

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3911416号
(P3911416)

(45) 発行日 平成19年5月9日(2007.5.9)

(24) 登録日 平成19年2月2日(2007.2.2)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 D
C O 7 K 14/47 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 N
C O 7 K 16/18 (2006.01)	C O 7 K 14/47
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	C O 7 K 16/18

請求項の数 4 (全 57 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2001-397725 (P2001-397725)	(73) 特許権者 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
(22) 出願日 平成13年12月27日(2001.12.27)	(73) 特許権者 396023812 本庶 佑 京都府京都市左京区岩倉大鷲町19-4
(65) 公開番号 特開2003-189872 (P2003-189872A)	(74) 代理人 100081086 弁理士 大家 邦久
(43) 公開日 平成15年7月8日(2003.7.8)	(72) 発明者 本庶 佑 京都府京都市左京区岩倉大鷲町19-4
審査請求日 平成16年7月27日(2004.7.27)	(72) 発明者 田代 啓 京都府京都市北区小山東大野町93
特許法第30条第1項適用 2001年9月7日 発行 の「The Journal of Biologic al Chemistry Vol. 276, No. 3 6, pp. 34105-34114」に発表	(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

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規なポリペプチドESDN、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

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

配列番号2で示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドの発現増加を測定する方法を用いることを特徴とするPTCA後の再狭窄の検査方法。

【請求項2】

配列番号2で示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドの発現増加を測定する方法が、配列番号2で示されるアミノ酸配列からなる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を用いることを特徴とする免疫化学的測定方法である請求項1記載の検査方法。

【請求項3】

配列番号2で示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードするcDNAの発現増加を測定する方法を用いることを特徴とするPTCA後の再狭窄の検査方法。

【請求項4】

配列番号2で示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードするcDNAの発現増加を測定する方法が、RT-PCRを用いることを特徴とする請求項3記載の検査方法。

【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日目に胎生死につながる。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日目に胎生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、血管のリ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- β 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

10

20

30

40

50

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。

10

【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(シグナルシークエンストラップ(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便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)。

20

【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。

30

【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。

40

【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】

50

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 配列を含む全長鎖 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。

10

【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

20

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、

30

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 / または担体を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 / または担体を含有することを特徴とする P T C A 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 / または担体を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、

40

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 P T C A 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

50

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、ストリンジェント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

10

20

30

40

50

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ビオースに、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 μ 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

10

20

30

40

50

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遺伝子の上流に哺乳類の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ペ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ペ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の上流に得られた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年に発刊)またはCurrent Protocol in Molecular Biology(F.M.Ausubelら編、John Wiley & Sons, Inc.より発刊)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の上流に(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

10

20

30

40

50

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、Y T 4 5 5 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。

10

【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 m

20

【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。

30

【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。

40

【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、

50

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。

10

【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、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。

20

30

【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、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。

40

「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

50

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 V E G F 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。

【 0 0 5 3 】

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 c D N A 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 D N A 導入に適したベクター) により、提供される。

【 0 0 5 4 】

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。

10

【 0 0 5 5 】

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クラムを作製して、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。

【 0 0 5 6 】

また該ポリペプチドを用いて、例えばウエスト - ウェスタン法により、または該 c D N A (好ましくは該ポリペプチドをコードする c D N A) 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。

20

【 0 0 5 7 】

さらに本ポリペプチドを用いることによって、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。

【 0 0 5 8 】

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

30

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。

【 0 0 5 9 】

本発明の c D N A 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鑄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 D N A (R N A) 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。

40

また、本発明の c D N A をプローブとしてゲノミック (genomic) D N A を分離できる。

【 0 0 6 0 】

【 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。

【 0 0 6 1 】

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、 1 0 0 μ g から 1 0 0 m g 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、 1 0 μ g から 1 0 0 m g の範囲で

50

、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。

10

【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（繊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。

20

【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。このような組成物は、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。

30

【0069】

本発明による非経口投与のための注射剤としては、無菌の水性または非水性的溶液剤、懸濁剤、乳濁剤を包含する。水性または非水性的溶液剤、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。非水性的希釈剤としては、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。

40

【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。

50

【 0 0 7 2 】

実施例 1 : S S T によるスクリーニング

ヒト冠動脈初代培養内皮細胞 (h C A E C) および平滑筋細胞 (h C A S M C) (Clontec h)、そしてそれらの共培養 (同じ細胞数の h C A E C と h C A S M C を混ぜ、 E G M - 2 - M V (商品名、BioWhittakerより購入) を用いて 2 日間培養) をソースとして c D N A ライブラリーを構築した (特願平 10-119731 号参照)。次に酵母 S S T 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 c D N A ライブラリーから C U B ドメインを有する E S D N を得た。

【 0 0 7 3 】

実施例 2 : ヒト、マウス、ラットの全長 c D N A クローニング

全長 c D N A を得るためにマラソン・c D N A・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' - R A C E (Rapid Amplification of cDNA End) 法を用いて 5' - 、 3' - 末端 c D N A 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、 R T - P C R によりラット、マウスの E S D N の単離も行なった。

マウスプライマー

5' - C T G C T C C A A C T C C T C C T C C T T C - 3' (配列番号 1 0)

5' - C T G C T T C A T T C C T T T C C A C C A A C C T G - 3' (配列番号 1 1)

ラットプライマー

5' - T G T G C T G G T C A T G G T C C T C A C T A C T C T C - 3' (配列番号 1 2)

5' - T G T G C T T T A A A A C G A T G C T T T G - 3' (配列番号 1 3)

その結果、E S D N 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 A T G を含む 5' 末端配列を見出すことができなかつた。この原因として E S D N の 5' 末端領域の高い G C 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 (M e t) を含む 2 個の陽性クローンを得た。そこでこの M e t 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' - G C A C T A T G C G G G C G G A T T G C - 3' (配列番号 1 4)

antisense primer : 5' - G G A T G T A A G G G T T C C A C T C T C A G G - 3' (配列番号 1 5)

と共に R T - P C R 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 8 4 ~ 5 % の相同性、マウスとラットでは 9 2 % の相同性を表した。ヒト、ラットおよびマウスの E S D N のアライメントを図 1 に示す。

モチーフ検索の結果から、E S D N は、細胞外に 1 個の C U B 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 C U B 、 2 個の FV / VIII ドメイン、 1 個の M A M 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 C o c h 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 C o c h においては、D F N A 9 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。

【 0 0 7 4 】

実施例 3 : 哺乳動物細胞を用いたヒト E S D N 蛋白の発現と抗ペプチド抗体による同定
ヒト全長 c D N A を哺乳動物細胞用発現ベクターのオリジナル V 5 エピトープをファッグ

10

20

30

40

50

・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) やリポフェクトアミン (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、細胞のライセイト (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)

G l y G l u A r g I l e A r g I l e L y s P h e G l y A s p G l y A s p I l e G l u A s p S e r A s 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

G l n A s p L y s I l e P h e G l n G l y A s n L y s A s p T y r H i s L y s A s p V a l A r g A s n A s n (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KLH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、ECL (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セイト (lysate) には認められないバンドが、127、106、93kDa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、ESDN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・マイクロスコプ (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ESDNの細胞外領域のC端にHis-tagを付けたmESDN-Ex (Edns) やヒトCD5のシグナル配列：MetProMetGlySerLeuGlnProLeuAlaThrLeuTyrLeuLeuGlyMetLeuValAlaSerValLeuAla (配列番号18) に置換したmESDN-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、mESDN-Ex (Edns) とmESDN-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ESDNのシグナル配列は、39アミノ酸 (約4kDa) 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：ESDN蛋白のサザーン・ズープロット (southern zooblot) 解析

[³²P] dCTP-ラベルしたヒトESDN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) の種におけるサザーン・ズープロット (southern zooblot) 解析を行なった (37、1xSSC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、ESDN

