

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4378083号
(P4378083)

(45) 発行日 平成21年12月2日(2009.12.2)

(24) 登録日 平成21年9月18日(2009.9.18)

(51) Int.Cl.

F 1

C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N	15/00	Z N A A
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q	1/68	A
G O 1 N 33/15 (2006.01)	G O 1 N	33/15	Z
G O 1 N 33/50 (2006.01)	G O 1 N	33/50	Z
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N	33/53	D

請求項の数 19 (全 98 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2002-362772 (P2002-362772)
 (22) 出願日 平成14年12月13日(2002.12.13)
 (65) 公開番号 特開2004-89176 (P2004-89176A)
 (43) 公開日 平成16年3月25日(2004.3.25)
 審査請求日 平成17年12月7日(2005.12.7)
 (31) 優先権主張番号 特願2001-382174 (P2001-382174)
 (32) 優先日 平成13年12月14日(2001.12.14)
 (33) 優先権主張国 日本国(JP)
 (31) 優先権主張番号 特願2002-200556 (P2002-200556)
 (32) 優先日 平成14年7月9日(2002.7.9)
 (33) 優先権主張国 日本国(JP)

(73) 特許権者 000002934
 武田薬品工業株式会社
 大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号
 (74) 代理人 100092783
 弁理士 小林 浩
 (74) 代理人 100095360
 弁理士 片山 英二
 (74) 代理人 100093676
 弁理士 小林 純子
 (74) 代理人 100120134
 弁理士 大森 規雄
 (72) 発明者 森 正明
 茨城県つくば市春日3丁目8番地5
 (72) 発明者 千勝 智子
 茨城県下妻市大字平沼89番地の12
 最終頁に続く

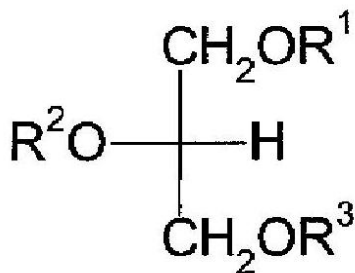
(54) 【発明の名称】スクリーニング方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

(a) 配列番号：1もしくは配列番号：19で表わされるアミノ酸配列、または配列番号：1もしくは配列番号：19で表されるアミノ酸配列において1～数個のアミノ酸が欠失、置換、付加もしくは挿入またはそれらの組み合わせられたアミノ酸配列を含有する蛋白質であって、リゾホスファチジルセリンへの結合活性またはシグナル伝達活性を有する前記蛋白質および(b)該蛋白質と特異的に結合する能力を有し、下式：

【化1】



〔式中、R¹は水素原子またはC₁₄₋₂₀アシルを、mは0または1を、R²は水素原子またはC₁₄₋₂₀アシルを示す〕で表される化合物またはその塩であるリガンドを用いることを特徴とする、該蛋白質と該リガンドとの結合性を变化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法。

【請求項 2】

リガンドが、上記式中、 R^1 が水素原子または C_{14-20} アシルを、 R^2 が水素原子を、 m が0または1を示す化合物またはその塩である請求項1記載のスクリーニング方法。

【請求項 3】

R^1 が C_{14-20} アシルである請求項2記載のスクリーニング方法。

【請求項 4】

R^1 が C_{13-19} アルキル - カルボニルである請求項1記載のスクリーニング方法。

【請求項 5】

リガンドが、1 - ステアロイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホ - L - セリン、1 - パルミトイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホ - L - セリンまたは1 - オレオイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホ - L - セリンである請求項1記載のスクリーニング方法。

10

【請求項 6】

蛋白質が、配列番号：22で表わされるアミノ酸配列を含有する蛋白質である請求項1記載のスクリーニング方法。

【請求項 7】

配列番号：1で表わされるアミノ酸配列からなる蛋白質を用いる請求項1記載のスクリーニング方法。

【請求項 8】

配列番号：19で表わされるアミノ酸配列からなる蛋白質を用いる請求項1記載のスクリーニング方法。

20

【請求項 9】

(a) 配列番号：1もしくは配列番号：19で表わされるアミノ酸配列、または配列番号：1もしくは配列番号：19で表されるアミノ酸配列において1～数個のアミノ酸が欠失、置換、付加もしくは挿入またはそれらの組み合わせられたアミノ酸配列を含有する蛋白質であって、リゾホスファチジルセリンへの結合活性またはシグナル伝達活性を有する前記蛋白質と特異的に結合する能力を有する該リガンドを、該蛋白質に接触させた場合と、(b) 該リガンドおよび試験化合物を、該蛋白質に接触させた場合における、該リガンドの該蛋白質に対する結合量を測定し比較する、請求項1記載のスクリーニング方法。

【請求項 10】

(a) 配列番号：1もしくは配列番号：19で表わされるアミノ酸配列、または配列番号：1もしくは配列番号：19で表されるアミノ酸配列において1～数個のアミノ酸が欠失、置換、付加もしくは挿入またはそれらの組み合わせられたアミノ酸配列を含有する蛋白質であって、リゾホスファチジルセリンへの結合活性またはシグナル伝達活性を有する前記蛋白質と特異的に結合する能力を有する該リガンドを、該蛋白質を含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合と、(b) 該リガンドおよび試験化合物を、該蛋白質を含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合における、該リガンドの該細胞または該膜画分に対する結合量を測定し比較する、請求項1記載のスクリーニング方法。

30

【請求項 11】

蛋白質が、該蛋白質をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現した蛋白質である請求項9記載のスクリーニング方法。

40

【請求項 12】

リガンドが、標識したリガンドである請求項9～11記載のスクリーニング方法。

【請求項 13】

標識したリガンドが、1 - [9 , 10 - 3H_2] - ステアロイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホ - L - セリンである請求項12記載のスクリーニング方法。

【請求項 14】

(a) 配列番号：1もしくは配列番号：19で表わされるアミノ酸配列、または配列番号：1もしくは配列番号：19で表されるアミノ酸配列において1～数個のアミノ酸が欠失、置換、付加もしくは挿入またはそれらの組み合わせられたアミノ酸配列を含有する蛋白質であって、リゾホスファチジルセリンへの結合活性またはシグナル伝達活性を有する前

50

記蛋白質と特異的に結合する能力を有する該リガンドを、該蛋白質に接触させた場合と、(b) 該リガンドおよび試験化合物を、該蛋白質に接触させた場合における、該蛋白質を介した細胞刺激活性を測定し、比較する、請求項 1 記載のスクリーニング方法。

【請求項 15】

(a) 配列番号：1 もしくは配列番号：19 で表わされるアミノ酸配列、または配列番号：1 もしくは配列番号：19 で表されるアミノ酸配列において 1 ~ 数個のアミノ酸が欠失、置換、付加もしくは挿入またはそれらの組み合わせられたアミノ酸配列を含有する蛋白質であって、リゾホスファチジルセリンへの結合活性またはシグナル伝達活性を有する前記蛋白質と特異的に結合する能力を有する該リガンドを、該蛋白質を含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合と、(b) 該リガンドおよび試験化合物を、該蛋白質を含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合における、該蛋白質を介した細胞刺激活性を測定し、比較する、請求項 1 記載のスクリーニング方法。

10

【請求項 16】

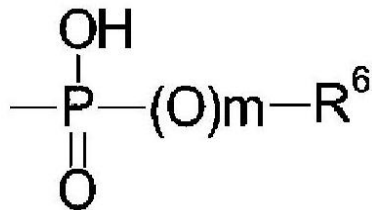
蛋白質が、該蛋白質をコードする DNA を含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現した蛋白質である請求項 14 記載のスクリーニング方法。

【請求項 17】

(a) 配列番号：1 もしくは配列番号：19 で表わされるアミノ酸配列、または配列番号：1 もしくは配列番号：19 で表されるアミノ酸配列において 1 ~ 数個のアミノ酸が欠失、置換、付加もしくは挿入またはそれらの組み合わせられたアミノ酸配列を含有する蛋白質であって、リゾホスファチジルセリンへの結合活性またはシグナル伝達活性を有する前記蛋白質および (b) 該蛋白質と特異的に結合する能力を有し、下式：

20

【化 3】



〔式中、R¹は水素原子または C₁₄₋₂₀ アシルを、m は 0 または 1 を、R²は水素原子または C₁₄₋₂₀ アシルを示す〕で表される化合物またはその塩であるリガンドを含有することを特徴とする、該蛋白質と該リガンドとの結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング用キット。

30

【請求項 18】

リガンドが、上記式中、R¹が水素原子または C₁₄₋₂₀ アシルを、R²が水素原子を、m が 0 または 1 を示す化合物である請求項 17 記載のスクリーニング用キット。

【請求項 19】

配列番号：1 もしくは配列番号：19 で表わされるアミノ酸配列、または配列番号：1 もしくは配列番号：19 で表されるアミノ酸配列において 1 ~ 数個のアミノ酸が欠失、置換、付加もしくは挿入またはそれらの組み合わせられたアミノ酸配列を含有する蛋白質であって、リゾホスファチジルセリンへの結合活性またはシグナル伝達活性を有する前記蛋白質に対する抗体を含有してなる免疫疾患または炎症性疾患の予防・治療剤。

40

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、受容体と該受容体と特異的に結合する能力を有するリガンドとを用いる医薬のスクリーニング方法およびスクリーニング用キット、該スクリーニング方法またはキットによって得られうる化合物、新規受容体などに関する。詳細には、神経変性疾患、免疫疾患、浮腫、胃酸過多などの予防・治療剤などのスクリーニング方法およびスクリーニング用キットなどに関する。

50

c) に作用してヒスタミンを放出させる活性（非特許文献 5 FEBS Lett.、138巻、190-192頁、1982年）、ヒト T 細胞に対する増殖調節活性（非特許文献 6 FEBS Lett.、316巻、1-4頁、1993年）、NGF の示す PC12 細胞に対する分化誘導能の増強活性（非特許文献 7 Neurosci.Lett.、248巻、77-80頁、1998年）を有することが知られている。これらの作用は l y s o - P S に特異的であり、また、比較的低濃度で観察されることから特異的な受容体の介在が予想されていたが、これまでに受容体の同定に関する報告はない。ホスファチジルセリン（以下、P S と略称することがある）は、古くから血液凝固や血小板凝集反応を阻害することが知られている。最近、アポトーシスを起こした細胞表面に P S が提示され、その細胞のクリアランスに P S を認識する受容体が関与していることが示された（非特許文献 8 Nature、405巻、85-90頁、2000年）ものの、この受容体と G P R 3 4 とは異なる。

10

【 0 0 0 4 】

【非特許文献 1】

Genomics、56巻、12-21頁、1999年

【非特許文献 2】

Biochim. Biophys. Acta、1446巻、57-70頁、1999年

【非特許文献 3】

Nature、279巻、250-252頁、1979年

【非特許文献 4】

FEBS Lett.、105巻、58-62頁、1979年

20

【非特許文献 5】

FEBS Lett.、138巻、190-192頁、1982年

【非特許文献 6】

FEBS Lett.、316巻、1-4頁、1993年

【非特許文献 7】

Neurosci.Lett.、248巻、77-80頁、1998年

【非特許文献 8】

Nature、405巻、85-90頁、2000年

【 0 0 0 5 】

【発明が解決しようとする課題】

30

G P R 3 4 のリガンドを見出し、該リガンドを用いる医薬のスクリーニング系を利用することにより、全く新規な作用機序を有する医薬の開発が望まれていた。

【 0 0 0 6 】

【課題を解決するための手段】

本発明者たちは上記の課題を解決するために鋭意研究を重ねた結果、l y s o - P S が G P R 3 4 発現 C H O 細胞に対して顕著な細胞内 c A M P 産生抑制活性を示すこと、P S が高濃度において G P R 3 4 発現 C H O 細胞に対して細胞内 c A M P 産生抑制活性を示すこと、さらに l y s o - P S および P S が極めて特異性の高い G P R 3 4 の内在性リガンドであることを見出した。上記の l y s o - P S の示す種々の生理作用は、l y s o - P S が炎症などの免疫作用、神経再生などの中枢作用およびこれらに関与した疾患において重要な生理機能を有することを示しており、L y s o - P S 等と G P R 3 4 とを用いて免疫疾患、中枢疾患などに有効な医薬の探索が可能となることも見出した。これらの知見に基づいて、さらに検討を重ねた結果、本発明を完成するに至った。

40

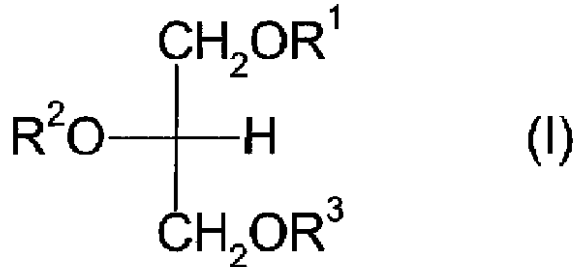
【 0 0 0 7 】

すなわち、本発明は、

(1) (a) 配列番号 : 1 または配列番号 : 1 9 で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質（以下、本発明の受容体と略記する場合がある）もしくはその部分ペプチドまたはその塩および (b) 該蛋白質またはその塩と特異的に結合する能力を有するリガンドを用いることを特徴とする、該蛋白質またはその塩と該リガンドとの結合性を变化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

50

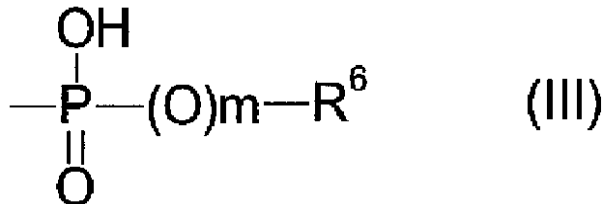
- (2) リガンドが脂質である上記(1)記載のスクリーニング方法、
 (3) リガンドが、エーテルリン脂質、ホスホノエーテル脂質、グリセロリン脂質、ホスホグリセロ脂質、スフィンゴ脂質、スフィンゴリン脂質またはホスホノスフィンゴ脂質である上記(1)記載のスクリーニング方法、
 (4) リガンドが、下式：
 【化6】



10

〔式中、 R^1 は水素原子、置換基を有していてもよい炭化水素基またはアシルを、 R^2 および R^3 は、それぞれ、水素原子、置換基を有していてもよい炭化水素基、アシルまたは下式：

【化7】



20

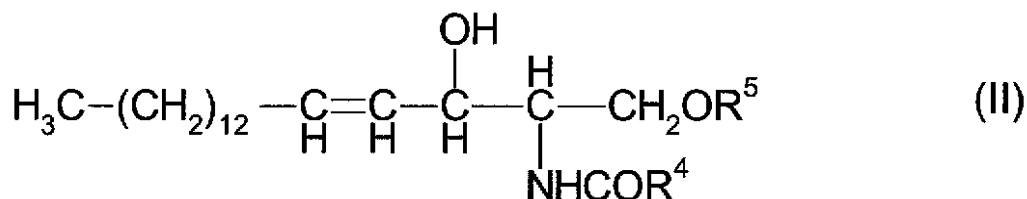
〔式中、 R^6 は水素原子、置換基を有していてもよいアルキルまたは置換基を有していてもよいシクロアルキルを、 m は0または1を示す。〕で表される基(以下、基(III)と略記する場合もある)を示す。〕で表される化合物またはその塩(以下、化合物(I)と略記する場合もある)である上記(1)記載のスクリーニング方法、

- (5) R^1 がアシルである上記(4)記載のスクリーニング方法、
 (6) R^2 が水素原子またはアシルである上記(4)記載のスクリーニング方法、
 (7) R^3 が基(III)である上記(4)記載のスクリーニング方法、
 (8) R^6 がヒドロキシ、カルボキシ、アミノおよびアルキルアンモニオから選ばれる置換基をそれぞれ有していてもよいアルキルまたはシクロアルキルである上記(4)記載のスクリーニング方法、
 (9) R^6 が2-アミノ-2-カルボキシエチルである上記(7)記載のスクリーニング方法、
 (10) R^1 および R^2 が、それぞれ炭化水素基またはアシル、 m が1である上記(9)記載のスクリーニング方法、
 (11) リガンドが、下式：

30

40

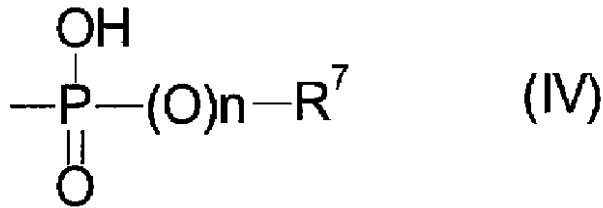
【化8】



〔式中、 R^4 は水素原子、置換基を有していてもよい炭化水素基またはアシルを、 R^5 は水素原子、置換基を有していてもよい炭化水素基、アシルまたは下式：

【化9】

50



(式中、 R^7 は水素原子、置換基を有していてもよいアルキルまたは置換基を有していてもよいシクロアルキルを、 n は0または1を示す。)で表される基(以下、基(IV)と略記する場合もある)を示す。)で表される化合物またはその塩である上記(1)記載のスクリーニング方法、

(12)リガンドがリゾホスファチジルセリンまたはホスファチジルセリンである上記(1)記載のスクリーニング方法、

(13)配列番号:1で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質が、配列番号:22で表わされるアミノ酸配列を含有する蛋白質である上記(1)記載のスクリーニング方法、

(14)配列番号:1で表わされるアミノ酸配列からなる蛋白質またはその塩を用いる上記(1)記載のスクリーニング方法、

(15)配列番号:19で表わされるアミノ酸配列からなる蛋白質またはその塩を用いる上記(1)記載のスクリーニング方法、

(16)(a)配列番号:1または配列番号:19で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩と特異的に結合する能力を有するリガンドを、該蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に接触させた場合と、(b)該リガンドおよび試験化合物を、該蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に接触させた場合における、該リガンドの該蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する結合量を測定し比較する、上記(1)記載のスクリーニング方法、

(17)(a)配列番号:1または配列番号:19で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩と特異的に結合する能力を有するリガンドを、該蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合と、(b)該リガンドおよび試験化合物を、該蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合における、該リガンドの該細胞または該膜画分に対する結合量を測定し比較する、上記(1)記載のスクリーニング方法、

(18)配列番号:1または配列番号:19で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩が、該蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現した蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩である上記(16)記載のスクリーニング方法、

(19)リガンドが、標識したリガンドである上記(16)~(18)記載のスクリーニング方法、

(20)(a)配列番号:1または配列番号:19で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩と特異的に結合する能力を有するリガンドを、該蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に接触させた場合と、(b)該リガンドおよび試験化合物を、該蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に接触させた場合における、該蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を介した細胞刺激活性を測定し、比較する、上記(1)記載のスクリーニング方法、

(21)(a)配列番号:1または配列番号:19で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその

10

20

30

40

50

塩と特異的に結合する能力を有するリガンドを、該蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合と、(b)該リガンドおよび試験化合物を、該蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合における、該蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を介した細胞刺激活性を測定し、比較する、上記(1)記載のスクリーニング方法、

(22) 配列番号：1または配列番号：19で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩が、該蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現した蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩である上記(20)記載のスクリーニング方法、

10

(23) (a) 配列番号：1または配列番号：19で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質またはその塩および(b)該蛋白質またはその塩と特異的に結合する能力を有するリガンドを含有することを特徴とする、該蛋白質またはその塩と該リガンドとの結合性を变化させる化合物またはその塩のスクリーニング用キット、

(24) 上記(1)記載のスクリーニング方法または上記(23)記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる化合物またはその塩、

(25) 化合物が、配列番号：1または配列番号：19で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩とリガンドとの結合を阻害する化合物またはその塩である上記(24)記載の化合物またはその塩、

20

(26) アンタゴニストである上記(25)記載の化合物またはその塩、

(27) アゴニストである上記(25)記載の化合物またはその塩、

(28) 上記(26)記載の化合物またはその塩を含有してなるヒスタミン遊離抑制剤、

(29) 上記(26)記載の化合物またはその塩を含有してなる免疫疾患の予防・治療剤、

(30) 上記(26)記載の化合物またはその塩を含有してなる炎症性疾患の予防・治療剤、

(31) 上記(27)記載の化合物またはその塩を含有してなる神経成長因子活性増強剤

30

(32) 上記(27)記載の化合物またはその塩を含有してなる神経変性疾患の予防・治療剤、

(33) 配列番号：1または配列番号：19で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の活性を阻害する化合物またはその塩を含有してなる免疫疾患の予防・治療剤、

(34) 配列番号：1または配列番号：19で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の活性を促進する化合物またはその塩を含有してなる神経変性疾患の予防・治療剤、

(35) 配列番号：1または配列番号：19で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体を含有してなる免疫疾患または炎症性疾患の予防・治療剤、

40

(36) 配列番号：1または配列番号：19で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩をコードするポリヌクレオチドに相補的または実質的に相補的な塩基配列またはその一部を含有するポリヌクレオチドを含有してなる免疫疾患または炎症性疾患の予防・治療剤、

(37) 配列番号：1または配列番号：19で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質またはその塩と特異的に結合する能力を有するリガンド、

(38) 配列番号：19で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ

50

酸配列を含有する蛋白質またはその塩、

(39) 配列番号：19で表わされるアミノ酸配列からなる蛋白質またはその塩、

(40) 上記(38)記載の蛋白質の部分ペプチドまたはその塩、

(41) 上記(38)記載の蛋白質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチド、

(42) DNAである上記(41)記載のポリヌクレオチド、

(43) 配列番号：20で表される塩基配列からなるポリヌクレオチド、

(44) 上記(41)記載のポリヌクレオチドを含有する組換えベクター、

(45) 上記(44)記載の組換えベクターで形質転換された形質転換体、

(46) 上記(45)記載の形質転換体を培養し、上記(38)記載の蛋白質またはその部分ペプチドを生成・蓄積せしめることを特徴とする上記(38)記載の蛋白質またはその部分ペプチドまたはその塩の製造法、

(47) 上記(38)記載の蛋白質またはその部分ペプチドまたはその塩を含有してなる医薬、

(48) 上記(41)記載のポリヌクレオチドを含有してなる医薬、

(49) 上記(41)記載のポリヌクレオチドを含有してなる診断薬、

(50) 上記(38)記載の蛋白質またはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体、

(51) 上記(50)記載の抗体を含有してなる医薬、

(52) 上記(50)記載の抗体を含有してなる診断薬、

(53) 上記(41)記載のポリヌクレオチドに相補的または実質的に相補的な塩基配列またはその一部を含有するポリヌクレオチド、

(54) DNAである上記(53)記載のポリヌクレオチド、

(55) 上記(53)記載のポリヌクレオチドを含有してなる医薬、

(56) 上記(41)記載のポリヌクレオチドまたはその一部を用いることを特徴とする上記(38)記載の蛋白質のmRNAの定量方法、

(57) 上記(50)記載の抗体を用いることを特徴とする上記(38)記載の蛋白質の定量方法、

(58) 上記(57)記載の定量方法を用いることを特徴とする上記(38)記載の蛋白質の機能が関連する疾患の診断方法、

(59) 上記(38)記載の蛋白質またはその部分ペプチドまたはその塩を用いることを特徴とする上記(38)記載の蛋白質またはその塩に対するリガンドの決定方法、

(60) 外来性の上記(42)記載のポリヌクレオチドまたはその変異DNAを有するトランスジェニック非ヒト哺乳動物、

(61) 非ヒト動物がゲッ歯動物である上記(60)記載の動物、

(62) ゲッ歯動物がマウスまたはラットである上記(61)記載の動物、

(63) 外来性の上記(42)記載のポリヌクレオチドまたはその変異DNAを含有し、非ヒト動物において発現しうる組換えベクター、

(64) 上記(60)記載の動物を用いることを特徴とする上記(42)記載のポリヌクレオチドの欠損・損傷に起因する疾病に対して効果を有する化合物またはその塩のスクリーニング方法などを提供する。

【0008】

以下、「配列番号：1または配列番号：19で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質またはその部分ペプチドもしくはその塩」を「本発明の受容体」と略記する場合がある。さらに、「本発明の受容体と特異的に結合する能力を有するリガンド」を「本発明のリガンド」と略記する場合がある。

さらに、本発明は、

(i) 標識したGTP Sの存在下、本発明のリガンドを本発明の受容体細胞膜画分に接触させた場合と、本発明のリガンドおよび試験化合物を本発明の受容体細胞膜画分に接触させた場合における、本発明の受容体細胞膜画分へのGTP S結合促進活性を測定し、比較することを特徴とする、本発明のリガンドと本発明の受容体との結合性を変化させる

10

20

30

40

50

化合物のスクリーニング方法、

(ii) 細胞内 cAMP 量を増加させる物質の存在下、本発明のリガンドを本発明の受容体発現細胞に接触させた場合と、本発明のリガンドおよび試験化合物を本発明の受容体発現細胞に接触させた場合における、該細胞の細胞内 cAMP の産生抑制活性を測定し、比較することを特徴とする、本発明のリガンドと本発明の受容体との結合性を变化させる化合物のスクリーニング方法、

(iii) 細胞内 cAMP 量を増加させる物質の存在下、本発明のリガンドを、CRE-レポーター遺伝子ベクター導入本発明の受容体発現細胞に接触させた場合と、本発明のリガンドおよび試験化合物を、CRE-レポーター遺伝子ベクター導入本発明の受容体発現細胞に接触させた場合における、レポーター遺伝子蛋白質の酵素活性を測定し、比較することを特徴とする、本発明のリガンドと本発明の受容体との結合性を变化させる化合物のスクリーニング方法、

10

(iv) 本発明のリガンドを、標識したアラキドン酸を含有する本発明の受容体発現細胞に接触させた場合と、本発明のリガンドおよび試験化合物を、標識したアラキドン酸を含有する本発明の受容体発現細胞に接触させた場合における、アラキドン酸代謝物の放出活性を測定し、比較することを特徴とする、本発明のリガンドと本発明の受容体との結合性を变化させる化合物のスクリーニング方法、

(v) 本発明のリガンドを、本発明の受容体発現細胞に接触させた場合と、本発明のリガンドおよび試験化合物を、本発明の受容体発現細胞に接触させた場合における、細胞内カルシウム濃度上昇活性を測定し、比較することを特徴とする、本発明のリガンドと本発明の受容体との結合性を变化させる化合物のスクリーニング方法、

20

(vi) 標識したイノシトールの存在下、本発明のリガンドを、本発明の受容体発現細胞に接触させた場合と、本発明のリガンドおよび試験化合物を、本発明の受容体発現細胞に接触させた場合における、イノシトール三リン酸産生活性を測定し、比較することを特徴とする、本発明のリガンドと本発明の受容体との結合性を变化させる化合物のスクリーニング方法、

(vii) 本発明のリガンドを、TRE-レポーター遺伝子ベクター導入本発明の受容体発現細胞に接触させた場合と、本発明のリガンドおよび試験化合物を、TRE-レポーター遺伝子ベクター導入本発明の受容体発現細胞に接触させた場合における、レポーター遺伝子蛋白質の酵素活性を測定し、比較することを特徴とする、本発明のリガンドと本発明の受容体との結合性を变化させる化合物のスクリーニング方法、

30

(viii) 本発明のリガンドを、本発明の受容体発現細胞に接触させた場合と、本発明のリガンドおよび試験化合物を、本発明の受容体発現細胞に接触させた場合における、細胞増殖を測定し、比較することを特徴とする、本発明のリガンドと本発明の受容体との結合性を变化させる化合物のスクリーニング方法、

(ix) 標識したルビジウムの存在下、本発明のリガンドを、本発明の受容体発現細胞に接触させた場合と、本発明のリガンドおよび試験化合物を、本発明の受容体発現細胞に接触させた場合における、標識したルビジウムの流出活性を測定し、比較することを特徴とする、本発明のリガンドと本発明の受容体との結合性を变化させる化合物のスクリーニング方法、

40

(x) 本発明のリガンドを、本発明の受容体発現細胞に接触させた場合と、本発明のリガンドおよび試験化合物を、本発明の受容体発現細胞に接触させた場合における、細胞外の pH 変化を測定し、比較することを特徴とする、本発明のリガンドと本発明の受容体との結合性を变化させる化合物のスクリーニング方法、

(xi) ヒスチジン合成遺伝子導入本発明の受容体発現酵母を、ヒスチジン欠乏培地で培養し、本発明のリガンドまたは本発明のリガンドおよび試験化合物を接触させ、該酵母の生育を測定し、比較することを特徴とする、本発明のリガンドと本発明の受容体との結合性を变化させる化合物のスクリーニング方法、

(xii) 本発明のリガンドを、本発明の受容体遺伝子 RNA 導入アフリカツメガエル卵母細胞に接触させた場合と、本発明のリガンドおよび試験化合物を、本発明の受容体遺伝子

50

RNA導入アフリカツメガエル卵母細胞に接触させた場合における、細胞膜電位の変化を測定し、比較することを特徴とする、本発明のリガンドと本発明の受容体との結合性を变化させる化合物のスクリーニング方法なども提供する。

【0009】

【発明の実施の形態】

配列番号：1または配列番号：19で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有する蛋白質は、ヒトや温血動物（例えば、モルモット、ラット、マウス、ニワトリ、ウサギ、ブタ、ヒツジ、ウシ、サルなど）の細胞（例えば、網膜細胞、肝細胞、脾細胞、神経細胞、グリア細胞、膵臓細胞、骨髄細胞、メサンギウム細胞、ランゲルハンス細胞、表皮細胞、上皮細胞、内皮細胞、繊維芽細胞、繊維細胞、筋細胞、脂肪細胞、免疫細胞（例、マクロファージ、T細胞、B細胞、ナチュラルキラー細胞、肥満細胞、好中球、好塩基球、好酸球、単球）、巨核球、滑膜細胞、軟骨細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、乳腺細胞、肝細胞もしくは間質細胞、またはこれら細胞の前駆細胞、幹細胞もしくは癌細胞など）もしくはそれらの細胞が存在するあらゆる組織、例えば、脳、脳の各部位（例、網膜、嗅球、扁桃核、大脳基底球、海馬、視床、視床下部、大脳皮質、延髄、小脳）、脊髄、下垂体、胃、膵臓、腎臓、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆のう、骨髄、副腎、皮膚、筋肉、肺、消化管（例、大腸、小腸）、血管、心臓、胸腺、脾臓、顎下腺、末梢血、前立腺、睾丸、卵巣、胎盤、子宮、骨、関節、骨格筋など、または血球系の細胞もしくはその培養細胞（例えば、MEL, M1, CTKL-2, HT-2, WEHI-3, HL-60, JOSK-1, K562, ML-1, MOLT-3, MOLT-4, MOLT-10, CCRF-CEM, TALL-1, Jurkat, CCRT-HSB-2, KE-37, SKW-3, HUT-78, HUT-102, H9, U937, THP-1, HEL, JK-1, CMK, KO-812, MEG-01など）に由来する蛋白質であってもよく、合成蛋白質であってもよい。

【0010】

配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上の相同性を有するアミノ酸配列などがあげられる。

配列番号：1で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質としては、例えば、配列番号：1で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有し、配列番号：1で表されるアミノ酸配列と実質的に同質の活性を有する蛋白質などが好ましい。配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、例えば、配列番号：22で表わされるアミノ酸配列などが挙げられる。

配列番号：19で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、配列番号：19で表わされるアミノ酸配列と約95%以上、好ましくは約97%以上、より好ましくは約99%以上の相同性を有するアミノ酸配列などがあげられる。

配列番号：19で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質としては、例えば、配列番号：19で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有し、配列番号：19で表されるアミノ酸配列と実質的に同質の活性を有する蛋白質などが好ましい。

実質的に同質の活性としては、例えば、リガンド結合活性、シグナル情報伝達作用などが挙げられる。実質的に同質とは、それらの活性が性質的に同質であることを示す。したがって、リガンド結合活性やシグナル情報伝達作用などの活性が同等（例、約0.01~100倍、好ましくは約0.5~20倍、より好ましくは約0.5~2倍）であることが好ましいが、これらの活性の程度や蛋白質の分子量などの量的要素は異なってもよい。リガンド結合活性やシグナル情報伝達作用などの活性の測定は、自体公知の方法に準じて行なうことができるが、例えば、後に記載するリガンドの決定方法やスクリーニング方法に従って測定することができる。

また、本発明の蛋白質としては、(1)(i)配列番号：1で表されるアミノ酸配列中の1または2個以上（例えば1~100個程度、好ましくは1~50個程度、好ましくは1

10

20

30

40

50

～ 30 個程度、より好ましくは 1 ～ 10 個程度、さらに好ましくは数個 (1 ～ 5 個) のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、(ii) 配列番号 : 1 で表されるアミノ酸配列に 1 または 2 個以上 (例えば 1 ～ 100 個程度、好ましくは 1 ～ 50 個程度、好ましくは 1 ～ 30 個程度、より好ましくは 1 ～ 10 個程度、さらに好ましくは数個 (1 ～ 5 個)) のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、(iii) 配列番号 : 1 で表されるアミノ酸配列中の 1 または 2 個以上 (例えば 1 ～ 100 個程度、好ましくは 1 ～ 50 個程度、好ましくは 1 ～ 30 個程度、より好ましくは 1 ～ 10 個程度、さらに好ましくは数個 (1 ～ 5 個)) のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、(iv) 配列番号 : 1 で表されるアミノ酸配列中の 1 または 2 個以上 (例えば 1 ～ 100 個程度、好ましくは 1 ～ 50 個程度、好ましくは 1 ～ 30 個程度、より好ましくは 1 ～ 10 個程度、さらに好ましくは数個 (1 ～ 5 個)) のアミノ酸が挿入されたアミノ酸配列、または (v) それらを組み合わせたアミノ酸配列を含有する蛋白質、(2) (i) 配列番号 : 19 で表されるアミノ酸配列中の 1 または 2 個以上 (例えば 1 ～ 15 個程度、好ましくは 1 ～ 10 個程度、さらに好ましくは数個 (1 ～ 5 個)) のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、(ii) 配列番号 : 19 で表されるアミノ酸配列に 1 または 2 個以上 (例えば 1 ～ 15 個程度、好ましくは 1 ～ 10 個程度、さらに好ましくは数個 (1 ～ 5 個)) のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、(iii) 配列番号 : 19 で表されるアミノ酸配列中の 1 または 2 個以上 (例えば 1 ～ 15 個程度、好ましくは 1 ～ 10 個程度、さらに好ましくは数個 (1 ～ 5 個)) のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、(iv) 配列番号 : 19 で表されるアミノ酸配列中の 1 または 2 個以上 (例えば 1 ～ 15 個程度、好ましくは 1 ～ 10 個程度、さらに好ましくは数個 (1 ～ 5 個)) のアミノ酸が挿入されたアミノ酸配列、または (v) それらを組み合わせたアミノ酸配列を含有する蛋白質なども用いられる。

【 0 0 1 1 】

本発明の受容体の部分ペプチド (以下、本発明の部分ペプチドと称する場合がある) としては、後述の医薬等のスクリーニング方法に用いることのできる部分ペプチドであれば、いかなるものであってもよく、例えば、本発明の蛋白質分子のうち、細胞膜の外に露出している部位であって、実質的に同質のリガンド結合活性などを有するものなどが用いられる。

