80
Leu Thr Ser Ile Asn Tyr Pro His Thr
Tyr Pro Asn Ser Thr Val Cys
85
90 95
Lys Trp Glu Ile Arg Val Lys Thr Gly
Glu Arg Ile Arg Ile Lys Phe
100 105
110
Gly Asp Phe Asp Ile Glu Asp Ser Asp
Tyr Cys His Leu Asn Tyr Leu
115 120
125
Lys Ile Phe Asn Gly Ile Gly Val Ser
Arg Thr Glu Ile Gly Lys Tyr
130 135
140

```

Cys	Gly	Leu	Gly	Leu	Gln	Met	Asn	Gln	
Ser	Ile	Glu	Ser	Lys	Gly	Ser			
145					150				
	155					160			
Glu	Ile	Thr	Val	Leu	Phe	Met	Ser	Gly	
Ile	His	Ala	Ser	Gly	Arg	Gly			
				165					
170					175				
Phe	Leu	Ala	Ser	Tyr	Ser	Val	Ile	Asp	
Lys	Gln	Asp	Leu	Ile	Thr	Cys			
			180						185
				190					
Leu	Asp	Thr	Val	Ser	Asn	Phe	Leu	Glu	
Pro	Glu	Phe	Ser	Lys	Tyr	Cys			
		195					200		
			205						
Pro	Ala	Gly	Cys	Leu	Leu	Pro	Phe	Ala	
Glu	Ile	Ser	Gly	Thr	Ile	Pro			
	210					215			
		220							
His	Gly	Tyr	Arg	Asp	Ser	Ser	Pro	Leu	
Cys	Met	Ala	Gly	Ile	His	Ala			
225					230				
	235					240			
Gly	Val	Val	Ser	Asp	Val	Leu	Gly	Gly	
Gln	Ile	Ser	Val	Val	Ile	Ser			
				245					
250					255				
Lys	Gly	Thr	Pro	Tyr	Tyr	Glu	Ser	Ser	
Leu	Ala	Asn	Asn	Val	Thr	Ser			
			260						265
				270					
Met	Val	Gly	Tyr	Leu	Ser	Thr	Ser	Leu	
Phe	Thr	Phe	Lys	Thr	Ser	Gly			
		275					280		
			285						
Cys	Tyr	Gly	Thr	Leu	Gly	Met	Glu	Ser	
Gly	Val	Ile	Ala	Asp	Pro	Gln			
	290					295			
		300							
Ile	Thr	Ala	Ser	Ser	Val	Leu	Glu	Trp	
Thr	Asp	His	Met	Gly	Gln	Glu			
305					310				
	315					320			
Asn	Ser	Trp	Lys	Pro	Glu	Lys	Ala	Arg	
Leu	Arg	Lys	Pro	Gly	Pro	Pro			
				325					
330					335				
Trp	Ala	Ala	Phe	Ala	Thr	Asp	Glu	His	
Gln	Trp	Leu	Gln	Ile	Asp	Leu			

			340					345
				350				
Asn	Lys	Glu	Lys	Lys	Ile	Thr	Gly	Ile
Val	Thr	Thr	Gly	Ser	Thr	Leu		
		355					360	
			365					
Ile	Glu	His	Asn	Tyr	Tyr	Val	Ser	Ala
Tyr	Arg	Val	Leu	Tyr	Ser	Asp		
	370					375		
		380						
Asp	Gly	Gln	Lys	Trp	Thr	Val	Tyr	Arg
Glu	Pro	Gly	Ala	Ala	Gln	Asp		
385					390			
	395					400		
Lys	Ile	Phe	Gln	Gly	Asn	Lys	Asp	Tyr
His	Lys	Asp	Val	Arg	Asn	Asn		