10

20

30

40

50

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 9 A に示す。)。

【 0 0 7 7 】

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 S T S (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 A 9 (Neo3)、A 9 (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 A 9 (Neo3)、A 9 (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、A 9 (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 9 B に示す。)。

【 0 0 7 8 】

実施例 7 : E S D N m R N A の発現部位の解析

培養ヒト細胞のノザン (Northern) 解析は、h C A E C、h C A S M C そしてそれらの共培養からトータル (total) R N A を T R I z o l (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) R N A を T R I z o l L S (全血に対して)、T R I z o l (その他の組織や培養細胞に対して) により抽出した。次に p o l y (A) R N A は、「OligotexTM-dT30 Super」 (商品名、Roche Molecular Biochemicals社より購入) により精製した。次に [³²P] d C T P - ラベルしたヒト、ラット E S D N や G A P D H c D N A をプローブとして用い、ノザン・プロット (Northern blot) 解析 (6.5、0.2 × S S C により洗浄) を行なった。その結果、h C A S M C 細胞において強い発現が認められた (6.4、3 k b)。一方 h C A E C 細胞においては、h C A S M C 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 m R N A の発現の変化は認められなかった (図 10 A 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 E S D N m R N A 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 10 B に示す。)。

【 0 0 7 9 】

実施例 8 : ヒト冠動脈平滑筋細胞を用いた E S D N 蛋白の発現

h C A S M C を血清 (serum) 飢餓の状態の D M E M / 2 m M グルタミン (glutamine) で 4 8 時間培養した。次に指定濃度の P D G F - B B、A T - I I、F C S (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) R N A は T r i z o l (商品名、Life Technologies社より購入) により調製し、c D N A 合成はスーパースクリプト・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 m R N A は、リアルタイム定量 R T - P C R (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) リバース (Reverse) プライマーの配列は以下の通りである。

ESDN forward: 5' - C C C A G C A A G G T G A T G G A T G - 3' (配列番号 19)

ESDN reverse: 5' - C A A G A A T C A G A A T C T T C A A T G T C A A A G - 3' (配列番号 20)

ESDN probe: 5' - (6 - F A M) - C C T G A G A G T G G A A C C C T T A C A T C C A T A A A C - (T A M R A) - 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。

10

20

30

40

50

ヒト GAPDH のシーケンスは以下の通りである。

human GAPDH forward: 5' - G A A G G T G A A G G T C G G A G T C - 3' (配列番号 22)

human GAPDH reverse: 5' - G A A G A T G G T G A T G G G A T T T C - 3' (配列番号 23)

human GAPDH probe: 5' - (V I C) - C A A G C T T C C C G T T C T C A G C C - (T A M R A) - 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-IT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酔下にして、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)/CIAAにより2回抽出し、CIAA抽出を1回行なった。セルフェクト(Cell Plect)(商品名、Amersham Life Science社より購入)を用いて293T細胞にトランス

10

20

30

40

50

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。)

10

【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。

【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Lg1-1、ヒトCoch、マウスCochおよびラットCochのLCC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ト解析を表わす。

【図7】 細胞膜表面でESDNが発現されている様子を表わす。

20

【図8】 開裂したシグナル配列のウエスタンブロット解析を表わす。

【図9】 AはヒトESDNのcDNAを用いたサザンブロット解析を表わす。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とのノザンブロット解析を示す。

【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。

【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。

30

【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.

10

<130> ONP3979

<160> 24

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 2328

20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> sig_peptide

<222> (1)..(198)

<220>

<221> mat_peptide

30

<222> (199)..(2328)

<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

40

-65

-60

-55

95	100	105	110	
gga cgc gga ttt ttg gcc tca tac tct gtt ata gat aaa caa gat cta	576			
Gly Arg Gly Phe Leu Ala Ser Tyr Ser Val Ile Asp Lys Gln Asp Leu				
	115	120	125	
att act tgt ttg gac act gca tcc aat ttt ttg gaa cct gag ttc agt	624			
Ile Thr Cys Leu Asp Thr Ala Ser Asn Phe Leu Glu Pro Glu Phe Ser				
	130	135	140	10
aag tac tgc cca gct ggt tgt ctg ctt cct ttt gct gag ata tct gga	672			
Lys Tyr Cys Pro Ala Gly Cys Leu Leu Pro Phe Ala Glu Ile Ser Gly				
	145	150	155	
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			20
Val His Ala Gly Val Val Ser Asn Thr Leu Gly Gly Gln Ile Ser Val				
	175	180	185	
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 tct gtg gtg gga cac tta tct aca agt ctt ttt aca ttt aag	864			
Val Thr Ser Val Val Gly His Leu Ser Thr Ser Leu Phe Thr Phe Lys				30
	210	215	220	
aca agt gga tgt tat gga aca ctg ggg atg gag tct ggt gtg atc gcg	912			
Thr Ser Gly Cys Tyr Gly Thr Leu Gly Met Glu Ser Gly Val Ile Ala				
	225	230	235	
gat cct caa ata aca gca tca tct gtg ctg gag tgg act gac cac aca	960			
Asp Pro Gln Ile Thr Ala Ser Ser Val Leu Glu Trp Thr Asp His Thr				
	240	245	250	40
ggg caa gag aac agt tgg aaa ccc aaa aaa gcc agg ctg aaa aaa cct	1008			

Gly	Gln	Glu	Asn	Ser	Trp	Lys	Pro	Lys	Lys	Ala	Arg	Leu	Lys	Lys	Pro				
255					260					265					270				
gga	ccg	cct	tgg	gct	gct	ttt	gcc	act	gat	gaa	tac	cag	tgg	tta	caa	1056			
Gly	Pro	Pro	Trp	Ala	Ala	Phe	Ala	Thr	Asp	Glu	Tyr	Gln	Trp	Leu	Gln				
				275					280						285				
ata	gat	tig	aat	aag	gaa	aag	aaa	ata	aca	ggc	att	ata	acc	act	gga	1104			
Ile	Asp	Leu	Asn	Lys	Glu	Lys	Lys	Ile	Thr	Gly	Ile	Ile	Thr	Thr	Gly				10
			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				20
		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	Asp	Tyr	His	Gln	Asp	Val				
335					340						345				350				
cgt	aat	aac	ttt	tig	cca	cca	att	att	gca	cgt	ttt	att	aga	gtg	aat	1296			
Arg	Asn	Asn	Phe	Leu	Pro	Pro	Ile	Ile	Ala	Arg	Phe	Ile	Arg	Val	Asn				
				355					360						365				
cct	acc	caa	tgg	cag	cag	aaa	att	gcc	atg	aaa	atg	gag	ctg	ctc	gga	1344			30
Pro	Thr	Gln	Trp	Gln	Gln	Lys	Ile	Ala	Met	Lys	Met	Glu	Leu	Leu	Gly				
				370				375							380				
tgt	cag	ttt	att	cct	aaa	ggt	cgt	cct	cca	aaa	ctt	act	caa	cct	cca	1392			
Cys	Gln	Phe	Ile	Pro	Lys	Gly	Arg	Pro	Pro	Lys	Leu	Thr	Gln	Pro	Pro				
		385					390						395						
cct	cct	cgg	aac	agc	aat	gac	ctc	aaa	aac	act	aca	gcc	cct	cca	aaa	1440			
Pro	Pro	Arg	Asn	Ser	Asn	Asp	Leu	Lys	Asn	Thr	Thr	Ala	Pro	Pro	Lys				40
		400				405									410				