具体的には、配列番号 : 1 または配列番号 : 19 で表されるアミノ酸配列を有するレセプター蛋白質の部分ペプチドとしては、疎水性プロット解析において細胞外領域 (親水性 (Hydrophilic) 部位) であると分析された部分を含むペプチドである。また、疎水性 (Hydrophobic) 部位を一部に含むペプチドも同様に用いることができる。個々のドメインを個別に含むペプチドも用い得るが、複数のドメインを同時に含む部分のペプチドでもよい。本発明の部分ペプチドのアミノ酸の数は、本発明の蛋白質の構成アミノ酸配列のうち少なくとも 20 個以上、好ましくは 50 個以上、より好ましくは 100 個以上のアミノ酸配列を有するペプチドなどが好ましい。

ここで、「実質的に同質の活性」とは、上記と同意義を示す。「実質的に同質の活性」の測定は上記と同様に行なうことができる。

また、本発明の部分ペプチドは、 1 上記アミノ酸配列中の 1 または 2 個以上 (好ましくは、 1 ～ 10 個程度、さらに好ましくは数個 (1 ～ 5 個)) のアミノ酸が欠失し、 2 上記アミノ酸配列に 1 または 2 個以上 (好ましくは、 1 ～ 20 個程度、より好ましくは 1 ～ 10 個程度、さらに好ましくは数個 (1 ～ 5 個)) のアミノ酸が付加し、または 3 上記アミノ酸配列中の 1 または 2 個以上 (好ましくは、 1 ～ 10 個程度、より好ましくは数個、さらに好ましくは 1 ～ 5 個程度) のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されていてもよい。

具体例としては、配列番号 : 1 で表される配列の第 1 ～ 53 番目、第 114 ～ 128 番目、第 197 ～ 216 番目、または第 293 ～ 310 番目のアミノ酸配列を含む部分ペプチド、配列番号 : 19 で表される配列の第 1 ～ 46 番目、第 107 ～ 121 番目、第 190 番目～ 209 番目、または第 286 番目～ 303 番目のアミノ酸配列を含む部分ペプチドなどが用いられる。

【 0 0 1 2 】

本発明の受容体および本発明の部分ペプチドは、ペプチド標記の慣例に従って左端がN末端（アミノ末端）、右端がC末端（カルボキシル末端）である。C末端はカルボキシ（ $-COOH$ ）、カルボキシレート（ $-COO^-$ ）、アミド（ $-CONH_2$ ）またはエステル（ $-COOR$ ）であってもよい。

ここでエステルにおけるRとしては、例えば、メチル、エチル、*n*-プロピル、イソプロピルもしくは*n*-ブチルなどの C_{1-6} アルキル、例えば、シクロペンチル、シクロヘキシルなどの C_{3-8} シクロアルキル、例えば、フェニル、*n*-ナフチルなどの C_{6-12} アリール、例えば、ベンジル、フェネチルなどのフェニル- C_{1-2} アルキルもしくは*n*-ナフチルメチルなどの*n*-ナフチル- C_{1-2} アルキルなどの C_{7-14} アラルキルのほか、経口用エステルとして汎用されるピバロイルオキシメチルなどが用いられる。

本発明の受容体および本発明の部分ペプチドがC末端以外にカルボキシ（またはカルボキシレート）を有している場合、カルボキシがアミド化またはエステル化されているものも本発明の受容体および本発明の部分ペプチドに含まれる。この場合のエステルとしては、例えば上記したC末端のエステルなどが用いられる。

さらに、本発明の受容体および本発明の部分ペプチドには、N末端のアミノ酸残基（例、メチオニン残基）のアミノ基が保護基（例えば、ホルミル、アセチルなどの C_{1-6} アルカノイルなどの C_{1-6} アシルなど）で保護されているもの、生体内で切断されて生成するN末端のグルタミン残基がピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基（例えば、 $-OH$ 、 $-SH$ 、アミノ基、イミダゾール基、インドール基、グアニジノ基など）が適当な保護基（例えば、ホルミル、アセチルなどの C_{1-6} アルカノイルなどの C_{1-6} アシルなど）で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖蛋白質などの複合蛋白質なども含まれる。

【 0 0 1 3 】

本発明の受容体または本発明の部分ペプチドの塩としては、生理学的に許容される酸（例、無機酸、有機酸）や塩基（例、アルカリ金属塩）などとの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。このような塩としては、例えば、無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸）との塩などが用いられる。

【 0 0 1 4 】

配列番号：1または配列番号：19で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質と特異的に結合する能力を有するリガンド（本発明のリガンド）としては、本発明の受容体と特異的に結合するものであれば、何れの物であってもよい。例えば、配列番号：1または配列番号：19で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質またはその塩との結合の解離定数が $10\ \mu M$ 以下、好ましくは $2\ \mu M$ 以下、さらに好ましくは $1\ \mu M$ 以下、特に好ましくは $200\ nM$ 以下、最も好ましくは $100\ nM$ 以下である物などが挙げられる。

本発明のリガンドとしては、例えば、脂質などが用いられる。具体的にはホスホノ脂質などのリン脂質なども用いられる。好ましくは、エーテルリン脂質、ホスホノエーテル脂質、グリセロリン脂質、ホスホノグリセロ脂質、スフィンゴ脂質、スフィンゴリン脂質、ホスホノスフィンゴ脂質などが用いられる。なかでも、エーテルリン脂質、ホスホノエーテル脂質、グリセロリン脂質、ホスホノグリセロ脂質が好ましい。さらにグリセロリン脂質が好ましい。

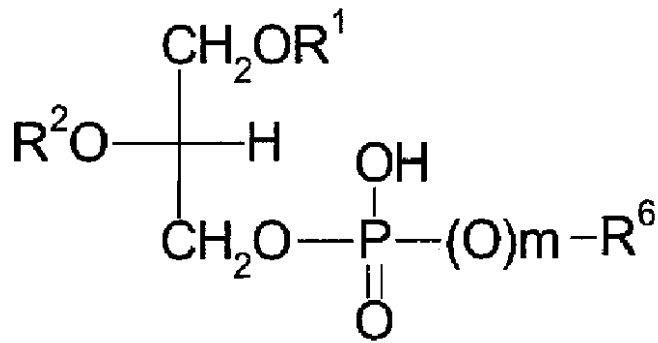
エーテルリン脂質、ホスホノエーテル脂質、グリセロリン脂質、ホスホノグリセロ脂質、スフィンゴ脂質、スフィンゴリン脂質およびホスホノスフィンゴ脂質などから選ばれる2種以上の混合物も、本発明のリガンドに含まれる。

エーテルリン脂質、ホスホノエーテル脂質、グリセロリン脂質およびホスホノグリセロ脂質としては、例えば化合物(1)などが挙げられる。

【 0 0 1 5 】

化合物(1)は、好ましくは、下式：

【化10】

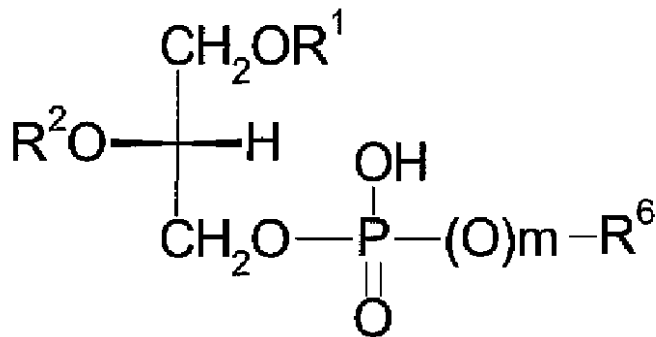


10

〔式中、各記号は上記と同意義を示す〕で表される化合物またはその塩である。

さらに好ましくは、下式：

【化11】



20

〔式中、各記号は上記と同意義を示す〕で表される化合物またはその塩である。

【0016】

各式中、 R^1 、 R^2 または R^3 で示される「置換基を有していてもよい炭化水素基」の「炭化水素基」としては、例えば、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキルなどが挙げられる。炭素数は1～30個が好ましい。

30

「アルキル」としては、例えば C_{1-30} アルキル（例、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、sec-ブチル、tert-ブチル、ペンチル、ヘキシル、ヘプチル、オクチル、ノニル、デシル、ウンデシル、ドデシル、トリデシル、テトラデシル、ペンタデシル、ヘキサデシル、ヘプタデシル、オクタデシル、ノナデシル、イコシル、ヘニコシル、ドコシル、トリコシル、テトラコシル、ペンタコシル、ヘキサコシル、ヘプタコシル、オクタコシル、ノナコシル、トリアコンチルなど）などが挙げられる。好ましくは C_{9-30} アルキルなどである。さらに好ましくはトリデシル、テトラデシル、ペンタデシル、ヘキサデシル、ヘプタデシル、オクタデシル、ノナデシルなどの C_{13-19} アルキルなどである。

「アルケニル」としては、例えば C_{2-30} アルケニル（例、ビニル、アリル、イソプロペニル、1-ブテニル、2-ブテニル、3-ブテニル、2-メチル-2-プロペニル、1-メチル-2-プロペニル、2-メチル-1-プロペニル、ヘキセニル、ヘプテニル、オクテニル、ノネニル、デセニル、ウンデセニル、ドデセニル、トリデセニル、テトラデセニル、テトラデカジエニル、ペンタデセニル、ペンタデカジエニル、ヘキサデセニル、ヘキサデカジエニル、ヘプタデセニル、ヘプタデカジエニル、ヘプタデカトリエニル、オクタデセニル、オクタデカジエニル、ノナデセニル、ノナデカジエニル、ノナデカトリエニル、ノナデカテトラエニル、イコセニル、イコサジエニル、ヘニコセニル、ドコセニル、トリコセニル、テトラコセニル、ペンタコセニル、ヘキサコセニル、ヘプタコセニル、オクタコセニル、ノナコセニル、トリアコンテニルなど）などが挙げられる。好ましくは C_{13-19} アルケニルである。

40

50

「アルキニル」としては、例えば C_{2-30} アルキニル（例、エチニル、プロパルギル、1-ブチニル、2-ブチニル、3-ブチニル、1-ヘキシニル、テトラデシニル、ペンタデシニル、ヘキサデシニル、ヘプタデシニル、オクタデシニル、ノナデシニル、イコシニル、ヘニコシニル、ドコシニル、トリコシニル、テトラコシニル、ペンタコシニル、ヘキサコシニル、ヘプタコシニル、オクタコシニル、ノナコシニル、トリアコンチニルなど）などが挙げられる。好ましくは C_{15-17} アルキニルである。

「シクロアルキル」としては、例えば C_{3-6} シクロアルキル（例、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシルなど）などが挙げられる。

【0017】

R^1 、 R^2 または R^3 で示される「アシル」としては、式： $-CO-R^8$ 、 $-(C=O)-OR^8$ 、 $-(C=O)-NR^8R^9$ 、 $-SO-R^{10}$ 、または $-SO_2-R^{10}$ 〔式中、 R^8 は水素原子、置換基を有していてもよい炭化水素基または置換基を有していてもよい複素環基を、 R^9 は水素原子または C_{1-6} アルキルを、 R^{10} は置換基を有していてもよい炭化水素基または置換基を有していてもよい複素環基を示す〕で表される基などが挙げられる。好ましくは、式： $-CO-R^8$ で表される基である。

10

【0018】

R^8 または R^{10} で示される「置換基を有していてもよい炭化水素基」の「炭化水素基」としては、上記 R^1 、 R^2 または R^3 で示される「炭化水素基」などが挙げられる。

本明細書中の「置換基を有していてもよい炭化水素基」の「置換基」としては、例えばハロゲン原子（例、フッ素、塩素、臭素、ヨウ素など）、 C_{1-3} アルケレンジオキシ（例、メチレンジオキシ、エチレンジオキシなど）、 C_{1-6} アルキル（例、メチル、クロロメチル、ジフルオロメチル、トリクロロメチル、トリフルオロメチル、エチル、2-プロモエチル、2,2,2-トリフルオロエチル、ペンタフルオロエチル、プロピル、3,3,3-トリフルオロプロピル、イソプロピル、ブチル、4,4,4-トリフルオロブチル、イソブチル、sec-ブチル、tert-ブチル、ペンチル、イソペンチル、ネオペンチル、5,5,5-トリフルオロペンチル、ヘキシル、6,6,6-トリフルオロヘキシルなど）、 C_{2-6} アルケニル、 C_{2-6} アルキニル、ハロゲン化されていてもよい C_{3-6} シクロアルキル（例、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、4,4-ジシクロヘキシル、2,2,3,3-テトラフルオロシクロペンチル、4-クロロシクロヘキシルなど）、 C_{6-14} アリール（例、フェニル、1-ナフチル、2-ナフチル、2-ピフェニル、3-ピフェニル、4-ピフェニル、2-アンズリルなど）、ハロゲン化されていてもよい C_{1-8} アルコキシ（例、メトキシ、ジフルオロメトキシ、トリフルオロメトキシ、エトキシ、2,2,2-トリフルオロエトキシ、プロポキシ、イソプロポキシ、ブトキシ、4,4,4-トリフルオロブトキシ、イソブトキシ、sec-ブトキシ、ペンチルオキシ、ヘキシルオキシなど）、ヒドロキシ、 C_{6-14} アリールオキシ（例、フェニルオキシ、1-ナフチルオキシ、2-ナフチルオキシなど）、 C_{7-16} アラルキルオキシ（例、ベンジルオキシ、フェネチルオキシなど）、メルカプト、ハロゲン化されていてもよい C_{1-6} アルキルチオ（例、メチルチオ、ジフルオロメチルチオ、トリフルオロメチルチオ、エチルチオ、プロピルチオ、イソプロピルチオ、ブチルチオ、4,4,4-トリフルオロブチルチオ、ペンチルチオ、ヘキシルチオなど）、 C_{6-14} アリールチオ（例、フェニルチオ、1-ナフチルチオ、2-ナフチルチオなど）、 C_{7-16} アラルキルチオ（例、ベンジルチオ、フェネチルチオなど）、アミノ、モノ- C_{1-6} アルキルアミノ（例、メチルアミノ、エチルアミノなど）、モノ- C_{6-14} アリールアミノ（例、フェニルアミノ、1-ナフチルアミノ、2-ナフチルアミノなど）、ジ- C_{1-6} アルキルアミノ（例、ジメチルアミノ、ジエチルアミノ、エチルメチルアミノなど）、ジ- C_{6-14} アリールアミノ（例、ジフェニルアミノなど）、ホルミル、カルボキシ、 C_{1-6} アルキル-カルボニル（例、アセチル、プロピオニルなど）、 C_{3-6} シクロアルキル-カルボニル（例、シクロプロピルカルボニル、シクロペンチルカルボニル、シクロヘキシルカルボニルなど）、 C_{1-6} アルコキシ-カルボニル（例、メトシカルボニル、エトシカルボニル、プロポキシカルボニル、tert-ブトシカルボニルなど）、 C_{6-14} ア

20

30

40

50

リール - カルボニル (例、ベンゾイル、1 - ナフトイル、2 - ナフトイルなど)、 C_{7-16}
 アラルキル - カルボニル (例、フェニルアセチル、3 - フェニルプロピオニルなど)、 C_{6-14}
 アリールオキシ - カルボニル (例、フェノキシカルボニルなど)、 C_{7-16} アラルキル
 オキシ - カルボニル (例、ベンジルオキシカルボニル、フェネチルオキシカルボニルなど)
)、5 ないし 6 員複素環カルボニル (例、ニコチノイル、イソニコチノイル、テノイル、
 フロイル、モルホリノカルボニル、チオモルホリノカルボニル、ピペラジン - 1 - イルカ
 ルボニル、ピロリジン - 1 - イルカルボニルなど)、カルバモイル、モノ - C_{1-6} アルキ
 ル - カルバモイル (例、メチルカルバモイル、エチルカルバモイルなど)、ジ - C_{1-6} ア
 ルキル - カルバモイル (例、ジメチルカルバモイル、ジエチルカルバモイル、エチルメチ
 ルカルバモイルなど)、 C_{6-14} アリール - カルバモイル (例、フェニルカルバモイル、1
 - ナフチルカルバモイル、2 - ナフチルカルバモイルなど)、5 ないし 6 員複素環カルバ
 モイル (例、2 - ピリジルカルバモイル、3 - ピリジルカルバモイル、4 - ピリジルカル
 バモイル、2 - チエニルカルバモイル、3 - チエニルカルバモイルなど)、 C_{1-6} アルキ
 ルスルホニル (例、メチルスルホニル、エチルスルホニルなど)、 C_{6-14} アリールスルホ
 ニル (例、フェニルスルホニル、1 - ナフチルスルホニル、2 - ナフチルスルホニルなど)
)、ホルミルアミノ、 C_{1-6} アルキル - カルボニルアミノ (例、アセチルアミノなど)、
 C_{6-14} アリール - カルボニルアミノ (例、ベンゾイルアミノ、ナフトイルアミノなど)、
 C_{1-6} アルコキシ - カルボニルアミノ (例、メトキシカルボニルアミノ、エトキシカルボ
 ニルアミノ、プロポキシカルボニルアミノ、ブトキシカルボニルアミノなど)、 C_{1-6} アル
 キルスルホニルアミノ (例、メチルスルホニルアミノ、エチルスルホニルアミノなど)
)、 C_{6-14} アリールスルホニルアミノ (例、フェニルスルホニルアミノ、2 - ナフチルスル
 ホニルアミノ、1 - ナフチルスルホニルアミノなど)、 C_{1-6} アルキル - カルボニルオキ
 シ (例、アセトキシ、プロピオニルオキシなど)、 C_{6-14} アリール - カルボニルオキシ (例、
 ベンゾイルオキシ、ナフチルカルボニルオキシなど)、 C_{1-6} アルコキシ - カルボニ
 ルオキシ (例、メトキシカルボニルオキシ、エトキシカルボニルオキシ、プロポキシカル
 ボニルオキシ、ブトキシカルボニルオキシなど)、モノ - C_{1-6} アルキル - カルバモイル
 オキシ (例、メチルカルバモイルオキシ、エチルカルバモイルオキシなど)、ジ - C_{1-6}
 アルキル - カルバモイルオキシ (例、ジメチルカルバモイルオキシ、ジエチルカルバモイ
 ルオキシなど)、 C_{6-14} アリール - カルバモイルオキシ (例、フェニルカルバモイルオキ
 シ、ナフチルカルバモイルオキシなど)、ニコチノイルオキシ、5 ないし 7 員飽和環状ア
 ミノ (例、ピロリジン - 1 - イル、ピペリジノ、ピペラジン - 1 - イル、モルホリノ、チ
 オモルホリノ、テトラヒドロアゼピン - 1 - イルなど)、5 ないし 10 員芳香族複素環基
 (例、2 - チエニル、3 - チエニル、2 - ピリジル、3 - ピリジル、4 - ピリジル、2 -
 キノリル、3 - キノリル、4 - キノリル、5 - キノリル、8 - キノリル、1 - イソキノリ
 ル、3 - イソキノリル、4 - イソキノリル、5 - イソキノリル、1 - インドリル、2 - イ
 ンドリル、3 - インドリル、2 - ベンゾチアゾリル、2 - ベンゾ [b] チエニル、3 - ベ
 ンゾ [b] チエニル、2 - ベンゾ [b] フラニル、3 - ベンゾ [b] フラニルなど)、ス
 ルホなどが挙げられる。

該「炭化水素基」は、例えば上記置換基を、置換可能な位置に 1 ないし 5 個、好ましくは
 1 ないし 3 個有していてもよく、置換基数が 2 個以上の場合、各置換基は同一または異な
 っていてもよい。

【 0 0 1 9 】

R^8 または R^{10} で示される「置換基を有していてもよい複素環基」の「複素環基」として
 は、例えば、炭素原子以外に窒素原子、硫黄原子および酸素原子から選ばれる 1 または 2
 種、1 ないし 4 個のヘテロ原子を含む 5 ないし 14 員 (単環、2 環または 3 環式) 複素環
 、好ましくは (i) 5 ないし 14 員 (好ましくは 5 ないし 10 員) 芳香族複素環、(ii)
 5 ないし 10 員非芳香族複素環または (iii) 7 ないし 10 員複素架橋環から任意の 1 個
 の水素原子を除いてできる 1 価基などが挙げられる。

上記「5 ないし 14 員 (好ましくは 5 ないし 10 員) の芳香族複素環」としては、例えば
 、チオフェン、ベンゾ [b] チオフェン、ベンゾ [b] フラン、ベンズイミダゾール、ベ

10

20

30

40

50

ンズオキサゾール、ベンゾチアゾール、ベンズイソチアゾール、ナフト[2,3-b]チオフェン、フラン、ピロール、イミダゾール、ピラゾール、ピリジン、ピラジン、ピリミジン、ピリダジン、インドール、イソインドール、1H-インダゾール、プリン、4H-キノリジン、イソキノリン、キノリン、フタラジン、ナフチリジン、キノキサリン、キナゾリン、シンノリン、カルバゾール、 α -カルボリン、フェナントリジン、アクリジン、フェナジン、チアゾール、イソチアゾール、フェノチアジン、イソオキサゾール、フラザン、フェノキサジンなどの芳香族複素環、またはこれらの環(好ましくは単環)が1ないし複数個(好ましくは1または2個)の芳香環(例、ベンゼン環等)と縮合して形成された環などが挙げられる。

上記「5ないし10員非芳香族複素環」としては、例えば、ピロリジン、イミダゾリン、ピラゾリジン、ピラゾリン、ピペリジン、ピペラジン、モルホリン、チオモルホリン、ジオキサゾール、オキサジアゾリン、チアジアゾリン、トリアゾリン、チアジアゾール、ジチアゾールなどが挙げられる。

上記「7ないし10員複素架橋環」としては、例えば、キヌクリジン、7-アザピシクロ[2.2.1]ヘプタンなどが挙げられる。

【0020】

該「複素環基」として好ましくは、炭素原子以外に窒素原子、硫黄原子および酸素原子から選ばれる1または2種、好ましくは、1ないし4個のヘテロ原子を含む5ないし14員(好ましくは5ないし10員)の(単環または2環式)複素環基である。具体的には、例えば2-チエニル、3-チエニル、2-フリル、3-フリル、2-ピリジル、3-ピリジル、4-ピリジル、2-キノリル、3-キノリル、4-キノリル、5-キノリル、8-キノリル、1-イソキノリル、3-イソキノリル、4-イソキノリル、5-イソキノリル、ピラジニル、2-ピリミジニル、4-ピリミジニル、3-ピロリル、2-イミダゾリル、3-ピリダジニル、3-イソチアゾリル、3-イソオキサゾリル、1-インドリル、2-インドリル、3-インドリル、2-ベンゾチアゾリル、2-ベンゾ[b]チエニル、3-ベンゾ[b]チエニル、2-ベンゾ[b]フラニル、3-ベンゾ[b]フラニルなどの芳香族複素環基、例えば1-ピロリジニル、2-ピロリジニル、3-ピロリジニル、2-イミダゾリニル、4-イミダゾリニル、2-ピラゾリジニル、3-ピラゾリジニル、4-ピラゾリジニル、ピペリジノ、2-ピペリジル、3-ピペリジル、4-ピペリジル、1-ピペラジニル、2-ピペラジニル、モルホリノ、チオモルホリノなどの非芳香族複素環基などである。

このうち、例えば炭素原子以外に窒素原子、硫黄原子および酸素原子から選ばれる1ないし3個のヘテロ原子を含む5ないし6員の複素環基等がさらに好ましい。具体的には、2-チエニル、3-チエニル、2-ピリジル、3-ピリジル、4-ピリジル、2-フリル、3-フリル、ピラジニル、2-ピリミジニル、3-ピロリル、3-ピリダジニル、3-イソチアゾリル、3-イソオキサゾリル、1-ピロリジニル、2-ピロリジニル、3-ピロリジニル、2-イミダゾリニル、4-イミダゾリニル、2-ピラゾリジニル、3-ピラゾリジニル、4-ピラゾリジニル、ピペリジノ、2-ピペリジル、3-ピペリジル、4-ピペリジル、1-ピペラジニル、2-ピペラジニル、モルホリノ、チオモルホリノなどが挙げられる。

該「置換基を有していてもよい複素環基」の「置換基」としては、例えば上記R⁸またはR¹⁰で示される「置換基を有していてもよい炭化水素基」の「置換基」と同様のものなどが挙げられる。

該「複素環基」は、例えば上記置換基を、置換可能な位置に1ないし5個、好ましくは1ないし3個有していてもよく、置換基数が2個以上の場合、各置換基は同一または異なっているもよい。

【0021】

R⁹で示される「C₁₋₆アルキル」としては、例えば、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、sec-ブチル、tert-ブチル、ペンチル、ヘキシルなどのC₁₋₆アルキルが挙げられる。

10

20

30

40

50

【0022】

R⁶で示される「置換基を有していてもよいアルキル」の「アルキル」としては、例えばC₁₋₃₀アルキル（例、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、sec-ブチル、tert-ブチル、ペンチル、ヘキシル、ヘプチル、オクチル、ノニル、デシル、ウンデシル、ドデシル、トリデシル、テトラデシル、ペンタデシル、ヘキサデシル、ヘプタデシル、オクタデシル、ノナデシル、イコシル、ヘニコシル、ドコシル、トリコシル、テトラコシル、ペンタコシル、ヘキサコシル、ヘプタコシル、オクタコシル、ノナコシル、トリアコンチルなど）などが挙げられる。好ましくはC₁₋₆アルキルなどである。

R⁶で示される「置換基を有していてもよいアルキル」の「置換基」としては、例えば、ヒドロキシ、カルボキシ、アミノ、アルキルアンモニオ（例、トリメチルアンモニオなど）などが1～30個挙げられる。

10

【0023】

R⁶で示される「置換基を有していてもよいシクロアルキル」の「シクロアルキル」としては、例えばC₃₋₆シクロアルキル（例、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシルなど）などが挙げられる。

R⁶で示される「置換基を有していてもよいシクロアルキル」の「置換基」としては、例えば、ホスホノを有していてもよいヒドロキシ、カルボキシ、アミノ、アルキルアンモニオ（例、トリメチルアンモニオなど）などが1～30個挙げられる。

【0024】

R⁶の好ましい例としては、R⁶-OHで表される化合物が、例えば、アルコール（例、エタノールなどのC₁₋₆アルコールなど）、多価アルコール（例、グリセロールなどの三価アルコールなど）、多価アルコールリン酸付加体（例、グリセロール-3-リン酸など）、アミノアルコール（例、エタノールアミンなどのC₁₋₆アルコールアミンなど）、アルキルアンモニオアルコール（例、コリンなど）、ヒドロキシを有するアミノ酸（例、セリン、スレオニン、ホモセリン、3-ヒドロキプロリン、4-ヒドロキプロリン、ヒドロキシリジン、チロシンなど；好ましくはセリン）、糖アルコール（例、イノシトールなど）、糖アルコールリン酸付加体（例、イノシトール-リン酸、イノシトールニリン酸、イノシトール三リン酸など）、単糖（例、グルコースなど）、単糖リン酸付加体（例、グルコース6-リン酸、グルコース1-リン酸など）などを形成する場合が挙げられる。

20

中でも好ましくは、ヒドロキシを有するアミノ酸などが挙げられる。中でもL体が好ましい。最も好ましくはL-セリンなどである。

30

【0025】

R¹およびR²は、それぞれ、水素原子、アルキル（例、C₁₄₋₁₈アルキルなど）、アルケニル（例、C₂₋₃アルケニルなど）、アシル（例、C₁₋₃₀アルキル-カルボニル、C₂₋₃₀アルケニル-カルボニルなど）などが好ましい。さらに好ましくはC₁₋₃₀アルキル-カルボニル、C₂₋₃₀アルケニル-カルボニルなどのアシルである。

R³は基(III)などが好ましい。

R⁶は(a)水素原子または(b)ヒドロキシ、カルボキシ、アミノおよびアルキルアンモニオから選ばれる置換基をそれぞれ有していてもよいアルキルまたはシクロアルキルが好ましい。具体例としては、C₁₋₆アルキル、ジヒドロキシプロピル、アミノエチル、トリメチルアンモニオエチル、2-アミノ-2-カルボキシエチル、ヘキサヒドロキシシクロヘキシルなどが挙げられる。

40

mは1が好ましい。

【0026】

化合物(1)中、以下の化合物などが好ましく用いられる。

(1a) 血小板活性化因子(platelet activating factor)〔R¹がC₁₆アルキル(ヘキサデシル)および/またはC₁₈アルキル(オクタデシル)、R²がアセチル、R³が基(III)、R⁶がトリメチルアンモニオエチル、mが1である化合物(1)〕、

(1b) リゾ血小板活性化因子〔R¹がヘキサデシルおよび/またはオクタデシル、R²が水素原子、R³が基(III)、R⁶がトリメチルアンモニオエチル、mが1である化合物(1)〕

50

〕、

(1c) プラスマローゲン類〔 R^1 が1-アルケニル、 R^2 が C_{1-29} アルキル-カルボニルまたは C_{2-29} アルケニル-カルボニル(1から5個の二重結合を有する)、 R^3 が基(III)、 R^6 がトリメチルアンモニオエチル、アミノエチルまたは2-アミノ-2-カルボキシエチル、 m が1である化合物(1)〕、

(1d) リゾプラスマローゲン類〔 R^1 が1-アルケニル、 R^2 が水素原子、 R^3 が基(III)、 R^6 がトリメチルアンモニオエチル、アミノエチルまたは2-アミノ-2-カルボキシエチル、 m が1である化合物(1)〕などのエーテルリン脂質；

【0027】

(2a) ホスファチジン酸類〔 R^1 が C_{10-28} アルキル-カルボニルまたは C_{10-28} アルケニル-カルボニル(1から5個の二重結合を有する)(例、デカノイル、ドデカノイル、テトラデカノイル、ヘキサデカノイル、9-ヘキサデセノイル、オクタデカノイル、9-オクタデセノイル、11-オクタデセノイル、9,12-オクタデカジエノイル、9,12,15-オクタデカトリエノイル、6,9,12-オクタデカトリエノイル、9,11,13-オクタデカトリエノイル、イコサノイル、8,11-イコサジエノイル、5,8,11-イコサトリエノイル、5,8,11,14-イコサテトラエノイル、ドコサノイル、テトラコサノイル、15-テトラコサノイル、ヘキサコサノイル、オクタコサノイルなど)、 R^2 が C_{10-28} アルキル-カルボニルまたは C_{10-28} アルケニル-カルボニル(1から5個の二重結合を有する)(例、デカノイル、ドデカノイル、テトラデカノイル、ヘキサデカノイル、9-ヘキサデセノイル、オクタデカノイル、9-オクタデセノイル、11-オクタデセノイル、9,12-オクタデカジエノイル、9,12,15-オクタデカトリエノイル、6,9,12-オクタデカトリエノイル、9,11,13-オクタデカトリエノイル、イコサノイル、8,11-イコサジエノイル、5,8,11-イコサトリエノイル、5,8,11,14-イコサテトラエノイル、ドコサノイル、テトラコサノイル、15-テトラコサノイル、ヘキサコサノイル、オクタコサノイルなど)、 R^3 が基(III)、 R^6 が水素原子、 m が1である化合物(1)〕、

【0028】

(2b) リゾホスファチジン酸類〔 R^1 が水素原子または C_{10-28} アルキル-カルボニルもしくは C_{10-28} アルケニル-カルボニル(1から5個の二重結合を有する)(例、デカノイル、ドデカノイル、テトラデカノイル、ヘキサデカノイル、9-ヘキサデセノイル、オクタデカノイル、9-オクタデセノイル、11-オクタデセノイル、9,12-オクタデカジエノイル、9,12,15-オクタデカトリエノイル、6,9,12-オクタデカトリエノイル、9,11,13-オクタデカトリエノイル、イコサノイル、8,11-イコサジエノイル、5,8,11-イコサトリエノイル、5,8,11,14-イコサテトラエノイル、ドコサノイル、テトラコサノイル、15-テトラコサノイル、ヘキサコサノイル、オクタコサノイルなど)、 R^2 が水素原子または C_{13-23} アルキル-カルボニルもしくは C_{13-23} アルケニル-カルボニル(1から5個の二重結合を有する)(例、デカノイル、ドデカノイル、テトラデカノイル、ヘキサデカノイル、9-ヘキサデセノイル、オクタデカノイル、9-オクタデセノイル、11-オクタデセノイル、9,12-オクタデカジエノイル、9,12,15-オクタデカトリエノイル、6,9,12-オクタデカトリエノイル、9,11,13-オクタデカトリエノイル、イコサノイル、8,11-イコサジエノイル、5,8,11-イコサトリエノイル、5,8,11,14-イコサテトラエノイル、ドコサノイル、テトラコサノイル、15-テトラコサノイル、ヘキサコサノイル、オクタコサノイルなど)、 R^3 が基(III)、 R^6 が水素原子、 m が1である(ただし R^1 が水素原子の場合、 R^2 は水素原子以外)化合物(1)〕、

【0029】

(2c) ホスファチジルコリン類〔 R^1 が C_{10-28} アルキル-カルボニルまたは C_{10-28} アルケニル-カルボニル(1から5個の二重結合を有する)(例、デカノイル、ドデカノイル、テトラデカノイル、ヘキサデカノイル、9-ヘキサデセノイル、オクタデカノイル、9-オクタデセノイル、11-オクタデセノイル、9,12-オクタデカジエノイル、9,1

10

20

30

40

50

2, 15 - オクタデカトリエノイル、6, 9, 12 - オクタデカトリエノイル、9, 11, 13 - オクタデカトリエノイル、イコサノイル、8, 11 - イコサジエノイル、5, 8, 11 - イコサトリエノイル、5, 8, 11, 14 - イコサテトラエノイル、ドコサノイル、テトラコサノイル、15 - テトラコサノイル、ヘキサコサノイル、オクタコサノイルなど)、 R^2 が C_{13-23} アルキル - カルボニルまたは C_{13-23} アルケニル - カルボニル(1から5個の二重結合を有する)(例、デカノイル、ドデカノイル、テトラデカノイル、ヘキサデカノイル、9 - ヘキサデセノイル、オクタデカノイル、9 - オクタデセノイル、11 - オクタデセノイル、9, 12 - オクタデカジエノイル、9, 12, 15 - オクタデカトリエノイル、6, 9, 12 - オクタデカトリエノイル、9, 11, 13 - オクタデカトリエノイル、イコサノイル、8, 11 - イコサジエノイル、5, 8, 11 - イコサトリエノイル、5, 8, 11, 14 - イコサテトラエノイル、ドコサノイル、テトラコサノイル、15 - テトラコサノイル、ヘキサコサノイル、オクタコサノイルなど)、 R^3 が基(III)、 R^6 がトリメチルアンモニオエチル、 m が1である化合物(I)、