				405				
410					415			
Phe	Leu	Pro	Pro	Ile	Ile	Ala	Arg	Phe
Ile	Arg	Val	Asn	Pro	Val	Gln		
			420					425
				430				
Trp	Gln	Gln	Lys	Ile	Ala	Met	Lys	Val
Glu	Leu	Leu	Gly	Cys	Gln	Phe		
		435					440	
			445					
Thr	Leu	Lys	Gly	Arg	Leu	Pro	Lys	Leu
Thr	Gln	Pro	Pro	Pro	Pro	Arg		
	450					455		
		460						
Asn	Ser	Asn	Asn	Leu	Lys	Asn	Thr	Thr
Val	His	Pro	Lys	Leu	Gly	Arg		
465					470			
	475					480		
Ala	Pro	Lys	Phe	Thr	Gln	Ala	Leu	Gln
Pro	Arg	Ser	Arg	Asn	Asp	Leu		
				485				
490					495			
Pro	Leu	Leu	Pro	Ala	Gln	Thr	Thr	Ala
Thr	Pro	Asp	Val	Lys	Asn	Thr		
			500					505
				510				
Thr	Val	Thr	Pro	Ser	Val	Thr	Lys	Asp
Val	Ala	Leu	Ala	Ala	Val	Leu		
		515					520	
			525					
Val	Pro	Val	Leu	Val	Met	Ala	Leu	Thr
Thr	Leu	Ile	Leu	Ile	Leu	Val		
	530					535		
		540						

Cys	Ala	Trp	His	Trp	Arg	Asn	Arg	Lys	
Lys	Lys	Ala	Glu	Gly	Thr	Tyr			
545					550				
	555					560			
Asp	Leu	Pro	His	Trp	Asp	Arg	Ala	Gly	
Trp	Trp	Lys	Gly	Val	Lys	Gln			
				565					
570					575				
Leu	Leu	Pro	Ala	Lys	Ser	Val	Glu	His	
Glu	Glu	Thr	Pro	Val	Arg	Tyr			
			580						585
				590					
Ser	Asn	Ser	Glu	Val	Ser	His	Leu	Ser	
Pro	Arg	Glu	Val	Thr	Thr	Val			
		595					600		
			605						
Leu	Gln	Ala	Asp	Ser	Ala	Glu	Tyr	Ala	
Gln	Pro	Leu	Val	Gly	Gly	Ile			
	610					615			
		620							
Val	Gly	Thr	Leu	His	Gln	Arg	Ser	Thr	
Phe	Lys	Pro	Glu	Glu	Gly	Lys			
625					630				
	635					640			
Glu	Ala	Ser	Tyr	Ala	Asp	Leu	Asp	Pro	
Tyr	Asn	Ala	Pro	Val	Gln	Glu			
				645					
650					655				
Val	Tyr	His	Ala	Tyr	Ala	Glu	Pro	Leu	
Pro	Val	Thr	Gly	Pro	Glu	Tyr			
			660						665
				670					
Ala	Thr	Pro	Ile	Val	Met	Asp	Met	Ser	
Gly	His	Ser	Thr	Ala	Ser	Val			
		675					680		
			685						
Gly	Leu	Pro	Ser	Thr	Ser	Thr	Phe	Arg	
Thr	Ala	Gly	Asn	Gln	Pro	Pro			
	690					695			
		700							
Ala	Leu	Val	Gly	Thr	Tyr	Asn	Thr	Leu	
Leu	Ser	Arg	Thr	Asp	Ser	Cys			
705					710				
	715					720			
Ser	Ser	Gly	Gln	Ala	Gln	Tyr	Asp	Thr	