560	565	570		
cca gaa gaa gga aaa gaa gca ggc tat gca gac cta gat cct tac aac	1968			
Pro Glu Glu Gly Lys Glu Ala Gly Tyr Ala Asp Leu Asp Pro Tyr Asn				
575	580	585	590	
tca cca ggg cag gaa gtt tat cat gcc tat gct gaa cca ctc cca att	2016			
Ser Pro Gly Gln Glu Val Tyr His Ala Tyr Ala Glu Pro Leu Pro Ile				
	595	600	605	10
acg ggg cct gag tat gca acc cca atc atc atg gac atg tca ggg cac	2064			
Thr Gly Pro Glu Tyr Ala Thr Pro Ile Ile Met Asp Met Ser Gly His				
	610	615	620	
ccc aca act tca gtt ggt cag ccc tcc aca tcc act ttc aag gct acg	2112			
Pro Thr Thr Ser Val Gly Gln Pro Ser Thr Ser Thr Phe Lys Ala Thr				
	625	630	635	
ggg aac caa cct ccc cca cta gtg gga act tac aat aca ctt ctc tcc	2160			20
Gly Asn Gln Pro Pro Pro Leu Val Gly Thr Tyr Asn Thr Leu Leu Ser				
	640	645	650	
agg act gac agc tgc tcc tca gcc cag gcc cag tat gat acc ccg aaa	2208			
Arg Thr Asp Ser Cys Ser Ser Ala Gln Ala Gln Tyr Asp Thr Pro Lys				
	655	660	665	670
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				30
	675	680	685	
cca cag agc aca caa gaa gta tca gga gca gga agg gat ggg gaa tgt	2304			
Pro Gln Ser Thr Gln Glu Val Ser Gly Ala Gly Arg Asp Gly Glu Cys				
	690	695	700	
gat gtt ttt aaa gaa atc ctt tga	2328			
Asp Val Phe Lys Glu Ile Leu				
	705	710		40

Ile Thr Cys Leu Asp Thr Ala Ser Asn Phe Leu Glu Pro Glu Phe Ser	
195	200
Lys Tyr Cys Pro Ala Gly Cys Leu Leu Pro Phe Ala Glu Ile Ser Gly	
210	215
Thr Ile Pro His Gly Tyr Arg Asp Ser Ser Pro Leu Cys Met Ala Gly	
225	230
Val His Ala Gly Val Val Ser Asn Thr Leu Gly Gly Gln Ile Ser Val	10
245	250
Val Ile Ser Lys Gly Ile Pro Tyr Tyr Glu Ser Ser Leu Ala Asn Asn	
260	265
Val Thr Ser Val Val Gly His Leu Ser Thr Ser Leu Phe Thr Phe Lys	
275	280
Thr Ser Gly Cys Tyr Gly Thr Leu Gly Met Glu Ser Gly Val Ile Ala	
290	295
Asp Pro Gln Ile Thr Ala Ser Ser Val Leu Glu Trp Thr Asp His Thr	
305	310
Gly Gln Glu Asn Ser Trp Lys Pro Lys Lys Ala Arg Leu Lys Lys Pro	
325	330
Gly Pro Pro Trp Ala Ala Phe Ala Thr Asp Glu Tyr Gln Trp Leu Gln	
340	345
Ile Asp Leu Asn Lys Glu Lys Lys Ile Thr Gly Ile Ile Thr Thr Gly	30
355	360
Ser Thr Met Val Glu His Asn Tyr Tyr Val Ser Ala Tyr Arg Ile Leu	
370	375
Tyr Ser Asp Asp Gly Gln Lys Trp Thr Val Tyr Arg Glu Pro Gly Val	
385	390
Glu Gln Asp Lys Ile Phe Gln Gly Asn Lys Asp Tyr His Gln Asp Val	
405	410
Arg Asn Asn Phe Leu Pro Pro Ile Ile Ala Arg Phe Ile Arg Val Asn	40

agaactgaaa taggcaaata ctgtggctcg gggttgcaaa tgaaccattc aatigaatca 480
 aaaggcaatg aaatcacatt gctgttcacg agtggaaatc atgtttctgg acgeggattt 540
 ttggcctcat actctgttat agataaacia gatciaatta ctgttttggc cactgcatcc 600
 aatTTTTtgg aacctgagtt cagtaagtac tgeccagctg gttgtctgct tccTTTTtget 660
 gagatatctg gaacaattcc tcatggatat agagattcct cgccattgtg catggctggg 720
 gtgcatgcag gactagtgct aaacacgttg ggcggccaaa tcagtgttgt aattagtaaa 780
 ggtattccct attatgaaag ttctttggct aacaacgtca catctgtggg gggacactta 840
 tctacaagtc tttttacatt taagacaagt ggatgttatg gaacactggg gatggagtct 900
 ggtgtgatcg cggatcctca aataacagca tcatctgtgc tggagtggac tgaccacaca 960
 gggcaagaga acagtiggaa acccaaaaaa gccaggctga aaaaacctgg accgccttgg 1020
 gctgcttttg ccactgatga ataccagtgg ttacaaatag atttgaataa ggaaaagaaa 1080
 ataacaggca ttataaccac tggatccacc atgggtggagc acaattacta tgtgtctgcc 1140
 tacagaatcc tgtacagtga tgatgggcag aaatggactg tgtacagaga gccitgggtg 1200
 gagcaagata agatatttca aggaaacaaa gattatcacc aggatgtgcg taataacttt 1260
 ttgccaccaa ttattgcacg ttttattaga gtgaatccta cccaatggca gcagaaaatt 1320
 gccatgaaaa tggagctgct cggatgtcag ttatttcta aaggctgctc tccaaaactt 1380
 actcaacctc caccctctcg gaacagcaat gacctcaaaa aacttacagc ccttccaaaa 1440
 atagccaaag gtcgtgcccc aaaatttacc caaccactac aacctcgcag tagcaatgaa 1500
 tttctgcac agacagaaca aacaactgcc agtcttgata tcagaaatac taccgtaact 1560
 ccaaatgtaa ccaaagatgt agcgcitggct gcagttcttg tccctgtgct ggctcatggc 1620
 ctcactactc tcattctcat attagtgtgt gcttggcact ggagaaacag aaagaaaaaa 1680
 actgaaggca cctatgactt accttactgg gaccgggcag gtitggttgaa aggaatgaag 1740
 cagtttctc ctgcaaaagc agtggaccat gaggaaacce cagttcgcta tagcagcagc 1800
 gaagttaatc acctgagtec aagagaagtc accacagtgc tgcaggctga ctctgcagag 1860
 tatgctcagc cactggtagg aggaatgtt ggtacacttc atcaaagatc tacctttaa 1920
 ccagaagaag gaaaagaagc aggcctatgca gacctagatc cttaacaactc accagggcag 1980
 gaagtttatc atgcctatgc tgaaccactc ccaattacgg ggcttgagta tgcaacccca 2040
 atcatcatgg acatgtcagg gcaccccaaca acttcagtig gtcagccctc cacatccact 2100
 ttcaaggcta cggggaacca acctccccca ctagtgggaa cttaacaatac acttctctcc 2160

10

20

30

40

aggactigaca gctgctcctc agcccaggcc cagtaigata ccccgaaagc tgggaagcca 2220
 ggtctacctg ccccagacga attggigtac caggigccac agagcacaca agaagtatca 2280
 ggagcaggaa gggatgggga atgtgatgtt tttaaagaaa tccttga 2328

<210> 4

<211> 2310

<212> DNA

10

<213> Mus musculus

<220>

<221> sig_peptide

<222> (1)..(198)

<220>

<221> mat_peptide

<222> (199)..(2310)