【0030】

(2d) リゾホスファチジルコリン類 [R^1 が水素原子または C_{10-28} アルキル - カルボニルもしくは C_{10-28} アルケニル - カルボニル(1から5個の二重結合を有する)(例、デカノイル、ドデカノイル、テトラデカノイル、ヘキサデカノイル、9 - ヘキサデセノイル、オクタデカノイル、9 - オクタデセノイル、11 - オクタデセノイル、9, 12 - オクタデカジエノイル、9, 12, 15 - オクタデカトリエノイル、6, 9, 12 - オクタデカトリエノイル、9, 11, 13 - オクタデカトリエノイル、イコサノイル、8, 11 - イコサジエノイル、5, 8, 11 - イコサトリエノイル、5, 8, 11, 14 - イコサテトラエノイル、ドコサノイル、テトラコサノイル、15 - テトラコサノイル、ヘキサコサノイル、オクタコサノイルなど)、 R^2 が水素原子または C_{10-28} アルキル - カルボニルもしくは C_{10-28} アルケニル - カルボニル(1から5個の二重結合を有する)(例、デカノイル、ドデカノイル、テトラデカノイル、ヘキサデカノイル、9 - ヘキサデセノイル、オクタデカノイル、9 - オクタデセノイル、11 - オクタデセノイル、9, 12 - オクタデカジエノイル、9, 12, 15 - オクタデカトリエノイル、6, 9, 12 - オクタデカトリエノイル、9, 11, 13 - オクタデカトリエノイル、イコサノイル、8, 11 - イコサジエノイル、5, 8, 11 - イコサトリエノイル、5, 8, 11, 14 - イコサテトラエノイル、ドコサノイル、テトラコサノイル、15 - テトラコサノイル、ヘキサコサノイル、オクタコサノイルなど)、 R^3 が基(III)、 R^6 がトリメチルアンモニオエチル、 m が1である(ただし R^1 が水素原子の場合、 R^2 は水素原子以外)化合物(I)、

【0031】

(2e) ホスファチジエタノールアミン類 [R^1 が C_{10-28} アルキル - カルボニルまたは C_{10-28} アルケニル - カルボニル(1から5個の二重結合を有する)(例、デカノイル、ドデカノイル、テトラデカノイル、ヘキサデカノイル、9 - ヘキサデセノイル、オクタデカノイル、9 - オクタデセノイル、11 - オクタデセノイル、9, 12 - オクタデカジエノイル、9, 12, 15 - オクタデカトリエノイル、6, 9, 12 - オクタデカトリエノイル、9, 11, 13 - オクタデカトリエノイル、イコサノイル、8, 11 - イコサジエノイル、5, 8, 11 - イコサトリエノイル、5, 8, 11, 14 - イコサテトラエノイル、ドコサノイル、テトラコサノイル、15 - テトラコサノイル、ヘキサコサノイル、オクタコサノイルなど)、 R^2 が C_{10-28} アルキル - カルボニルまたは C_{10-28} アルケニル - カルボニル(1から5個の二重結合を有する)(例、デカノイル、ドデカノイル、テトラデカノイル、ヘキサデカノイル、9 - ヘキサデセノイル、オクタデカノイル、9 - オクタデセノイル、11 - オクタデセノイル、9, 12 - オクタデカジエノイル、9, 12, 15 - オクタデカトリエノイル、6, 9, 12 - オクタデカトリエノイル、9, 11, 13 - オクタデカトリエノイル、イコサノイル、8, 11 - イコサジエノイル、5, 8, 11 - イコサトリエノイル、5, 8, 11, 14 - イコサテトラエノイル、ドコサノイル、テトラコサノイル、15 - テトラコサノイル、ヘキサコサノイル、オクタコサノイルなど)、 R^3 が基(III)、 R^6 がアミノエチル、 m が1である化合物(I)、

10

20

30

40

50

【0032】

(2f) リゾホスファチジルエタノールアミン類〔 R^1 が水素原子または C_{10-28} アルキル-カルボニルもしくは C_{10-28} アルケニル-カルボニル(1から5個の二重結合を有する)(例、デカノイル、ドデカノイル、テトラデカノイル、ヘキサデカノイル、9-ヘキサデセノイル、オクタデカノイル、9-オクタデセノイル、11-オクタデセノイル、9,12-オクタデカジエノイル、9,12,15-オクタデカトリエノイル、6,9,12-オクタデカトリエノイル、9,11,13-オクタデカトリエノイル、イコサノイル、8,11-イコサジエノイル、5,8,11-イコサトリエノイル、5,8,11,14-イコサテトラエノイル、ドコサノイル、テトラコサノイル、15-テトラコサノイル、ヘキサコサノイル、オクタコサノイルなど)、 R^2 が水素原子または C_{10-28} アルキル-カルボニルもしくは C_{10-28} アルケニル-カルボニル(1から5個の二重結合を有する)(例、デカノイル、ドデカノイル、テトラデカノイル、ヘキサデカノイル、9-ヘキサデセノイル、オクタデカノイル、9-オクタデセノイル、11-オクタデセノイル、9,12-オクタデカジエノイル、9,12,15-オクタデカトリエノイル、6,9,12-オクタデカトリエノイル、9,11,13-オクタデカトリエノイル、イコサノイル、8,11-イコサジエノイル、5,8,11-イコサトリエノイル、5,8,11,14-イコサテトラエノイル、ドコサノイル、テトラコサノイル、15-テトラコサノイル、ヘキサコサノイル、オクタコサノイルなど)、 R^3 が基(III)、 R^6 がアミノエチル、 m が1である(ただし R^1 が水素原子の場合、 R^2 は水素原子以外)化合物(I)〕、

10

【0033】

(2g) ホスファチジルセリン類〔 R^1 が C_{10-28} アルキル-カルボニルまたは C_{10-28} アルケニル-カルボニル(1から5個の二重結合を有する)(例、デカノイル、ドデカノイル、テトラデカノイル、ヘキサデカノイル、9-ヘキサデセノイル、オクタデカノイル、9-オクタデセノイル、11-オクタデセノイル、9,12-オクタデカジエノイル、9,12,15-オクタデカトリエノイル、6,9,12-オクタデカトリエノイル、9,11,13-オクタデカトリエノイル、イコサノイル、8,11-イコサジエノイル、5,8,11-イコサトリエノイル、5,8,11,14-イコサテトラエノイル、ドコサノイル、テトラコサノイル、15-テトラコサノイル、ヘキサコサノイル、オクタコサノイルなど)、 R^2 が C_{10-28} アルキル-カルボニルまたは C_{10-28} アルケニル-カルボニル(1から5個の二重結合を有する)(例、デカノイル、ドデカノイル、テトラデカノイル、ヘキサデカノイル、9-ヘキサデセノイル、オクタデカノイル、9-オクタデセノイル、11-オクタデセノイル、9,12-オクタデカジエノイル、9,12,15-オクタデカトリエノイル、6,9,12-オクタデカトリエノイル、9,11,13-オクタデカトリエノイル、イコサノイル、8,11-イコサジエノイル、5,8,11-イコサトリエノイル、5,8,11,14-イコサテトラエノイル、ドコサノイル、テトラコサノイル、15-テトラコサノイル、ヘキサコサノイル、オクタコサノイルなど)、 R^3 が基(III)、 R^6 が2-アミノ-2-カルボキシエチル、 m が1である化合物(I)〕、

20

30

【0034】

(2h) リゾホスファチジルセリン類〔 R^1 が水素原子または C_{10-28} アルキル-カルボニルもしくは C_{10-28} アルケニル-カルボニル(1から5個の二重結合を有する)(例、デカノイル、ドデカノイル、テトラデカノイル、ヘキサデカノイル、9-ヘキサデセノイル、オクタデカノイル、9-オクタデセノイル、11-オクタデセノイル、9,12-オクタデカジエノイル、9,12,15-オクタデカトリエノイル、6,9,12-オクタデカトリエノイル、9,11,13-オクタデカトリエノイル、イコサノイル、8,11-イコサジエノイル、5,8,11-イコサトリエノイル、5,8,11,14-イコサテトラエノイル、ドコサノイル、テトラコサノイル、15-テトラコサノイル、ヘキサコサノイル、オクタコサノイルなど)、 R^2 が水素原子または C_{10-28} アルキル-カルボニルもしくは C_{10-28} アルケニル-カルボニル(1から5個の二重結合を有する)(例、デカノイル、ドデカノイル、テトラデカノイル、ヘキサデカノイル、9-ヘキサデセノイル、オクタデカノイル、9-オクタデセノイル、11-オクタデセノイル、9,12-オクタデカジエノイル

40

50

、 9, 12, 15 - オクタデカトリエノイル、 6, 9, 12 - オクタデカトリエノイル、 9, 11, 13 - オクタデカトリエノイル、 イコサノイル、 8, 11 - イコサジエノイル、 5, 8, 11 - イコサトリエノイル、 5, 8, 11, 14 - イコサテトラエノイル、 ドコサノイル、 テトラコサノイル、 15 - テトラコサノイル、 ヘキサコサノイル、 オクタコサノイルなど)、 R^3 が基(III)、 R^6 が2 - アミノ - 2 - カルボキシエチル、 m が1である(ただし R^1 が水素原子の場合、 R^2 は水素原子以外)化合物(1)]、

【 0 0 3 5 】

(2i) ホスファチジルイノシトール類 [R^1 が C_{10-28} アルキル - カルボニルまたは C_{10-28} アルケニル - カルボニル(1から5個の二重結合を有する)(例、デカノイル、ドデカノイル、テトラデカノイル、ヘキサデカノイル、9 - ヘキサデセノイル、オクタデカノイル、9 - オクタデセノイル、11 - オクタデセノイル、9, 12 - オクタデカジエノイル、9, 12, 15 - オクタデカトリエノイル、6, 9, 12 - オクタデカトリエノイル、9, 11, 13 - オクタデカトリエノイル、イコサノイル、8, 11 - イコサジエノイル、5, 8, 11 - イコサトリエノイル、5, 8, 11, 14 - イコサテトラエノイル、ドコサノイル、テトラコサノイル、15 - テトラコサノイル、ヘキサコサノイル、オクタコサノイルなど)、 R^2 が C_{10-28} アルキル - カルボニルまたは C_{10-28} アルケニル - カルボニル(1から5個の二重結合を有する)(例、デカノイル、ドデカノイル、テトラデカノイル、ヘキサデカノイル、9 - ヘキサデセノイル、オクタデカノイル、9 - オクタデセノイル、11 - オクタデセノイル、9, 12 - オクタデカジエノイル、9, 12, 15 - オクタデカトリエノイル、6, 9, 12 - オクタデカトリエノイル、9, 11, 13 - オクタデカトリエノイル、イコサノイル、8, 11 - イコサジエノイル、5, 8, 11 - イコサトリエノイル、5, 8, 11, 14 - イコサテトラエノイル、ドコサノイル、テトラコサノイル、15 - テトラコサノイル、ヘキサコサノイル、オクタコサノイルなど)、 R^3 が基(III)、 R^6 がヘキサヒドロキシシクロヘキシル、 m が1である化合物(1)]、

【 0 0 3 6 】

(2j) リゾホスファチジルイノシトール類 [R^1 が水素原子または C_{10-28} アルキル - カルボニルもしくは C_{10-28} アルケニル - カルボニル(1から5個の二重結合を有する)(例、デカノイル、ドデカノイル、テトラデカノイル、ヘキサデカノイル、9 - ヘキサデセノイル、オクタデカノイル、9 - オクタデセノイル、11 - オクタデセノイル、9, 12 - オクタデカジエノイル、9, 12, 15 - オクタデカトリエノイル、6, 9, 12 - オクタデカトリエノイル、9, 11, 13 - オクタデカトリエノイル、イコサノイル、8, 11 - イコサジエノイル、5, 8, 11 - イコサトリエノイル、5, 8, 11, 14 - イコサテトラエノイル、ドコサノイル、テトラコサノイル、15 - テトラコサノイル、ヘキサコサノイル、オクタコサノイルなど)、 R^2 が水素原子または C_{10-28} アルキル - カルボニルもしくは C_{10-28} アルケニル - カルボニル(1から5個の二重結合を有する)(例、デカノイル、ドデカノイル、テトラデカノイル、ヘキサデカノイル、9 - ヘキサデセノイル、オクタデカノイル、9 - オクタデセノイル、11 - オクタデセノイル、9, 12 - オクタデカジエノイル、9, 12, 15 - オクタデカトリエノイル、6, 9, 12 - オクタデカトリエノイル、9, 11, 13 - オクタデカトリエノイル、イコサノイル、8, 11 - イコサジエノイル、5, 8, 11 - イコサトリエノイル、5, 8, 11, 14 - イコサテトラエノイル、ドコサノイル、テトラコサノイル、15 - テトラコサノイル、ヘキサコサノイル、オクタコサノイルなど)、 R^3 が基(III)、 R^6 がヘキサヒドロキシシクロヘキシル、 m が1である(ただし R^1 が水素原子の場合、 R^2 は水素原子以外)化合物(1)] などのグリセロリン脂質など。

【 0 0 3 7 】

なかでも好ましくは、

(i) ホスファチジルセリン [R^1 がデカノイル、ドデカノイル、テトラデカノイル、ヘキサデカノイル、9 - ヘキサデセノイル、オクタデカノイル、9 - オクタデセノイル、11 - オクタデセノイル、9, 12 - オクタデカジエノイル、9, 12, 15 - オクタデカトリエノイル、6, 9, 12 - オクタデカトリエノイル、9, 11, 13 - オクタデカトリエノイ

10

20

30

40

50

ル、イコサノイル、8,11-イコサジエノイル、5,8,11-イコサトリエノイル、5,8,11,14-イコサテトラエノイル、ドコサノイル、テトラコサノイル、15-テトラコサノイル、ヘキサコサノイルまたはオクタコサノイル、 R^2 がデカノイル、ドデカノイル、テトラデカノイル、ヘキサデカノイル、9-ヘキサデセノイル、オクタデカノイル、9-オクタデセノイル、11-オクタデセノイル、9,12-オクタデカジエノイル、9,12,15-オクタデカトリエノイル、6,9,12-オクタデカトリエノイル、9,11,13-オクタデカトリエノイル、イコサノイル、8,11-イコサジエノイル、5,8,11-イコサトリエノイル、5,8,11,14-イコサテトラエノイル、ドコサノイル、テトラコサノイル、15-テトラコサノイル、ヘキサコサノイルまたはオクタコサノイル、 R^3 が基(III)、 R^6 が2-アミノ-2-カルボキシエチル、 m が1である化合物(1)]

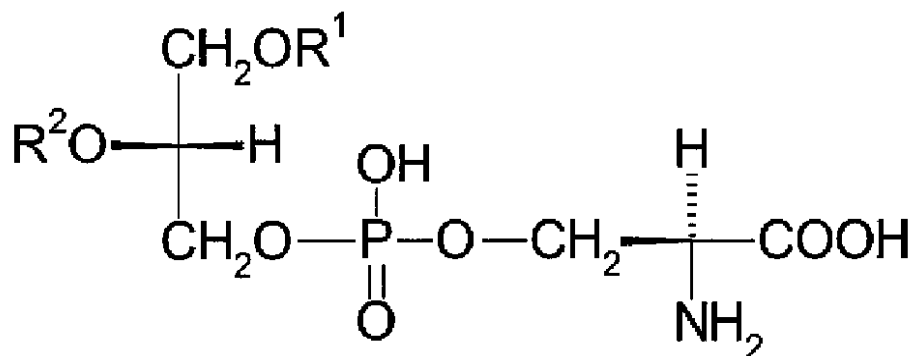
10

(ii) リゾホスファチジルセリン [R^1 がデカノイル、ドデカノイル、テトラデカノイル、ヘキサデカノイル、9-ヘキサデセノイル、オクタデカノイル、9-オクタデセノイル、11-オクタデセノイル、9,12-オクタデカジエノイル、9,12,15-オクタデカトリエノイル、6,9,12-オクタデカトリエノイル、9,11,13-オクタデカトリエノイル、イコサノイル、8,11-イコサジエノイル、5,8,11-イコサトリエノイル、5,8,11,14-イコサテトラエノイル、ドコサノイル、テトラコサノイル、15-テトラコサノイル、ヘキサコサノイルまたはオクタコサノイル、 R^2 がデカノイル、ドデカノイル、テトラデカノイル、ヘキサデカノイル、9-ヘキサデセノイル、オクタデカノイル、9-オクタデセノイル、11-オクタデセノイル、9,12-オクタデカジエノイル、9,12,15-オクタデカトリエノイル、6,9,12-オクタデカトリエノイル、9,11,13-オクタデカトリエノイル、イコサノイル、8,11-イコサジエノイル、5,8,11-イコサトリエノイル、5,8,11,14-イコサテトラエノイル、ドコサノイル、テトラコサノイル、15-テトラコサノイル、ヘキサコサノイルまたはオクタコサノイル、 R^3 が基(III)、 R^6 が2-アミノ-2-カルボキシエチル、 m が1である化合物(1)]などである。

20

好ましくは、下式で表される化合物などである。

【化12】



30

〔式中、各記号は上記と同意義を示す。〕ここで、 R^1 および R^2 は、好ましくは水素原子、アルキル(例、 C_{14-18} アルキルなど)、アルケニル(例、 C_{2-3} アルケニルなど)、またはアシル(例、 C_{1-30} アルキル-カルボニル、 C_{2-30} アルケニル-カルボニルなど)などである。

40

R^1 として好ましくは、 C_{1-30} アルキル-カルボニルなどである。 R^2 として好ましくは、水素原子である。

具体的には、1-ステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホ-L-セリン、1-パルミトイル-sn-グリセロ-3-ホスホ-L-セリン、または1-オレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホ-L-セリンなどが挙げられる。

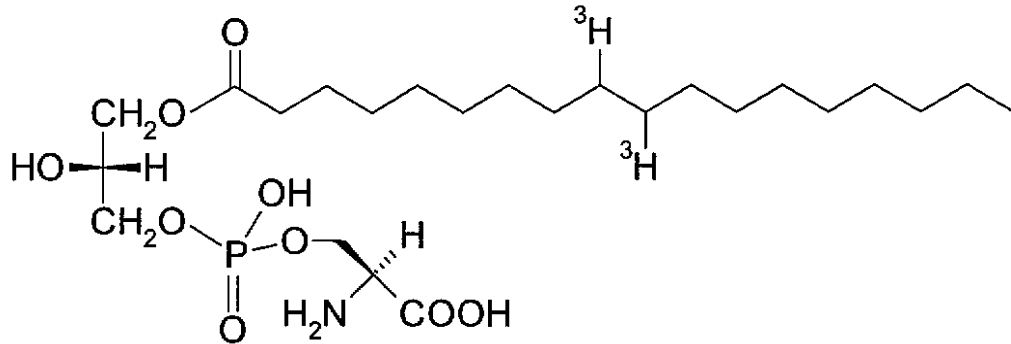
【0038】

スフィンゴ脂質、スフィンゴリン脂質およびホスホスフィンゴ脂質としては、例えば化合物(II)などが挙げられる。

50

合物またはその塩、さらに好ましくは、放射性同位元素で標識されたグリセロリン脂質、さらに好ましくは放射性同位元素（好ましくはトリチウム）で標識されたリゾホスファチジルセリンまたはホスファチジルセリン、さらに好ましくはトリチウムで標識されたリゾホスファチジルセリンなどが挙げられる。トリチウムで標識されたリゾホスファチジルセリンの具体例としては、下式の 1 - [9 , 10 ³H₂] - ステアロイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホ - L - セリンなどが挙げられる。

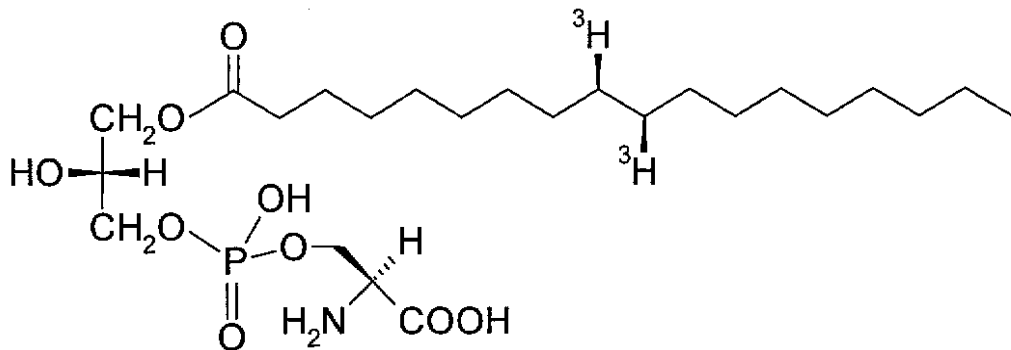
【化 1 4】



10

好ましくは、下式の 1 - [9 (S) , 10 (R) ³H₂] - ステアロイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホ - L - セリン、または

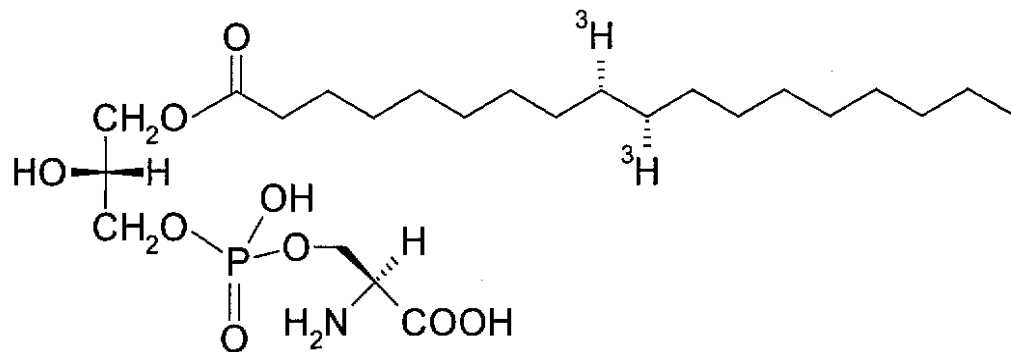
【化 1 5】



20

下式の 1 - [9 (R) , 10 (S) ³H₂] - ステアロイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホ - L - セリンなどである。

【化 1 6】



30

40

【 0 0 4 3 】

式 (I) で表される化合物の塩、および式 (II) で表される化合物の塩としては、例えば金属塩、アンモニウム塩、有機塩基との塩、無機酸との塩、有機酸との塩、塩基性または酸性アミノ酸との塩などが挙げられる。金属塩の好適な例としては、例えばナトリウム塩、カリウム塩などのアルカリ金属塩；カルシウム塩、マグネシウム塩、バリウム塩などのアルカリ土類金属塩；アルミニウム塩などが挙げられる。有機塩基との塩の好適な例としては、例えばトリメチルアミン、トリエチルアミン、ピリジン、ピコリン、2,6-ルチ

50

ジン、エタノールアミン、ジエタノールアミン、トリエタノールアミン、シクロヘキシルアミン、ジシクロヘキシルアミン、N, N' - ジベンジルエチレンジアミンなどとの塩が挙げられる。無機酸との塩の好適な例としては、例えば塩酸、臭化水素酸、硝酸、硫酸、リン酸などとの塩が挙げられる。有機酸との塩の好適な例としては、例えばギ酸、酢酸、トリフルオロ酢酸、フタル酸、フマル酸、シュウ酸、酒石酸、マレイン酸、クエン酸、コハク酸、リンゴ酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、p - トルエンスルホン酸などとの塩が挙げられる。塩基性アミノ酸との塩の好適な例としては、例えばアルギニン、リジン、オルニチンなどとの塩が挙げられ、酸性アミノ酸との塩の好適な例としては、例えばアスパラギン酸、グルタミン酸などとの塩が挙げられる。

このうち、薬学的に許容し得る塩が好ましい。例えば、化合物内に酸性官能基を有する場合にはアルカリ金属塩（例、ナトリウム塩、カリウム塩など）、アルカリ土類金属塩（例、カルシウム塩、マグネシウム塩、バリウム塩など）などの無機塩、アンモニウム塩など、また、化合物内に塩基性官能基を有する場合には、例えば臭化水素酸、硝酸、硫酸、リン酸など無機酸との塩、または酢酸、フタル酸、フマル酸、シュウ酸、酒石酸、マレイン酸、クエン酸、コハク酸、メタンスルホン酸、p - トルエンスルホン酸などの有機酸との塩が挙げられる。

【0044】

本発明の受容体および本発明の部分ペプチドは、前述したヒトや温血動物の細胞または組織から自体公知のポリペプチドの精製方法によって製造することもできるし、後述するポリペプチドをコードするDNAで形質転換された形質転換体を培養することによっても製造することができる。また、後述のペプチド合成法に準じて製造することもできる。例えば、Genomics、56巻、12-21頁、1999年、Biochim. Biophys. Acta、1446巻、57-70頁、1999年などに記載の方法またはこれに準じた方法により、製造することもできる。

ヒトや哺乳動物の組織または細胞から製造する場合、ヒトや哺乳動物の組織または細胞をホモジナイズした後、酸などで抽出を行ない、該抽出液を逆相クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーなどのクロマトグラフィーを組み合わせるにより精製単離することができる。

本発明の受容体または部分ペプチドもしくはそれらの塩の合成には、通常、市販のポリペプチド合成用樹脂を用いることができる。そのような樹脂としては、例えば、クロロメチル樹脂、ヒドロキシメチル樹脂、ベンズヒドリルアミン樹脂、アミノメチル樹脂、4 - ベンジルオキシベンジルアルコール樹脂、4 - メチルベンズヒドリルアミン樹脂、PAM樹脂、4 - ヒドロキシメチルメチルフェニルアセトアミドメチル樹脂、ポリアクリルアミド樹脂、4 - (2', 4' - ジメトキシフェニル - ヒドロキシメチル)フェノキシ樹脂、4 - (2', 4' - ジメトキシフェニル - Fmocアミノエチル)フェノキシ樹脂などをあげることができる。このような樹脂を用い、-アミノ基と側鎖官能基を適当に保護したアミノ酸を、目的とするポリペプチドの配列通りに、自体公知の各種縮合方法に従い、樹脂上で縮合させる。反応の最後に樹脂からポリペプチドを切り出すと同時に各種保護基を除去し、さらに高希釈溶液中で分子内ジスルフィド結合形成反応を実施し、目的のポリペプチド、受容体、部分ペプチドまたはそれらのアミド体を取得する。

上記した保護アミノ酸の縮合に関しては、ポリペプチド合成に使用できる各種活性化試薬を用いることができるが、特に、カルボジイミド類がよい。カルボジイミド類としては、DCC、N, N' - ジイソプロピルカルボジイミド、N - エチル - N' - (3 - ジメチルアミノプロリル)カルボジイミドなどが用いられる。これらによる活性化にはラセミ化抑制添加剤（例えば、HOBt、HOObt）とともに保護アミノ酸を直接樹脂に添加するかまたは、対称酸無水物またはHOBtエステルあるいはHOObtエステルとしてあらかじめ保護アミノ酸の活性化を行なった後に樹脂に添加することができる。

保護アミノ酸の活性化や樹脂との縮合に用いられる溶媒としては、ポリペプチド縮合反応に使用しうることが知られている溶媒から適宜選択されうる。例えば、N, N - ジメチルホルムアミド、N, N - ジメチルアセトアミド、N - メチルピロリドンなどの酸アミド類、塩化メチレン、クロロホルムなどのハロゲン化炭化水素類、トリフルオロエタノールな

10

20

30

40

50

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

10

【0045】

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

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

20

セリンの水酸基は、例えば、エステル化またはエーテル化によって保護することができる。このエステル化に適する基としては、例えば、アセチル基などの低級（C₁₋₆）アルカノイル基、ベンゾイル基などのアロイル基、ベンジルオキシカルボニル基、エトキシカルボニル基などの炭酸から誘導される基などが用いられる。また、エーテル化に適する基としては、例えば、ベンジル基、テトラヒドロピラニル基、t-ブチル基などである。

チロシンのフェノール性水酸基の保護基としては、例えば、Bzl、Cl₂-Bzl、2-ニトロベンジル、Br-Z、t-ブチルなどが用いられる。

30

ヒスチジンのイミダゾールの保護基としては、例えば、Tos、4-メトキシ-2,3,6-トリメチルベンゼンスルホニル、DNP、ベンジルオキシメチル、Bum、Boc、Trt、Fmocなどが用いられる。

【0046】

原料のカルボキシル基の活性化されたものとしては、例えば、対応する酸無水物、アジド、活性エステル〔アルコール（例えば、ペンタクロロフェノール、2,4,5-トリクロロフェノール、2,4-ジニトロフェノール、シアノメチルアルコール、パラニトロフェノール、HONB、N-ヒドロキシスクシミド、N-ヒドロキシフタルイミド、HOBt）とのエステル〕などが用いられる。原料のアミノ基の活性化されたものとしては、例えば、対応するリン酸アミドが用いられる。

40

保護基の除去（脱離）方法としては、例えば、Pd-黒あるいはPd-炭素などの触媒の存在下での水素気流中での接触還元や、また、無水フッ化水素、メタンスルホン酸、トリフルオロメタンスルホン酸、トリフルオロ酢酸あるいはこれらの混合液などによる酸処理や、ジイソプロピルエチルアミン、トリエチルアミン、ピペリジン、ピペラジンなどによる塩基処理、また液体アンモニア中ナトリウムによる還元なども用いられる。上記酸処理による脱離反応は、一般に約 - 20 ~ 40 の温度で行なわれるが、酸処理においては、例えば、アニソール、フェノール、チオアニソール、メタクレゾール、パラクレゾール、ジメチルスルフィド、1,4-ブタンジチオール、1,2-エタンジチオールなどのようなカチオン捕捉剤の添加が有効である。また、ヒスチジンのイミダゾール保護基として用いられる2,4-ジニトロフェニル基はチオフェノール処理により除去され、トリプト

50

ファンのインドール保護基として用いられるホルミル基は上記の 1, 2 - エタンジチオール、1, 4 - ブタンジチオールなどの存在下の酸処理による脱保護以外に、希水酸化ナトリウム溶液、希アンモニアなどによるアルカリ処理によっても除去される。

原料の反応に関与すべきでない官能基の保護ならびに保護基、およびその保護基の脱離、反応に関与する官能基の活性化などは公知の基または公知の手段から適宜選択しうる。

【0047】

本発明の受容体または部分ペプチドを得る別の方法としては、例えば、まず、カルボキシ末端アミノ酸の - カルボキシル基をアミド化して保護した後、アミノ基側にペプチド（ポリペプチド）鎖を所望の鎖長まで延ばした後、該ペプチド鎖の N 末端の - アミノ基の保護基のみを除いたポリペプチドと C 末端のカルボキシル基の保護基のみを除去したポリペプチドとを製造し、この両ポリペプチドを上記したような混合溶媒中で縮合させる。縮合反応の詳細については上記と同様である。縮合により得られた保護ポリペプチドを精製した後、上記方法によりすべての保護基を除去し、所望の粗ポリペプチドを得ることができる。この粗ポリペプチドは既知の各種精製手段を駆使して精製し、主要画分を凍結乾燥することで所望の受容体またはその部分ペプチドのアミド体を得ることができる。

本発明の受容体または部分ペプチドもしくはそれらの塩のエステル体を得るには、例えば、カルボキシ末端アミノ酸の - カルボキシル基を所望のアルコール類と縮合しアミノ酸エステルとした後、受容体またはその部分ペプチドのアミド体と同様にして、所望の受容体またはその部分ペプチドのエステル体を得ることができる。

【0048】

本発明の受容体または部分ペプチドは、自体公知のペプチドの合成法に従って、あるいは受容体の部分ペプチドについては、受容体を適当なペプチダーゼで切断することによって製造することができる。ペプチドの合成法としては、例えば、固相合成法、液相合成法のいずれによっても良い。すなわち、本発明受容体または部分ペプチドを構成し得る部分ペプチドもしくはアミノ酸と残余部分とを縮合させ、生成物が保護基を有する場合は保護基を脱離することにより目的のペプチドを製造することができる。公知の縮合方法や保護基の脱離としては、例えば、以下の 1 ~ 5 に記載された方法があげられる。

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

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

3 泉屋信夫他、ペプチド合成の基礎と実験、丸善(株) (1975年)

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

5 矢島治明監修、続医薬品の開発、第14巻、ペプチド合成、広川書店

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

【0049】

本発明の受容体または部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドとしては、前述した本発明の受容体または部分ペプチドをコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。このうち DNA が好ましく、該 DNA は、ゲノム DNA、ゲノム DNA ライブラリー、前記した細胞・組織由来の cDNA、前記した細胞・組織由来の cDNA ライブラリー、合成 DNA のいずれでもよい。

ライブラリーに使用するベクターは、バクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってもよい。また、前記した細胞・組織より total RNA または mRNA 画分を調製したものをを用いて直接 Reverse Transcriptase Polymerase Chain Rea

10

20

30

40

50

ction (以下、RT-PCR法と略称する)によって増幅することもできる。

【0050】

本発明の受容体をコードするDNAとしては、例えば(1)配列番号:2で表わされる塩基配列を含有するDNA、または配列番号:2で表わされる塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、配列番号:1で表されるアミノ酸配列を含有する蛋白質と実質的に同質の活性を有する受容体をコードするDNA、(2)配列番号:20で表わされる塩基配列を含有するDNA、または配列番号:20で表わされる塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、配列番号:19で表されるアミノ酸配列を含有する蛋白質と実質的に同質の活性を有する受容体をコードするDNAなどであれば何れのものでよい。

10

配列番号:2で表わされる塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズできるDNAとしては、例えば、配列番号:2で表わされる塩基配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、さらに好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

配列番号:20で表わされる塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズできるDNAとしては、例えば、配列番号:20で表わされる塩基配列と約95%以上、好ましくは約97%以上、より好ましくは約99%以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

ハイブリダイゼーションは、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法、例えば、モレキュラー・クローニング(Molecular Cloning) 2nd (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989)に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。より好ましくは、ハイストリンジェントな条件に従って行なうことができる。

20

ハイストリンジェントな条件とは、例えば、ナトリウム濃度が約19~40mM、好ましくは約19~20mMで、温度が約50~70℃、好ましくは約60~65℃の条件を示す。特に、ナトリウム濃度が約19mMで温度が約65℃の場合が最も好ましい。

より具体的には、配列番号:1で表わされるアミノ酸配列を含有する受容体をコードするDNAとしては、配列番号:2で表わされる塩基配列を含有するDNAなどが、配列番号:19で表わされるアミノ酸配列を含有する受容体をコードするDNAとしては、配列番号:20で表わされる塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

30

【0051】

本発明の部分ペプチドをコードするDNAとしては、本発明の受容体の部分ペプチドをコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。また、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、前記した細胞・組織由来のcDNA、前記した細胞・組織由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。具体的には、配列番号:2または配列番号:20で表わされる塩基配列を有するDNAの部分塩基配列を有するDNA、または配列番号:2または配列番号:20で表わされる塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、配列番号:1または配列番号:19で表されるアミノ酸配列を含有する蛋白質と実質的に同質の活性を有する受容体をコードするDNAの部分塩基配列を有するDNAなどが用いられる。

40

配列番号:2または配列番号:20で表わされる塩基配列とハイブリダイズできるDNAは、前記と同意義を示す。

ハイブリダイゼーションの方法およびハイストリンジェントな条件は前記と同様のものが用いられる。

【0052】

本発明の受容体または部分ペプチドをコードするポリヌクレオチド(例、DNA)は、自体公知の方法で標識化されていてもよい。標識物質としては、放射性同位元素、蛍光物質(例、フルオレセインなど)、発光物質、酵素、ビオチン、ランタニド元素などがあげられる。