Pro	Lys	Gly	Gly	Lys	Pro	Ala			
				725					
730					735				
Ala	Ala	Pro	Glu	Glu	Leu	Val	Tyr	Gln	
Val	Pro	Gln	Ser	Thr	Gln	Glu			

740  
 750  
 Ala Ser Gly Ala Gly Arg Asp Glu Lys  
 Phe Asp Ala Phe Lys Glu Thr  
 755  
 760  
 765  
 Leu

<210> 9  
 <211> 2310  
 <212> DNA  
 <213> Rattus rattus  
 <400> 9

atggc g a g c c g g g c g c c g c t g a g a g c c g c g c g c  
 a g c c c g c a g g a t c c c g g a g g c c g g g c c 60  
 g c g c c c g c c g c c a c c g g c c g g g c c c g c t g c c c  
 a g c g c c g g c t g g t g t c c c c t c c c t c c t 120  
 g g c c g c a a c t c c t c c t c c a g g c c t c g g c t g c t c  
 c t t c t a c t g c t c c t a c t g c t c c c g g a c 180  
 g c t g g a g c c c a g a a a g g t g a t g g a t g t g g a c a c  
 a c t g t a c t a g g c c c t g a g a g t g g a a c c 240  
 c t t a c a t c c a t c a a c t a c c c a c a t a c c t a t c c t  
 a a c a g t a c t g t g t g t a a a t g g g a g a t t 300  
 c g a g t a a a g a c g g g a g a a a g a a t t c g c a t c a a g  
 t t c g g t g a c t t t g a c a t t g a a g a t t c t 360  
 g a t t a t t g t c a c c t t a a t t a c c t g a a a a t c t t t  
 a a t g g a a t t g g a g t c a g c a g a a c g g a a 420  
 a t a g g c a a g t a c t g t g g t c t g g g t t t a c a a a t g  
 a a t c a g t c a a t t g a g t c c a a a g g c a g t 480  
 g a a a t c a c a g t g c t g t t c a t g a g t g g a a t c c a t  
 g c t t c t g g t c g a g g a t t t t t g g c t t c t 540  
 t a c t c a g t t a t a g a t a a a c a a g a t t t a a t c a c t  
 t g t t t g g a t a c t g t a t c t a a t t t t t t g 600  
 g a a c c t g a g t t c a g t a a g t a c t g c c c a g c t g g c  
 t g t c t g c t g c c t t t t g c t g a a a t a t c t 660  
 g g a a c g a t t c c t c a t g g a t a t a g a g a t t c t t c a  
 c c g c t g t g t a t g g c t g g a a t c c a t g c a 720  
 g g a g t a g t g t c a g a t g t g c t g g g t g g c c a a a t c  