20

<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

30

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

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

-50 -45 -40 -35

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

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

-30 -25 -20

cga ctg ctc ctt ctg ctg ctc cta ctg ctc cag gac gct gga ggc cag 192

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

40

ata gaa cac agt tac tat gtg tct gcc tac aga gtc ctg tac agt gac	1152	
Ile Glu His Ser Tyr Tyr 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	10
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 ctg ctc gga tgt cag ttt	1344	
Trp Gln Gln Lys Ile Ala Met Lys Val Glu Leu Leu Gly Cys Gln Phe		20
370 375 380		
act ctc aaa ggt cgc ctt cca aag ctt act cca cct cct cgg aac ggc	1392	
Thr Leu Lys Gly Arg Leu Pro Lys Leu Thr Pro Pro Pro Arg Asn Gly		
385 390 395		
aat aac ctc aga aat act aca gct cgt ccc aaa cta ggt aaa ggt cgt	1440	
Asn Asn Leu Arg Asn Thr Thr Ala Arg Pro Lys Leu Gly Lys Gly Arg		
400 405 410		30
gcc cct aaa ttt act caa gtg ctc caa cct cga agt agg aat gaa ctt	1488	
Ala Pro Lys Phe Thr Gln Val Leu Gln Pro Arg Ser Arg Asn Glu Leu		
415 420 425 430		
cct gtg cag ccg gcg gag aca act acc act cct gat ata aaa aac acg	1536	
Pro Val Gln Pro Ala Glu Thr Thr Thr Thr Pro Asp Ile Lys Asn Thr		
435 440 445		
act gta act ccc agt gta acc aaa gat gtc gca ctg gct gcc gtt ctg	1584	40
Thr Val Thr Pro Ser Val Thr Lys Asp Val Ala Leu Ala Ala Val Leu		

450	455	460		
gtc 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 cac tgg aga aac agg aag aag aaa act gaa ggc gcc tat	1680			
Cys Ala Trp His Trp Arg Asn Arg Lys Lys Lys Thr Glu Gly Ala Tyr				
480	485	490		10
gat tta ccc cac tgg gat cgg gca ggt tgg tgg aaa gga atg aag cag	1728			
Asp Leu Pro His Trp Asp Arg Ala Gly Trp Trp Lys Gly Met Lys Gln				
495	500	505	510	
ctt ctc cct gcc aag tcg gtg gac cac gag gag acg cca gtg cgc tac	1776			
Leu Leu Pro Ala Lys Ser Val Asp His Glu Glu Thr Pro Val Arg Tyr				
515	520	525		
agc act agt gaa gtc agt cac ctg agt gcc agg gaa gtc acc aca gtg	1824			20
Ser Thr Ser Glu Val Ser His Leu Ser Ala Arg Glu Val Thr Thr Val				
530	535	540		
ctg cag gcc gac tct gca gaa tat 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				
545	550	555		
gtt ggc aca ctc cat cag aga tcc acc ttt aaa cct gag gaa ggg aag	1920			
Val Gly Thr Leu His Gln Arg Ser Thr Phe Lys Pro Glu Glu Gly Lys				30
560	565	570		
gaa gca ggc tat gca gac ctc gat cct tac aac tct cca atg cag gaa	1968			
Glu Ala Gly Tyr Ala Asp Leu Asp Pro Tyr Asn Ser Pro Met Gln Glu				
575	580	585	590	
gtg tac cac gcc tat gct gaa cca ctg ccc gta acg ggg cct gag tac	2016			
Val Tyr His Ala Tyr Ala Glu Pro Leu Pro Val Thr Gly Pro Glu Tyr				
595	600	605		40
gca acc ccg atc gtc atg gac atg tca ggg cac ccc aca gcc tca gtt	2064			

Ala Thr Pro Ile Val Met Asp Met Ser Gly His Pro Thr Ala Ser Val		
610	615	620
ggt ctg ccc tcc aca tcc acc ttc aaa act gca ggg acc cag cct cac	2112	
Gly Leu Pro Ser Thr Ser Thr Phe Lys Thr Ala Gly Thr Gln Pro His		
625	630	635
gct tta gtg gga act tac aac act ctt ctc tcc agg act gac agc tgt	2160	
Ala Leu Val Gly Thr Tyr Asn Thr Leu Leu Ser Arg Thr Asp Ser Cys		10
640	645	650
tcc tca ggc cag gct cag tat gac acc cca aaa ggt ggg aag tca gct	2208	
Ser Ser Gly Gln Ala Gln Tyr Asp Thr Pro Lys Gly Gly Lys Ser Ala		
655	660	665
670		
gct acc cca gag gaa ctg gta tac cag gtg ccc cag agc acc cag gag	2256	
Ala Thr Pro Glu Glu Leu Val Tyr Gln Val Pro Gln Ser Thr Gln Glu		20
675	680	685
cta tca gga gca gga agg gat gag aag ttt gat gct ttt aaa gaa atc	2304	
Leu Ser Gly Ala Gly Arg Asp Glu Lys Phe Asp Ala Phe Lys Glu Ile		
690	695	700
ctt tga	2310	
Leu		
<210> 5		30
<211> 769		
<212> PRT		
<213> Mus musculus		
<400> 5		
Met Ala Ser Arg Ala Pro Leu Arg Ala Ala Arg Ser Pro Gln Gly Pro		
1	5	10
15		
Gly Gly Pro Ala Ala Pro Ala Ala Thr Gly Arg Ala Ala Leu Pro Ser		40
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 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	10
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	20
Cys Gly Leu Gly Leu Gln Met Asn Gln Ser Ile Glu Ser Lys Gly Ser	
145 150 155 160	
Glu Val Thr Val Leu Phe Met Ser Gly Thr His Ala Ala Gly Arg Gly	
165 170 175	
Phe Leu Ala Ser Tyr Ser Val Ile Asp Lys Glu Asp Leu Ile Thr Cys	
180 185 190	
Leu Asp Thr Val Ser Asn Phe Leu Glu Pro Glu Phe Ser Lys Tyr Cys	30
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 Asn Val Leu Gly Gly Gln Ile Ser Ile Val Ile Ser	
245 250 255	40
Lys Gly Thr Pro Tyr Tyr Glu Ser Ser Leu Ala Asn Asn Val Thr Ser	

Pro Val Gln Pro Ala Glu Thr Thr Thr Thr Pro Asp Ile Lys Asn Thr	
500	505
Thr Val Thr Pro Ser Val Thr Lys Asp Val Ala Leu Ala Ala Val Leu	
515	520
Val Pro Val Leu Val Met Ala Leu Thr Thr Leu Ile Leu Ile Leu Val	
530	535
Cys Ala Trp His Trp Arg Asn Arg Lys Lys Lys Thr Glu Gly Ala Tyr	10
545	550
Asp Leu Pro His Trp Asp Arg Ala Gly Trp Trp Lys Gly Met Lys Gln	
565	570
Leu Leu Pro Ala Lys Ser Val Asp His Glu Glu Thr Pro Val Arg Tyr	
580	585
Ser Thr Ser Glu Val Ser His Leu Ser Ala Arg Glu Val Thr Thr Val	
595	600
Leu Gln Ala Asp Ser Ala Glu Tyr Ala Gln Pro Leu Val Gly Gly Ile	20
610	615
Val Gly Thr Leu His Gln Arg Ser Thr Phe Lys Pro Glu Glu Gly Lys	
625	630
Glu Ala Gly Tyr Ala Asp Leu Asp Pro Tyr Asn Ser Pro Met Gln Glu	
645	650
Val Tyr His Ala Tyr Ala Glu Pro Leu Pro Val Thr Gly Pro Glu Tyr	30
660	665
Ala Thr Pro Ile Val Met Asp Met Ser Gly His Pro Thr Ala Ser Val	
675	680
Gly Leu Pro Ser Thr Ser Thr Phe Lys Thr Ala Gly Thr Gln Pro His	
690	695
Ala Leu Val Gly Thr Tyr Asn Thr Leu Leu Ser Arg Thr Asp Ser Cys	
705	710
Ser Ser Gly Gln Ala Gln Tyr Asp Thr Pro Lys Gly Gly Lys Ser Ala	40