本発明の受容体または部分ペプチドを完全にコードするDNAのクローニングの手段とし

50

ては、本発明の受容体または部分ペプチドの部分塩基配列を有する合成DNAプライマーを用いて自体公知のPCR法によって増幅するか、または適当なベクターに組み込んだDNAを本発明の受容体または部分ペプチドの一部あるいは全領域をコードするDNA断片もしくは合成DNAを用いて標識したものとハイブリダイゼーションによって選別することができる。ハイブリダイゼーションの方法は、例えば、モレキュラー・クローニング (Molecular Cloning) 2nd (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。

【0053】

DNAの塩基配列の変換は、公知のキット、例えば、MutanTM-super Express Km (宝酒造(株))、MutanTM-K (宝酒造(株))等を用いて、ODA-LA PCR法、Gapped duplex法、Kunkel法等の自体公知の方法あるいはそれらに準じる方法に従って行なうことができる。

クローン化された受容体をコードするDNAは目的によりそのまま、または所望により制限酵素で消化したり、リンカーを付加したりして使用することができる。該DNAはその5'末端側に翻訳開始コドンとしてのATGを有し、また3'末端側には翻訳終止コドンとしてのTAA、TGAまたはTAGを有していてもよい。これらの翻訳開始コドンや翻訳終止コドンは、適当な合成DNAアダプターを用いて付加することもできる。

本発明の受容体または部分ペプチドの発現ベクターは、例えば、(a)本発明の受容体または部分ペプチドをコードするDNAから目的とするDNA断片を切り出し、(b)該DNA断片を適当な発現ベクター中のプロモーターの下流に連結することにより製造することができる。

ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド(例、pBR322、pBR325、pUC12、pUC13)、枯草菌由来のプラスミド(例、pUB110、pTP5、pC194)、酵母由来プラスミド(例、pSH19、pSH15)、ファージなどのバクテリオファージ、レトロウイルス、ワクシニアウイルス、バキュロウイルスなどの動物ウイルスなどの他、pA1-11、pXT1、pRc/CMV、pRc/RSV、pcDNA1/Neoなどが用いられる。

本発明で用いられるプロモーターとしては、遺伝子の発現に用いる宿主に対応して適切なプロモーターであればいかなるものでもよい。例えば、動物細胞を宿主として用いる場合は、SRプロモーター、SV40プロモーター、HIV・LTRプロモーター、CMVプロモーター、HSV-TKプロモーターなどがあげられる。

【0054】

これらのうち、CMV(サイトメガロウイルス)プロモーター、SRプロモーターなどを用いるのが好ましい。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、trpプロモーター、lacプロモーター、recAプロモーター、PLプロモーター、lppプロモーター、T7プロモーターなどが、宿主がバチルス属菌である場合は、SPO1プロモーター、SPO2プロモーター、penPプロモーターなど、宿主が酵母である場合は、PHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーターなどが好ましい。宿主が昆虫細胞である場合は、ポリヘドリンプロモーター、P10プロモーターなどが好ましい。発現ベクターには、以上の他に、所望によりエンハンサー、スプライシングシグナル、ポリA付加シグナル、選択マーカー、SV40複製オリジン(以下、SV40oriと略称する場合がある)などを含有しているものを用いることができる。選択マーカーとしては、例えば、ジヒドロ葉酸還元酵素(以下、dhfrと略称する場合がある)遺伝子〔メソトレキセート(MTX)耐性〕、アンピシリン耐性遺伝子(以下、Amp^rと略称する場合がある)、ネオマイシン耐性遺伝子(以下、Neo^rと略称する場合がある、G418耐性)等があげられる。特に、dhfr遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞を用いてdhfr遺伝子を選択マーカーとして使用する場合、目的遺伝子をチミジンを含まない培地によっても選択できる。

また、必要に応じて、宿主に合ったシグナル配列を、本発明の受容体のN端末側に付加する。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、PhoA・シグナル配列、OmpA・シグナ

10

20

30

40

50

ル配列などが、宿主がバチルス属菌である場合は、 α -アミラーゼ・シグナル配列、サブチリシン・シグナル配列などが、宿主が酵母である場合は、MF α ・シグナル配列、SUC2・シグナル配列など、宿主が動物細胞である場合には、インシュリン・シグナル配列、 α -インターフェロン・シグナル配列、抗体分子・シグナル配列などがそれぞれ利用できる。

このようにして構築された本発明の受容体または部分ペプチドをコードするDNAを含有するベクターを用いて、形質転換体を製造することができる。

宿主としては、例えば、エシェリヒア属菌、バチルス属菌、酵母、昆虫細胞、昆虫、動物細胞などが用いられる。

【0055】

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

バチルス属菌としては、例えば、バチルス・サブチルス (*Bacillus subtilis*) MI114〔ジーン, 24巻, 255(1983)〕, 207-21〔ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (Journal of Biochemistry), 95巻, 87(1984)〕などが用いられる。

酵母としては、例えば、サッカロマイセス セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*) AH22, AH22R⁻, NA87-11A, DKD-5D, 20B-12、シゾサッカロマイセス ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*) NCYC1913, NCYC2036、ピキア パストリス (*Pichia pastoris*) KM71などが用いられる。

【0056】

昆虫細胞としては、例えば、ウィルスがAcNPVの場合は、ヨトウガの幼虫由来株化細胞 (*Spodoptera frugiperda* cell; Sf細胞)、*Trichoplusia ni*の中腸由来のMG1細胞、*Trichoplusia ni*の卵由来のHigh FiveTM細胞、*Mamestra brassicae*由来の細胞または *Estigma acraea*由来の細胞などが用いられる。ウィルスがBmNPVの場合は、蚕由来株化細胞 (*Bombyx mori* N細胞; BmN細胞)などが用いられる。該Sf細胞としては、例えば、Sf9細胞 (ATCC CRL1711)、Sf21細胞 (以上、Vaughn, J.L.ら、イン・ヴィボ (In Vivo), 13, 213-217, (1977))などが用いられる。

昆虫としては、例えば、カイコの幼虫などが用いられる〔前田ら、ネイチャー (Nature), 315巻, 592(1985)〕。

動物細胞としては、例えば、サル細胞COS-7 (COS7), VerO, チャイニーズハムスター細胞CHO (以下、CHO細胞と略記), dhfr⁻遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞CHO (以下、CHO (dhfr⁻)細胞と略記), マウスL細胞, マウスAtT-20, マウスミエローマ細胞, ラットGH3, ヒトFL細胞などが用いられる。エシェリヒア属菌を形質転換するには、例えば、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 69巻, 2110(1972)やジーン (Gene), 17巻, 107(1982)などに記載の方法に従って行なうことができる。

バチルス属菌を形質転換するには、例えば、モレキュラー・アンド・ジェネラル・ジェネティクス (Molecular & General Genetics), 168巻, 111(1979)などに記載の方法に従って行なうことができる。

酵母を形質転換するには、例えば、メソッズ・イン・エンザイモロジー (Methods in Enzymology), 194巻, 182-187(1991)、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナ

10

20

30

40

50

ショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 75巻, 1929(1978)などに記載の方法に従って行なうことができる。

【0057】

昆虫細胞または昆虫を形質転換するには、例えば、バイオテクノロジー (Bio/Technology), 6, 47-55(1988)などに記載の方法に従って行なうことができる。

動物細胞を形質転換するには、例えば、細胞工学別冊8 新細胞工学実験プロトコル, 263-267(1995) (秀潤社発行)、ウイルス学 (Virology), 52巻, 456(1973)に記載の方法に従って行なうことができる。

このようにして、受容体または部分ペプチドをコードするDNAを含有する発現ベクターで形質転換された形質転換体を得ることができる。

宿主がエシェリヒア属菌、バチルス属菌である形質転換体を培養する際、培養に使用される培地としては液体培地が適当であり、その中には該形質転換体の生育に必要な炭素源、窒素源、無機物その他が含有せしめられる。炭素源としては、例えば、グルコース、デキストリン、可溶性澱粉、ショ糖など、窒素源としては、例えば、アンモニウム塩類、硝酸塩類、コーンステープ・リカー、ペプトン、カゼイン、肉エキス、大豆粕、バレイショ抽出液などの無機または有機物質、無機物としては、例えば、塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウムなどがあげられる。また、酵母エキス、ビタミン類、生長促進因子などを添加してもよい。培地のpHは約5~8が望ましい。

エシェリヒア属菌を培養する際の培地としては、例えば、グルコース、カザミノ酸を含むM9培地〔ミラー (Miller), ジャーナル・オブ・エクスペリメンツ・イン・モレキュラー・ジェネティクス (Journal of Experiments in Molecular Genetics), 431-433, Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1972〕が好ましい。ここに必要によりプロモーターを効率よく働かせるために、例えば、3-インドリルアクリル酸のような薬剤を加えることができる。

【0058】

宿主がエシェリヒア属菌の場合、培養は通常約15~43で約3~24時間行ない、必要により、通気や攪拌を加えることもできる。

宿主がバチルス属菌の場合、培養は通常約30~40で約6~24時間行ない、必要により通気や攪拌を加えることもできる。

宿主が酵母である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、バークホルダー (Burkholder) 最小培地〔Bostian, K. L. ら、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 77巻, 4505(1980)〕や0.5%カザミノ酸を含有するSD培地〔Bitter, G. A. ら、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 81巻, 5330(1984)〕があげられる。培地のpHは約5~8に調整するのが好ましい。培養は通常約20~35で約24~72時間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

宿主が昆虫細胞または昆虫である形質転換体を培養する際、培地としては、Grace's Insect Medium (Grace, T.C.C., ネイチャー (Nature), 195, 788(1962)) に非動化した10%ウシ血清等の添加物を適宜加えたものなどが用いられる。培地のpHは約6.2~6.4に調整するのが好ましい。培養は通常約27で約3~5日間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

宿主が動物細胞である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、約5~20%の胎児牛血清を含むMEM培地〔サイエンス (Science), 122巻, 501(1952)〕, D MEM培地〔ウイルス学 (Virology), 8巻, 396(1959)〕, RPMI 1640培地〔ジャーナル・オブ・ザ・アメリカン・メディカル・アソシエーション (The Journal of the American Medical Association) 199巻, 519(1967)〕, 199培地〔プロシーディング・オブ・ザ・ソサイエティ・フォー・ザ・バイオリジカル・メディスン (Proceeding of the Society for the Biological Medicine), 73巻, 1(19

10

20

30

40

50

50))などが用いられる。pHは約6~8であるのが好ましい。培養は通常約30~40で約15~60時間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

以上のようにして、形質転換体の細胞内、細胞膜または細胞外などに本発明の受容体または部分ペプチドを生成せしめることができる。

上記培養物から本発明の受容体または部分ペプチドを分離精製するには、例えば、下記の方法により行なうことができる。

【0059】

本発明の受容体または部分ペプチドを培養菌体あるいは細胞から抽出するに際しては、培養後、公知の方法で菌体あるいは細胞を集め、これを適当な緩衝液に懸濁し、超音波、リゾチームおよび/または凍結融解などによって菌体あるいは細胞を破壊したのち、遠心分離やろ過によりポリペプチドの粗抽出液を得る方法などが適宜用いられる。緩衝液の中に尿素や塩酸グアニジンなどの蛋白質変性剤や、トリトンX-100TMなどの界面活性剤が含まれていてもよい。培養液中にポリペプチドが分泌される場合には、培養終了後、それ自体公知の方法で菌体あるいは細胞と上清とを分離し、上清を集める。

このようにして得られた培養上清、あるいは抽出液中に含まれる受容体または部分ペプチドの精製は、自体公知の分離・精製法を適宜組み合わせることで行なうことができる。これらの公知の分離、精製法としては、塩析や溶媒沈澱法などの溶解度を利用する方法、透析法、限外ろ過法、ゲルろ過法、およびSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法などの主として分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィーなどの荷電の差を利用する方法、アフィニティークロマトグラフィーなどの特異的親和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィーなどの疎水性の差を利用する方法、等電点電気泳動法などの等電点の差を利用する方法などが用いられる。

かくして得られる受容体または部分ペプチドが遊離体で得られた場合には、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法によって塩に変換することができ、逆に塩で得られた場合には自体公知の方法あるいはそれに準じる方法により、遊離体または他の塩に変換することができる。

なお、組換え体が産生する受容体または部分ペプチドを、精製前または精製後に適当な蛋白修飾酵素を作用させることにより、任意に修飾を加えたり、ポリペプチドを部分的に除去することもできる。蛋白修飾酵素としては、例えば、トリプシン、キモトリプシン、アルギニルエンドペプチダーゼ、プロテインキナーゼ、グリコシダーゼなどが用いられる。

【0060】

本発明の受容体と特異的に結合する能力を有するリガンドは、市販されている場合には市販品をそのまま用いることもでき、自体公知の方法またはこれらに準じた方法に従って抽出または製造することもできる。

【0061】

配列番号：1または配列番号：19で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体（以下、単に本発明の抗体と称する場合がある）は、本発明の受容体に対する抗体を認識し得る抗体であれば、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体の何れであってもよい。本発明の受容体に対する抗体としては、受容体のシグナル伝達を不活性化する抗体、受容体のシグナル伝達を活性化する抗体などが挙げられる。

本発明の受容体に対する抗体は、本発明の受容体を抗原として用い、公知の抗体または抗血清の製造法に従って製造することができる。

〔モノクローナル抗体の作製〕

（a）モノクローナル抗体産生細胞の作製

本発明の受容体は、温血動物に対して投与により抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は通常2~6週毎に1回ずつ、計2~10回程行われる。用いられる温血動物としては、例えば、サル、ウサギ、イヌ、モルモット、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギ、ニワトリがあげられる

10

20

30

40

50

が、マウスおよびラットが好ましく用いられる。

モノクローナル抗体産生細胞の作製に際しては、抗原で免疫された温血動物、例えばマウスから抗体価の認められた個体を選択し最終免疫の2～5日後に脾臓またはリンパ節を採取し、それらに含まれる抗体産生細胞を同種または異種動物の骨髄腫細胞と融合させることにより、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを調製することができる。抗血清中の抗体価の測定は、例えば、後記の標識化ポリペプチドと抗血清とを反応させたのち、抗体に結合した標識剤の活性を測定することにより行なうことができる。融合操作は既知の方法、例えば、ケーラーとミルスタインの方法〔ネイチャー(Nature)、256、495(1975)〕に従い実施することができる。融合促進剤としては、例えば、ポリエチレングリコール(P E G)やセンダイウィルスなどがあげられるが、好ましくはP E Gが用いられる。

骨髄腫細胞としては、例えば、NS-1、P3U1、SP2/0、AP-1などの温血動物の骨髄腫細胞があげられるが、P3U1が好ましく用いられる。用いられる抗体産生細胞(脾臓細胞)数と骨髄腫細胞数との好ましい比率は1:1～20:1程度であり、P E G(好ましくはP E G 1000～P E G 6000)が10～80%程度の濃度で添加され、20～40、好ましくは30～37で1～10分間インキュベートすることにより効率よく細胞融合を実施できる。モノクローナル抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングには種々の方法が使用できるが、例えば、ポリペプチド(蛋白質)抗原を直接あるいは担体とともに吸着させた固相(例、マイクロプレート)にハイブリドーマ培養上清を添加し、次に放射性物質や酵素などで標識した抗免疫グロブリン抗体(細胞融合に用いられる細胞がマウスの場合、抗マウス免疫グロブリン抗体が用いられる)またはプロテインAを加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法、抗免疫グロブリン抗体またはプロテインAを吸着させた固相にハイブリドーマ培養上清を添加し、放射性物質や酵素などで標識したポリペプチドを加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法などがあげられる。

モノクローナル抗体の選別は、公知あるいはそれに準じる方法に従って行なうことができる。通常HAT(ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン)を添加した動物細胞用培地で行なうことができる。選別および育種用培地としては、ハイブリドーマが生育できるものならばどのような培地を用いても良い。例えば、1～20%、好ましくは10～20%の牛胎児血清を含むRPMI 1640培地、1～10%の牛胎児血清を含むGIT培地(和光純薬工業(株))あるいはハイブリドーマ培養用無血清培地(SFM-101、日水製薬(株))などを用いることができる。培養温度は、通常20～40、好ましくは約37である。培養時間は、通常5日～3週間、好ましくは1週間～2週間である。培養は、通常5%炭酸ガス下で行なうことができる。ハイブリドーマ培養上清の抗体価は、上記の抗血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。

【0062】

(b)モノクローナル抗体の精製

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

〔ポリクローナル抗体の作製〕

本発明のポリクローナル抗体は、公知あるいはそれに準じる方法に従って製造することができる。例えば、免疫抗原(ポリペプチド抗原)自体、あるいはそれとキャリアー蛋白質との複合体をつくり、上記のモノクローナル抗体の製造法と同様に温血動物に免疫を行い、該免疫動物から本発明の受容体に対する抗体含有物を採取して、抗体の分離精製を行なうことにより製造することができる。

温血動物を免疫するために用いられる免疫抗原とキャリアー蛋白質との複合体に関し、キャリアー蛋白質の種類およびキャリアーとハプテンとの混合比は、キャリアーに架橋させて免疫したハプテンに対して抗体が効率良くできれば、どのようなものをどのような比率で架

10

20

30

40

50

橋させてもよいが、例えば、ウシ血清アルブミンやウシサイログロブリン、ヘモシアニン等を重量比でハプテン 1 に対し、約 0.1 ~ 20、好ましくは約 1 ~ 5 の割合でカプルさせる方法が用いられる。

また、ハプテンとキャリアーのカプリングには、種々の縮合剤を用いることができるが、グルタルアルデヒドやカルボジイミド、マレイミド活性エステル、チオール基、ジチオピリジル基を含有する活性エステル試薬等が用いられる。

縮合生成物は、温血動物に対して、抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は、通常約 2 ~ 6 週毎に 1 回ずつ、計約 3 ~ 10 回程度行なわれる。

ポリクローナル抗体は、上記の方法で免疫された温血動物の血液、腹水など、好ましくは血液から採取することができる。

抗血清中のポリクローナル抗体価の測定は、上記の抗血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。ポリクローナル抗体の分離精製は、上記のモノクローナル抗体の分離精製と同様の免疫グロブリンの分離精製法に従って行なうことができる。

【 0 0 6 3 】

配列番号：1 または配列番号：19 で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩をコードするポリヌクレオチド（例、DNA）に相補的な、または実質的に相補的な塩基配列またはその一部を含有するポリヌクレオチド（例、DNA）としては、該ポリヌクレオチドに相補的な、または実質的に相補的な塩基配列またはその一部を有し、該ポリヌクレオチドの発現を抑制し得る作用を有するものであれば、いずれのポリヌクレオチド（アンチセンスポリヌクレオチド）であってもよい。

具体的には、本発明の受容体をコードするポリヌクレオチド（例、DNA）（以下、これらの DNA を本発明の DNA と略記する場合がある）に相補的な、または実質的に相補的な塩基配列またはその一部を有するアンチセンス DNA（以下、これらの DNA をアンチセンス DNA と略記する場合がある）が挙げられ、本発明の DNA に相補的な、または実質的に相補的な塩基配列またはその一部を有し、該 DNA の発現を抑制し得る作用を有するものであれば、いずれのアンチセンス DNA であってもよい。

本発明の DNA に実質的に相補的な塩基配列とは、例えば、本発明の DNA に相補的な塩基配列（すなわち、本発明の DNA の相補鎖）の全塩基配列あるいは部分塩基配列と約 70% 以上、好ましくは約 80% 以上、より好ましくは約 90% 以上、最も好ましくは約 95% 以上の相同性を有する塩基配列などがあげられる。特に、本発明の DNA の相補鎖の全塩基配列うち、本発明の受容体の N 末端部位をコードする部分の塩基配列（例えば、開始コドン付近の塩基配列など）の相補鎖と約 70% 以上、好ましくは約 80% 以上、より好ましくは約 90% 以上、最も好ましくは約 95% 以上の相同性を有するアンチセンス DNA が好適である。これらのアンチセンス DNA は、公知の DNA 合成装置などを用いて製造することができる。

【 0 0 6 4 】

具体的には、配列番号：20 で表わされる塩基配列を有する DNA の塩基配列に相補的な、もしくは実質的に相補的な塩基配列、またはその一部分を有するアンチセンスポリヌクレオチド、配列番号：2 で表わされる塩基配列を有する DNA の塩基配列に相補的な、もしくは実質的に相補的な塩基配列、またはその一部分を有するアンチセンスポリヌクレオチドなどが挙げられる。好ましくは例えば、配列番号：20 で表わされる塩基配列を有する DNA の塩基配列に相補な塩基配列、またはその一部分を有するアンチセンスポリヌクレオチド、配列番号：2 で表わされる塩基配列を有する DNA の塩基配列に相補な塩基配列、またはその一部分を有するアンチセンスポリヌクレオチドなどが挙げられる。

アンチセンスポリヌクレオチドは通常、10 ~ 40 個程度、好ましくは 15 ~ 30 個程度の塩基から構成される。

ヌクレアーゼなどの加水分解酵素による分解を防ぐために、アンチセンス DNA を構成す

10

20

30

40

50

る各ヌクレオチドのりん酸残基（ホスフェート）は、例えば、ホスホロチオエート、メチルホスホネート、ホスホロジチオネートなどの化学修飾りん酸残基に置換されていてもよい。これらのアンチセンスポリヌクレオチドは、公知のDNA合成装置などを用いて製造することができる。

本発明に従えば、本発明の受容体遺伝子の複製または発現を阻害することのできるアンチセンスポリヌクレオチド（核酸）を、クローン化した、あるいはアミノ酸が決定された蛋白質をコードするDNAの塩基配列情報に基づき設計し、合成しうる。かかるポリヌクレオチド（核酸）は、本発明の受容体遺伝子のRNAとハイブリダイズすることができ、該RNAの合成または機能を阻害することができるか、あるいは本発明の受容体関連RNAとの相互作用を介して本発明の受容体遺伝子の発現を調節・制御することができる。本発明の受容体関連RNAの選択された配列に相補的なポリヌクレオチド、および本発明の受容体関連RNAと特異的にハイブリダイズすることができるポリヌクレオチドは、生体内および生体外で本発明の受容体遺伝子の発現を調節・制御するのに有用であり、また病気などの治療または診断に有用である。用語「対応する」とは、遺伝子を含めたヌクレオチド、塩基配列または核酸の特定の配列に相同性を有するあるいは相補的であることを意味する。ヌクレオチド、塩基配列または核酸とペプチド（蛋白質）との間で「対応する」とは、ヌクレオチド（核酸）の配列またはその相補体から誘導される指令にあるペプチド（蛋白質）のアミノ酸を通常指している。蛋白質遺伝子の5'端ヘアピンループ、5'端6-ベースペア・リピート、5'端非翻訳領域、蛋白質翻訳終止コドン、蛋白質コード領域、ORF翻訳終止コドン、3'端非翻訳領域、3'端パルンドローム領域、および3'端ヘアピンループは好ましい対象領域として選択しうるが、蛋白質遺伝子内の如何なる領域も対象として選択しうる。

目的核酸と、対象領域の少なくとも一部に相補的なポリヌクレオチドとの関係は、対象物とハイブリダイズすることができるポリヌクレオチドとの関係は、「アンチセンス」であるということができる。アンチセンスポリヌクレオチドは、2-デオキシ-D-リボースを含有しているポリヌクレオチド、D-リボースを含有しているポリヌクレオチド、プリンまたはピリミジン塩基のN-グリコシドであるその他のタイプのポリヌクレオチド、あるいは非ヌクレオチド骨格を有するその他のポリマー（例えば、市販の蛋白質核酸および合成配列特異的な核酸ポリマー）または特殊な結合を含有するその他のポリマー（但し、該ポリマーはDNAやRNA中に見出されるような塩基のペアリングや塩基の付着を許容する配置をもつヌクレオチドを含有する）などが挙げられる。それらは、二本鎖DNA、一本鎖DNA、二本鎖RNA、一本鎖RNA、さらにDNA:RNAハイブリッドであることができ、さらに非修飾ポリヌクレオチド（または非修飾オリゴヌクレオチド）、さらには公知の修飾の付加されたもの、例えば当該分野で知られた標識のあるもの、キャップの付いたもの、メチル化されたもの、1個以上の天然のヌクレオチドを類縁物で置換したもの、分子内ヌクレオチド修飾のされたもの、例えば非荷電結合（例えば、メチルホスホネート、ホスホトリエステル、ホスホホルアミデート、カルバメートなど）を持つもの、電荷を有する結合または硫黄含有結合（例えば、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエートなど）を持つもの、例えば蛋白質（ヌクレアーゼ、ヌクレアーゼ・インヒビター、トキシン、抗体、シグナルペプチド、ポリ-L-リジンなど）や糖（例えば、モノサッカライドなど）などの側鎖基を有しているもの、インターカレート化合物（例えば、アクリジン、ソラレンなど）を持つもの、キレート化合物（例えば、金属、放射活性をもつ金属、ホウ素、酸化性の金属など）を含有するもの、アルキル化剤を含有するもの、修飾された結合を持つもの（例えば、アノマー型の核酸など）であってもよい。ここで「ヌクレオチド」、「ヌクレオチド」および「核酸」とは、プリンおよびピリミジン塩基を含有するのみでなく、修飾されたその他の複素環型塩基をもつようなものを含んでいて良い。こうした修飾物は、メチル化されたプリンおよびピリミジン、アシル化されたプリンおよびピリミジン、あるいはその他の複素環を含むものであってよい。修飾されたヌクレオチドおよび修飾されたヌクレオチドはまた糖部分が修飾されていてよく、例えば、1個以上の水酸基がハロゲンとか、脂肪族基などで置換されていたり、あるいはエーテル、アミンなどの

10

20

30

40

50

官能基に変換されてよい。

【0065】

本発明のアンチセンスポリヌクレオチド(核酸)は、RNA、DNA、あるいは修飾された核酸(RNA、DNA)である。修飾された核酸の具体例としては核酸の硫黄誘導体やチオホスフェート誘導体、そしてポリヌクレオシドアミドやオリゴヌクレオシドアミドの分解に抵抗性のものが挙げられるが、それに限定されるものではない。本発明のアンチセンスヌクレオチドは次のような方針で好ましく設計されうる。すなわち、細胞内でのアンチセンスヌクレオチドをより安定なものにする、アンチセンスヌクレオチドの細胞透過性をより高める、目標とするセンス鎖に対する親和性をより大きなものにする、そしてもし毒性があるならアンチセンスヌクレオチドの毒性をより小さなものにする。

10

こうした修飾は当該分野で数多く知られており、例えば J. Kawakami et al., Pharm Tech Japan, Vol. 8, pp.247, 1992; Vol. 8, pp.395, 1992; S. T. Crooke et al. ed., Antisense Research and Applications, CRC Press, 1993 などに開示がある。

本発明のアンチセンスポリヌクレオチドは、変化せしめられたり、修飾された糖、塩基、結合を含有して良く、リポゾーム、ミクロスフェアのような特殊な形態で供与されたり、遺伝子治療により適用されたり、付加された形態で与えられることができる。こうして付加形態で用いられるものとしては、リン酸基骨格の電荷を中和するように働くポリリジンのようなポリカチオン体、細胞膜との相互作用を高めたり、核酸の取込みを増大せしめるような脂質(例えば、ホスホリピド、コレステロールなど)といった疎水性のものが挙げられる。付加するに好ましい脂質としては、コレステロールやその誘導体(例えば

20

、コレステリルクロロホルメート、コール酸など)が挙げられる。こうしたものは、核酸の3'端あるいは5'端に付着させることができ、塩基、糖、分子内ヌクレオシド結合を介して付着させることができる。その他の基としては、核酸の3'端あるいは5'端に特異的に配置されたキャップ用の基で、エキソヌクレアーゼ、RNaseなどのヌクレアーゼによる分解を阻止するためのものが挙げられる。こうしたキャップ用の基としては、ポリエチレングリコール、テトラエチレングリコールなどのグリコールをはじめとした当該分野で知られた水酸基の保護基が挙げられるが、それに限定されるものではない。

30

アンチセンスヌクレオチドの阻害活性は、本発明の形質転換体、本発明の生体内や生体外の遺伝子発現系、あるいは本発明の受容体の生体内や生体外の翻訳系を用いて調べることができる。該核酸は公知の各種の方法で細胞に適用できる。

【0066】

以下に、(i)本発明の受容体、(ii)本発明の受容体をコードするポリヌクレオチド(本発明のポリヌクレオチド)、(iii)本発明の受容体に対する抗体(本発明の抗体)、(iv)本発明の受容体のアンチセンスポリヌクレオチド(例、本発明のアンチセンスDNA)、(v)本発明の受容体に特異的に結合する能力を有するリガンド(本発明のリガンド)などの用途を説明する。

〔1〕疾病に対する医薬候補化合物のスクリーニング

本発明のリガンドは、抗原またはコンカナバリンA刺激したラットマスト細胞に対するヒスタミン遊離活性、ラットマスト細胞に対して神経成長因子(NGF)と共働的(synergistic)に作用してヒスタミンを放出させる活性、ヒトT細胞に対する増殖調節活性、NGFの示すPC12細胞に対する分化誘導能の増強活性、血液凝固阻害活性、血小板凝集反応阻害活性などを有する。

40

本発明の受容体を用い、または組換え型本発明の受容体の発現系を用いたりリガンドレセプターアッセイ系を用いることにより、本発明の受容体と、本発明のリガンドとの結合性を变化させる化合物(例えば、ペプチド、蛋白質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物など)またはその塩を効率よくスクリーニングすることができる。

該化合物またはその塩には、(i)本発明の受容体を介して細胞刺激活性(例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca²⁺遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cAMP産生抑制、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下、GTP-S結合活性、cAMP

50

依存性プロテインキナーゼの活性化、c G M P 依存性プロテインキナーゼの活性化、リン脂質依存性プロテインキナーゼの活性化、微小管結合蛋白質リン酸化酵素（M A P キナーゼ）の活性化などを促進する活性などを有する化合物（アゴニスト）、（ii）上記細胞刺激活性を有しない化合物（アンタゴニスト）、（iii）本発明の受容体と本発明のリガンドとの結合力を促進する化合物、（iv）本発明の受容体と本発明のリガンドとの結合力を阻害する化合物などが含まれる。

【 0 0 6 7 】

具体的には、（i）本発明の受容体に、本発明のリガンドを接触させた場合と（ii）本発明の受容体に、本発明のリガンドおよび試験化合物を接触させた場合との比較を行なう。比較は、例えば、本発明の受容体に対する本発明のリガンドの結合量、細胞刺激活性などを測定して行う。

10

本発明のスクリーニング方法としての具体例としては、例えば、

（a）本発明のリガンドを本発明の受容体に接触させた場合と、本発明のリガンドおよび試験化合物を本発明の受容体に接触させた場合における、本発明のリガンドの本発明の受容体に対する結合量を測定し、比較することを特徴とする、本発明のリガンドと本発明の受容体との結合性を变化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

（b）本発明のリガンドを、本発明の受容体を含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合と、本発明のリガンドおよび試験化合物を本発明の受容体を含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合における、本発明のリガンドの該細胞または該膜画分に対する結合量を測定し、比較することを特徴とする、本発明のリガンドと本発明の受容体との結合性を变化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、および

20

（c）本発明の受容体が、本発明の受容体をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現した本発明の受容体である上記（b）記載のスクリーニング方法、

（d）本発明のリガンドが、標識したリガンドである上記（a）～（c）のスクリーニング方法などのレセプター結合アッセイ系、

【 0 0 6 8 】

（e）本発明のリガンドを本発明の受容体に接触させた場合と、本発明のリガンドおよび試験化合物を本発明の受容体に接触させた場合における、本発明の受容体を介した細胞刺激活性を測定し、比較することを特徴とする、本発明のリガンドと本発明の受容体との結合性を变化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

30

（f）本発明のリガンドを本発明の受容体を含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合と、本発明のリガンドおよび試験化合物を本発明の受容体を含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合における、本発明の受容体を介した細胞刺激活性を測定し、比較することを特徴とする、本発明のリガンドと本発明の受容体との結合性を变化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、および

（g）本発明の受容体が、本発明の受容体をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現した本発明の受容体である上記（f）のスクリーニング方法などの細胞刺激アッセイ系などが挙げられる。

【 0 0 6 9 】

40

本発明のスクリーニング方法の具体的な説明を以下にする。

本発明の受容体としては、ヒトや温血動物の臓器の膜画分などが好適に用いられる。しかし、特にヒト由来の臓器は入手が極めて困難なことから、スクリーニングに用いられるものとしては、組換え体を用いて大量発現させた本発明の受容体などが適している。

本発明の受容体を製造するには、前述の本発明の受容体の製造方法などが用いられる。

本発明のスクリーニング方法において、本発明の受容体を含有する細胞あるいは該細胞膜画分などを用いる場合、後述の調製法に従えばよい。

本発明の受容体を含有する細胞を用いる場合、該細胞をグルタルアルデヒド、ホルマリンなどで固定化してもよい。固定化方法はそれ自体公知の方法に従って行うことができる。

本発明の受容体を含有する細胞としては、本発明の受容体を発現した宿主細胞をいうが、

50

該宿主細胞としては、前述の大腸菌、枯草菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞などが挙げられる。製造方法は前述と同様である。

膜画分としては、細胞を破碎した後、それ自体公知の方法で得られる細胞膜が多く含まれる画分のことをいう。細胞の破碎方法としては、Potter - Elvehjem型ホモジナイザーで細胞を押し潰す方法、ワーリングブレンダーやポリトロン（Kinematica社製）による破碎、超音波による破碎、フレンチプレスなどで加圧しながら細胞を細いノズルから噴出させることによる破碎などがあげられる。細胞膜の分画には、分画遠心分離法や密度勾配遠心分離法などの遠心力による分画法が主として用いられる。例えば、細胞破碎液を低速（500rpm～3000rpm）で短時間（通常、約1分～10分）遠心し、上清をさらに高速（15000rpm～30000rpm）で通常30分～2時間遠心し、得られる沈澱を膜画分とする。該膜画分中には、発現した本発明の受容体と細胞由来のリン脂質や膜蛋白質などの膜成分が多く含まれる。

該本発明の受容体を含有する細胞や膜画分中の本発明の受容体の量は、1細胞当たり $10^3 \sim 10^8$ 分子であるのが好ましく、 $10^5 \sim 10^7$ 分子であるのが好適である。なお、発現量が多いほど膜画分当たりのリガンド結合活性（比活性）が高くなり、高感度なスクリーニング系の構築が可能になるばかりでなく、同一ロットで大量の試料を測定できるようになる。

【0070】

前記のレセプター結合アッセイ系や細胞刺激アッセイ系などのスクリーニング方法を実施するためには、例えば、本発明の受容体画分と、本発明のリガンド（例、標識した本発明のリガンド）などが用いられる。本発明の受容体画分としては、天然型の本発明の受容体画分か、またはそれと同等の活性を有する組換え型本発明の受容体画分などが望ましい。ここで、同等の活性とは、同等のリガンド結合活性などを示す。標識したリガンドとしては、例えば、放射性同位元素（例、 $[^3\text{H}]$ 、 $[^{125}\text{I}]$ 、 $[^{14}\text{C}]$ 、 $[^{32}\text{P}]$ 、 $[^{33}\text{P}]$ 、 $[^5\text{S}]$ など）、蛍光物質（例、フルオレセインなど）、発光物質（例、ルミノールなど）、酵素（例、ペルオキシダーゼなど）またはランタニド元素などで標識されたりガンドなどを用いることができる。