 a g c g t t g t g a t t a g c a a a g g c a c c c c a 780  
 t a t t a c g a a a g t t c t t t g g c c a a c a a t g t c a c t  
 t c c a t g g t g g g a t a c t t a t c t a c g a g t 840  
 c t g t t t a c a t t t a a g a c a a g t g g t t g c t a t g g g  
 a c t c t a g g g a t g g a g t c a g g t g t g a t c 900  
 g c c g a t c c c c a g a t a a c a g c a t c a t c t g t a c t g  
 g a g t g g a c t g a c c a c a t g g g g c a g g a g 960  
 a a c a g c t g g a a a c c c g a g a a g g c c a g g c t g a g a  
 a a a c c g g g g c c t c c c t g g g c t g c t t t t 1020  
 g c c a c t g a t g a g c a t c a g t g g c t g c a a a t t g a c  
 c t t a a t a a g g a g a a g a a g a t a a c a g g c 1080  
 a t c g t a a c c a c t g g a t c t a c c c t g a t a g a g c a c

a a t t a c t a t g t g t c t g c c t a c a g a g t t 1140  
c t g t a c a g t g a c g a t g g g c a g a a a t g g a c t g t g  
t a c a g a g a g c c t g g t g c g g c t c a g g a c 1200  
a a g a t a t t t c a a g g a a a c a a a g a t t a t c a c a a g  
g a t g t t c g t a a t a a c t t t t t g c c a c c a 1260  
a t t a t t g c a c g t t t c a t t a g a g t g a a c c c t g t c  
c a g t g g c a a c a g a a a a t t g c c a t g a a a 1320  
g t g g a a t t g c t g g g a t g t c a g t t c a c t c t g a a a  
g g t c g c c t t c c a a a g c t t a c t c a a c c t 1380  
c c c c c a c c t c g g a a c a g c a a t a a c c t c a a a a a c  
a c t a c a g t t c a t c c c a a a c t a g g t c g t 1440  
g c c c c t a a a t t t a c t c a a g c a c t c c a a c c a c g a  
a g t a g g a a t g a c c t t c c t c t g c t g c c g 1500  
g c c c a g a c a a c t g c c a c t c c t g a t g t c a a a a a c  
a c g a c t g t g a c t c c c a g t g t g a c c a a a 1560  
g a t g t t g c a c t g g c c g c c g t t c t g g t t c c t g t g  
c t g g t c a t g g c c c t c a c c a c a c t c a t c 1620  