	725		730		735
Ala Thr Pro Glu Glu Leu Val Tyr Gln Val Pro Gln Ser Thr Gln Glu					
	740		745		750
Leu Ser Gly Ala Gly Arg Asp Glu Lys Phe Asp Ala Phe Lys Glu Ile					
	755		760		765
Leu					

- <210> 6
- <211> 2310
- <212> DNA
- <213> Mus musculus
- <400> 6

```

atggcgagcc gggcgccgct gagagccgcg cgcagccccc agggtcgccg aggccccggc 60
gcgccccgcg ccaccggccg ggccgcgctg cccagcgccg gctgctgtcc cctcccctct 120
ggccgcaact cctcctccag gctcgcactg ctctctctgc tgcctctact gctccaggac 180
gctggaggcc agcaaggiga tggatgtgga cacactgtac taggccciga gagtggaaacc 240
cttacatcca tcaactacc acatacctat cctaacagca ctgtgtgtga atgggagatt 300
cgagtcagga cgggagaaag gattcgcata aaaticggig actttgacat tgaagattct 360
gattattgtc accittaatta ctgaaaatc tttaatggaa ttggagtcag cagaacggaa 420
ataggcaaat actgtggctt gggtttacia atgaatcagt caattgagtc caaaggcagt 480
gaagtcacag tgcgttcat gagtggaaacc catgctgctg ggcgaggatt tttggcttca 540
tactcagtta tagataaaga agatttaate acttgtttgg atactgtate taattttttg 600
gaaccagagt tcagtaagta ctgccagct ggctgtcttt tgccttttgc tgaatatatc 660
ggaacaattc ctcatggata cagagattct tcaccattgt gtatggctgg aatccatgca 720
ggagttagit caaacgtgct gggttggcaa atcagcattg tgattagcaa agggacccca 780
tattatgaaa gctcttttggc caacaatgtc acttccacgg tgggatactt atctgcaagt 840
ctgtttacat ttaagacaag tggttgctat gggactctgg ggatggagtc tgggtgtgatt 900
gccgatcccc agataacagc atcgtctgca ctggagtggg ctgaccacat ggggcaggag 960
aacagctgga cagcggagaa ggccaggctg agaaaaccgg ggccctccctg ggctgctttt 1020

```

10

20

30

40

gccactgatg agcatcagtg gctgcagata gaccitaaca aggagaagaa gataacaggt	1080	
atcgtaacca ctgggtctac catgatagaa cacagttact atgtgtctgc ctacagagtc	1140	
ctgtacagtg acgatgggca gagatggact gigtacagag aacctgggtg ggaccaggac	1200	
aagatatttc aaggaaacaa agattatcac aaggatgttc gtaataactt ttigccacca	1260	
attatigcac gtttcattag agtgaacctt gtccagtggc aacagaaaat tgccatgaaa	1320	
gtggaactgc tgggatgtca gtttactctc aaaggctgcc ttccaaagct tactccacct	1380	
ctcggaacg gcaataacct cagaaatact acagctcgtc ccaaactagg taaaggctgt	1440	10
gccccataat ttactcaagt gctccaacct cgaagtagga atgaacttcc tgtgcagccg	1500	
gcggagacaa ctaccactcc tgatataaaa aacacgactg taactcccag tgtaacacaa	1560	
gatgtcgcac tggctgccgt tctggctcct gtgtctgtca tggccctcac cacactcacc	1620	
ctcattctag tgtgtcttg gcactggaga aacaggaaga agaaaactga aggcgcctat	1680	
gatttacecc actgggatcg ggcaggctgg tggaaaggaa tgaagcagct tctccctgcc	1740	
aagtcggigg accacgagga gacgccagtg cgctacagca ctagtgaagt cagtcacctg	1800	
agtgccaggg aagtcaccac agtgcctcag gccgactctg cagaatatgc acagccctc	1860	20
gtgggaggaa ttgttggcac actccatcag agatccacct ttaaacctga ggaagggag	1920	
gaagcaggct atgcagacct cgatccttac aactctccaa tgcaggaagt gtaccacgcc	1980	
tatgctgaac cactgccgt aacggggcct gactacgcaa ccccgatct catggacatg	2040	
tcagggcacc ccacagctc agttggctcg cctccacat ccacctcaa aactgcaggg	2100	
accagctc acgcttagt gggaacttac aacactctc tctccaggac tgacagctgt	2160	
tctcaggcc aggcctagta tgacaccca aaaggctggga agtcagctgc taccacagag	2220	
gaactggtat accaggctcc ccagagcacc caggagctat caggagcagg aagggatgag	2280	30
aagttgatg cttttaaaga aatccttga	2310	

<210> 7

<211> 2310

<212> DNA

<213> Rattus rattus

<220>

<221> sig_peptide

40

<222> (1)..(198)

<220>

<221> mat_peptide

<222> (199)..(2310)

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(2310)

10

<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		20
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 Leu Pro Asp Ala Gly Ala Gln		
-15 -10 -5		
aaa ggt gat gga tgt gga cac act gta cta ggc cct gag agt gga acc	240	30
Lys 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 agt act gtg tgt	288	
Leu Thr Ser Ile Asn Tyr Pro His Thr Tyr Pro Asn Ser Thr Val Cys		
15 20 25 30		
aaa tgg gag att cga gta aag acg gga gaa aga att cgc atc aag ttc	336	
Lys Trp Glu Ile Arg Val Lys Thr Gly Glu Arg Ile Arg Ile Lys Phe		40
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 aag 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	10
Cys Gly Leu Gly Leu Gln Met Asn Gln Ser Ile Glu Ser Lys Gly Ser		
80 85 90		
gaa atc aca gtg ctg ttc atg agt gga atc cat gct tct ggt cga gga	528	
Glu Ile Thr Val Leu Phe Met Ser Gly Ile His Ala Ser Gly Arg Gly		
95 100 105 110		
ttt ttg gct tct tac tca gtt ata gat aaa caa gat tta atc act tgt	576	
Phe Leu Ala Ser Tyr Ser Val Ile Asp Lys Gln Asp Leu Ile Thr Cys		20
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		30
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		
175 180 185 190		
aaa ggc acc cca tat tac gaa agt tct ttg gcc aac aat gtc act tcc	816	40
Lys Gly Thr Pro Tyr Tyr Glu Ser Ser Leu Ala Asn Asn Val Thr Ser		

	195	200	205		
atg gfg 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					
	210	215	220		
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					
	225	230	235		10
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					
	240	245	250		
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					
	255	260	265	270	
tgg gct gct ttt gcc act gat gag cat cag tgg ctg caa att gac ctt				1056	20
Trp Ala Ala Phe Ala Thr Asp Glu His Gln Trp Leu Gln Ile Asp Leu					
	275	280	285		
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					30
	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	40
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		10
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	435	440
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		30
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		40
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	10
Leu Gln Ala Asp Ser Ala Glu Tyr Ala Gln Pro Leu Val Gly Gly Ile		
545 550 555		
gtt ggc aca ctc cat cag aga tct acc ttt aaa cct gaa gaa gga aaa	1920	
Val Gly Thr Leu His Gln Arg Ser Thr Phe Lys Pro Glu Glu Gly Lys		
560 565 570		
gaa gcg agc tac gca gat cta gac ccc tac aac gct cca gta cag gaa	1968	
Glu Ala Ser Tyr Ala Asp Leu Asp Pro Tyr Asn Ala Pro Val Gln Glu		20
575 580 585 590		
gtg tat cat gcc tac gct gag ccg ctg ccg gta acg ggg cct gag tac	2016	
Val Tyr His Ala Tyr Ala Glu Pro Leu Pro Val Thr Gly Pro Glu Tyr		
595 600 605		
gca acc cca atc gtc atg gac atg tca ggg cac tcc aca gcc tca gtt	2064	
Ala Thr Pro Ile Val Met Asp Met Ser Gly His Ser Thr Ala Ser Val		
610 615 620		30
ggc ctg ccc tcc aca tcc act ttc aga act gca ggg aac cag cct ccc	2112	
Gly Leu Pro Ser Thr Ser Thr Phe Arg Thr Ala Gly Asn Gln Pro Pro		
625 630 635		
gca tta gtg gga act tac aac act ctt ctc tcc agg act gac agc tgt	2160	
Ala Leu Val Gly Thr Tyr Asn Thr Leu Leu Ser Arg Thr Asp Ser Cys		
640 645 650		
tcc tcg ggc cag gct cag tac gac acc cca aaa ggt ggg aag cca gca	2208	40
Ser Ser Gly Gln Ala Gln Tyr Asp Thr Pro Lys Gly Gly Lys Pro Ala		