具体的には、本発明のリガンドと本発明の受容体との結合性を变化させる化合物のスクリーニングを行うには、本発明の受容体を含有する細胞または細胞の膜画分を、スクリーニングに適したバッファーに懸濁することによりレセプター標品を調製する。バッファーには、pH4～10（望ましくはpH6～8）のリン酸バッファー、トリス-塩酸バッファーなどのリガンドと受容体との結合を阻害しないバッファーであればいずれでもよい。また、非特異的結合を低減させる目的で、CHAPS、Tween-80TM（花王-アトラス社）、ジギトニン、デオキシコレートなどの界面活性剤をバッファーに加えることもできる。さらに、プロテアーゼによる本発明の受容体の分解を抑える目的でPMSF、ロイペプチン、E-64（ペプチド研究所製）、ペプスタチンなどのプロテアーゼ阻害剤を添加することもできる。0.01～10mlの該レセプター溶液に、一定量（5000～50000cpm）の標識した本発明のリガンドを添加し、同時に $10^{-10} \sim 10^{-7}\text{M}$ の試験化合物を共存させる。非特異的結合量（NSB）を知るために大過剰の未標識の本発明のリガンドを加えた反応チューブも用意する。反応は0～50、望ましくは4～37で20分～24時間、望ましくは30分～3時間行う。反応後、ガラス繊維濾紙等で濾過し、適量の同バッファーで洗浄した後、ガラス繊維濾紙に残存する放射活性を液体シンチレーションカウンターまたはβ-カウンターで計測する。拮抗する物質がない場合のカウント（ B_0 ）から非特異的結合量（NSB）を引いたカウント（ $B_0 - \text{NSB}$ ）を100%とした時、特異的結合量（ $B - \text{NSB}$ ）が例えば50%以下になる試験化合物を拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができる。

さらに、表面プラズモンセンサー技術を利用することによって、本発明の受容体に結合する化合物をスクリーニングすることもできる。

具体的には、ピアコア3000（ピアコア社）のセンサーチップ表面に、本発明の受容体を固定化後、チップ表面にリン酸緩衝液（PBS）などに溶解した試験化合物を流したと

10

20

30

40

50

きの表面プラズモンの変化を測定することにより、本発明の受容体に結合する試験籠物を選択する。例えば、表面プラズモンの変化の測定値が5レゾナンスユニット以上与える試験化合物を本発明の受容体に結合性を有する物質として選択する。

【0071】

前記の細胞刺激アッセイ系のスクリーニング方法を実施するためには、本発明の受容体を介する細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca²⁺遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cAMP産生抑制、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下、GTP-S結合活性、cAMP依存性プロテインキナーゼの活性化、cGMP依存性プロテインキナーゼの活性化、リン脂質依存性プロテインキナーゼの活性化、微小管結合蛋白質リン酸化酵素（MAPキナーゼ）の活性化などを促進する活性または抑制する活性など）を、自体公知の方法または市販の測定用キットを用いて測定することができる。具体的には、まず、本発明の受容体を含有する細胞をマルチウェルプレート等に培養する。スクリーニングを行うにあたっては前もって新鮮な培地あるいは細胞に毒性を示さない適当なバッファーに交換し、試験化合物などを添加して一定時間インキュベートした後、細胞を抽出あるいは上清液を回収して、生成した産物をそれぞれの方法に従って定量する。細胞刺激活性の指標とする物質（例えば、アラキドン酸など）の生成が、細胞が含有する分解酵素によって検定困難な場合は、該分解酵素に対する阻害剤を添加してアッセイを行なってもよい。また、cAMP産生抑制などの活性については、フォルスコリンなどで細胞の基礎的産生量を増大させておいた細胞に対する産生抑制作用として検出することができる。

10

20

細胞刺激活性を測定してスクリーニングを行なうには、適当な本発明の受容体を発現した細胞が必要である。本発明の受容体を発現した細胞としては、前述の本発明の受容体発現細胞株などが望ましい。

試験化合物としては、例えばペプチド、蛋白質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液などがあげられる。

【0072】

上記細胞刺激アッセイ系のスクリーニング方法について、さらに具体的に以下(1)～(12)に記載する。

(1) 受容体発現細胞が受容体アゴニストによって刺激されると細胞内のG蛋白質が活性化されてGTPが結合する。この現象は受容体発現細胞の膜画分においても観察される。通常、GTPは加水分解されてGDPへと変化するが、このとき反応液中にGTP-Sを添加しておく、GTP-SはGTPと同様にG蛋白質に結合するが、加水分解されずにG蛋白質を含む細胞膜に結合した状態が維持される。標識したGTP-Sを用いると細胞膜に残存した標識されたGTP-Sを測定することにより、受容体アゴニストの受容体発現細胞刺激活性を測定することができる。

30

この反応を利用して、本発明のリガンドの本発明の受容体発現細胞に対する刺激活性を測定することにより、本発明のリガンドと本発明の受容体との結合性を変化させる化合物をスクリーニングすることができる。

この方法は、本発明の受容体を含む膜画分を用いて行う。本測定法において本発明の受容体膜画分へのGTP-S結合促進活性を示す物質はアゴニストである。

40

具体的には、標識したGTP-Sの存在下、本発明のリガンドを本発明の受容体細胞膜画分に接触させた場合と、本発明のリガンドおよび試験化合物を本発明の受容体細胞膜画分に接触させた場合における、本発明の受容体細胞膜画分へのGTP-S結合促進活性を測定し、比較することにより、本発明のリガンドと本発明の受容体との結合性を変化させる化合物をスクリーニングする。

本方法において、本発明のリガンドによる本発明の受容体細胞膜画分へのGTP-S結合促進活性を抑制する活性を示す試験化合物を、拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができる。

一方、試験化合物のみを本発明の受容体細胞膜画分に接触させ、本発明の受容体細胞膜画

50

分へのGTP S結合促進活性を測定することにより、アゴニストのスクリーニングを行なうこともできる。

【0073】

スクリーニング法の一具体例を以下に述べる。

公知の方法に従って調製した本発明の受容体を含む細胞膜画分を、膜希釈緩衝液(50 mM Tris、5 mM MgCl₂、150 mM NaCl、1 μM GDP、0.1% BSA; pH 7.4)で希釈する。希釈率は、受容体の発現量により異なる。これをFalcon 2053に0.2 mlずつ分注し、本発明のリガンドまたは本発明のリガンドおよび試験化合物を加え、さらに終濃度200 pMとなるように[³⁵S]GTP Sを加える。25 °Cで1時間保温した後、氷冷した洗浄用緩衝液(50 mM Tris、5 mM MgCl₂、150 mM NaCl、0.1% BSA、0.05% CHAPS; pH 7.4)1.5 mlを加えて、ガラス繊維ろ紙GF/Fでろ過する。65 °C、30分保温して乾燥後、液体シンチレーションカウンターでろ紙上に残った膜画分に結合した[³⁵S]GTP Sの放射活性を測定する。本発明のリガンドのみを加えた実験区の放射活性を100%、本発明のリガンドを加えなかった実験区の放射活性を0%とし、本発明のリガンドによるGTP S結合促進活性に対する試験化合物の影響を算出する。GTP S結合促進活性が例えば50%以下になる試験化合物を拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができる。

10

【0074】

(2)本発明の受容体発現細胞は、本発明のリガンドの刺激により、細胞内cAMPの産生が抑制される。この反応を利用して、本発明のリガンドの本発明の受容体発現細胞に対する刺激活性を測定することにより、本発明のリガンドと本発明の受容体との結合性を变化させる化合物をスクリーニングすることができる。具体的には、細胞内cAMP量を増加させる物質の存在下、本発明のリガンドを本発明の受容体発現細胞に接触させた場合と、本発明のリガンドおよび試験化合物を本発明の受容体発現細胞に接触させた場合における、該細胞の細胞内cAMPの産生抑制活性を測定し、比較することにより、本発明のリガンドと本発明の受容体との結合性を变化させる化合物をスクリーニングする。

20

細胞内cAMP量を増加させる物質としては、例えば、フォルスコリン、カルシトニンなどが用いられる。

本発明の受容体発現細胞内のcAMP産生量は、マウス、ラット、ウサギ、ヤギ、ウシなどを免疫して得られた抗cAMP抗体と[¹²⁵I]標識cAMP(ともに市販品)を使用することによるRIA系、または抗cAMP抗体と標識cAMPとを組み合わせたEIA系で測定することができる。また、抗cAMP抗体を、protein Aまたは抗cAMP抗体産生に用いた動物のIgGなどに対する抗体などを使用して固定したシンチラントを含むビーズと[¹²⁵I]標識cAMPとを使用するSPA(Scintillation Proximity Assay)法による定量も可能である(アマシャムファルマシアバイオテック社製のキットを使用する)。

30

本方法において、本発明のリガンドによる本発明の受容体発現細胞のcAMP産生抑制性を阻害する活性を示す試験化合物を、拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができる。

40

一方、試験化合物のみを本発明の受容体発現細胞に接触させて、cAMP産生抑制性を調べることによりアゴニスト活性を示す化合物のスクリーニングを行なうことができる。

【0075】

スクリーニング法の一具体例を以下に述べる。

本発明の受容体発現細胞(例、CHO細胞などの動物細胞)を24穴プレートに5×10⁴ cell/wellで播種し、48時間培養する。細胞を0.2 mM 3-イソブチル-メチルキサンチン、0.05% BSAおよび20 mM HEPESを含むハンスバッファー(pH 7.4)で洗浄する(以下、反应用バッファーと略記する)。その後、0.5 mlの反应用バッファーを加えて30分間培養器で保温する。反应用バッファーを除き、新たに0.25 mlの反应用バッファーを細胞に加えた後、1 μMの本発明のリガ

50

ドまたは 1 μ M の本発明のリガンドおよび試験化合物を添加した 2 μ M フォルスコリンを含む 0.25 ml の反応用バッファーを、細胞に加え、37 で 24 分間反応させる。100 μ l の 20% 過塩素酸を加えて反応を停止させ、その後氷上で 1 時間置くことにより細胞内 cAMP を抽出する。抽出液中の cAMP 量を、cAMP EIA キット (アマシャムファルマシアバイオテック) を用いて測定する。フォルスコリンの刺激によって産生された cAMP 量を 100% とし、1 μ M の本発明のリガンドの添加によって抑制された cAMP 量を 0% とし、本発明のリガンドによる cAMP 産生抑制活性に対する試験化合物の影響を算出する。本発明のリガンドの活性を阻害して、cAMP 産生活性が例えば 50% 以上になる試験化合物を、拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができる。

10

【0076】

また、本発明のリガンドの刺激により、細胞内 cAMP 量が増加する性質を示す本発明の受容体発現細胞を使用する場合、本発明のリガンドを本発明の受容体発現細胞に接触させた場合と、本発明のリガンドおよび試験化合物を本発明の受容体発現細胞に接触させた場合における、該細胞の細胞内 cAMP の産生促進活性を測定し、比較することにより、本発明のリガンドと本発明の受容体との結合性を变化させる化合物をスクリーニングすることができる。

本方法において、本発明のリガンドによる本発明の受容体発現細胞の cAMP 産生促進活性を阻害する活性を示す試験化合物を、拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができる。

20

一方、試験化合物のみを本発明の受容体発現細胞に接触させて cAMP 産生促進活性を調べることによりアゴニスト活性を示す化合物のスクリーニングを行なうことができる。

cAMP 産生促進活性は、上記のスクリーニング法においてフォルスコリンを添加せずに本発明の受容体発現細胞 (例、CHO 細胞などの動物細胞) に本発明のリガンドまたは本発明のリガンドおよび試験化合物を添加して産生された cAMP を上記の方法で定量して測定する。

【0077】

(3) CRE - レポーター遺伝子ベクターを用いて、本発明のリガンドの本発明の受容体発現細胞に対する刺激活性を測定することにより、本発明のリガンドと本発明の受容体との結合性を变化させる化合物をスクリーニングすることができる。

30

CRE (cAMP response element) を含む DNA を、ベクターのレポーター遺伝子上流に挿入し、CRE - レポーター遺伝子ベクターを得る。CRE - レポーター遺伝子ベクターを導入した本発明の受容体発現細胞において、cAMP の上昇を伴う刺激は、CRE を介したレポーター遺伝子発現と、それに引き続くレポーター遺伝子の遺伝子産物 (蛋白質) の産生を誘導する。つまり、レポーター遺伝子蛋白質の酵素活性を測定することにより、CRE - レポーター遺伝子ベクター導入細胞内の cAMP 量の変動を検出することができる。

具体的には、細胞内 cAMP 量を増加させる物質の存在下、本発明のリガンドを、CRE - レポーター遺伝子ベクター導入本発明の受容体発現細胞に接触させた場合と、本発明のリガンドおよび試験化合物を、CRE - レポーター遺伝子ベクター導入本発明の受容体発現細胞に接触させた場合における、レポーター遺伝子蛋白質の酵素活性を測定し、比較することにより、本発明のリガンドと本発明の受容体との結合性を变化させる化合物をスクリーニングする。

40

細胞内 cAMP 量を増加させる物質としては、例えば、フォルスコリン、カルシトニンなどが用いられる。

ベクターとしては、例えば、ピッカジーン ベイシックベクター、ピッカジーン エンハンサーベクター (東洋インキ製造 (株)) などが用いられる。CRE を含む DNA を、上記ベクターのレポーター遺伝子、例えばルシフェラーゼ遺伝子上流のマルチクロニングサイトに挿入し、CRE - レポーター遺伝子ベクターとする。

本方法において、本発明のリガンドによるレポーター遺伝子蛋白質の酵素活性抑制を回復

50

させる試験化合物を、拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができる。

一方、試験化合物のみを本発明の受容体発現細胞に接触させて、フォルスコリン刺激によって上昇した発光量の本発明のリガンドと同様な抑制を測定することによりアゴニストのスクリーニングを行なうこともできる。

【0078】

レポーター遺伝子として、ルシフェラーゼを利用する例を用いて、このスクリーニング方法の具体例を以下に述べる。

CRE - レポーター遺伝子 (ルシフェラーゼ) を導入した本発明の受容体発現細胞を、24穴プレートに 5×10^3 cell/well で播種し、48時間培養する。細胞を 0.2 mM 3 - イソブチル - メチルキサンチン、 0.05% BSA および 20 mM HEPES を含むハンスバッファー (pH 7.4) で洗浄する (以下、反应用バッファーと略記する)。その後 0.5 ml の反应用バッファーを加えて30分間培養器で保温する。反应用バッファーを除き、新たに 0.25 ml の反应用バッファーを細胞に加えた後、 $1 \mu\text{M}$ の本発明のリガンドまたは $1 \mu\text{M}$ の本発明のリガンドおよび試験化合物を添加した $2 \mu\text{M}$ フォルスコリンを含む 0.25 ml の反应用バッファーを、細胞に加え、37°C で24分間反応させる。細胞をピッカジーン用細胞溶解剤 (東洋インキ製造 (株)) で溶かし、溶解液に発光基質 (東洋インキ製造 (株)) を添加する。ルシフェラーゼによる発光は、ルミノメーター、液体シンチレーションカウンターまたはトップカウンターにより測定する。本発明のリガンド単独を添加した場合と、 $1 \mu\text{M}$ の本発明のリガンドおよび試験化合物を添加した場合のルシフェラーゼによる発光量を測定して、比較する。

本発明のリガンドは、フォルスコリン刺激に基づくルシフェラーゼによる発光量の増加を抑制する。該抑制を回復させる化合物を拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができる。

【0079】

レポーター遺伝子として、例えば、アルカリフォスファターゼ、クロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼ (chloramphenicol acetyltransferase)、 β -ガラクトシダーゼなどの遺伝子を用いてもよい。これらのレポーター遺伝子蛋白質の酵素活性は、公知の方法に従い、または市販の測定キットを用いて測定する。アルカリフォスファターゼ活性は、例えば和光純薬製 Lumi-Phos 530 を用いて、クロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼ活性は、例えば和光純薬製 FAST CAT chloramphenicol Acetyltransferase Assay Kit を用いて、 β -ガラクトシダーゼ活性は、例えば和光純薬製 Aurora Gal-XE を用いて測定する。

【0080】

(4) 本発明の受容体発現細胞は、本発明のリガンドの刺激により、アラキドン酸代謝物を細胞外に放出する。この反応を利用して、本発明のリガンドの本発明の受容体発現細胞に対する刺激活性を測定することにより、本発明のリガンドと本発明の受容体との結合性を変化させる化合物をスクリーニングすることができる。

あらかじめ、標識したアラキドン酸を、本発明の受容体発現細胞に取り込ませておくことによって、アラキドン酸代謝物放出活性を、細胞外に放出された標識されたアラキドン酸代謝物を測定することによって測定することができる。

具体的には、本発明のリガンドを、標識したアラキドン酸を含有する本発明の受容体発現細胞に接触させた場合と、本発明のリガンドおよび試験化合物を、標識したアラキドン酸を含有する本発明の受容体発現細胞に接触させた場合における、アラキドン酸代謝物の放出活性を測定し、比較することにより、本発明のリガンドと本発明の受容体との結合性を変化させる化合物をスクリーニングする。

本方法において、本発明のリガンドによるアラキドン酸代謝物放出活性を阻害する試験化合物を、拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができる。

また、試験化合物のみを本発明の受容体発現細胞に接触させ、本発明の受容体発現細胞のアラキドン酸代謝物放出活性を公知の方法で調べることによりアゴニスト活性を示す化合物のスクリーニングを行なうこともできる。

【0081】

スクリーニング法の一具体例を以下に述べる。

本発明の受容体発現細胞を24穴プレートに 5×10^4 cell/wellで播種し、24時間培養後、 $[^3\text{H}]$ アラキドン酸を $0.25 \mu\text{Ci/well}$ となるよう添加し、16時間後、細胞を0.05% BSAおよび20mM HEPESを含むハンスバッファー(pH7.4)(以下、反作用バッファーと略記する)で洗浄する。終濃度 $10 \mu\text{M}$ の本発明のリガンドまたは終濃度 $10 \mu\text{M}$ の本発明のリガンドおよび試験化合物を含む反作用バッファー $500 \mu\text{l}$ を、各wellに添加する。37°Cで60分間インキュベートした後、反応液 $400 \mu\text{l}$ をシンチレーターに加え、反応液中に遊離した $[^3\text{H}]$ アラキドン酸代謝物の量をシンチレーションカウンターにより測定する。

10

反作用バッファー $500 \mu\text{l}$ のみを添加した場合(本発明のリガンド非添加・試験化合物非添加)の遊離 $[^3\text{H}]$ アラキドン酸代謝物の量を0%、 $10 \mu\text{M}$ の本発明のリガンドを含む反作用バッファーを添加した場合(試験化合物非添加)の遊離 $[^3\text{H}]$ アラキドン酸代謝物の量を100%として、試験化合物を添加した場合の遊離 $[^3\text{H}]$ アラキドン酸代謝物の量を算出する。

アラキドン酸代謝物放出活性が、例えば50%以下になる試験化合物を拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができる。

【0082】

(5)本発明の受容体発現細胞は、本発明のリガンドの刺激により、細胞内のCa濃度が上昇する。この反応を利用して、本発明のリガンドの本発明の受容体発現細胞に対する刺激活性を測定することにより、本発明のリガンドと本発明の受容体との結合性を変化させる化合物をスクリーニングすることができる。

20

具体的には、本発明のリガンドを、本発明の受容体発現細胞に接触させた場合と、本発明のリガンドおよび試験化合物を、本発明の受容体発現細胞に接触させた場合における、細胞内カルシウム濃度上昇活性を測定し、比較することにより、本発明のリガンドと本発明の受容体との結合性を変化させる化合物をスクリーニングする。測定は公知の方法に従って行う。

本方法において、本発明のリガンドによる細胞内カルシウム濃度の上昇を抑制する試験化合物を、拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができる。

一方、試験化合物のみの添加による蛍光強度の上昇を測定することによってアゴニストのスクリーニングを行なうこともできる。

30

【0083】

スクリーニング法の一具体例を以下に述べる。

本発明の受容体発現細胞を、滅菌した顕微鏡用カバーガラス上に播き、2日後、培養液を、4mM Fura-2 AM(同仁化学研究所)を懸濁したHBSSに置換し、室温で2時間30分おく。HBSSで洗浄した後、キュベットにカバーガラスをセットし、本発明のリガンドまたは本発明のリガンドおよび試験化合物を添加し、励起波長340nmおよび380nmでの、505nmの蛍光強度の比の上昇を蛍光測定器で測定し、比較する。また、FLIPR(モレキュラーデバイス社製)を使って行ってもよい。本発明の受容体発現細胞懸濁液にFluo-3 AM(同仁化学研究所製)を添加し、細胞に取り込ませた後、上清を遠心により数度洗浄後、96穴プレートに細胞を播く。FLIPR装置にセットし、Fura-2の場合と同様に、本発明のリガンドまたは本発明のリガンドおよび試験化合物を添加し、蛍光強度の比の上昇を蛍光測定器で測定し、比較する。

40

さらに、本発明の受容体発現細胞に、細胞内Caイオンの上昇によって発光するような蛋白質の遺伝子(例、aequorinなど)を共発現させておき、細胞内Caイオン濃度の上昇によって、該遺伝子蛋白質(例、aequorinなど)がCa結合型となり発光することを利用して、本発明のリガンドと本発明の受容体との結合性を変化させる化合物をスクリーニングすることもできる。

細胞内Caイオンの上昇によって発光するような蛋白質の遺伝子を共発現させた本発明の受容体発現細胞を、96穴プレートに播き、上記と同様に、本発明のリガンドまたは本発

50

明のリガンドおよび試験化合物を添加し、蛍光強度の比の上昇を蛍光測定器で測定し、比較する。

本発明のリガンドによる蛍光強度の上昇を、抑制する試験化合物を拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができる。

【0084】

(6) 受容体を発現する細胞に、受容体アゴニストを添加すると、細胞内イノシトール三リン酸濃度は上昇する。本発明のリガンドの、本発明の受容体発現細胞における細胞内イノシトール三リン酸産生活性を利用することにより、本発明のリガンドと本発明の受容体との結合性を变化させる化合物をスクリーニングすることができる。

具体的には、標識したイノシトールの存在下、本発明のリガンドを、本発明の受容体発現細胞に接触させた場合と、本発明のリガンドおよび試験化合物を、本発明の受容体発現細胞に接触させた場合における、イノシトール三リン酸産生活性を測定し、比較することにより、本発明のリガンドと本発明の受容体との結合性を变化させる化合物をスクリーニングする。測定は公知の方法に従って行う。

本方法において、イノシトール三リン酸産生活性を抑制する試験化合物を、拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができる。

一方、試験化合物のみを本発明の受容体発現細胞に接触させ、イノシトール三リン酸産生上昇を測定することによってアゴニストのスクリーニングを行なうこともできる。

【0085】

スクリーニング法の一具体例を以下に述べる。

本発明の受容体発現細胞を24穴プレートに播き、1日間培養する。その後、myo-[2-³H]inositol (2.5 μCi/well) を添加した培地で1日間培養し、細胞を放射活性を有するイノシトールを無添加の培地でよく洗浄する。本発明のリガンドまたは本発明のリガンドおよび試験化合物を添加後、10%過塩素酸を加え、反応を止める。1.5 M 水酸化カリウムおよび60 mM HEPES 溶液で中和し、0.5 ml のAG1 x 8 樹脂 (Bio-Rad) を詰めたカラムに通し、5 mM 四ホウ酸ナトリウム (Na₂B₄O₇) および60 mM ギ酸アンモニウムで洗浄した後、1 M ギ酸アンモニウムおよび0.1 M ギ酸で溶出した放射活性を、液体シンチレーションカウンターで測定する。本発明のリガンドを添加しない場合の放射活性を0%、本発明のリガンドを添加した場合の放射活性を100%とし、試験化合物の、本発明のリガンドと本発明の受容体の結合に対する影響を算出する。

イノシトール三リン酸産生活性が、例えば50%以下になる試験化合物を拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができる。

【0086】

(7) TRE-レポーター遺伝子ベクターを用いて、本発明のリガンドの本発明の受容体発現細胞に対する刺激活性を測定することにより、本発明のリガンドと本発明の受容体との結合性を变化させる化合物をスクリーニングすることができる。

TRE (TPA response element) を含むDNAを、ベクターのレポーター遺伝子上流に挿入し、TRE-レポーター遺伝子ベクターを得る。TRE-レポーター遺伝子ベクターを導入した本発明の受容体発現細胞において、細胞内カルシウム濃度の上昇を伴う刺激は、TREを介したレポーター遺伝子発現と、それに引き続くレポーター遺伝子の遺伝子産物(蛋白質)の産生を誘導する。つまり、レポーター遺伝子蛋白質の酵素活性を測定することにより、TRE-レポーター遺伝子ベクター導入細胞内のカルシウム量の変動を検出することができる。

具体的には、本発明のリガンドを、TRE-レポーター遺伝子ベクター導入本発明の受容体発現細胞に接触させた場合と、本発明のリガンドおよび試験化合物を、TRE-レポーター遺伝子ベクター導入本発明の受容体発現細胞に接触させた場合における、レポーター遺伝子蛋白質の酵素活性を測定し、比較することにより、本発明のリガンドと本発明の受容体との結合性を变化させる化合物をスクリーニングする。

ベクターとしては、例えば、ピッカジーン ベイシックベクター、ピッカジーン エンハ

10

20

30

40

50

ンサーベクター（東洋インキ製造（株））などが用いられる。T R Eを含むD N Aを、上記ベクターのレポーター遺伝子、例えばルシフェラーゼ遺伝子上流のマルチクローニングサイトに挿入し、T R E - レポーター遺伝子ベクターとする。

本方法において、本発明のリガンドによるレポーター遺伝子蛋白質の酵素活性を抑制する試験化合物を、拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができる。

一方、試験化合物のみをT R E - レポーター遺伝子ベクター導入本発明の受容体発現細胞に接触させ、本発明のリガンドと同様な発光量の増加を測定することによりアゴニストのスクリーニングを行なうこともできる。

【0087】

レポーター遺伝子として、ルシフェラーゼを利用する例を用いて、このスクリーニング方法の具体例を以下に述べる。

T R E - レポーター遺伝子（ルシフェラーゼ）を導入した本発明の受容体発現細胞を、24穴プレートに 5×10^3 cell / wellで播種し、48時間培養する。細胞を0.05% BSAおよび20mM HEPESを含むハンスバッファー（pH7.4）で洗浄した後、10nMの本発明のリガンドまたは10nMの本発明のリガンドおよび試験化合物を添加し、37℃で60分間反応させる。細胞をピッカジン用細胞溶解剤（東洋インキ製造（株））で溶かし、溶解液に発光基質（東洋インキ製造（株））を添加する。ルシフェラーゼによる発光は、ルミノメーター、液体シンチレーションカウンターまたはトップカウンターにより測定する。本発明のリガンドを添加した場合と、10nMの本発明のリガンドおよび試験化合物を添加した場合のルシフェラーゼによる発光量を測定して、比較する。

本発明のリガンドによる細胞内カルシウムの上昇によって、ルシフェラーゼによる発光量が増加する。この増加を抑制する化合物を拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができる。

【0088】

レポーター遺伝子として、例えば、アルカリフォスファターゼ、クロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼ（chloramphenicol acetyltransferase）、 β -ガラクトシダーゼなどの遺伝子を用いてもよい。これらのレポーター遺伝子蛋白質の酵素活性は、公知の方法に従い、または市販の測定キットを用いて測定する。アルカリフォスファターゼ活性は、例えば和光純薬製Lumi-Phos 530を用いて、クロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼ活性は、例えば和光純薬製FAST CAT chloramphenicol Acetyltransferase Assay Kitを用いて、 β -ガラクトシダーゼ活性は、例えば和光純薬製Aurora Gal-XEを用いて測定する。

【0089】

（8）本発明の受容体発現細胞は、本発明のリガンドの刺激により、MAPキナーゼが活性化され、増殖する。この反応を利用して、本発明のリガンドの本発明の受容体発現細胞に対する刺激活性を測定することにより、本発明のリガンドと本発明の受容体との結合性を変化させる化合物をスクリーニングすることができる。

具体的には、本発明のリガンドを、本発明の受容体発現細胞に接触させた場合と、本発明のリガンドおよび試験化合物を、本発明の受容体発現細胞に接触させた場合における、細胞増殖を測定し、比較することにより、本発明のリガンドと本発明の受容体との結合性を変化させる化合物をスクリーニングする。

本発明の受容体発現細胞の増殖は、例えば、MAPキナーゼ活性、チミジン取り込み活性、細胞数などを測定すればよい。

具体例としては、MAPキナーゼ活性については、本発明のリガンドまたは本発明のリガンドおよび試験化合物を、本発明の受容体発現細胞に添加した後、細胞溶解液から抗MAPキナーゼ抗体を用いた免疫沈降によりMAPキナーゼ分画を得た後、公知の方法、例えば和光純薬製MAP Kinase Assay Kitおよび $[\text{}^{32}\text{P}]$ -ATPを使用してMAPキナーゼ活性を測定し、比較する。

チミジン取り込み活性については、本発明の受容体発現細胞を24穴プレートに播種し、

10

20

30

40

50

培養し、本発明のリガンドまたは本発明のリガンドおよび試験化合物を添加した後、放射活性により標識したチミジン（例、[m e t h y l - ³H] - チミジンなど）を加え、その後、細胞を溶解し、細胞内に取り込まれたチミジンの放射活性を、液体シンチレーションカウンターで計数することにより、チミジン取り込み活性を測定し、比較する。

細胞数の測定については、本発明の受容体発現細胞を24穴プレートに播種し、培養し、本発明のリガンドまたは本発明のリガンドおよび試験化合物を添加した後、MTT (3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) を添加する。細胞内に取り込まれてMTTが変化したMTTホルマゼンを、塩酸にて酸性としたイソプロパノール水溶液で細胞を溶解した後、570nmの吸収によって測定し、比較する。

本方法において、本発明の受容体発現細胞の増殖を抑制する試験化合物を、拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができる。

一方、試験化合物のみを本発明の受容体発現細胞に接触させ、本発明のリガンドと同様な細胞増殖活性を測定することによりアゴニストのスクリーニングを行なうこともできる。

【0090】

チミジン取り込み活性を利用するスクリーニング法の一具体例を以下に述べる。

本発明の受容体発現細胞を24穴プレートに5000個/ウェル播き、1日間培養する。次に血清を含まない培地で2日間培養し、細胞を飢餓状態にする。本発明のリガンドまたは本発明のリガンドおよび試験化合物を、細胞に添加して24時間培養した後、[m e t h y l - ³H] - チミジンをウェル当たり0.015MBq添加し、6時間培養する。細胞をPBSで洗った後、メタノールを添加して10分間放置する。次に5%トリクロロ酢酸を添加して15分間放置後、固定された細胞を蒸留水で4回洗う。0.3N水酸化ナトリウム溶液で細胞を溶解し、溶解液中の放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定する。

本発明のリガンドを添加した場合の放射活性の増加を抑制する試験化合物を、拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができる。

【0091】

(9) 本発明の受容体発現細胞は、本発明のリガンドの刺激により、カリウムチャンネルが活性化し、細胞内にあるKイオンが、細胞外に流出する。この反応を利用して、本発明のリガンドの本発明の受容体発現細胞に対する刺激活性を測定することにより、本発明のリガンドと本発明の受容体との結合性を変化させる化合物をスクリーニングすることができる。

Kイオンと同族元素であるRbイオン（ルビジウムイオン）は、Kイオンと区別無く、カリウムチャンネルを通して細胞外に流出する。よって、本発明の受容体発現細胞に、放射活性同位体であるRb（[⁸⁶Rb]）を取り込ませておいた後、本発明のリガンドの刺激によって流出する⁸⁶Rbの流れ（流出活性）を測定することにより、本発明のリガンドの本発明の受容体発現細胞に対する刺激活性を測定する。

具体的には、⁸⁶Rbの存在下、本発明のリガンドを、本発明の受容体発現細胞に接触させた場合と、本発明のリガンドおよび試験化合物を、本発明の受容体発現細胞に接触させた場合における、⁸⁶Rbの流出活性を測定し、比較することにより、本発明のリガンドと本発明の受容体との結合性を変化させる化合物をスクリーニングする。

本方法において、本発明のリガンド刺激による⁸⁶Rbの流出活性の上昇を抑制する試験化合物を、拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができる。

一方、試験化合物のみを本発明の受容体発現細胞に接触させ、本発明のリガンドと同様な⁸⁶Rbの流出活性の上昇を測定することによりアゴニストのスクリーニングを行なうこともできる。

【0092】

スクリーニング法の一具体例を以下に述べる。

本発明の受容体発現細胞を24穴プレートに播き、2日間培養する。その後、1mCi/mlの⁸⁶RbClを含む培地中で2時間保温する。細胞を培地でよく洗浄し、外液中の⁸⁶RbClを完全に除く。本発明のリガンドまたは本発明のリガンドおよび試験化合物を細

10

20

30

40

50

胞に添加し、30分後外液を回収し、カウンターで放射活性を測定し、比較する。本発明のリガンド刺激による⁸⁶Rbの流出活性の上昇を抑制する試験化合物を、拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができる。

【0093】

(10) 本発明の受容体発現細胞が本発明のリガンドに反応し、細胞外のpHが変化する。この反応を利用して、本発明のリガンドの本発明の受容体発現細胞に対する刺激活性を測定することにより、本発明のリガンドと本発明の受容体との結合性を変化させる化合物をスクリーニングすることができる。

具体的には、本発明のリガンドを、本発明の受容体発現細胞に接触させた場合と、本発明のリガンドおよび試験化合物を、本発明の受容体発現細胞に接触させた場合における、細胞外のpH変化を測定し、比較することにより、本発明のリガンドと本発明の受容体との結合性を変化させる化合物をスクリーニングする。

細胞外pH変化は、例えば、Cytosensor装置(モレキュラーデバイス社)を使用して測定する。

本方法において、本発明のリガンドによる細胞外pH変化を抑制する試験化合物を、拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができる。

一方、試験化合物のみを本発明の受容体発現細胞に接触させ、本発明のリガンドと同様な細胞外pH変化を測定することによりアゴニストのスクリーニングを行なうこともできる。

【0094】

スクリーニング法の一具体例を以下に述べる。

本発明の受容体発現細胞をCytosensor装置用のカプセル内で終夜培養し、装置のチャンバーにセットして細胞外pHが安定するまで約2時間、0.1%BSAを含むRPMI1640培地(モレキュラーデバイス社製)を灌流させる。pHが安定した後、本発明のリガンドまたは本発明のリガンドおよび試験化合物を含む培地を細胞上に灌流させる。灌流によって生じた培地のpH変化を測定し、比較する。

本発明のリガンドによる細胞外pH変化を抑制する化合物を拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができる。