c t c a t t c t a g t g t g t g c t t g g c a t t g g a g a a a c  
a g a a a g a a a a a a g c c g a a g g c a c c t a t 1680  
g a t t t a c c c c a c t g g g a t c g g g c a g g c t g g t g g  
a a a g g a g t g a a g c a g c t t c t c c c t g c c 1740  
a a a t c g g t g g a a c a c a g a g g a g a c g c c a g t g c g c  
t a c a g c a a c a g t g a a g t t a g t c a c c t g 1800  
a g c c c g a g g g a a g t c a c g a c a g t g c t g c a a g c t  
g a t t c t g c a g a a t a c g c a c a g c c c c t c 1860  
g t g g g a g g a a t t g t t g g c a c a c t c c a t c a g a g a  
t c t a c c t t t a a a c c t g a a g a a g g a a a a 1920  
g a a g c g a g c t a c g c a g a t c t a g a c c c c t a c a a c  
g c t c c a g t a c a g g a a g t g t a t c a t g c c 1980  
t a c g c t g a g c c g c t g c c g g t a a c g g g g c c t g a g  
t a c g c a a c c c c a a t c g t c a t g g a c a t g 2040  
t c a g g g c a c t c c a c a g c c t c a g t t g g t c t g c c c  
t c c a c a t c c a c t t t c a g a a c t g c a g g g 2100  
a a c c a g c c t c c c g c a t t a g t g g g a a c t t a c a a c  
a c t c t t c t c t c c a g g a c t g a c a g c t g t 2160  
t c c t c g g g c c a g g c t c a g t a c g a c a c c c c a a a a  
g g t g g g a a g c c a g c a g c t g c c c c a g a g 2220  
g a a c t g g t g t a c c a g g t g c c g c a g a g c a c c c a g  
g a a g c a t c a g g a g c a g g a a g g g a t g a g 2280  
a a a t t t g a t g c t t t t a a a g a a a c c c t t t g a  
2310

<210> 10

<211> 22

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 10

c t g c t c c a a c t c c t c c t c c t t c

22

<210> 11

<211> 26

```

<212> DNA
<213> Mus musculus
<400> 11
ctgcttcatt cctttccacc aacctg
26

<210> 12
<211> 28
<212> DNA
<213> Rattus rattus
<400> 12
tgtgctggtc atggtcctca ctactctc
28

<210> 13
<211> 22
<212> DNA
<213> Rattus rattus
<400> 13
tgtgctttaa aacgatgctt tg
22

<210> 14
<211> 20
<212> DNA
<213> Mus musculus
<400> 14