655	660	665	670	
gct gcc cca gag gaa ctg gtg tac cag gtg ccg cag agc acc cag gaa	2256			
Ala Ala Pro Glu Glu Leu Val Tyr Gln Val Pro Gln Ser Thr Gln Glu				
	675	680	685	
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	10
ctt tga			2310	
Leu				
<210> 8				
<211> 769				
<212> PRT				
<213> Rattus rattus				20
<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				30
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				40
100 105 110				

Gly Asp Phe Asp Ile Glu Asp Ser Asp Tyr Cys His Leu Asn Tyr Leu	
115	120
Lys Ile Phe Asn Gly Ile Gly Val Ser Arg Thr Glu Ile Gly Lys Tyr	
130	135
Cys Gly Leu Gly Leu Gln Met Asn Gln Ser Ile Glu Ser Lys Gly Ser	
145	150
Glu Ile Thr Val Leu Phe Met Ser Gly Ile His Ala Ser Gly Arg Gly	10
165	170
Phe Leu Ala Ser Tyr Ser Val Ile Asp Lys Gln Asp Leu Ile Thr Cys	
180	185
Leu Asp Thr Val Ser Asn Phe Leu Glu Pro Glu Phe Ser Lys Tyr Cys	
195	200
Pro Ala Gly Cys Leu Leu Pro Phe Ala Glu Ile Ser Gly Thr Ile Pro	
210	215
His Gly Tyr Arg Asp Ser Ser Pro Leu Cys Met Ala Gly Ile His Ala	20
225	230
Gly Val Val Ser Asp Val Leu Gly Gly Gln Ile Ser Val Val Ile Ser	
245	250
Lys Gly Thr Pro Tyr Tyr Glu Ser Ser Leu Ala Asn Asn Val Thr Ser	
260	265
Met Val Gly Tyr Leu Ser Thr Ser Leu Phe Thr Phe Lys Thr Ser Gly	30
275	280
Cys Tyr Gly Thr Leu Gly Met Glu Ser Gly Val Ile Ala Asp Pro Gln	
290	295
Ile Thr Ala Ser Ser Val Leu Glu Trp Thr Asp His Met Gly Gln Glu	
305	310
Asn Ser Trp Lys Pro Glu Lys Ala Arg Leu Arg Lys Pro Gly Pro Pro	
325	330
Trp Ala Ala Phe Ala Thr Asp Glu His Gln Trp Leu Gln Ile Asp Leu	40

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	10
			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	20
Gly	Leu	Pro	Ser	Thr	Ser	Thr	Phe	Arg	Thr	Ala	Gly	Asn	Gln	Pro	Pro	
										690					695	
Ala	Leu	Val	Gly	Thr	Tyr	Asn	Thr	Leu	Leu	Ser	Arg	Thr	Asp	Ser	Cys	
										705					710	
Ser	Ser	Gly	Gln	Ala	Gln	Tyr	Asp	Thr	Pro	Lys	Gly	Gly	Lys	Pro	Ala	
										715					720	
										725					730	
										735					740	
Ala	Ala	Pro	Glu	Glu	Leu	Val	Tyr	Gln	Val	Pro	Gln	Ser	Thr	Gln	Glu	30
										740					745	
										750					755	
Ala	Ser	Gly	Ala	Gly	Arg	Asp	Glu	Lys	Phe	Asp	Ala	Phe	Lys	Glu	Thr	
										755					760	
										765					765	

Leu

<210> 9

<211> 2310

<212> DNA

40

<213> Rattus rattus

<400> 9

atggcgagcc gggcgccgct gagagccgcg cgcagcccgc aggatcccgg aggccgggccc 60
gcgcccgcgg ccaccggcgg ggccccgctg cccagcgcgg gctgggtgicc cctcccctct 120
ggccgcaact cctcccag gcctcggctg ctctctctac tgcctctact gctcccggac 180
gctggagccc agaaagggtga tggatgtgga cacactgtac taggccciga gagtggaaacc 240
cttacatcca tcaactaccc acatacctat cctaacagta ctgtgtgtaa atgggagatt 300 10
cgagtaaaga cgggagaaaag aattcgcata aagtccgggtg actttgacat tgaagattct 360
gattattgtc accttaatta cctgaaaatc tttaatggaa ttggagtcag cagaacggaa 420
ataggcaagt actgtggctc gggtttacia atgaatcagt caattgagtc caaaggcagt 480
gaaatcacag tgcgttcat gagtggaaatc catgctctcg gtcgaggatt ttggcctct 540
tactcagtta tagataaaca agatttaate acttgtttgg atactgtatc taattttttg 600
gaaccigagt tcagtaagta ctgccagct ggcgtctcgc tgccttttgc tgaatatct 660
ggaacgattc ctcatggata tagagattct tcaccgctgt gtatggctgg aatccatgca 720 20
ggagtagtgt cagatgtgct gggtaggcaa atcagcgttg tgattagcaa aggcacccca 780
tattacgaaa gttctttggc caacaatgtc acttccatgg tggatactt atctacgagt 840
ctgtttacat ttaagacaag tggttgctat gggactctag ggatggagtc aggtgtgatc 900
gccgatcccc agataacagc atcatctgta ctggagtgga ctgaccacat ggggcaggag 960
aacagctgga aaccgagaa ggccaggctg agaaaaccgg ggcctcccctg ggctgctttt 1020
gccactgatg agcatcagtg gctgcaaatt gaccitaata aggagaagaa gataacaggc 1080
atcgtaacca ctggatctac ctgatagag cacaattact atgtgtctgc ctacagagtt 1140 30
ctgtacagtg acgatgggca gaaatggact gtgtacagag agcctgggtc ggctcaggac 1200
aagatatctc aaggaaacaa agattatcac aaggatgttc gtaataactt ttggccacca 1260
attattgcac gtttcattag agtgaacctt gtccagtggc aacagaaaat tgccatgaaa 1320
gtggaatgic tgggatgtca gttcactctg aaaggctgcc ttccaaagct tactcaacct 1380
ccccaccctc ggaacagcaa taacctcaaa aacactacag ttcateccaa actaggtcgt 1440
gccccataat ttactcaagc actccaacca cgaagtagga atgaccttc tctgtgccg 1500
gcccagacaa ctgccactcc tgatgtcaaa aacacgactg tgactcccag tgtgacacaa 1560 40
gatgttgcac tggccgccgt tctggttcct gtgctggtea tggccctcac cacactcact 1620

ctcttctag tgtgtgcttg gcattggaga aacagaaaga aaaaagccga aggcacctat 1680
 gatttacecc actgggatcg ggcaggctgg tggaaaggag tgaagcagct tctccctgcc 1740
 aatcggigg aacacgagga gacgccagtg cgctacagca acagtgaagt tagtcacctg 1800
 agccccaggg aagtcacgac agtgcctgcaa gctgattctg cagaatacgc acagcccttc 1860
 gtgggaggaa ttgttggcac actccatcag agatctacct ttaaacciga agaaggaaaa 1920
 gaagcgagct acgcagatct agacccttac aacgctccag tacaggaagt gtatcatgcc 1980
 tacgcigagc cgcigccggt aacggggcct gactacgcaa cccaatcgt catggacatg 2040
 tcagggcact ccacagcttc agttggcttg cctctccat ccactttcag aactgcaggg 2100
 aaccagcttc ccgcattagt gggaacttac aacactcttc tctccaggac tgacagctgt 2160
 tctcggggcc aggtcagta cgacacccca aaaggtagga agccagcagc tgccccagag 2220
 gaactggigt accaggigcc gcagagcacc caggaagcat caggagcagg aagggatgag 2280
 aaatttgatg cttttaaaga aacctttga 2310