【0095】

(11) 酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)のhaploid -mating Type (MAT) の性フェロモン受容体Ste2は、G蛋白質Gpa1と共役しており、性フェロモン -mating factorに応答してMAPキナーゼを活性化し、これに引き続き、Far1 (cell-cycle arrest) および転写活性化因子Ste12が活性化される。Ste12は、種々の蛋白質(例えば、接合に関与するFUS1)の発現を誘導する。一方、制御因子Sst2は上記の過程に抑制的に機能する。この系において、受容体遺伝子を導入した酵母を作製し、受容体アゴニストの刺激により酵母細胞内のシグナル伝達系を活性化し、その結果生じる増殖などを指標として用いる、受容体アゴニストと受容体との反応の測定系の試みが行なわれている(Trends in Biotechnology, 15巻, 487-494頁, 1997年)。上記の受容体遺伝子導入酵母の系を利用して、本発明のリガンドと本発明の受容体との結合性を変化させる化合物をスクリーニングすることができる。

【0096】

具体例を以下に示す。

MAT 酵母のSte2およびGpa1をコードする遺伝子を除去し、代わりに、本発明の受容体遺伝子およびGpa1-Gai2融合蛋白質をコードする遺伝子を導入する。Farをコードする遺伝子を除去してcell-cycle arrestが生じないようにし、また、Sstをコードする遺伝子を除去して本発明のリガンドに対する応答の感度を向上させておく。さらに、FUS1にヒスチジン生合成遺伝子HIS3を結合したFUS1-HIS3遺伝子を導入する。この遺伝子組換え操作は、例えば、Molecular and Cellular Biology, 15巻, 6188-6195頁, 1995年に記載の方法において、ソマトスタチン受容体タイプ2 (SSTR2) 遺伝子を、本発明の受容体に置き換えて実施することができる。

このように構築された形質変換酵母は、本発明のリガンドに高感度で反応し、その結果、MAPキナーゼの活性化が起き、ヒスチジン生合成酵素が合成されるようになり、ヒスチジン欠乏培地で生育可能になる。

従って、上記の本発明の受容体発現酵母 (Ste2 遺伝子およびGpa1 遺伝子が除去され、本発明の受容体遺伝子およびGpa1 - Gai2 融合蛋白質コード遺伝子が導入され、Far 遺伝子およびSst 遺伝子が除去され、FUS1 - HIS3 遺伝子が導入されたMAT 酵母) を、ヒスチジン欠乏培地で培養し、本発明のリガンドまたは本発明のリガンドおよび試験化合物を接触させ、該酵母の生育を測定し、比較することにより、本発明のリガンドと本発明の受容体との結合性を変化させる化合物をスクリーニングすることができる。

10

本方法において、該酵母の生育を抑制する試験化合物を、拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができる。

一方、試験化合物のみを上記の本発明の受容体発現酵母に接触させ、本発明のリガンドと同様な酵母の生育を測定することによりアゴニストのスクリーニングを行なうこともできる。

【0097】

スクリーニング法の一具体例を以下に述べる。

上記の本発明の受容体発現酵母を完全合成培地の液体培地で終夜培養し、その後、ヒスチジンを除去した溶解寒天培地に、 2×10^4 cells/ml の濃度になるように加える。

ついで、 9×9 cm の角形シャーレに播く。寒天が固化した後、本発明のリガンドまたは本発明のリガンドおよび試験化合物をしみこませた滅菌濾紙を寒天表面におき、30 で3日間培養する。試験化合物の影響は、濾紙の周囲の酵母の生育を、本発明のリガンドのみをしみこませた滅菌濾紙を用いた場合と比較する。また、あらかじめ、ヒスチジンを除去した寒天培地に本発明のリガンドを添加しておき、滅菌濾紙に試験化合物のみをしみこませて酵母を培養し、シャーレ全面での酵母の生育が濾紙の周囲で影響を受けることを観察してもよい。

20

酵母の生育を抑制する化合物を拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができる。

【0098】

(12) 本発明の受容体遺伝子RNAをアフリカツメガエル卵母細胞に注入し、本発明のリガンドによって刺激すると細胞カルシウム濃度が上昇して、calcium-activated chloride currentが生じる。これは、膜電位の変化としてとらえることができる (Kイオン濃度勾配に変化がある場合も同様)。本発明のリガンドによって生じる本発明の受容体導入アフリカツメガエル卵母細胞における上記反応を利用して、本発明のリガンドの本発明の受容体発現細胞に対する刺激活性を測定することにより、本発明のリガンドと本発明の受容体との結合性を変化させる化合物をスクリーニングすることができる。

30

具体的には、本発明のリガンドを、本発明の受容体遺伝子RNA導入アフリカツメガエル卵母細胞に接触させた場合と、本発明のリガンドおよび試験化合物を、本発明の受容体遺伝子RNA導入アフリカツメガエル卵母細胞に接触させた場合における、細胞膜電位の変化を測定し、比較することにより、本発明のリガンドと本発明の受容体との結合性を変化させる化合物をスクリーニングする。

40

本方法において、細胞膜電位変化を抑制する試験化合物を、拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができる。

一方、試験化合物のみを本発明の受容体遺伝子RNA導入アフリカツメガエル卵母細胞に接触させ、本発明のリガンドと同様な細胞膜電位変化を測定することによりアゴニストのスクリーニングを行なうこともできる。

【0099】

スクリーニング法の一具体例を以下に述べる。

氷冷して動けなくなった雌のアフリカツメガエルから取り出した、卵母細胞塊を、MBS液 (88mM NaCl, 1mM KCl, 0.41mM CaCl_2 , 0.33mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 0.82mM MgSO_4 , 2.4mM NaHCO

50

3, 10mM HEPES ; pH7.4) に溶かしたコラーゲナーゼ (0 . 5 m g / m l) で卵塊がほぐれるまで 1 9、1 ~ 6 時間、1 5 0 r p m で処理する。外液を M B S 液に置換することで 3 度洗浄し、マイクロマニピュレーターで本発明の受容体遺伝子 p o l y A 付加 c R N A (5 0 n g / 5 0 n l) を卵母細胞にマイクロインジェクションする。

本発明の受容体遺伝子 m R N A は、組織や細胞から調製してもよく、プラスミドから i n v i t r o で転写してもよい。本発明の受容体遺伝子 m R N A を M B S 液中で 2 0 で 3 日培養し、これを Ringer 液を流している v o l t a g e c l a m p 装置のくぼみに置き、電位固定用ガラス微小電極および電位測定用ガラス微小電極を細胞内に刺入し、(-) 極は細胞外に置く。電位が安定したら、本発明のリガンドまたは本発明のリガンドおよび試験化合物を含む R i n g e r 液を流して電位変化を記録する。試験化合物の影響は、本発明の受容体遺伝子 R N A 10 導入アフリカツメガエル卵母細胞の細胞膜電位変化を、本発明のリガンドのみ含む Ringer 液を流した場合と比較することによって測定することができる。

細胞膜電位変化を抑制する化合物を拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができる。

上記の系において、電位の変化量を増大させると、測定しやすくなるため、各種の G 蛋白質遺伝子の p o l y A 付加 R N A を導入してもよい。また、カルシウム存在下で発光を生じるような蛋白質 (例、aequorin など) の遺伝子の p o l y A 付加 R N A を共インジェクションすることにより、膜電位変化ではなく発光量を測定することもできる。

【 0 1 0 0 】

本発明のリガンドと本発明の受容体との結合性を变化させる化合物またはその塩のスクリーニング用キットは、本発明の受容体または本発明の受容体を含有する細胞もしくは細胞の膜画分、および本発明のリガンドを含有する。 20

本発明のスクリーニング用キットの例としては、次のものが挙げられる。

1 . スクリーニング用試薬

1 測定用緩衝液および洗浄用緩衝液

Hanks' Balanced Salt Solution (ギブコ社製) に、0 . 0 5 % のウシ血清アルブミン (シグマ社製) を加えたもの。

孔径 0 . 4 5 μ m のフィルターで濾過滅菌し、4 で保存するか、または用時調製しても良い。

2 本発明の受容体標品

本発明の受容体を発現させた C H O 細胞を、1 2 穴プレートに 5 × 1 0 ⁵ 個 / 穴で継代し、3 7、5 % C O ₂、9 5 % a i r で 2 日間培養したもの。 30

3 標識リガンド

[³H]、[¹²⁵I]、[¹⁴C]、[³²P]、[³³P]、[³⁵S] などの放射性同位元素で標識した本発明のリガンドを適当な溶媒または緩衝液に溶解したものを、4 または - 2 0 にて保存し、用時に測定用緩衝液にて 1 μ M に希釈する。

4 リガンド標準液

本発明のリガンドを 0 . 1 % ウシ血清アルブミン (シグマ社製) を含む P B S で 1 m M と なるように溶解し、- 2 0 で保存する。

【 0 1 0 1 】

2 . 測定法

1 1 2 穴組織培養用プレートにて培養した本発明の受容体を発現させた細胞を、測定用緩衝液 1 m l で 2 回洗浄した後、4 9 0 μ l の測定用緩衝液を各穴に加える。

2 1 0 ⁻³ ~ 1 0 ⁻¹⁰ M の試験化合物溶液を 5 μ l 加えた後、標識した本発明のリガンドを 5 μ l 加え、室温にて 1 時間反応させる。非特異的結合量を知るためには試験化合物の代わりに 1 0 ⁻³ M の本発明のリガンドを 5 μ l 加えておく。

3 反応液を除去し、1 m l の洗浄用緩衝液で 3 回洗浄する。細胞に結合した標識された本発明のリガンドを 0 . 2 N N a O H - 1 % S D S で溶解し、4 m l の液体シンチレーター A (和光純薬製) と混合する。

4 液体シンチレーションカウンター (ベックマン社製) を用いて放射活性を測定し、 50

Percent Maximum Binding (P M B) を次式で求める。

$$P M B = [(B - N S B) / (B_0 - N S B)] \times 100$$

P M B : Percent Maximum Binding

B : 検体を加えた時の値

N S B : Non-specific Binding (非特異的結合量)

B₀ : 最大結合量

【 0 1 0 2 】

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られうる化合物またはその塩は、本発明のリガンドと本発明の受容体との結合を変化させる化合物あるいは本発明の受容体の活性を促進または阻害する化合物であり、具体的には、(i) 本発明の受容体を介して細胞刺激活性を有する化合物またはその塩(本発明の受容体アゴニスト)、(ii) 該刺激活性を有しない化合物(本発明の受容体アンタゴニスト)、(iii) 本発明の受容体と本発明のリガンドとの結合力を促進する化合物、(iv) 本発明の受容体と本発明のリガンドとの結合力を阻害する化合物などである。該化合物としては、ペプチド、蛋白質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液、血漿などから選ばれた化合物などが挙げられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

10

該化合物の塩としては、前記した本発明の受容体の塩と同様のものが用いられる。

【 0 1 0 3 】

上記本発明の受容体アゴニストであるか、またはアンタゴニストであるかの評価方法は、例えば、以下の(i) または(ii) に従えばよい。

20

(i) 前記 1 ~ 3 のスクリーニング方法で示されるバインディング・アッセイを行い、本発明のリガンドと本発明の受容体との結合性を变化させる(特に、結合を阻害する)化合物を得た後、該化合物が上記した本発明の受容体を介する細胞刺激活性を有しているか否かを測定する。細胞刺激活性を有する化合物またはその塩は本発明の受容体アゴニスト(アゴニスト)であり、該活性を有しない化合物またはその塩は本発明の受容体アンタゴニスト(アンタゴニスト)である。

(ii) (a) 試験化合物を本発明の受容体を含有する細胞に接触させ、本発明の受容体を介した細胞刺激活性を測定する。細胞刺激活性を有する化合物またはその塩は本発明の受容体アゴニストである。

30

(b) 本発明のリガンドを本発明の受容体を含有する細胞に接触させた場合と、本発明のリガンドおよび試験化合物を本発明の受容体を含有する細胞に接触させた場合における、本発明の受容体を介した細胞刺激活性を測定し、比較する。本発明の受容体を活性化する化合物による細胞刺激活性を減少させ得る化合物またはその塩は本発明の受容体アンタゴニストである。

【 0 1 0 4 】

前述したように、本発明のリガンドは、抗原またはコンカナバリン A 刺激したラットマスト細胞に対するヒスタミン遊離活性、ラットマスト細胞に対して神経成長因子(N G F) と共働的(synergistic) に作用してヒスタミンを放出させる活性、ヒト T 細胞に対する増殖調節活性、N G F の示す P C 1 2 細胞に対する分化誘導能の増強活性、血液凝固阻害活性、血小板凝集反応阻害活性などを有する。

40

従って、本発明の受容体アゴニストは、本発明のリガンドが有する生理活性(例、神経成長因子に対する活性増強作用など)と同様の作用を有しており、安全で低毒性な医薬、例えば、神経成長因子活性増強剤、神経変性疾患(例、アルツハイマー病、パーキンソン病、ダウン症、筋萎縮性側索硬化症、プリオン病、クロイツフェルト - ヤコブ病、ハンチントン舞蹈病、糖尿病性ニューロパチー、多発性硬化症など)などの予防・治療剤として有用である。

本発明の受容体アンタゴニストは、本発明のリガンドが有する生理活性(例、ヒスタミン遊離作用など)を抑制することができるので、安全で低毒性な医薬、例えば、ヒスタミン遊離抑制剤や、免疫疾患(例、炎症性疾患(例、下垂体膿瘍、甲状腺炎、腹膜炎、クロー

50

ン病、潰瘍性大腸炎、結節性紅斑、慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーデスなど)、アレルギー、喘息、滲出性中耳炎、メニエール病、アレルギー性結膜炎、接触皮膚炎、アレルギー性鼻炎、アナフィラキシー、蕁麻疹、重症筋無力症、糸球体腎炎、シェーグレン症候群、インスリン抵抗性糖尿病、アトピー性皮膚炎、白血球異常など)、浮腫、胃酸過多などの予防・治療剤などとして有用である。

本発明の受容体と本発明のリガンドとの結合力を促進する化合物は、安全で低毒性な医薬、例えば、神経成長因子活性増強剤、神経変性疾患(例、アルツハイマー病、パーキンソン病、ダウン症、筋萎縮性側索硬化症、プリオン病、クロイツフェルト-ヤコブ病、ハンチントン舞踏病、糖尿病性ニューロパチー、多発性硬化症など)などの予防・治療剤として有用である。

10

本発明の受容体と本発明のリガンドとの結合力を阻害する化合物は、安全で低毒性な医薬、例えば、ヒスタミン遊離抑制剤や、免疫疾患〔例、炎症性疾患(例、下垂体腫瘍、甲状腺炎、腹膜炎、クローン病、潰瘍性大腸炎、結節性紅斑、慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーデスなど)、アレルギー、喘息、滲出性中耳炎、メニエール病、アレルギー性結膜炎、接触皮膚炎、アレルギー性鼻炎、アナフィラキシー、蕁麻疹、重症筋無力症、糸球体腎炎、シェーグレン症候群、インスリン抵抗性糖尿病、アトピー性皮膚炎、白血球異常など)、浮腫、胃酸過多などの予防・治療剤などとして有用である。

【0105】

また、本発明は、本発明の受容体をコードする本発明のポリヌクレオチドを用いることを特徴とする本発明の受容体の遺伝子の発現を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法なども提供する。

20

具体的には、(i)本発明の受容体を産生する能力を有する細胞を培養した場合と(ii)本発明の受容体を産生する能力を有する細胞と試験化合物の混合物を培養した場合との比較を行い、本発明の受容体の遺伝子の発現を促進または阻害する化合物またはその塩をスクリーニングする。

上記スクリーニング方法においては、例えば、(i)と(ii)の場合における、本発明の受容体の遺伝子の発現量(具体的には、本発明の受容体量または本発明の受容体をコードするmRNA量など)を測定して、比較する。

試験化合物としては、例えば、ペプチド、蛋白質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液などが挙げられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

30

上記のスクリーニング方法を実施するには、本発明ポリペプチドまたは本発明の受容体を産生する能力を有する細胞をスクリーニングに適したバッファーに浮遊して調製する。バッファーには、pH約4~10(望ましくは、pH約6~8)のリン酸バッファー、ほう酸バッファーなどの、本発明の受容体の活性を阻害しないバッファーであればいずれでもよい。

本発明の受容体を産生する能力を有する細胞としては、例えば、前述した本発明の受容体をコードするDNAを含有するベクターで形質転換された宿主(形質転換体)などが用いられる。宿主としては、例えば、CHO細胞などの動物細胞が好ましく用いられる。該スクリーニングには、例えば、前述の方法で培養することによって、本発明の受容体を細胞膜上に発現させた形質転換体などが好ましく用いられる。

40

本発明の受容体の蛋白質量の測定は、公知の方法、例えば、本発明の抗体を用いて、細胞抽出液中などに存在する前記ポリペプチドまたは受容体を、ウェスタン解析、ELISA法などの方法またはそれに準じる方法に従い測定することができる。

本発明の受容体の遺伝子の発現量は、公知の方法、例えば、ノーザンブロッティングやReverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR)、リアルタイムPCR解析システム(ABI社製、TaqMan polymerase chain reaction)などの方法あるいはそれに準じる方法にしたがって測定することができる。

例えば、上記(ii)の場合における本発明の受容体の遺伝子の発現を、上記(i)の場合に比べて、約20%以上、好ましくは30%以上、より好ましくは約50%以上促進する

50

試験化合物を本発明の受容体の遺伝子の発現を促進する化合物またはその塩として選択することができる。

例えば、上記(ii)の場合における本発明の受容体の遺伝子の発現を、上記(i)の場合に比べて、約20%以上、好ましくは30%以上、より好ましくは約50%以上阻害する試験化合物を本発明の受容体の遺伝子の発現を阻害する化合物またはその塩として選択することができる。

本発明の受容体の遺伝子の発現を促進(発現量を増加)する化合物またはその塩は、本発明の受容体と同様に、例えば、神経成長因子活性増強剤、神経変性疾患(例、アルツハイマー病、パーキンソン病、ダウン症、筋萎縮性側索硬化症、プリオン病、クロイツフェルト-ヤコブ病、ハンチントン舞踏病、糖尿病性ニューロパチー、多発性硬化症など)などの安全で低毒性な予防・治療剤などの医薬として使用できる。

本発明の受容体の遺伝子の発現を阻害する化合物またはその塩は、本発明の受容体に対する本発明のリガンドが有する生理活性を抑制することができるので、例えば、ヒスタミン遊離抑制剤や、免疫疾患〔例、炎症性疾患(例、下垂体膿瘍、甲状腺炎、腹膜炎、クローン病、潰瘍性大腸炎、結節性紅斑、慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーデスなど)、アレルギー、喘息、滲出性中耳炎、メニエール病、アレルギー性結膜炎、接触皮膚炎、アレルギー性鼻炎、アナフィラキシー、蕁麻疹、重症筋無力症、糸球体腎炎、シェーグレン症候群、インスリン抵抗性糖尿病、アトピー性皮膚炎、白血球異常など)、浮腫、胃酸過多などの低毒性で安全な予防・治療剤として有用である。

【0106】

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩は、例えば、ペプチド、蛋白、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液、血漿などから選ばれた化合物であり、本発明の受容体と本発明のリガンドとの結合性を変化させる化合物、本発明の受容体の活性または機能を促進または阻害する化合物、本発明の受容体の遺伝子の発現を促進または阻害(発現量を増加または減少)する化合物などである。

該化合物の塩としては、前記した本発明の受容体の塩と同様のものが用いられる。

【0107】

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩を上記の医薬(予防・治療剤など)として使用する場合、常套手段に従って実施することができる。

該化合物またはその塩は、例えば、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、該化合物またはその塩を生理学的に認められる担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般に認められた製剤実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な用量が得られるようにするものである。

錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えば、ゼラチン、コーンスターチ、トラガント、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸などのような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのような香味剤などが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、前記タイプの材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などのような天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施に従って処方することができる。

注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液(例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなど)などがあげられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール(例えば、エタノールなど)、ポリアルコール

10

20

30

40

50

(例えば、プロピレングリコール、ポリエチレングリコールなど)、非イオン性界面活性剤(例えば、ポリソルベート80TM、HCO-50など)などと併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油などがあげられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。また、該化合物またはその塩を、緩衝剤(例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液など)、無痛化剤(例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど)、安定剤(例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど)、保存剤(例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど)、酸化防止剤などと配合してもよい。調製された注射液は、通常、適当なアンプルに充填される。このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトまたは温血動物(例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、トリ、ネコ、イヌ、サル、チンパンジーなど)に対して投与することができる。

10

【0108】

該化合物またはその塩の投与量は、その作用、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はある。

例えば、アレルギー患者(体重60kg当たり)に、一日につき該化合物を約0.1~100mg、好ましくは約1.0~50mg、より好ましくは約1.0~20mg経口投与する。非経口的に投与する場合、例えば、該化合物を注射剤の形でアレルギー患者(60kg当たり)に投与する場合、一日につき該化合物を約0.01~30mg程度、好ましくは約0.1~20mg程度、より好ましくは約0.1~10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kg当たりに換算した量を投与することができる。

20

【0109】

〔2〕本発明の受容体が関与する各種疾病の予防・治療剤

本発明の受容体は、前述したような活性を有する本発明のリガンドへの結合活性などを有する。

従って本発明の受容体または本発明のポリヌクレオチド(例、DNA)に異常があったり、欠損している場合には、例えば、神経変性疾患(例、アルツハイマー病、パーキンソン病、ダウン症、筋萎縮性側索硬化症、プリオン病、クロイツフェルト-ヤコブ病、ハンチントン舞蹈病、糖尿病性ニューロパチー、多発性硬化症など)などとなる可能性が高い。従って、本発明の受容体または本発明のポリヌクレオチド(例、DNA)は、例えば、神経変性疾患(例、アルツハイマー病、パーキンソン病、ダウン症、筋萎縮性側索硬化症、プリオン病、クロイツフェルト-ヤコブ病、ハンチントン舞蹈病、糖尿病性ニューロパチー、多発性硬化症など)などの予防・治療剤などの低毒性で安全は医薬として使用することができる。

30

本発明の受容体または本発明のポリヌクレオチドは、例えば、生体内において本発明の受容体が減少あるいは欠損している患者がいる場合に、(イ)本発明のポリヌクレオチドを該患者に投与し、生体内で本発明の受容体を発現させることによって、(ロ)細胞に本発明のポリヌクレオチドを挿入し、本発明の受容体を発現させた後に、該細胞を患者に移植することによって、または(ハ)本発明の受容体を該患者に投与することなどによって、該患者における本発明の受容体の役割を十分に、あるいは正常に発揮させることができる。本発明のポリヌクレオチドを上記の予防・治療剤として使用する場合は、該ポリヌクレオチドを単独あるいはレトロウィルスベクター、アデノウィルスベクター、アデノウィルスアソシエートドウィルスベクターなどの適当なベクターに挿入した後、常套手段に従って、ヒトまたは温血動物に投与することができる。本発明のポリヌクレオチドは、そのまま、あるいは摂取促進のための補助剤などの生理学的に認められる担体とともに製剤化し、遺伝子銃やハイドロゲルカテーテルのようなカテーテルによって投与できる。

40

本発明の受容体を上記の予防・治療剤として使用する場合は、少なくとも90%、好ましくは95%以上、より好ましくは98%以上、さらに好ましくは99%以上に精製されたものを使用するのが好ましい。

【0110】

50

本発明の受容体は、例えば、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、または水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、本発明の受容体を生理学的に認められる担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などととも一般に認められた製剤実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な用量が得られるようにするものである。

錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えば、ゼラチン、コーンスターチ、トラガント、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸などのような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのような香味剤などが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、前記タイプの材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などのような天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施に従って処方することができる。

注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなど）などがあげられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール（例えば、エタノールなど）、ポリアルコール（例えば、プロピレングリコール、ポリエチレングリコールなど）、非イオン性界面活性剤（例えば、ポリソルベート 80TM、HCO-50など）などと併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油などがあげられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。また、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液など）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど）、保存剤（例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど）、酸化防止剤などと配合してもよい。調製された注射液は、通常、適当なアンプルに充填される。

本発明のポリヌクレオチド（例、DNA）が挿入されたベクターも上記と同様に製剤化され、通常、非経口的に使用される。

【0111】

このようにして得られる製剤は、安全で低毒性であるので、例えば、ヒトまたは温血動物（例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、トリ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サル、など）に対して投与することができる。

本発明の受容体の投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、アルツハイマー病の治療目的で本発明の受容体を経口投与する場合、一般的に成人（60kgとして）においては、一日につき該ポリペプチドを約0.1~100mg、好ましくは約1.0~50mg、より好ましくは約1.0~20mg投与する。非経口的に投与する場合は、該受容体の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、アルツハイマー病の治療目的で本発明の受容体を注射剤の形で成人（体重60kgとして）に投与する場合、一日につき該ポリペプチドまたは該受容体を約0.01~300mg程度、好ましくは約0.1~200mg程度、より好ましくは約0.1~100mg程度を患部に注射することにより投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kg当たり換算した量を投与することができる。

【0112】

〔3〕本発明の受容体の定量

本発明の受容体に対する抗体（以下、本発明の抗体と略記する場合がある）は、本発明の受容体を特異的に認識することができるので、被検液中の本発明の受容体の定量、特にサンドイッチ免疫測定法による定量などに使用することができる。

すなわち、本発明は、

(i) 本発明の抗体と、被検液および標識化された本発明の受容体とを競合的に反応させ

10

20

30

40

50

、該抗体に結合した標識化された本発明の受容体の割合を測定することを特徴とする被検液中の本発明の受容体の定量法、および

(ii) 被検液と担体上に不溶化した本発明の抗体および標識化された本発明の別の抗体とを同時あるいは連続的に反応させたのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することを特徴とする被検液中の本発明の受容体の定量法を提供する。

上記(ii)の定量法においては、一方の抗体が本発明の受容体のN端部を認識する抗体で、他方の抗体が本発明の受容体のC端部に反応する抗体であることが望ましい。

また、本発明の受容体に対するモノクローナル抗体を用いて本発明の受容体の定量を行うことができるほか、組織染色等による検出を行なうこともできる。これらの目的には、抗体分子そのものを用いてもよく、また、抗体分子のF(ab')₂、Fab'、あるいはFab画分を用いてもよい。

本発明の抗体を用いる本発明の受容体の定量法は、特に制限されるべきものではなく、被測定液中の抗原量(例えば、ポリペプチド量)に対応した抗体、抗原もしくは抗体-抗原複合体の量を化学的または物理的手段により検出し、これを既知量の抗原を含む標準液を用いて作製した標準曲線より算出する測定法であれば、いずれの測定法を用いてもよい。例えば、ネフロメトリー、競合法、イムノメトリック法およびサンドイッチ法が好適に用いられるが、感度、特異性の点で、後述するサンドイッチ法を用いるのが特に好ましい。

【0113】

標識物質を用いる測定法に用いられる標識剤としては、例えば、放射性同位元素、酵素、蛍光物質、発光物質などが用いられる。放射性同位元素としては、例えば、[¹²⁵I]、[¹³¹I]、[³H]、[¹⁴C]などが用いられる。上記酵素としては、安定で比活性の大きなものが好ましく、例えば、 α -ガラクトシダーゼ、 β -グルコシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、パーオキシダーゼ、リンゴ酸脱水素酵素などが用いられる。蛍光物質としては、例えば、フルオレスカミン、フルオレッセンイソチオシアネートなどが用いられる。発光物質としては、例えば、ルミノール、ルミノール誘導体、ルシフェリン、ルシゲニンなどが用いられる。さらに、抗体あるいは抗原と標識剤との結合にビオチン-アビジン系を用いることもできる。

抗原あるいは抗体の不溶化に当っては、物理吸着を用いてもよく、また通常ポリペプチドあるいは酵素等を不溶化、固定化するのに用いられる化学結合を用いる方法でもよい。担体としては、アガロース、デキストラン、セルロースなどの不溶性多糖類、ポリスチレン、ポリアクリルアミド、シリコン等の合成樹脂、あるいはガラス等があげられる。

サンドイッチ法においては不溶化した本発明のモノクローナル抗体に被検液を反応させ(1次反応)、さらに標識化した別の本発明のモノクローナル抗体を反応させ(2次反応)たのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することにより被検液中の受容体量を定量することができる。1次反応と2次反応は逆の順序に行っても、また、同時に行なってもよいし時間をずらして行なってもよい。標識化剤および不溶化の方法は前記のそれらに準じることができる。また、サンドイッチ法による免疫測定法において、固相用抗体あるいは標識用抗体に用いられる抗体は必ずしも1種類である必要はなく、測定感度を向上させる等の目的で2種類以上の抗体の混合物を用いてもよい。

【0114】

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

本発明のモノクローナル抗体をサンドイッチ法以外の測定システム、例えば、競合法、イムノメトリック法あるいはネフロメトリーなどに用いることができる。

競合法では、被検液中の抗原と標識抗原とを抗体に対して競合的に反応させたのち、未反

10

20

30

40

50

応の標識抗原（F）と、抗体と結合した標識抗原（B）とを分離し（B/F分離）、B、Fいずれかの標識量を測定し、被検液中の抗原量を定量する。本反応法には、抗体として可溶性抗体を用い、B/F分離をポリエチレングリコール、前記抗体に対する第2抗体などを用いる液相法、および、第1抗体として固相化抗体を用いるか、あるいは、第1抗体は可溶性のものを用い第2抗体として固相化抗体を用いる固相化法とが用いられる。

イムノメトリック法では、被検液中の抗原と固相化抗原とを一定量の標識化抗体に対して競合反応させた後固相と液相を分離するか、あるいは、被検液中の抗原と過剰量の標識化抗体とを反応させ、次に固相化抗原を加え未反応の標識化抗体を固相に結合させたのち、固相と液相を分離する。次に、いずれかの相の標識量を測定し被検液中の抗原量を定量する。

10

また、ネフロメトリーでは、ゲル内あるいは溶液中で抗原抗体反応の結果生じた不溶性の沈降物の量を測定する。被検液中の抗原量が僅かであり、少量の沈降物しか得られない場合にもレーザーの散乱を利用するレーザーネフロメトリーなどが好適に用いられる。

これら個々の免疫学的測定法を本発明の定量方法に適用するにあたっては、特別の条件、操作等の設定は必要とされない。それぞれの方法における通常の方法、操作法に当業者の通常の方法を加えて本発明の受容体の測定系を構築すればよい。これらの一般的な技術手段の詳細については、総説、成書などを参照することができる。

例えば、入江 寛編「ラジオイムノアッセイ」（講談社、昭和49年発行）、入江 寛編「続ラジオイムノアッセイ」（講談社、昭和54年発行）、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」（医学書院、昭和53年発行）、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」（第2版）（医学書院、昭和57年発行）、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」（第3版）（医学書院、昭和62年発行）、「Methods in ENZYMOLOGY」Vol. 70(Immunochemical Techniques(Part A))、同書 Vol. 73(Immunochemical Techniques(Part B))、同書 Vol. 74(Immunochemical Techniques(Part C))、同書 Vol. 84(Immunochemical Techniques(Part D : Selected Immunoassays))、同書 Vol. 92(Immunochemical Techniques(Part E : Monoclonal Antibodies and General Immunoassay Methods))、同書 Vol. 121(Immunochemical Techniques(Part I : Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies))（以上、アカデミックプレス社発行）などを参照することができる。

20

以上のようにして、本発明の抗体を用いることによって、本発明の受容体を感度良く定量することができる。

30

【0115】

さらには、本発明の抗体を用いて本発明の受容体の濃度を定量することによって、本発明の受容体の濃度の増加が検出された場合、例えば、免疫疾患〔例、炎症性疾患（例、下垂体腫瘍、甲状腺炎、腹膜炎、クローン病、潰瘍性大腸炎、結節性紅斑、慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーデスなど）、アレルギー、喘息、滲出性中耳炎、メニエール病、アレルギー性結膜炎、接触皮膚炎、アレルギー性鼻炎、アナフィラキシー、蕁麻疹、重症筋無力症、糸球体腎炎、シェーグレン症候群、インスリン抵抗性糖尿病、アトピー性皮膚炎、白血球異常など）、浮腫、胃酸過多などの疾病である、または将来罹患する可能性が高いと診断することができる。また、本発明の受容体の濃度の減少が検出された場合には、例えば、神経変性疾患（例、アルツハイマー病、パーキンソン病、ダウン症、筋萎縮性側索硬化症、プリオン病、クロイツフェルト-ヤコブ病、ハンチントン舞踏病、糖尿病性ニューロパチー、多発性硬化症など）などの疾病である、または将来罹患する可能性が高いと診断することができる。

40

また、本発明の抗体は、体液や組織などの被検体中に存在する本発明の受容体を検出するために使用することができる。また、本発明の受容体を精製するために使用する抗体カラムの作製、精製時の各分画中の本発明の受容体の検出、被検細胞内における本発明の受容体の挙動の分析などのために使用することができる。

【0116】

〔4〕遺伝子診断薬

本発明のポリヌクレオチド（DNA）は、例えば、プローブとして使用することにより、

50

ヒトや温血動物（例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、トリ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サル、など）における本発明の受容体をコードするDNAまたはmRNAの異常（遺伝子異常）を検出することができるので、例えば、該DNAまたはmRNAの損傷、突然変異あるいは発現低下や、該DNAまたはmRNAの増加あるいは発現過多などの遺伝子診断薬として有用である。

本発明のDNAを用いる上記の遺伝子診断は、例えば、公知のノーザンハイブリダイゼーションやPCR-SSCP法（ゲノミクス（Genomics），第5巻，874～879頁（1989年）、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ユーエスエー（Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America），第86巻，2766～2770頁（1989年））などにより実施することができる。例えば、本発明の受容体の遺伝子の発現過多が検出された場合は、例えば、免疫疾患〔例、炎症性疾患（例、下垂体腫瘍、甲状腺炎、腹膜炎、クローン病、潰瘍性大腸炎、結節性紅斑、慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーデスなど）、アレルギー、喘息、滲出性中耳炎、メニエール病、アレルギー性結膜炎、接触皮膚炎、アレルギー性鼻炎、アナフィラキシー、蕁麻疹、重症筋無力症、糸球体腎炎、シェーグレン症候群、インスリン抵抗性糖尿病、アトピー性皮膚炎、白血球異常など）、浮腫、胃酸過多などの疾病である、または将来罹患する可能性が高いと診断することができる。また、本発明の受容体の遺伝子の発現減少が検出された場合は、例えば、神経変性疾患（例、アルツハイマー病、パーキンソン病、ダウン症、筋萎縮性側索硬化症、プリオン病、クロイツフェルト-ヤコブ病、ハンチントン舞蹈病、糖尿病性ニューロパチー、多発性硬化症など）などの疾病である、または将来罹患する可能性が高いと診断することができる。