gcactatgcg ggcggattgc
20

<210> 15
<211> 24
<212> DNA
<213> Mus musculus
<400> 15
ggatgtaagg gttccactct cagg
24

<210> 16
<211> 17
<212> PRT
<213> Rabbit calicivirus
<400> 16
Gly Glu Arg Ile Arg Ile Lys Phe Gly
Asp Gly Asp Ile Glu Asp Ser
   1                   5
   10                   15
Asp

<210> 17
<211> 18
<212> PRT
<213> Rabbit calicivirus
<400> 17
Gln Asp Lys Ile Phe Gln Gly Asn Lys

```

Asp Tyr His Lys Asp Val Arg  
 1 5  
 10 15  
 Asn Asn

<210> 18  
 <211> 24  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 18  
 Met Pro Met Gly Ser Leu Gln Pro Leu  
 Ala Thr Leu Tyr Leu Leu Gly  
 1 5  
 10 15  
 Met Leu Val Ala Ser Val Leu Ala

20

<210> 19  
 <211> 19  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 19  
 cccagcaagg tgatggatg  
 19

<210> 20  
 <211> 27  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 20  
 caagaatcag aatcttcaat gtcaaag  
 27

<210> 21  
 <211> 30  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 21  
 cctgagagtg gaacccttac atccataaac  
 30

<210> 22  
 <211> 19  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 23  
 gaagg tgaag gtcggagtc  
 19

<210> 23  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 23

g a a g a t g g t g a t g g g a t t t c

20

< 210 > 24

< 211 > 20

< 212 > DNA

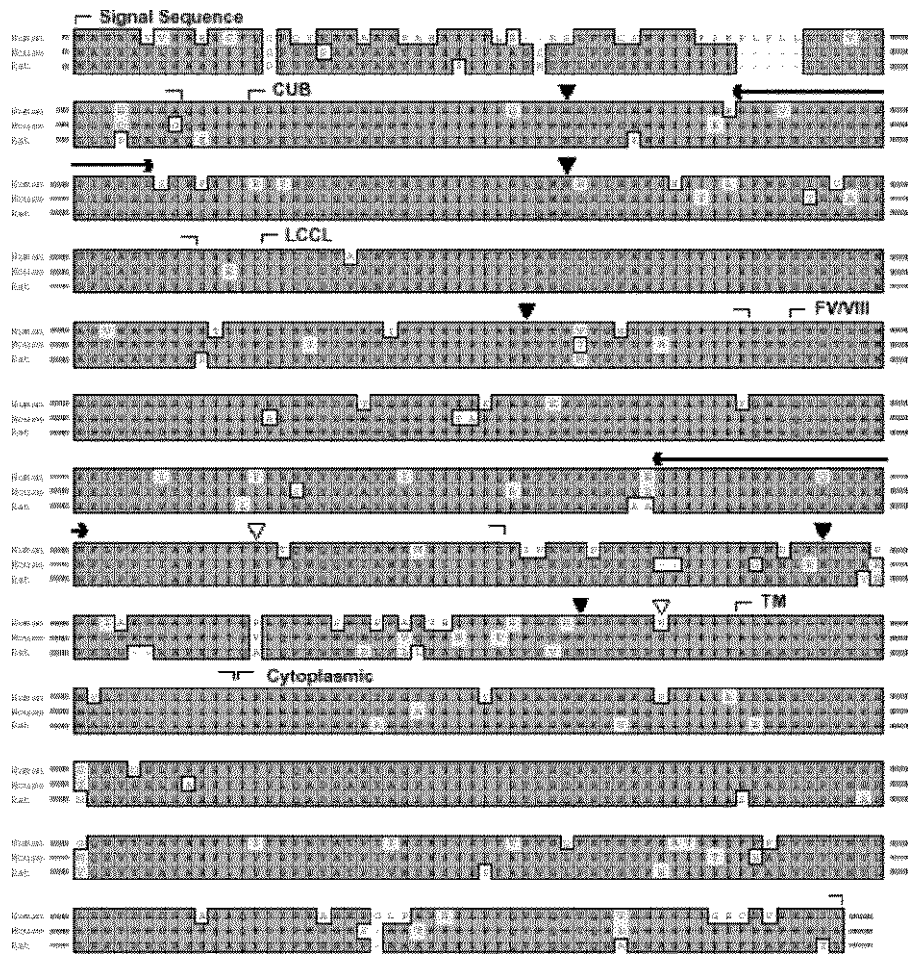
< 213 > Homo sapiens

< 400 > 24

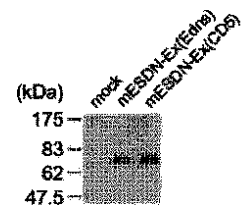
c a a g c t t c c c g t t c t c a g c c

20

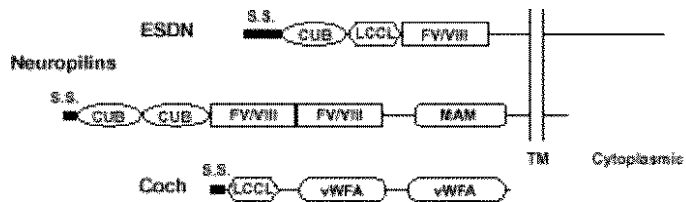
【図1】



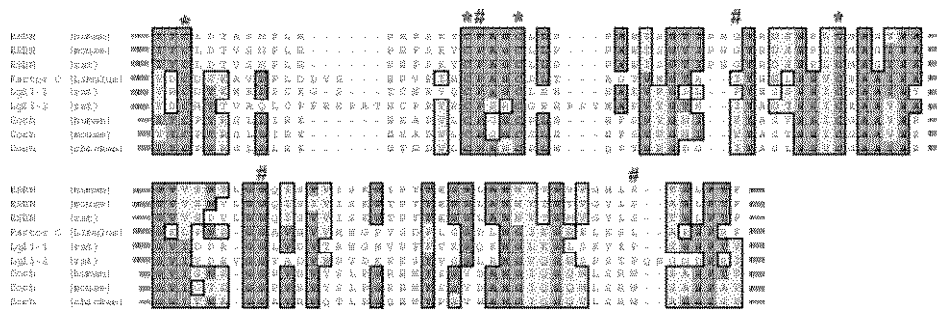
【図8】



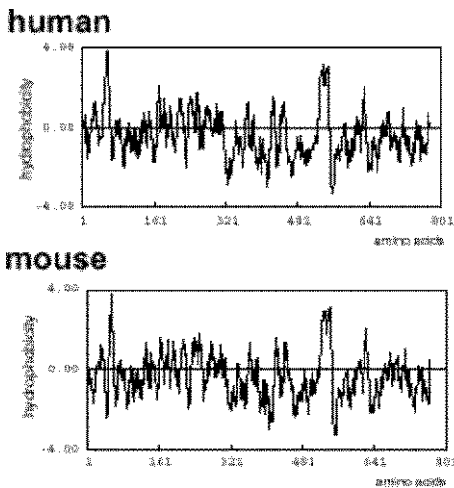
【図2】



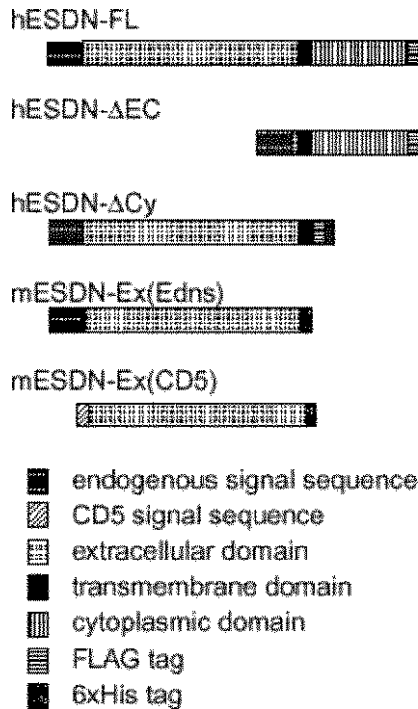
【図3】



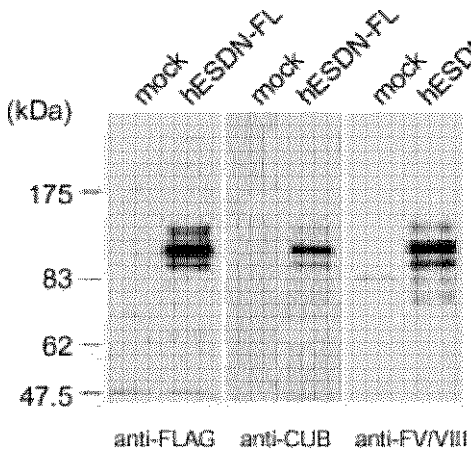
【図4】



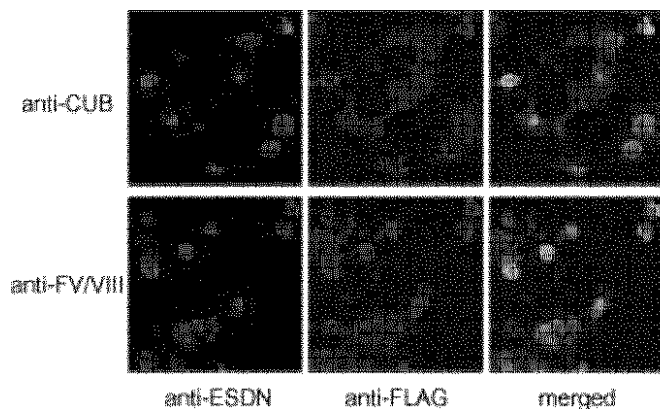
【図5】



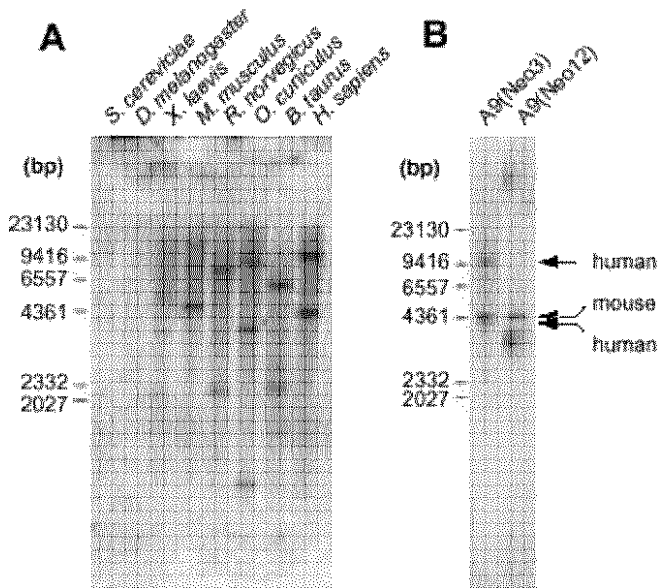
【図6】



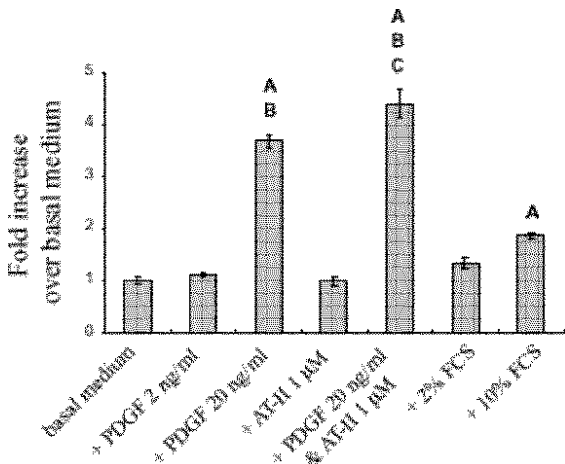
【図7】



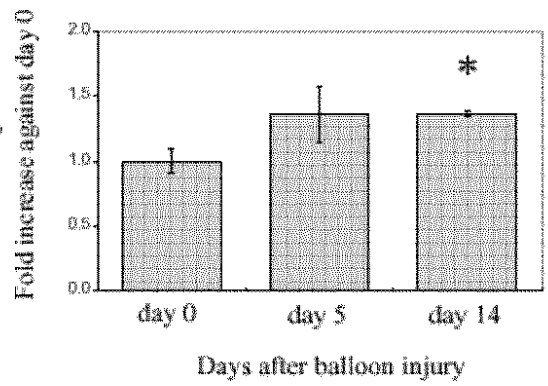
【図9】



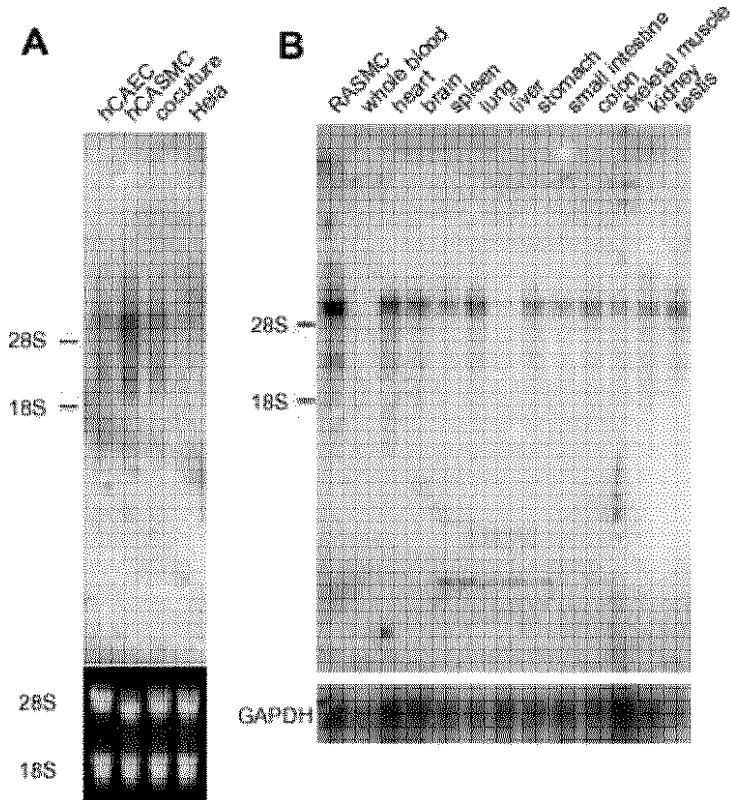