10

<210> 10

20

<211> 22

<212> DNA

<213> *Mus musculus*

<400> 10

ctgctccaac tctctctct tc 22

<210> 11

30

<211> 26

<212> DNA

<213> *Mus musculus*

<400> 11

ctgcttcatt cctttccacc aacctg 26

<210> 12

40

<211> 28

<212> DNA

<213> *Rattus rattus*

<400> 12

tgtgctggtc atggctctca ctactctc

28

<210> 13

<211> 22

10

<212> DNA

<213> *Rattus rattus*

<400> 13

tgtgctttaa aacgatgctt tg

22

<210> 14

<211> 20

20

<212> DNA

<213> *Mus musculus*

<400> 14

gcactatgcg ggcggattgc

20

<210> 15

<211> 24

30

<212> DNA

<213> *Mus musculus*

<400> 15

ggatgtaagg gttccactct cagg

24

<210> 16

<211> 17

40

<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

10

<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

20

<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

30

1

5

10

15

Met Leu Val Ala Ser Val Leu Ala

20

<210> 19

<211> 19

<212> DNA

40

<213> Homo sapiens

⟨400⟩ 19		
cccagcaagg tgatggatg	19	
⟨210⟩ 20		
⟨211⟩ 27		
⟨212⟩ DNA		
⟨213⟩ Homo sapiens		10
⟨400⟩ 20		
caagaatcag aatcttcaat gtcaaag	27	
⟨210⟩ 21		
⟨211⟩ 30		
⟨212⟩ DNA		
⟨213⟩ Homo sapiens		20
⟨400⟩ 21		
cctgagagtg gaacccttac atccataaac	30	
⟨210⟩ 22		
⟨211⟩ 19		
⟨212⟩ DNA		
⟨213⟩ Homo sapiens		30
⟨400⟩ 23		
gaaggtgaag gtcggagtc	19	
⟨210⟩ 23		
⟨211⟩ 20		
⟨212⟩ DNA		
⟨213⟩ Homo sapiens		40
⟨400⟩ 23		

gaagatggtg atgggatttc

20

<210> 24

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

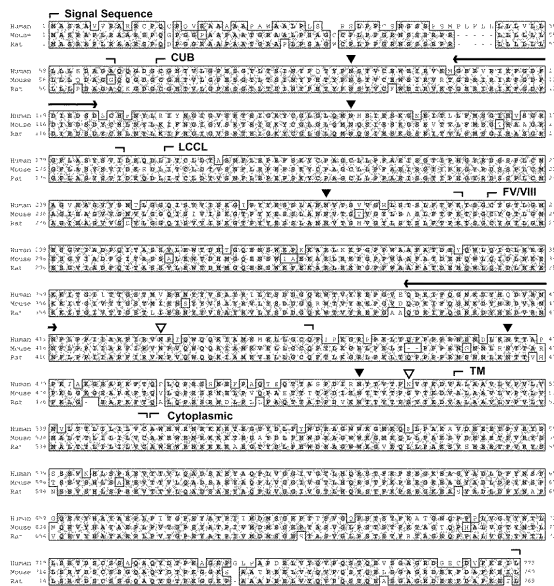
<400> 24

caagcttccc gttctcagcc

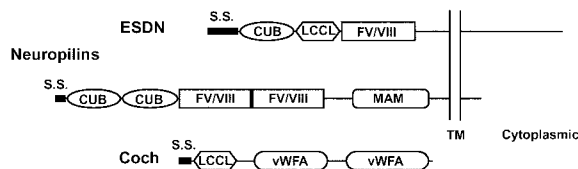
20

10

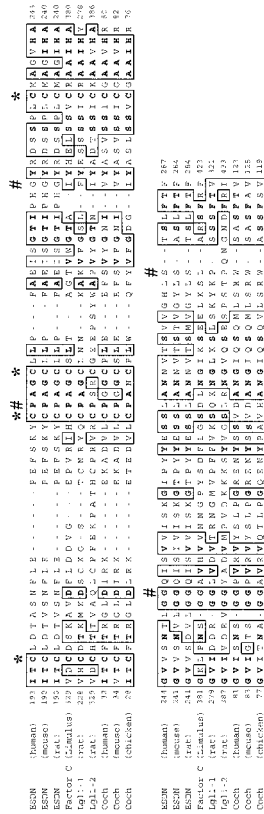
【 図 1 】



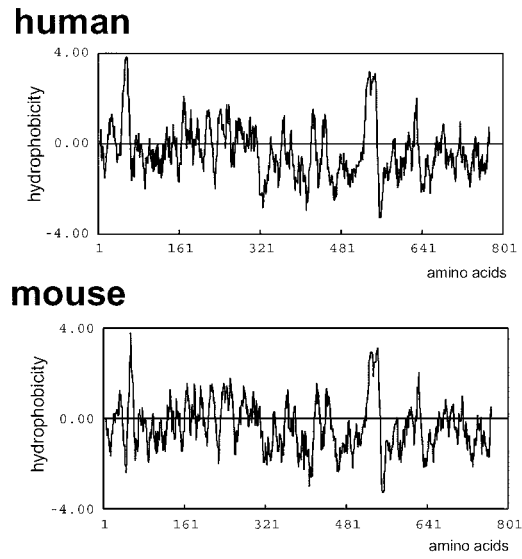
【 図 2 】



【 図 3 】



【 図 4 】

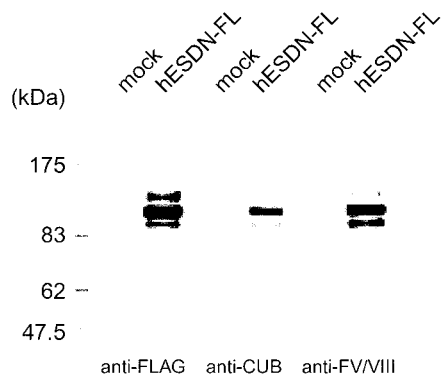


【 図 5 】

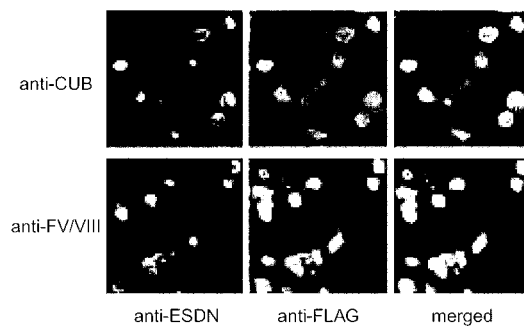


- endogenous signal sequence
- CD5 signal sequence
- extracellular domain
- transmembrane domain
- cytoplasmic domain
- FLAG tag
- 6xHis tag