【0117】

〔5〕アンチセンスポリヌクレオチド（例、DNA）を含有する医薬

本発明のポリヌクレオチド（例、DNA）に相補的に結合し、該ポリヌクレオチド（例、DNA）の発現を抑制することができるアンチセンスポリヌクレオチド（例、アンチセンスDNA）は、例えば、免疫疾患〔例、炎症性疾患（例、下垂体腫瘍、甲状腺炎、腹膜炎、クローン病、潰瘍性大腸炎、結節性紅斑、慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーデスなど）、アレルギー、喘息、滲出性中耳炎、メニエール病、アレルギー性結膜炎、接触皮膚炎、アレルギー性鼻炎、アナフィラキシー、蕁麻疹、重症筋無力症、糸球体腎炎、シェーグレン症候群、インスリン抵抗性糖尿病、アトピー性皮膚炎、白血球異常など）、浮腫、胃酸過多などの予防・治療剤などの低毒性で安全な医薬として有用である。

例えば、上記アンチセンスDNAを用いる場合、該アンチセンスDNAを単独あるいはレトロウィルスベクター、アデノウィルスベクター、アデノウィルスアソシエートドウィルスベクターなどの適当なベクターに挿入した後、常套手段に従って実施することができる。該アンチセンスDNAは、そのまま、あるいは摂取促進のために補助剤などの生理学的に認められる担体とともに製剤化し、遺伝子銃やハイドロゲルカテーテルのようなカテーテルによって投与できる。

さらに、該アンチセンスDNAは、組織や細胞における本発明のDNAの存在やその発現状況を調べるための診断用オリゴヌクレオチドプローブとして使用することもできる。

【0118】

上記アンチセンスポリヌクレオチドと同様に、本発明の受容体をコードするRNAの一部を含有する二重鎖RNA、本発明の受容体をコードするRNAの一部を含有するリボザイムなども、本発明のポリヌクレオチドの発現を抑制することができ、生体内における本発明の受容体または本発明のポリヌクレオチドの機能を抑制することができるので、例えば、免疫疾患〔例、炎症性疾患（例、下垂体腫瘍、甲状腺炎、腹膜炎、クローン病、潰瘍性大腸炎、結節性紅斑、慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーデスなど）、アレルギー、喘息、滲出性中耳炎、メニエール病、アレルギー性結膜炎、接触皮膚炎、アレルギー性鼻炎、アナフィラキシー、蕁麻疹、重症筋無力症、糸球体腎炎、シェーグレン症候群、インスリン抵抗性糖尿病、アトピー性皮膚炎、白血球異常など）、浮腫、胃酸過多などの予防・治療剤などの低毒性で安全な医薬として有用である。

二重鎖RNAは、公知の方法（例、Nature, 411巻, 494頁, 2001年）に準じて、本発明のポリヌクレオチドの配列を基に設計して製造することができる。

リボザイムは、公知の方法（例、TRENDS in Molecular Medicine, 7巻, 221頁, 2001年）に準じて、本発明のポリヌクレオチドの配列を基に設計して製造することができる。例えば、本発明の受容体をコードするRNAの一部に公知のリボザイムを連結することによって製造することができる。本発明の本発明の受容体をコードするRNAの一部としては、公知のリボザイムによって切断され得る本発明のRNA上の切断部位に近接した部分（RNA断片）が挙げられる。

上記の二重鎖RNAまたはリボザイムを上記予防・治療剤として使用する場合、アンチセンスポリヌクレオチドと同様にして製剤化し、投与することができる。

【0119】

〔6〕本発明の抗体を含有する医薬

本発明の受容体の抗体は、例えば、免疫疾患〔例、炎症性疾患（例、下垂体腫瘍、甲状腺炎、腹膜炎、クローン病、潰瘍性大腸炎、結節性紅斑、慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーデスなど）、アレルギー、喘息、滲出性中耳炎、メニエール病、アレルギー性結膜炎、接触皮膚炎、アレルギー性鼻炎、アナフィラキシー、蕁麻疹、重症筋無力症、糸球体腎炎、シェーグレン症候群、インスリン抵抗性糖尿病、アトピー性皮膚炎、白血球異常など）、浮腫、胃酸過多などの予防・治療剤などの低毒性で安全な医薬として有用である。本発明の受容体を中和する作用を有する（シグナル伝達を不活性化する）本発明の抗体は、例えば、免疫疾患〔例、炎症性疾患（例、下垂体腫瘍、甲状腺炎、腹膜炎、クローン病、潰瘍性大腸炎、結節性紅斑、慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーデスなど）、アレルギー、喘息、滲出性中耳炎、メニエール病、アレルギー性結膜炎、接触皮膚炎、アレルギー性鼻炎、アナフィラキシー、蕁麻疹、重症筋無力症、糸球体腎炎、シェーグレン症候群、インスリン抵抗性糖尿病、アトピー性皮膚炎、白血球異常など）、浮腫、胃酸過多などの予防・治療剤などの低毒性で安全な医薬として有用である。本発明の受容体のシグナル伝達を活性化する本発明の抗体は、例えば、神経変性疾患（例、アルツハイマー病、パーキンソン病、ダウン症、筋萎縮性側索硬化症、プリオン病、クロイツフェルト-ヤコブ病、ハンチントン舞蹈病、糖尿病性ニューロパチー、多発性硬化症など）などの安全で低毒性な予防・治療剤などの医薬として使用できる。

【0120】

本発明の抗体を含有する上記医薬は、そのまま液剤として、または適当な剤型の医薬組成物として、ヒトや温血動物（例、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して経口的または非経口的に投与することができる。投与量は、投与対象、対象疾患、症状、投与ルートなどによっても異なるが、例えば、成人のアトピー性皮膚炎の患者の治療・予防のために使用する場合には、本発明の抗体を1回量として、通常0.01~20mg/kg体重程度、好ましくは0.1~10mg/kg体重程度、さらに好ましくは0.1~5mg/kg体重程度を、1日1~5回程度、好ましくは1日1~3回程度、静脈注射により投与するのが好都合である。他の非経口投与および経口投与の場合もこれに準ずる量を投与することができる。症状が特に重い場合には、その症状に応じて増量してもよい。

本発明の抗体は、それ自体または適当な医薬組成物として投与することができる。上記投与に用いられる医薬組成物は、上記またはその塩と薬理的に許容され得る担体、希釈剤もしくは賦形剤とを含むものである。かかる組成物は、経口または非経口投与に適する剤形として提供される。

すなわち、例えば、経口投与のための組成物としては、固体または液体の剤形、具体的には錠剤（糖衣錠、フィルムコーティング錠を含む）、丸剤、顆粒剤、散剤、カプセル剤（ソフトカプセル剤を含む）、シロップ剤、乳剤、懸濁剤などがあげられる。かかる組成物は公知の方法によって製造され、製剤分野において通常用いられる担体、希釈剤もしくは賦形剤を含有するものである。例えば、錠剤用の担体、賦形剤としては、乳糖、でんぷん、蔗糖、ステアリン酸マグネシウムなどが用いられる。

【 0 1 2 1 】

非経口投与のための組成物としては、例えば、注射剤、坐剤などが用いられ、注射剤は静脈注射剤、皮下注射剤、皮内注射剤、筋肉注射剤、点滴注射剤などの剤形を包含する。かかる注射剤は、公知の方法に従って、例えば、上記抗体またはその塩を通常注射剤に用いられる無菌の水性もしくは油性液に溶解、懸濁または乳化することによって調製する。注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液などが用いられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール（例、エタノール）、ポリアルコール（例、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン界面活性剤〔例、ポリソルベート 80、HCO-50 (polyoxyethylene (50 mol) adduct of hydrogenated castor oil)〕などと併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油

10

などが用いられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどを併用してもよい。調製された注射液は、通常、適当なアンプルに充填される。直腸投与に用いられる坐剤は、上記抗体またはその塩を通常の坐薬用基剤に混合することによって調製される。

上記の経口用または非経口用医薬組成物は、活性成分の投与量に適合するような投薬単位の剤形に調製されることが好都合である。かかる投薬単位の剤形としては、錠剤、丸剤、カプセル剤、注射剤（アンプル）、坐剤などが例示され、それぞれの投薬単位剤形当たり通常 5 ~ 500 mg、とりわけ注射剤では 5 ~ 100 mg、その他の剤形では 10 ~ 250 mg の上記抗体が含有されていることが好ましい。

20

なお前記した各組成物は、上記抗体との配合により好ましくない相互作用を生じない限り他の活性成分を含有してもよい。

【 0 1 2 2 】

〔 7 〕 DNA 転移動物

本発明は、外来性の本発明の受容体をコードする DNA（以下、本発明の外来性 DNA と略記する）またはその変異 DNA（本発明の外来性変異 DNA と略記する場合がある）を有する非ヒト哺乳動物を提供する。

すなわち、本発明は、

- (1) 本発明の外来性 DNA またはその変異 DNA を有する非ヒト哺乳動物、
- (2) 非ヒト哺乳動物がゲッ歯動物である上記 (1) 記載の動物、
- (3) ゲッ歯動物がマウスまたはラットである上記 (2) 記載の動物、および
- (4) 本発明の外来性 DNA またはその変異 DNA を含有し、哺乳動物において発現しうる組換えベクターなどを提供する。

30

本発明の外来性 DNA またはその変異 DNA を有する非ヒト哺乳動物（以下、本発明の DNA 転移動物と略記する）は、未受精卵、受精卵、精子およびその始原細胞を含む胚芽細胞などに対して、好ましくは、非ヒト哺乳動物の発生における胚発生の段階（さらに好ましくは、単細胞または受精卵細胞の段階でかつ一般に 8 細胞期以前）に、リン酸カルシウム法、電気パルス法、リポフェクション法、凝集法、マイクロインジェクション法、パーティクルガン法、DEAE-デキストラン法などにより目的とする DNA を転移することによって作出することができる。また、該 DNA 転移方法により、体細胞、生体の臓器、組織細胞などに目的とする本発明の外来性 DNA を転移し、細胞培養、組織培養などに利用することもでき、さらに、これら細胞を上述の胚芽細胞と公知の細胞融合法により融合させることにより本発明の DNA 転移動物を作成することもできる。

40

非ヒト哺乳動物としては、例えば、ウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、マウス、ラットなどが用いられる。なかでも、病体動物モデル系の作成の面から個体発生および生物サイクルが比較的短く、また、繁殖が容易なゲッ歯動物、とりわけマウス（例えば、純系として、C57BL/6 系統、DBA2 系統など、交雑系として、B6C3F₁ 系統、BDF₁ 系統、B6D2F₁ 系統、BALB/c 系統、ICR 系統など）またはラット（例えば、Wistar、SD など）などが好ましい。

哺乳動物において発現しうる組換えベクターにおける「哺乳動物」としては、上記の非ヒト哺乳動物の他にヒトなどがあげられる。

50

【 0 1 2 3 】

本発明の外來性DNAとは、非ヒト哺乳動物が本来有している本発明のDNAではなく、いったん哺乳動物から単離・抽出された本発明のDNAをいう。

本発明の変異DNAとしては、元の本発明のDNAの塩基配列に変異（例えば、突然変異など）が生じたもの、具体的には、塩基の付加、欠損、他の塩基への置換などが生じたDNAなどが用いられ、また、異常DNAも含まれる。

該異常DNAとしては、異常な本発明の受容体を発現させるDNAを意味し、例えば、正常な本発明の受容体の機能を抑制するポリペプチドを発現させるDNAなどが用いられる。

本発明の外來性DNAは、対象とする動物と同種あるいは異種のどちらの哺乳動物由来のものであってもよい。本発明のDNAを対象動物に転移させるにあたっては、該DNAを動物細胞で発現させうるプロモーターの下流に結合したDNAコンストラクトとして用いるのが一般に有利である。例えば、本発明のヒトDNAを転移させる場合、これと相同性が高い本発明のDNAを有する各種哺乳動物（例えば、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスなど）由来のDNAを発現させうる各種プロモーターの下流に、本発明のヒトDNAを結合したDNAコンストラクト（例、ベクターなど）を対象哺乳動物の受精卵、例えば、マウス受精卵へマイクロインジェクションすることによって本発明のDNAを高発現するDNA転移哺乳動物を作出することができる。

10

【 0 1 2 4 】

本発明の受容体の発現ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド、枯草菌由来のプラスミド、酵母由来のプラスミド、ファージなどのバクテリオファージ、モロニー白血病ウイルスなどのレトロウイルス、ワクシニアウイルスまたはバキュロウイルスなどの動物ウイルスなどが用いられる。なかでも、大腸菌由来のプラスミド、枯草菌由来のプラスミドまたは酵母由来のプラスミドなどが好ましく用いられる。

20

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

30

40

上記ベクターは、DNA転移哺乳動物において目的とするメッセンジャーRNAの転写を終結する配列（一般にターミネターと呼ばれる）を有していることが好ましく、例えば、ウィルス由来および各種哺乳動物由来の各DNAの配列を用いることができ、好ましくは、シミアンウイルスのSV40ターミネターなどが用いられる。

【 0 1 2 5 】

50

その他、目的とする外来性DNAをさらに高発現させる目的で各DNAのプライミングシグナル、エンハンサー領域、真核DNAのイントロンの一部などをプロモーター領域の5'上流、プロモーター領域と翻訳領域間あるいは翻訳領域の3'下流に連結することも目的により可能である。

正常な本発明の受容体の翻訳領域は、ヒトまたは各種哺乳動物（例えば、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスなど）由来の肝臓、腎臓、甲状腺細胞、線維芽細胞由来DNAおよび市販の各種ゲノムDNAライブラリーよりゲノムDNAの全てあるいは一部として、または肝臓、腎臓、甲状腺細胞、線維芽細胞由来RNAより公知の方法により調製された相補DNAを原料として取得することが出来る。また、外来性の異常DNAは、上記の細胞または組織より得られた正常なポリペプチドの翻訳領域を点突然変異誘発法により変異した翻訳領域を作製することができる。

10

該翻訳領域は転移動物において発現しうるDNAコンストラクトとして、前記のプロモーターの下流および所望により転写終結部位の上流に連結させる通常のDNA工学的手法により作製することができる。

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

20

本発明の外来性正常DNAを転移させた非ヒト哺乳動物は、交配により外来性DNAを安定に保持することを確認して、該DNA保有動物として通常の飼育環境で継代飼育することが出来る。

受精卵細胞段階における本発明の外来性DNAの転移は、対象哺乳動物の胚芽細胞および体細胞の全てに過剰に存在するように確保される。DNA転移後の作出動物の胚芽細胞において本発明の外来性DNAが過剰に存在することは、作出動物の子孫が全てその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の外来性DNAを過剰に有することを意味する。本発明の外来性DNAを受け継いだこの種の動物の子孫はその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の外来性DNAを過剰に有する。

導入DNAを相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得し、この雌雄の動物を交配することによりすべての子孫が該DNAを過剰に有するように繁殖継代することができる。

30

【0126】

本発明の正常DNAを有する非ヒト哺乳動物は、本発明の正常DNAが高発現させられており、内在性の正常DNAの機能を促進することにより最終的に本発明の受容体の機能亢進症を発症することがあり、その病態モデル動物として利用することができる。例えば、本発明の正常DNA転移動物を用いて、本発明の受容体の機能亢進症や、本発明の受容体に関連する疾患の病態機序の解明およびこれらの疾患の治療方法の検討を行なうことが可能である。

また、本発明の外来性正常DNAを転移させた哺乳動物は、遊離した本発明の受容体の増加症状を有することから、本発明の受容体に関連する疾患〔例、免疫疾患（例、炎症性疾患（例、下垂体膿瘍、甲状腺炎、腹膜炎、クローン病、潰瘍性大腸炎、結節性紅斑、慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーデスなど）、アレルギー、喘息、滲出性中耳炎、メニエール病、アレルギー性結膜炎、接触皮膚炎、アレルギー性鼻炎、アナフィラキシー、蕁麻疹、重症筋無力症、糸球体腎炎、シェーグレン症候群、インスリン抵抗性糖尿病、アトピー性皮膚炎、白血球異常など）、浮腫、胃酸過多など〕に対する予防・治療剤のスクリーニング試験にも利用可能である。

40

一方、本発明の外来性異常DNAを有する非ヒト哺乳動物は、交配により外来性DNAを安定に保持することを確認して該DNA保有動物として通常の飼育環境で継代飼育することが出来る。さらに、目的とする外来DNAを前述のプラスミドに組み込んで原料として

50

用いることができる。プロモーターとのDNAコンストラクトは、通常のDNA工学的手法によって作製することができる。受精卵細胞段階における本発明の異常DNAの転移は、対象哺乳動物の胚芽細胞および体細胞の全てに存在するように確保される。DNA転移後の作出動物の胚芽細胞において本発明の異常DNAが存在することは、作出動物の子孫が全てその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の異常DNAを有することを意味する。本発明の外来性DNAを受け継いだこの種の動物の子孫は、その胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の異常DNAを有する。導入DNAを相同染色体の両方に持つホモザイゴット動物を取得し、この雌雄の動物を交配することによりすべての子孫が該DNAを有するように繁殖継代することができる。

【0127】

本発明の異常DNAを有する非ヒト哺乳動物は、本発明の異常DNAが高発現させられており、内在性の正常DNAの機能を阻害することにより最終的に本発明の受容体の機能不活性型不応症となることがあり、その病態モデル動物として利用することができる。例えば、本発明の異常DNA転移動物を用いて、本発明の受容体の機能不活性型不応症の病態機序の解明およびこの疾患を治療方法の検討を行なうことが可能である。

また、具体的な利用可能性としては、本発明の異常DNA高発現動物は、本発明の受容体の機能不活性型不応症における本発明の異常ポリペプチドまたは本発明の異常受容体による正常ポリペプチドまたは受容体の機能阻害(dominant negative作用)を解明するモデルとなる。

また、本発明の外来異常DNAを転移させた哺乳動物は、遊離した本発明の受容体の増加症状を有することから、本発明の受容体の機能不活性型不応症に対する治療薬スクリーニング試験にも利用可能である。

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

- 1 組織培養のための細胞源としての使用、
- 2 本発明のDNA転移動物の組織中のDNAもしくはRNAを直接分析するか、またはDNAにより発現されたポリペプチドまたは受容体組織を分析することによる、本発明の受容体により特異的に発現あるいは活性化するポリペプチドまたは受容体との関連性についての解析、
- 3 DNAを有する組織の細胞を標準組織培養技術により培養し、これらを使用して、一般に培養困難な組織からの細胞の機能の研究、
- 4 上記3記載の細胞を用いることによる細胞の機能を高めるような薬剤のスクリーニング、および
- 5 本発明の変異ポリペプチドまたは受容体を単離精製およびその抗体作製などが考えられる。

さらに、本発明のDNA転移動物を用いて、本発明の受容体の機能不活性型不応症などを含む、本発明の受容体に関連する疾患〔例、神経変性疾患(例、アルツハイマー病、パーキンソン病、ダウン症、筋萎縮性側索硬化症、プリオン病、クロイツフェルト-ヤコブ病、ハンチントン舞蹈病、糖尿病性ニューロパチー、多発性硬化症など)など〕の臨床症状を調べることができ、また、本発明の受容体に関連する疾患モデルの各臓器におけるより詳細な病理学的所見が得られ、新しい治療方法の開発、さらには、該疾患による二次的疾患の研究および治療に貢献することができる。

また、本発明のDNA転移動物から各臓器を取り出し、細切後、トリプシンなどの蛋白質分解酵素により、遊離したDNA転移細胞の取得、その培養またはその培養細胞の系統化を行なうことが可能である。さらに、本発明の受容体産生細胞の特定化、アポトーシス、分化あるいは増殖との関連性、またはそれらにおけるシグナル伝達機構を調べ、それらの異常を調べることなどができ、本発明の受容体およびその作用解明のための有効な研究材料となる。

さらに、本発明のDNA転移動物を用いて、本発明の受容体の機能不活性型不応症を含む、本発明の受容体に関連する疾患の治療薬の開発を行なうために、上述の検査法および定量法などを用いて、有効で迅速な該疾患治療薬のスクリーニング法を提供することが可能

10

20

30

40

50

となる。また、本発明のDNA転移動物または本発明の外来性DNA発現ベクターを用いて、本発明の受容体が関連する疾患のDNA治療法を検討、開発することが可能である。

【0128】

〔8〕ノックアウト動物

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

すなわち、本発明は、

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

本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞とは、該非ヒト哺乳動物が有する本発明のDNAに人為的に変異を加えることにより、DNAの発現能を抑制するか、あるいは該DNAがコードしている本発明の受容体の活性を実質的に喪失させることにより、DNAが実質的に本発明の受容体の発現能を有さない(以下、本発明のノックアウトDNAと称することがある)非ヒト哺乳動物の胚幹細胞(以下、ES細胞と略記する)をいう。

非ヒト哺乳動物としては、前記と同様のものが用いられる。

本発明のDNAに人為的に変異を加える方法としては、例えば、遺伝子工学的的手法により該DNA配列の一部又は全部の削除、他DNAを挿入または置換させることによつて行なうことができる。これらの変異により、例えば、コドンの読み取り枠をずらしたり、プロモーターあるいはエキソンの機能を破壊することにより本発明のノックアウトDNAを作製すればよい。

【0129】

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

また、相同組換え法等により本発明のDNAを不活化させる元のES細胞としては、例えば、前述のような既に樹立されたものを用いてもよく、また公知 EvansとKaufmaの方法に準じて新しく樹立したものでよい。例えば、マウスのES細胞の場合、現在、一般的には129系のES細胞が使用されているが、免疫学的背景がはっきりしていないので、これに代わる純系で免疫学的に遺伝的背景が明らかなES細胞を取得するなどの目的で例えば、C57BL/6マウスやC57BL/6の採卵数の少なさをDBA/2との交雑により改善したBDF₁マウス(C57BL/6とDBA/2とのF₁)を用いて樹立したのもなども良好に用いる。BDF₁マウスは、採卵数が多く、かつ、卵が丈夫であるという利点に加えて、C57BL/6マウスを背景に持つので、これを用いて得られたES細胞は病態モデルマウスを作出したとき、C57BL/6マウスとバッククロスすることでその遺伝的背景をC57BL/6マウスに代えることが可能である点で有利に用い得る。

10

また、ES細胞を樹立する場合、一般には受精後3.5日目の胚盤胞を使用するが、これ以外に8細胞期胚を採卵し胚盤胞まで培養して用いることにより効率よく多数の初期胚を取得することができる。

また、雌雄いずれのES細胞を用いてもよいが、通常雄のES細胞の方が生殖系列キメラを作出するのに都合が良い。また、煩雑な培養の手間を削減するためにもできるだけ早く雌雄の判別を行なうことが望ましい。

【0130】

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

20

また、第二次セレクションとしては、例えば、G-バンディング法による染色体数の確認等により行うことができる。得られるES細胞の染色体数は正常数の100%が望ましいが、樹立の際の物理的操作等の関係上困難な場合は、ES細胞の遺伝子をノックアウトした後、正常細胞(例えば、マウスでは染色体数が2n=40である細胞)に再びクローニングすることが望ましい。

このようにして得られた胚幹細胞株は、通常その増殖性は大変良いが、個体発生できる能力を失いやすいので、注意深く継代培養することが必要である。例えば、STO繊維芽細胞のような適当なフィーダー細胞上でLIF(1~10000 U/ml)存在下に炭酸ガス培養器内(好ましくは、5%炭酸ガス、95%空気または5%酸素、5%炭酸ガス、90%空気)で約37℃で培養するなどの方法で培養し、継代時には、例えば、トリプシン/EDTA溶液(通常0.001~0.5%トリプシン/0.1~5 mM EDTA、好ましくは約0.1%トリプシン/1 mM EDTA)処理により単細胞化し、新たに用意したフィーダー細胞上に播種する方法などがとられる。このような継代は、通常1~3日毎に行なうが、この際に細胞の観察を行い、形態的に異常な細胞が見受けられた場合はその培養細胞は放棄することが望まれる。

30

ES細胞は、適当な条件により、高密度に至るまで単層培養するか、または細胞集塊を形成するまで浮遊培養することにより、頭頂筋、内臓筋、心筋などの種々のタイプの細胞に分化させることが可能であり〔M. J. Evans及びM. H. Kaufman, ネイチャー(Nature)第292巻、154頁、1981年; G. R. Martin プロシーディングス・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・ユーエスエー(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.)第78巻、7634頁、1981年; T. C. Doetschman ら、ジャーナル・オブ・エンブリオロジー・アンド・エクスペリメンタル・モルフォロジー、第87巻、27頁、1985年〕、本発明のES細胞を分化させて得られる本発明のDNA発現不全細胞は、インビトロにおける本発明の受容体の細胞生物学的検討において有用である。

40

【0131】

本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、該動物のmRNA量を公知方法を用いて測定

50

して間接的にその発現量を比較することにより、正常動物と区別することが可能である。該非ヒト哺乳動物としては、前記と同様のものが用いられる。

本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、例えば、前述のようにして作製したターゲッティングベクターをマウス胚幹細胞またはマウス卵細胞に導入し、導入によりターゲッティングベクターの本発明のDNAが不活性化されたDNA配列が遺伝子相同組換えにより、マウス胚幹細胞またはマウス卵細胞の染色体上の本発明のDNAと入れ換わる相同組換えをさせることにより、本発明のDNAをロックアウトさせることができる。

本発明のDNAがロックアウトされた細胞は、本発明のDNA上またはその近傍のDNA配列をプローブとしたサザンハイブリダイゼーション解析またはターゲッティングベクター上のDNA配列と、ターゲッティングベクターに使用したマウス由来の本発明のDNA以外の近傍領域のDNA配列とをプライマーとしたPCR法による解析で判定することができる。非ヒト哺乳動物胚幹細胞を用いた場合は、遺伝子相同組換えにより、本発明のDNAが不活性化された細胞株をクローニングし、その細胞を適当な時期、例えば、8細胞期の非ヒト哺乳動物胚または胚盤胞に注入し、作製したキメラ胚を偽妊娠させた該非ヒト哺乳動物の子宮に移植する。作出された動物は正常な本発明のDNA座をもつ細胞と人為的に変異した本発明のDNA座をもつ細胞との両者から構成されるキメラ動物である。

該キメラ動物の生殖細胞の一部が変異した本発明のDNA座をもつ場合、このようなキメラ個体と正常個体を交配することにより得られた個体群より、全ての組織が人為的に変異を加えた本発明のDNA座をもつ細胞で構成された個体を、例えば、コートカラーの判定等により選別することにより得られる。このようにして得られた個体は、通常、本発明の受容体のヘテロ発現不全個体であり、本発明の受容体のヘテロ発現不全個体同志を交配し、それらの産仔から本発明の受容体のホモ発現不全個体を得ることができる。

【0132】

卵細胞を使用する場合は、例えば、卵細胞核内にマイクロインジェクション法でDNA溶液を注入することによりターゲッティングベクターを染色体内に導入したトランスジェニック非ヒト哺乳動物を得ることができ、これらのトランスジェニック非ヒト哺乳動物に比べて、遺伝子相同組換えにより本発明のDNA座に変異のあるものを選択することにより得られる。

このようにして本発明のDNAがロックアウトされている個体は、交配により得られた動物個体も該DNAがロックアウトされていることを確認して通常の飼育環境で飼育継代を行なうことができる。

さらに、生殖系列の取得および保持についても常法に従えばよい。すなわち、該不活化DNAの保有する雌雄の動物を交配することにより、該不活化DNAを相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得しうる。得られたホモザイゴート動物は、母親動物に対して、正常個体1，ホモザイゴート複数になるような状態で飼育することにより効率的に得ることができる。ヘテロザイゴート動物の雌雄を交配することにより、該不活化DNAを有するホモザイゴートおよびヘテロザイゴート動物を繁殖継代する。

本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞は、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物を作出する上で、非常に有用である。

また、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、本発明の受容体により誘導され得る種々の生物活性を欠失するため、本発明の受容体の生物活性の不活性化を原因とする疾病のモデルとなり得るので、これらの疾病の原因究明及び治療法の検討に有用である。

【0133】

〔8a〕本発明のDNAの欠損や損傷などに起因する疾病に対して治療・予防効果を有する化合物のスクリーニング方法

本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、本発明のDNAの欠損や損傷などに起因する疾病に対して治療・予防効果を有する化合物のスクリーニングに用いることができる。

すなわち、本発明は、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物に試験化合物を投与し、該動物の変化を観察・測定することを特徴とする、本発明のDNAの欠損や損傷などに起因する疾病、例えば、神経変性疾患（例、アルツハイマー病、パーキンソン病、ダウン症、

10

20

30

40

50

筋萎縮性側索硬化症、プリオン病、クロイツフェルト - ヤコブ病、ハンチントン舞蹈病、糖尿病性ニューロパチー、多発性硬化症など) などに対して治療・予防効果を有する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

該スクリーニング方法において用いられる本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物としては、前記と同様のものがあげられる。

試験化合物としては、例えば、ペプチド、蛋白質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液、血漿などがあげられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

具体的には、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物を、試験化合物で処理し、無処理の対照動物と比較し、該動物の各器官、組織、疾病の症状などの変化を指標として試験化合物の治療・予防効果を試験することができる。

10

試験動物を試験化合物で処理する方法としては、例えば、経口投与、静脈注射などが用いられ、試験動物の症状、試験化合物の性質などにあわせて適宜選択することができる。また、試験化合物の投与量は、投与方法、試験化合物の性質などにあわせて適宜選択することができる。

例えば、神経変性疾患(例、アルツハイマー病、パーキンソン病、ダウン症、筋萎縮性側索硬化症、プリオン病、クロイツフェルト - ヤコブ病、ハンチントン舞蹈病、糖尿病性ニューロパチー、多発性硬化症など) などに対して予防・治療効果を有する化合物をスクリーニングする場合、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物に試験化合物を投与し、該動物の学習能力、学習行動などを経時的に測定する。

20

【0134】

該スクリーニング方法において、試験動物に試験化合物を投与した場合、該試験動物の学習能力が約10%以上、好ましくは約30%以上、より好ましくは約50%以上向上した場合、該試験化合物を神経変性疾患(例、アルツハイマー病、パーキンソン病、ダウン症、筋萎縮性側索硬化症、プリオン病、クロイツフェルト - ヤコブ病、ハンチントン舞蹈病、糖尿病性ニューロパチー、多発性硬化症など) に対して予防・治療効果を有する化合物として選択することができる。

該スクリーニング方法を用いて得られる化合物は、上記した試験化合物から選ばれた化合物であり、本発明の受容体の欠損や損傷などによって引き起こされる疾患、例えば、神経変性疾患(例、アルツハイマー病、パーキンソン病、ダウン症、筋萎縮性側索硬化症、プリオン病、クロイツフェルト - ヤコブ病、ハンチントン舞蹈病、糖尿病性ニューロパチー、多発性硬化症など) などに対して予防・治療効果を有するので、該疾患に対する安全で低毒性な予防・治療剤などの医薬として使用することができる。さらに、上記スクリーニングで得られた化合物から誘導される化合物も同様に用いることができる。

30

該スクリーニング方法で得られた化合物は塩を形成していてもよく、該化合物の塩としては、生理学的に許容される酸(例、無機酸、有機酸など) や塩基(例、アルカリ金属など) などとの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。この様な塩としては、例えば、無機酸(例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸など) との塩、あるいは有機酸(例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンシルホン酸、ベンゼンシルホン酸など) との塩などが用いられる。

40

該スクリーニング方法で得られた化合物またはその塩を含有する医薬は、前記した本発明の受容体を含有する医薬と同様にして製造することができる。

このようにして得られる製剤は、安全で低毒性であるので、例えば、ヒトまたは哺乳動物(例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サルなど) に対して投与することができる。

該化合物またはその塩の投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、該化合物を経口投与する場合、一般的に成人(体重60kgとして) のアルツハイマー病の患者においては、一日につき該化合物を約0.1~100mg、好ましくは約1.0~50mg、より好ましくは約1.0~20mg投与する。非経口的に投与

50

する場合は、該化合物の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、該化合物を注射剤の形で通常成人（60kgとして）のアルツハイマー病の患者に投与する場合、一日につき該化合物を約0.01～30mg程度、好ましくは約0.1～20mg程度、より好ましくは約0.1～10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kg当りに換算した量を投与することができる。

【0135】

〔8b〕本発明のDNAに対するプロモーターの活性を促進または阻害する化合物をスクリーニング方法

本発明は、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物に、試験化合物を投与し、レポーター遺伝子の発現を検出することを特徴とする本発明のDNAに対するプロモーターの活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

上記スクリーニング方法において、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物としては、前記した本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物の中でも、本発明のDNAがレポーター遺伝子を導入することにより不活性化され、該レポーター遺伝子が本発明のDNAに対するプロモーターの制御下で発現しうるものが用いられる。

試験化合物としては、前記と同様のものがあげられる。

レポーター遺伝子としては、前記と同様のものが用いられ、 β -ガラクトシダーゼ遺伝子（lacZ）、可溶性アルカリフォスファターゼ遺伝子またはルシフェラーゼ遺伝子などが好適である。

本発明のDNAをレポーター遺伝子で置換された本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物では、レポーター遺伝子が本発明のDNAに対するプロモーターの支配下に存在するので、レポーター遺伝子がコードする物質の発現をトレースすることにより、プロモーターの活性を検出することができる。

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

上記スクリーニング方法を用いて得られる化合物またはその塩は、上記した試験化合物から選ばれた化合物であり、本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進または阻害する化合物である。

該スクリーニング方法で得られた化合物は塩を形成していてもよく、該化合物の塩としては、生理学的に許容される酸（例、無機酸など）や塩基（例、有機酸など）などとの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。この様な塩としては、例えば、無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸など）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸など）との塩などが用いられる。

【0136】

本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進する化合物またはその塩は、本発明の受容体の発現を促進し、該ポリペプチドまたは本発明の受容体の活性または機能を促進することができるので、例えば、神経変性疾患（例、アルツハイマー病、パーキンソン病、ダウン症、筋萎縮性側索硬化症、プリオン病、クロイツフェルト-ヤコブ病、ハンチントン舞踏病、糖尿病性ニューロパチー、多発性硬化症など）などの予防・治療剤などの低毒性

10

20

30

40

50

で安全な医薬として有用である。また、本発明のDNAに対するプロモーター活性を阻害する化合物またはその塩は、本発明の受容体の発現を阻害し、本発明の受容体の活性または機能を阻害することができるので、例えば、免疫疾患〔例、炎症性疾患（例、下垂体腫瘍、甲状腺炎、腹膜炎、クローン病、潰瘍性大腸炎、結節性紅斑、慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーデスなど）、アレルギー、喘息、滲出性中耳炎、メニエール病、アレルギー性結膜炎、接触皮膚炎、アレルギー性鼻炎、アナフィラキシー、蕁麻疹、重症筋無力症、糸球体腎炎、シェーグレン症候群、インスリン抵抗性糖尿病、アトピー性皮膚炎、白血球異常など）、浮腫、胃酸過多などの予防・治療剤などの低毒性で安全な医薬として有用である。

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

【0137】

該スクリーニング方法で得られた化合物またはその塩を含有する医薬は、前記した本発明のスクリーニング方法で得られる化合物またはその塩を含有する医薬と同様にして製造することができる。

このようにして得られる製剤は、安全で低毒性であるので、例えば、ヒトまたは哺乳動物（例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