【図11】



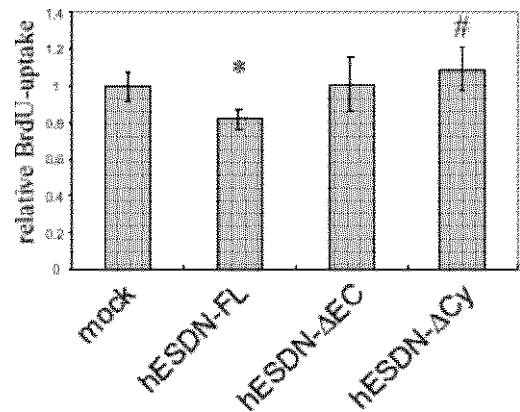
【図12】



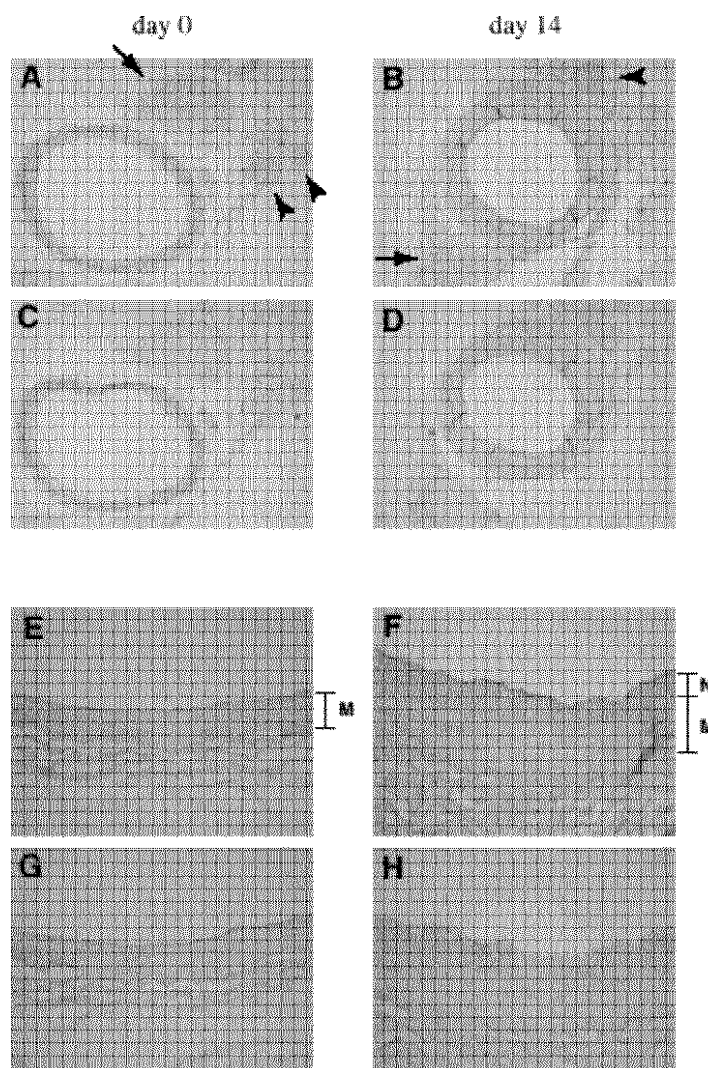
【図10】



【図14】



【図13】



フロントページの続き

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

識別記号

F I

テ-マコード (参考)

A 6 1 P 9/10  
43/00

1 0 1  
1 0 5

C 0 7 K 14/47  
16/18

4 C 0 8 5  
4 H 0 4 5

C 0 7 K 14/47  
16/18

C 1 2 N 1/15  
1/19

C 1 2 N 1/15  
1/19

1/21  
C 1 2 P 21/02

C

1/21  
5/10

G 0 1 N 33/15  
33/50

Z

C 1 2 P 21/02  
G 0 1 N 33/15

33/50  
33/53

Z

33/53

C 1 2 P 21/08  
C 1 2 N 15/00

D

Z N A A

// C 1 2 P 21/08

5/00  
A 6 1 K 37/02

A

(72)発明者 小夫家 和宏  
京都府京都市左京区一乗寺松田町76

\* F ターム(参考) 2G045 AA34 AA35 BB50 CB01 DA13  
DA36 FB02 FB03 FB08  
4B024 AA01 AA11 BA80 CA04 CA07  
CA09 CA12 CA20 DA02 DA03  
EA04 FA18 GA13 HA11 HA13  
HA14  
4B064 AG01 AG27 CA10 CA19 CA20  
CC01 CC24 DA01 DA13  
4B065 AA01X AA58X AA72X AA90X  
AA91Y AA93X AA93Y AB01  
AC14 BA02 BA05 CA24 CA43  
CA44 CA46  
4C084 AA02 AA03 AA06 AA07 BA01  
BA08 BA22 BA23 CA18 MA13  
MA17 MA22 MA23 MA35 MA37  
MA41 MA43 MA52 MA66 MA70  
NA14 ZA392 ZA452 ZB212  
4C085 AA13 AA14 BB11 CC02 CC05  
CC22 CC23 GG02 GG08 GG10  
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10  
BA41 CA40 DA75 DA76 EA20  
EA50 FA71 FA72 FA74

(54)【発明の名称】 新規なポリペプチド E S D N、その製造方法、E S D N をコードする c D N A、その c D N A からなるベクター、そのベクターで形質転換された宿主細胞、E S D N の抗体、E S D N または抗体を含有する薬学的組成物、E S D N を用いたスクリーニング方法、および抗 E S D N 抗体を用いた E S D N の免疫化学測定法

专利名称(译)	新的多肽ESDN，其制备方法，编码ESDN的cDNA，包含该cDNA的载体，用该载体转化的宿主细胞，ESDN的抗体，含有ESDN或抗体的药物组合物，ESDN使用抗ESDN抗体筛选ESDN的方法和免疫化学方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP2003189872A</a>	公开(公告)日	2003-07-08
申请号	JP2001397725	申请日	2001-12-27
[标]申请(专利权)人(译)	小野药品工业株式会社 本庶 佑		
申请(专利权)人(译)	小野制药有限公司 本庶 佑		
[标]发明人	本庶佑 田代啓 小夫家和宏		
发明人	本庶 佑 田代 啓 小夫家 和宏		
IPC分类号	G01N33/50 A61K38/00 A61K39/395 A61P9/10 A61P43/00 C07K14/47 C07K14/705 C07K16/18 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12P21/02 C12P21/08 G01N33/15 G01N33/53		