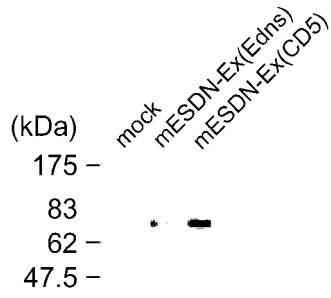
【 図 6 】



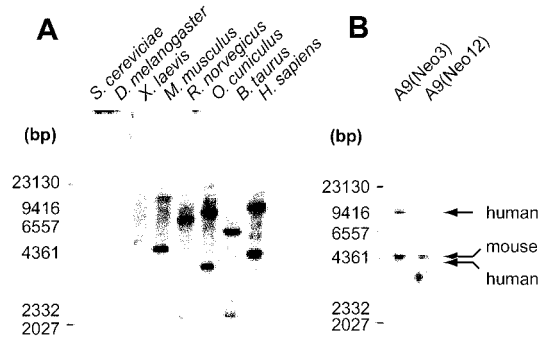
【 図 7 】



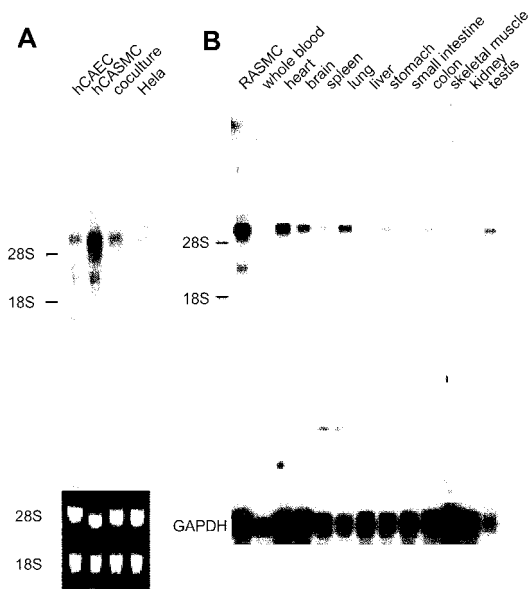
【 8 】



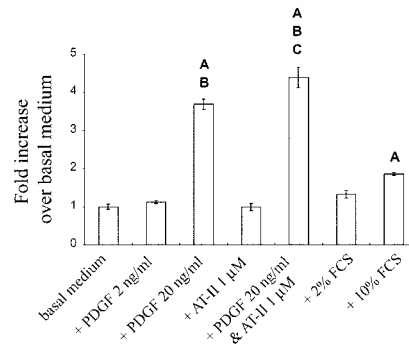
【 9 】



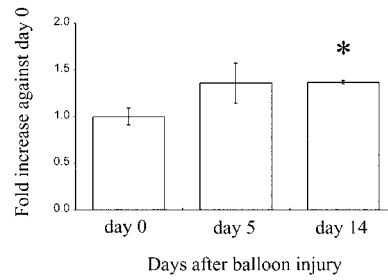
【 10 】



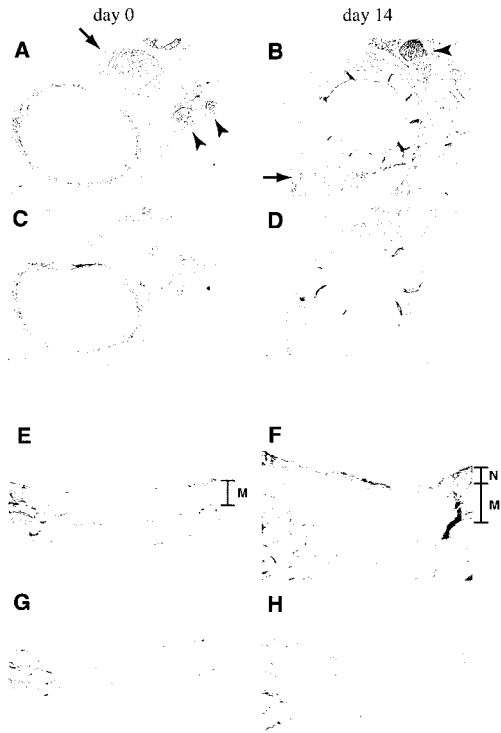
【 11 】



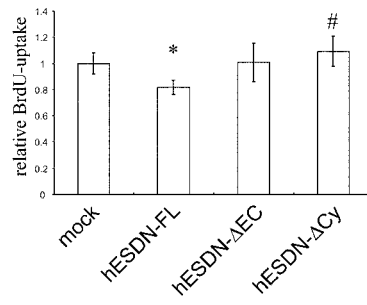
【 12 】



【 図 1 3 】



【 図 1 4 】



フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I	
C 1 2 P 21/02 (2006.01)		A 6 1 K	37/02
G 0 1 N 33/15 (2006.01)		C 1 2 P	21/02 C
G 0 1 N 33/50 (2006.01)		G 0 1 N	33/15 Z
G 0 1 N 33/53 (2006.01)		G 0 1 N	33/50 Z
C 1 2 P 21/08 (2006.01)		G 0 1 N	33/53 D
C 1 2 N 5/10 (2006.01)		C 1 2 P	21/08
A 6 1 P 9/10 (2006.01)		C 1 2 N	5/00 A
A 6 1 P 43/00 (2006.01)		A 6 1 P	9/10
C 1 2 N 1/15 (2006.01)		A 6 1 P	9/10 1 0 1
C 1 2 N 1/19 (2006.01)		A 6 1 P	43/00 1 0 5
C 1 2 N 1/21 (2006.01)		C 1 2 N	1/15
		C 1 2 N	1/19
		C 1 2 N	1/21

審査官 田村 明照

(56)参考文献 国際公開第00/012532(WO, A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

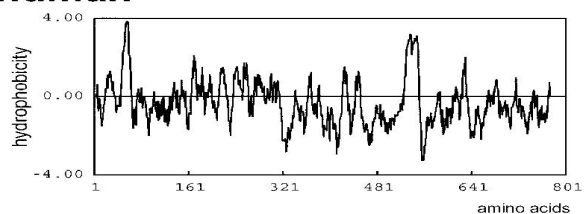
C12N 15/00-15/90
 A61K 38/00
 A61K 39/395
 C07K 14/47
 C07K 16/18
 C12P 21/02
 G01N 33/15
 G01N 33/50
 G01N 33/53
 BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)
 CAplus(STN)
 GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
 SwissProt/PIR/Geneseq
 PubMed
 JSTPlus(JDream2)

(54)【発明の名称】新規なポリペプチドESDN、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を用いたスクリーニング方法、および抗ESDN抗体を用いたESDN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	JP3911416B2	公开(公告)日	2007-05-09
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		
当前申请(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	C12N15/09 A61K39/395 C07K14/47 C07K16/18 A61K38/00 C12P21/02 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 C12P21/08 C12N5/10 A61P9/10 A61P43/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C07K14/705		
CPC分类号	A61K38/00 A61P9/10 A61P43/00 C07K14/705 C07K16/20 C07K16/36 G01N2333/71 G01N2800/323		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K39/395.D A61K39/395.N C07K14/47 C07K16/18 A61K37/02 C12P21/02.C G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D C12P21/08 C12N5/00.A A61P9/10 A61P9/10.101 A61P43/00.105 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 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	JP2003189872A		
外部链接	Espacenet		
摘要(译)			

要解决的问题：提供新的ESDN（内皮细胞和平滑肌细胞衍生的神经毡蛋白样分子）蛋白（多肽ESDN），其在冠状细胞和平滑肌细胞以及气球受损动脉的血管平滑肌中表达。或者是颈总动脉的中膜，因此可用于治疗PTCA后在循环器官区域或动脉硬化中的再狭窄。解决方案：新的多肽ESDN，其制备方法，编码其的cDNA，包含该cDNA的载体，用该载体转化的宿主细胞，ESDN抗体，含有该ESDN或该抗体的药物组合物，方法为了测定ESDN，分别提供了用于测定ESDN的试剂和使用ESDN进行筛选的方法。Ž

human



mouse