CPC分类号	A61K38/00 A61P9/10 A61P43/00 C07K14/705 C07K16/20 C07K16/36 G01N2333/71 G01N2800/323		
FI分类号	A61K39/395.D A61K39/395.N A61P9/10 A61P9/10.101 A61P43/00.105 C07K14/47 C07K16/18 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02.C G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D C12P21/08 C12N15/00.ZNA.A C12N5/00.A A61K37/02 A61K38/00 A61K38/16 A61K38/17 C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A C12N5/00.101 C12N5/10		
F-TERM分类号	2G045/AA34 2G045/AA35 2G045/BB50 2G045/CB01 2G045/DA13 2G045/DA36 2G045/FB02 2G045/FB03 2G045/FB08 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA80 4B024/CA04 4B024/CA07 4B024/CA09 4B024/CA12 4B024/CA20 4B024/DA02 4B024/DA03 4B024/EA04 4B024/FA18 4B024/GA13 4B024/HA11 4B024/HA13 4B024/HA14 4B064/AG01 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CA20 4B064/CC01 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA01X 4B065/AA58X 4B065/AA72X 4B065/AA90X 4B065/AA91Y 4B065/AA93X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/BA05 4B065/CA24 4B065/CA43 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA03 4C084/AA06 4C084/AA07 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA22 4C084/BA23 4C084/CA18 4C084/MA13 4C084/MA17 4C084/MA22 4C084/MA23 4C084/MA35 4C084/MA37 4C084/MA41 4C084/MA43 4C084/MA52 4C084/MA66 4C084/MA70 4C084/NA14 4C084/ZA392 4C084/ZA452 4C084/ZB212 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BB11 4C085/CC02 4C085/CC05 4C085/CC22 4C085/CC23 4C085/GG02 4C085/GG08 4C085/GG10 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA71 4H045/FA72 4H045/FA74		
代理人(译)	大家 邦久		
其他公开文献	JP3911416B2		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		
摘要(译)			

【图 8】

[结构]新型多肽ESDN，其制备方法，编码ESDN的cDNA，包含该cDNA的载体，用该载体转化的宿主细胞，ESDN的抗体，含有ESDN的药物组合物或抗体，测量ESDN的方法，测量ESDN的试剂以及使用ESDN的筛选方法。[效果]由于本发明的ESDN蛋白在冠状动脉细胞和平滑肌细胞中表达，并且还在球囊损伤动脉的血管平滑肌和颈总动脉的介质中表达，它可用于治疗再狭窄和动脉硬化。