該化合物またはその塩の投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進する化合物を経口投与する場合、一般的に成人（体重60kgとして）のアルツハイマー病の患者においては、一日につき該化合物を約0.1~100mg、好ましくは約1.0~50mg、より好ましくは約1.0~20mg投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進する化合物を注射剤の形で通常成人（60kgとして）のアルツハイマー病の患者に投与する場合、一日につき該化合物を約0.01~30mg程度、好ましくは約0.1~20mg程度、より好ましくは約0.1~10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kgあたりに換算した量を投与することができる。

一方、例えば、本発明のDNAに対するプロモーター活性を阻害する化合物を経口投与する場合、一般的に成人（体重60kgとして）のアトピー性皮膚炎の患者においては、一日につき該化合物を約0.1~100mg、好ましくは約1.0~50mg、より好ましくは約1.0~20mg投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、本発明のDNAに対するプロモーター活性を阻害する化合物を注射剤の形で通常成人（60kgとして）のアトピー性皮膚炎の患者に投与する場合、一日につき該化合物を約0.01~30mg程度、好ましくは約0.1~20mg程度、より好ましくは約0.1~10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kgあたりに換算した量を投与することができる。

このように、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、本発明のDNAに対するプロモーターの活性を促進または阻害する化合物またはその塩をスクリーニングする上で極めて有用であり、本発明のDNA発現不全に起因する各種疾患の原因究明または予防・治療薬の開発に大きく貢献することができる。

また、本発明の受容体のプロモーター領域を含有するDNAを使って、その下流に種々の蛋白質をコードする遺伝子を連結し、これを動物の卵細胞に注入していわゆるトランスジェニック動物（遺伝子移入動物）を作成すれば、特異的にそのポリペプチドを合成させ、その生体での作用を検討することも可能となる。さらに上記プロモーター部分に適当なレポーター遺伝子を結合させ、これが発現するような細胞株を樹立すれば、本発明の受容体そのものの体内での産生能力を特異的に促進または阻害（抑制）する作用を持つ低分子化合物の探索系として使用できる。

10

20

30

40

50

【 0 1 3 8 】

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

D N A	: デオキシリボ核酸	
c D N A	: 相補的デオキシリボ核酸	
A	: アデニン	
T	: チミン	
G	: グアニン	10
C	: シトシン	
I	: イノシン	
R	: アデニン (A) またはグアニン (G)	
Y	: チミン (T) またはシトシン (C)	
M	: アデニン (A) またはシトシン (C)	
K	: グアニン (G) またはチミン (T)	
S	: グアニン (G) またはシトシン (C)	
W	: アデニン (A) またはチミン (T)	
B	: グアニン (G)、グアニン (G) またはチミン (T)	
D	: アデニン (A)、グアニン (G) またはチミン (T)	20
V	: アデニン (A)、グアニン (G) またはシトシン (C)	
N	: アデニン (A)、グアニン (G)、シトシン (C) もしくはチミン (T)	
) または不明もしくは他の塩基	
R N A	: リボ核酸	
m R N A	: メッセンジャーリボ核酸	
d A T P	: デオキシアデノシン三リン酸	
d T T P	: デオキシチミジン三リン酸	
d G T P	: デオキシグアノシン三リン酸	
d C T P	: デオキシシチジン三リン酸	
A T P	: アデノシン三リン酸	30
E D T A	: エチレンジアミン四酢酸	
S D S	: ドデシル硫酸ナトリウム	
B H A	: ベンズヒドリルアミン	
p M B H A	: p - メチルベンズヒドリルアミン	
T o s	: p - トルエンスルフォニル	
B z l	: ベンジル	
B o m	: ベンジルオキシメチル	
B o c	: t - ブチルオキシカルボニル	
D C M	: ジクロロメタン	
H O B t	: 1 - ヒドロキシベンズトリアゾール	40
D C C	: N, N' - ジシクロヘキシルカルボジイミド	
T F A	: トリフルオロ酢酸	
D I E A	: ジイソプロピルエチルアミン	
	【 0 1 3 9 】	
G l y 又は G	: グリシン	
A l a 又は A	: アラニン	
V a l 又は V	: バリン	
L e u 又は L	: ロイシン	
I l e 又は I	: イソロイシン	
S e r 又は S	: セリン	50

Th r 又は T	: スレオニン	
C y s 又は C	: システイン	
M e t 又は M	: メチオニン	
G l u 又は E	: グルタミン酸	
A s p 又は D	: アスパラギン酸	
L y s 又は K	: リジン	
A r g 又は R	: アルギニン	
H i s 又は H	: ヒスチジン	
P h e 又は F	: フェニルアラニン	
T y r 又は Y	: チロシン	10
T r p 又は W	: トリプトファン	
P r o 又は P	: プロリン	
A s n 又は N	: アスパラギン	
G l n 又は Q	: グルタミン	
p G l u	: ピログルタミン酸	
T y r (I)	: 3 - ヨードチロシン	
D M F	: N , N - ジメチルホルムアミド	
F m o c	: N - 9 - フルオレニルメトキシカルボニル	
T r t	: トリチル	
P b f	: 2 , 2 , 4 , 6 , 7 - ペンタメチルジヒドロベンゾフラン - 5 - スル	20
ホニル		
C l t	: 2 - クロロトリチル	
B u ^t	: t - ブチル	
M e t (O)	: メチオニンスルフォキシド	

【 0 1 4 0 】

本願明細書の配列表の配列番号は、以下の配列を示す。

〔 配列番号 : 1 〕

ヒト由来 G 蛋白質共役型レセプター蛋白質 G P R 3 4 のアミノ酸配列を示す。

〔 配列番号 : 2 〕

ヒト由来 G 蛋白質共役型レセプター蛋白質 G P R 3 4 をコードする c D N A の塩基配列を示す。

30

〔 配列番号 : 3 〕

以下の実施例 1 (1 - 1) における P C R 反応で使用したプライマー 1 の塩基配列を示す。

〔 配列番号 : 4 〕

以下の実施例 1 (1 - 1) における P C R 反応で使用したプライマー 2 の塩基配列を示す。

〔 配列番号 : 5 〕

以下の実施例 1 (1 - 3) における P C R 反応で使用したプライマー 3 の塩基配列を示す。

40

〔 配列番号 : 6 〕

以下の実施例 1 (1 - 3) における P C R 反応で使用したプライマー 4 の塩基配列を示す。

〔 配列番号 : 7 〕

以下の実施例 1 (1 - 3) における P C R 反応で使用したプローブの塩基配列を示す。 5 ' 末端にリポーター色素として F A M (6-carboxy-fluorescein) を、 3 ' 末端にはクエンチャーとして T A M R A (6-carboxy-tetramethyl-rhodamine) を標識した。

〔 配列番号 : 8 〕

以下の実施例 2 における P C R 反応で使用したプライマー 1 の塩基配列を示す。

〔 配列番号 : 9 〕

50

以下の実施例 2 における P C R 反応で使用したプライマー 2 の塩基配列を示す。

〔配列番号：10〕

ラット由来 G 蛋白質共役型レセプター蛋白質 G P R 3 4 の一部をコードする c D N A 断片の塩基配列を示す。

〔配列番号：11〕

以下の実施例 3 における P C R 反応で使用したプライマー 1 の塩基配列を示す。

〔配列番号：12〕

以下の実施例 3 における P C R 反応で使用したプライマー 2 の塩基配列を示す。

〔配列番号：13〕

ラット由来 G 蛋白質共役型レセプター蛋白質 G P R 3 4 をコードする c D N A の 3 ' 側部分配列の塩基配列を示す。 10

〔配列番号：14〕

以下の実施例 4 における P C R 反応で使用したプライマー 1 の塩基配列を示す。

〔配列番号：15〕

以下の実施例 4 における P C R 反応で使用したプライマー 2 の塩基配列を示す。

〔配列番号：16〕

ラット由来 G 蛋白質共役型レセプター蛋白質 G P R 3 4 をコードする c D N A の 5 ' 側部分配列の塩基配列を示す。

〔配列番号：17〕

以下の実施例 5 における P C R 反応で使用したプライマー 1 の塩基配列を示す。 20

〔配列番号：18〕

以下の実施例 5 における P C R 反応で使用したプライマー 2 の塩基配列を示す。

〔配列番号：19〕

ラット由来 G 蛋白質共役型レセプター蛋白質 G P R 3 4 のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：20〕

ラット由来 G 蛋白質共役型レセプター蛋白質 G P R 3 4 をコードする c D N A の塩基配列を示す。

〔配列番号：21〕

以下の実施例 5 において得られたラット由来 G 蛋白質共役型レセプター蛋白質 G P R 3 4 をコードする c D N A の塩基配列を示す。 30

〔配列番号：22〕

マウス由来 G 蛋白質共役型レセプター蛋白質 G P R 3 4 のアミノ酸配列を示す。(Accession No. AAD50550)

〔配列番号：23〕

マウス由来 G 蛋白質共役型レセプター蛋白質 G P R 3 4 をコードする c D N A の塩基配列を示す。(Accession No. AF081916)

【0141】

後述の実施例 5 で取得された Escherichia coli DH5 -T1/pCR2.1-TOPO-ratGPR34 は、2002 年 4 月 25 日から、日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番地 1 中央第 6 (郵便番号 305-8566) の独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに寄託番号 F E R M B P - 8 0 3 2 とし、2002 年 4 月 16 日から、大阪府大阪市淀川区十三本町 2 丁目 1 7 番 8 5 号 (郵便番号 532-8686) の財団法人 発酵研究所 (I F O) に受託番号 I F O 1 6 7 9 2 としそれぞれ寄託されている。 40

【実施例】

以下に実施例を示して、本発明をより詳細に説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。

実施例 1

(1-1) ヒト由来 G 蛋白質共役型レセプター蛋白質 G P R 3 4 をコードする c D N A のクローニングおよび動物細胞発現ベクターの作製

ヒトゲノム (CLONTECH 社) を鋳型とし、S a l I 認識配列を付加したプライマー 1 (配列 50

番号：3) およびSpeI 認識配列を付加したプライマー2 (配列番号：4) を用いてPCR 反応を行った。該反応における反応液の組成は上記ゲノム100ng を鋳型として使用し、Pfu Turbo DNA Polymerase (STRATAGENE社) 2.5U、プライマー1 (配列番号：3) およびプライマー2 (配列番号：4) を各1.0μM、dNTPs を200μM、および酵素に2XGC BufferI (TaKaRa社) を25μl 加え、50μl の液量とした。PCR 反応は、94・1分の後、94・30秒、54・15秒、72・1.5分のサイクルを38回繰り返した。該PCR 反応産物をPCR Purification Kit (QIAGEN社) にて精製し、同キットに添付のBuffer EB 30μl にて溶出を行い、そのうち10μl を制限酵素SalI およびSpeI で切断した。次に制限酵素反応産物をアガロースゲル電気泳動後、アガロースゲルより切り出し、Gel Extraction Kit (QIAGEN社) を用いて回収した。この反応産物をSalI およびSpeI で切断した動物細胞発現用ベクタープラスミドpAKKO-111H (Biochim. Biophys. Acta, 1219巻、251-259頁、1994年記載のpAKKO1.11H と同一のベクタープラスミド) に加え、DNA Ligation Kit Ver.2 (TaKaRa社) を用いてライゲーション反応を行なった。これを大腸菌TOP10 (Invitrogen社) に導入し、GPR34のcDNAを持つクローンをアンピシリンを含むLB寒天培地中で選択した。個々のクローンの配列を解析した結果、GPR34 (配列番号：1) をコードするcDNAの塩基配列 (配列番号：2) を含むプラスミド (pAKKO-GPR34 と命名) を保持する大腸菌を得た。このpAKKO-GPR34で形質転換した大腸菌TOP10を培養後、Plasmid Miniprep Kit (BIORAD社) を用いてpAKKO-GPR34のプラスミドDNAを調製した。得られたGPR34のアミノ酸配列は、Genomics、56巻、12-21頁、1999年に記載されているGPR34のアミノ酸配列と同一で、アミノ酸配列の181番目はLeuであった。Biochim. Biophys. Acta、1446巻、57-70頁、1999年に記載されているGPR34のアミノ酸配列の181番目はValである。

【0142】

(1-2) GPR34発現CHO細胞株の作製

ハムスターCHO/dhfr⁻細胞を10%ウシ胎児血清を含むMEM培地 (GIBCO社 Cat.No.12571) を用いファルコンディッシュ (直径3.5cm) に1×10⁵個播種し、5%CO₂インキュベーターで37℃にて一晚培養した。上記(1-1)で得られた発現プラスミドpAKKO-GPR34 2μgをTransfection Reagent FuGENE6 (Roche社) を用い、添付説明書記載の方法に従ってトランスフェクトし、18時間培養後新鮮な増殖培地に交換した。さらに10時間培養を続けたのち、トランスフェクトした細胞をトリプシン-EDTA処理により集め、選択培地 (10%透析牛胎児血清を含むMEM培地 (GIBCO社 Cat.No.12561)) を用いて平底96穴プレートに播種した。3~4日ごとに選択培地を交換しながら培養を続け、2~3週間後にコロニー状に増殖してきたDHFR⁺細胞クローンを76個取得した。

【0143】

(1-3) TaqMan PCR法を用いたGPR34発現CHO細胞株のGPR34発現量の定量

上記(1-2)で得たGPR34発現CHO細胞株76クローンを、96ウェルプレートにて培養し、RNeasy 96 Kit (QIAGEN社) を用いてtotal RNAを調製した。得られたtotal RNA 1~200ngをTaqMan Reverse Transcription Reagents (アプライドバイオシステムズ社) を用いて、逆転写反応を行なった。得られたtotal RNA 0.1~20ng相当の逆転写産物、または逆転写反応を行っていないtotal RNA 0.1~20ng、または後に述べるようにして作製した標準cDNA、および2個のプライマー〔プライマー3 (配列番号：5) およびプライマー4 (配列番号：6)〕を各0.5μM、およびプローブ1 (配列番号：7; 5'端がFam (6-carboxy-fluorescein) により、3'端がTamra (6-carboxy-tetramethyl-rhodamine) によりそれぞれ標識されている) を0.1μM、およびTaqMan Universal PCR Master Mix (アプライドバイオシステムズ社) 25μlを加え、50μlの液量としPCR反応を行った。PCR反応は、ABI7700 (アプライドバイオシステムズ社) を用いて50・2分、95・10分の後、95・15秒、60・

10

20

30

40

50

1分のサイクルを40回繰り返し行った。

標準cDNAは、上記(1-1)で得られたプラスミドpAKKO-GPR34の260nmの吸光度を測定して濃度を算出し、正確なコピー数を算出した後、1mM EDTA含む10mM Tris-HCl (pH 8.0)溶液で希釈し、1コピーから 1×10^6 コピーの標準cDNA溶液を調製した。また、TaqMan PCR用プローブおよびプライマーはPrimer Express Ver.1.0 (アプライドバイオシステムズ社)により設計した。

発現量はABI PRISM 7700 SDSソフトウェアによって算出した。リポーターの蛍光強度が設定された値に達した瞬間のサイクル数を縦軸にとり、標準cDNAの初期濃度の対数値を横軸にとり、標準曲線を作成した。標準曲線より各逆転写産物、および逆転写反応を行っていないtotal RNA中のコピー数を算出し、逆転写産物のPCR反応産物より得られた値から、逆転写反応を行っていないPCR反応産物より得られた値を差し引くことにより、各クローンのtotal RNA 1ng当たりのGPR34遺伝子の発現量を求めた。その結果、GPR34の発現が高かったCHO細胞株12個を選択し、24ウェルプレートに培養した。これらの細胞について、GPR34の発現量を再検した。RNeasy Mini Kit (QIAGEN社)を用いてtotal RNAを調製した後、上記と同様に逆転写反応を行い、TaqMan PCR法で各クローンのtotal RNA 1ng当たりのGPR34遺伝子の発現量を求めた。その結果、GPR34発現CHO細胞株クローン#1-5および#1-9が高い発現量を示すことがわかった。

以後の実施例では、これら2つのクローンの発現細胞を用いた。

【0144】

(1-4) GPR34発現CHO細胞を用いた細胞内cAMP産生抑制活性の測定
上記(1-2)で作製し、上記(1-3)で選択したGPR34発現CHO細胞を24穴プレートに 6×10^4 cells/wellで播種し、48時間培養した。細胞を0.2mM 3-イソブチル-メチルキサンチン、0.05% BSAおよび20mM HEPESを含むMEM培地(pH 7.5)で洗浄した(以下、0.2mM 3-イソブチル-メチルキサンチン、0.05% BSAおよび20mM HEPESを含むMEM培地(pH 7.5)を反应用バッファーと記す)。その後、0.5mLの反应用バッファーを加えて30分間培養器で保温した。反应用バッファーを除き、新たに0.25mLの反应用バッファーを細胞に加えた後、試料と2 μ Mフォルスコリンを含む0.25mLの反应用バッファーを細胞に加え、37°Cで30分間反応させた。反応液を除き、cAMP EIAキット(アプライドバイオシステム)付属の細胞溶解液を0.5mL添加して細胞内のcAMPを抽出した。抽出液中のcAMP量は同キットを用いて定量した。この測定値をもとにしてcAMP産生抑制活性を以下に示した式で計算し、対照に対する百分率で表した。なお、試料添加群の活性はそれぞれ同一プレートに設置した対照の値を用いて算出した。

$$\% \text{ of control} = (X - C) / (T - C) \times 100$$

X: 試料添加群のcAMP量

T: 試料無添加、フォルスコリン刺激群の3wellのcAMP量の平均値

C: 試料無添加、フォルスコリン無刺激群の2wellのcAMP量の平均値

【0145】

(1-5) リゾホスファチジルセリンおよびホスファチジルセリンのGPR34発現CHO細胞に対するcAMP産生抑制活性

GPR34のアミノ酸配列は血小板活性化因子受容体あるいはウリジンニリン酸配糖体受容体のアミノ酸配列に低い相同性を示すことが知られている。そこで、これらのGPR34に相同性を示す受容体のリガンドである血小板活性化因子およびウリジンニリン酸配糖体を含めた種々の化合物をGPR34発現CHO細胞に投与し、上記(1-4)に示す方法によりそれらの化合物のGPR34発現CHO細胞に対するcAMP産生抑制活性を調べた。

その結果、リゾホスファチジルセリン(Sigma, L 5772)およびより高い濃度においてホスファチジルセリン(Sigma, P 7769)の2つの化合物が顕著な活性を示した。また、その作用は、他の受容体発現細胞では認められず、受容体特異的であった。以上からGPR

34はこれら2化合物をリガンドとすることが結論された。図1に種々の濃度のリゾホスファチジルセリンおよびホスファチジルセリンをGPR34発現CHO細胞に投与したときのcAMP産生抑制活性を示す。

【0146】

(1-6) GPR34とリゾホスファチジルセリンまたはホスファチジルセリンとの結合性を変化させる化合物のスクリーニング

上記(1-2)で作製し、上記(1-3)で選択したGPR34発現CHO細胞を24穴プレートに 6×10^4 cells/wellで播種し、48時間培養する。細胞を0.2 mM 3-イソブチル-メチルキサンチン、0.05% BSAおよび20 mM HEPESを含むMEM培地(pH 7.5)で洗浄する(以下、0.2 mM 3-イソブチル-メチルキサンチン、0.05% BSAおよび20 mM HEPESを含むMEM培地(pH 7.5)を反応用バッファーと記す)。その後、0.5 mLの反応用バッファーを加えて30分間培養器で保温する。反応用バッファーを除き、新たに0.25 mLの反応用バッファーを細胞に加えた後、(a) 1 μ Mのリゾホスファチジルセリンまたは10 μ Mのホスファチジルセリンを添加した2 μ Mフォルスコリンを含む0.25 mLの反応用バッファー、または(b) 1 μ Mのリゾホスファチジルセリンまたは10 μ Mのホスファチジルセリンおよび試験化合物を添加した2 μ Mフォルスコリンを含む0.25 mLの反応用バッファーを細胞に加え、37で30分間反応する。反応液を除き、cAMP EIAキット(アプライドバイオシステム)付属の細胞溶解液を0.5 mL添加して細胞内のcAMPを抽出する。抽出液中のcAMP量は同キットを用いて定量する。この測定値をもとにしてcAMP産生抑制活性を以下に示した式で計算し、対照に対する百分率で表す。なお、試料添加群の活性はそれぞれ同一プレートに設置した対照の値を用いて算出する。

$$\% \text{ of control} = (X - C) / (T - C) \times 100$$

X: 試料添加群のcAMP量

T: 試料無添加、フォルスコリン刺激群の3wellのcAMP量の平均値

C: 試料無添加、フォルスコリン無刺激群の2wellのcAMP量の平均値

リゾホスファチジルセリンまたはホスファチジルセリンによるcAMP産生抑制活性に対する試験化合物の影響を、リゾホスファチジルセリンまたはホスファチジルセリンを細胞に添加した時のcAMP産生抑制活性と、リゾホスファチジルセリンまたはホスファチジルセリンおよび試験化合物を細胞に添加した時のcAMP産生抑制活性とを比較することによって調べる。

リゾホスファチジルセリンまたはホスファチジルセリンによるcAMP産生抑制活性を減弱させる試験化合物を、拮抗阻害能力のある候補物質として、また、リゾホスファチジルセリンまたはホスファチジルセリンによるcAMP産生抑制活性を増強させる試験化合物を、結合力(リゾホスファチジルセリンまたはホスファチジルセリンとGPR34との結合)を促進する能力のある候補物質として選択する。

【0147】

実施例2

ラット由来G蛋白質共役型レセプター蛋白質GPR34の一部をコードするcDNA断片のクローニング

ラット由来G蛋白質共役型レセプター蛋白質GPR34の一部をコードするcDNAを取得するため、ヒトGPR34とマウスGPR34の共通配列に基づいてプライマー1(配列番号: 8)およびプライマー2(配列番号: 9)を設定してPCR反応を行なった。PCR反応の液量は20 μ lとし、組成は、鋳型としてラット全脳 Marathon ready cDNA(クロンテック社)を1 μ l、プライマー各0.2 μ M、dNTP 0.2 mM、GC-Melt 0.5 M、Advantage-GC 2 Polymerase Mix(クロンテック社) 1/50 volumeおよび5倍濃縮Buffer 1/5 volumeとした。増幅のためのサイクルは、96で2分保温した後、96・30秒、54・30秒、72・1分のサイクルを35回繰り返した後、72で10分保温した。得られた反応液をTOPO TA cloning kit(インビトロジェン社)を用いてプラスミドベクターpCR2.1-TOPOへサブクローニングし、大腸菌DH5-T1へ導入した。生じた形質転換体からQIAwell 8 Ultra Plasmid Kit(キ

アゲン社)を用いてプラスミドDNAを精製した。塩基配列決定のための反応は、BigDye Terminator Cycle Sequence Ready Reaction Kit(パーキンエルマー社)を用いて行なった。蛍光式自動シーケンサーを用いて解読した結果、ラット由来G蛋白質共役型レセプター蛋白質GPR34の一部をコードするcDNA断片の配列である配列番号:10に示す塩基配列が得られた。

【0148】

実施例3

3'RACE法によるラット由来G蛋白質共役型レセプター蛋白質GPR34をコードするcDNAの3'側部分配列のクローニング

3'RACE用の鋳型はラット全脳 Marathon ready cDNA(クロンテック社)を用いた。RACE PCR反応に用いたプライマーセットは、1回目のPCR反応ではキットに添付のアダプタープライマー1とプライマー1(配列番号:11)、2回目のPCR反応ではキットに添付のアダプタープライマー2とプライマー2(配列番号:12)を用いた。1回目のPCR反応では、PCR反応の液量は50 μ lとし、組成は鋳型のcDNAを5 μ l、プライマー各0.2 μ M、dNTP 0.2 mM、Advantage2 Polymerase Mix(クロンテック社)1/50 volume、10倍濃縮Buffer 1/10 volumeとした。増幅のためのサイクルは94 で2分保温した後、94 \cdot 30秒、68 \cdot 2分のサイクルを30回繰り返した後、72 で10分保温した。2回目のPCR反応では、PCR反応の液量は50 μ lとし、組成は鋳型として1回目のPCR反応液の10倍希釈液を5 μ l、プライマー各0.2 μ M、dNTP 0.2 mM、Advantage2 Polymerase Mix 1/50 volume、10倍濃縮Buffer 1/10 volumeとした。増幅のためのサイクルは94 で2分保温した後、94 \cdot 30秒、69 \cdot 2分のサイクルを20回繰り返した後、72 で10分保温した。反応物を0.8% Seakem LE Agarose(宝酒造)で電気泳動し、エチジウムブロマイドで染色した時に見える800 bp付近のバンドをQIAquick Gel Extraction Kit(キアゲン社)で抽出し、TOPO TA cloning kit(インビトロジェン社)を用いてプラスミドベクターpCR2.1-TOPOへサブクローニングし、大腸菌DH5 \cdot T1へ導入した。生じた形質転換体からQIAwell 8 Ultra Plasmid Kit(キアゲン社)を用いてプラスミドDNAを精製した。塩基配列決定のための反応は、BigDye Terminator Cycle Sequence Ready Reaction Kit(パーキンエルマー社)を用いて行なった。蛍光式自動シーケンサーを用いて解読した結果、ラット由来G蛋白質共役型レセプター蛋白質GPR34をコードするcDNAの3'側部分配列である配列番号:13で表される塩基配列が得られた。

【0149】

実施例4

5'RACE法によるラット由来G蛋白質共役型レセプター蛋白質GPR34をコードするcDNAの3'側部分配列のクローニング

5'RACE用の鋳型はラット脾臓 Marathon ready cDNA(クロンテック社)を用いた。RACE PCR反応に用いたプライマーセットは、1回目のPCR反応ではキットに添付のアダプタープライマー1およびプライマー1(配列番号:14)を、2回目のPCR反応ではキットに添付のアダプタープライマー2およびプライマー2(配列番号:15)をそれぞれ用いた。1回目のPCR反応では、PCR反応の液量は50 μ lとし、組成は鋳型のcDNAを5 μ l、プライマー各0.2 μ M、dNTP 0.2 mM、Advantage2 Polymerase Mix(クロンテック社)1/50 volume、10倍濃縮Buffer 1/10 volumeとした。増幅のためのサイクルは94 で30秒保温した後、94 \cdot 5秒、72 \cdot 3分のサイクルを5回、94 \cdot 5秒、70 \cdot 3分のサイクルを5回、94 \cdot 5秒、68 \cdot 3分のサイクルを25回繰り返した後、72 で10分保温した。2回目のPCR反応では、PCR反応の液量は50 μ lとし、組成は鋳型として1回目のPCR反応液の10倍希釈液を5 μ l、プライマー各0.2 μ M、dNTP 0.2 mM、Advantage2 Polymerase Mix 1/50 volume、10倍濃縮Buffer 1/10 volumeとした。増幅のためのサイクルは94 で2分保温した後、94 \cdot 30秒、69 \cdot 2分のサイクルを30回繰り返した後、72 で10分保温した。得られた反応液をTOPO TA cloning kit(インビトロジェン社)を用いてプラスミドベクターpCR2.1-TOPOへサブクローニングし、大腸菌DH5 \cdot T1へ導入した。生じた形質転換体からQIAwell 8 Ultra Plasmid Kit(キアゲン社)を用いてプラスミドDNAを精製した。塩基配列決定のた

めの反応は、BigDye Terminator Cycle Sequence Ready Reaction Kit (パーキンエルマー社)を用いて行なった。蛍光式自動シーケンサーを用いて解読した結果、ラット由来G蛋白質共役型レセプター蛋白質GPR34をコードするcDNAの5'側部分配列である配列番号: 16で表される塩基配列が得られた。

【0150】

実施例 5

ラット由来G蛋白質共役型レセプター蛋白質GPR34をコードするcDNAの全長配列のクローニング

5'および3'RACE法の結果から予想されるラット由来G蛋白質共役型レセプター蛋白質GPR34をコードするcDNAの全長を含む配列を得るためプライマー1(配列番号: 17)およびプライマー2(配列番号: 18)を設定してPCR反応を行なった。PCR反応の液量は50 μ lとし、組成は、鋳型としてラット脾臓 Marathon ready cDNA(クロンテック社)を3 μ l、プライマー各0.2 μ M、dNTP 0.2 mM、GC-Melt 0.5 M、Advantage-GC 2 Polymerase Mix(クロンテック社)1/50 volumeおよび5倍濃縮Buffer 1/5 volumeとした。増幅のためのサイクルは、96 で2分保温した後、96 \cdot 30秒、54 \cdot 30秒、72 \cdot 60秒のサイクルを35回繰り返した後、72 で10分保温した。得られた反応液をTOPO TA cloning kit(インビトロジェン社)を用いてプラスミドベクターpCR2.1-TOPOへサブクローニングし、大腸菌DH5 -T1へ導入した。生じた形質転換体からQIAwell 8 Ultra Plasmid Kit(キアゲン社)を用いてプラスミドDNAを精製した。塩基配列決定のための反応は、BigDye Terminator Cycle Sequence Ready Reaction Kit(パーキンエルマー社)を用いて行なった。蛍光式自動シーケンサーを用いて解読した結果、配列番号: 21に示す塩基配列が得られた。この配列にはラット由来G蛋白質共役型レセプター蛋白質GPR34の全アミノ酸配列(配列番号: 19)をコードするcDNAの塩基配列(配列番号: 20)が含まれていた。このプラスミドを用いて大腸菌DH5 -T1を形質転換し、Escherichia coli DH5 -T1/pCR2.1-TOPO-ratGPR34を得た。

【0151】

実施例 6

リゾホスファチジルセリンによるヒト由来GPR34発現CHO細胞の遊走刺激活性
実施例1に記載した方法と同様に作製したヒト由来GPR34発現CHO細胞に対するリゾホスファチジルセリンの遊走刺激活性を以下のようにして測定した。

遊走アッセイは96穴ケモタキシスチャンパー(Neuro Probe)を用いて行った。ポアサイズ5 μ mのポリカーボネートフレームフィルター(Neuro Probe)をPBSで希釈した10 μ g/mlのウシフィブロネクチン(ヤガイ中央研究所)溶液に室温で10分間浸漬した後、風乾することにより前処理を施した。ヒトGPR34発現CHO細胞をTrypsin-EDTA(GIBCO)で剥がし、DMEM(日研生物医学研究所)にて置換および再懸濁し、1 \times 10⁶ cells/mlの細胞浮遊液を調製した。96穴ケモタキシスチャンパーの下室に、DMEMに溶解した37 μ lの種々の濃度のリゾホスファチジルセリン溶液を添加し、上室には、1 \times 10⁶ cells/mlに調製したヒト由来GPR34発現CHO細胞浮遊液を1 wellあたり200 μ l(2 \times 10⁵ cells/well)添加した。CO₂インキュベーター内で5時間インキュベーションした後、遊走しなかったフィルター上面の細胞をキムワイプ(クレシア)で拭いとり、フィルター下面に遊走したCHO細胞をDiff-Quick(国際試薬)で固定染色し、プレートリーダーで595 nmの吸光度を測定した。

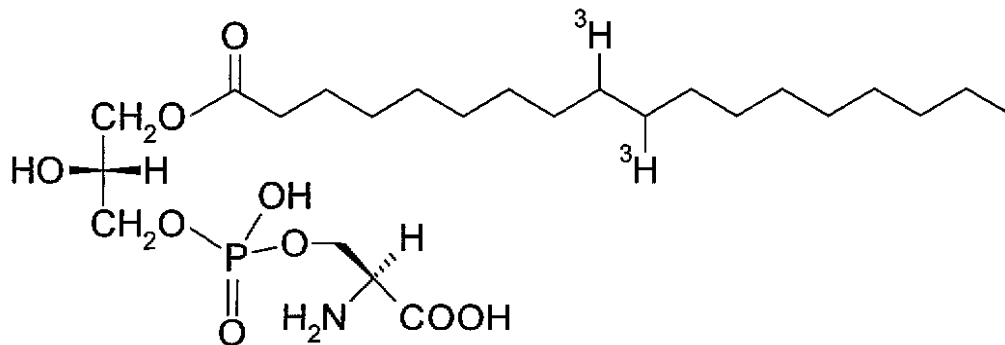
図2に、ヒト由来GPR34発現CHO細胞に対する0、0.3、1、3 および10 μ Mでのリゾホスファチジルセリンの遊走刺激活性を595 nmの吸光度として示す。

これより、ヒト由来GPR34発現CHO細胞は、リゾホスファチジルセリンに応答して遊走活性を示すことが明らかである。遊走活性は1 μ Mから確認され、リゾホスファチジルセリンの濃度依存的に増大し、10 μ Mで最大遊走活性を示した。遊走活性のEC₅₀値は、約2.5 μ Mであった。

【0152】

実施例 7

(7-1) 1 - [9 , 1 0 - $^3\text{H}_2$] - ステアロイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホ - L - セリン (1 - [9 , 1 0 - $^3\text{H}_2$] - ステアロイル - リゾホスファチジルセリン) の合成
【化17】



10

リゾホスファチジルセリンおよびGPR34発現CHO細胞膜画分を用いた結合実験を実施するために ^3H 標識したリゾホスファチジルセリンを以下のようにして合成する。

初めに、接触還元によって ^3H 標識するため、二重結合を有する1-オレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホ-L-セリン(1-オレオイル-リゾホスファチジルセリン)を合成した。

1, 2 - ジオレオイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホ - L - セリンナトリウム塩 (シグマ、P1060) (85 mg) を、蒸留水 (25 ml) に溶解し、200 mM トリス - 塩酸緩衝液 (pH8.0) (1.5 ml) および100 mM 塩化カルシウム (1.5ml) を添加し、さらにホスホリパーゼA2 (0.3 ml) (10mg/ml、5 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH5.0)) を添加した。室温で20時間反応させ、5 M 塩酸を用いてpHを2から3にして反応を終了させた。反応液を濃縮乾固した後、クロロホルム - メタノール混合溶媒に溶解してシリカゲルカラムクロマトグラフィーに吸着させた。クロロホルム - メタノール混合溶媒にて溶出し、1 - オレオイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホ - L - セリンを得た。

20

ついで、公知の方法 (例えば、R. F. Glascock、Isotopic Gas Analysis for Biochemists、227頁、Academic Press、New York、1954年、に記載の方法) に従い、1 - オレオイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホ - L - セリンをパラジウムの存在下にトリチウムガス ($^3\text{H}_2$) によって接触還元して二重結合にトリチウムを導入し、目的物である1 - [9 , 1 0 - $^3\text{H}_2$] - ステアロイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホ - L - セリンを得る。

30

【0153】

(7-2) ヒト由来GPR34発現CHO細胞膜画分の調製

実施例1に記載した方法に準じて作製したヒト由来GPR34発現CHO細胞を培養し、 1×10^8 個の細胞に10mlのホモジネートバッファー (10 mM NaHCO_3 、5 mM EDTA (エチレンジアミン四酢酸)、0.5 mM PMSF (フェニルメタンシルボニルフルオリド)、 $1 \mu\text{g/ml}$ ペプスタチン、 $4 \mu\text{g/ml}$ E64、 $20 \mu\text{g/ml}$ ロイペプチン) を添加し、ポリトロン (12,000 rpm、1分間) を用いて破碎する。細胞破碎液を遠心 (1,000 g、15分間) して上清を得る。次にこの上清を超遠心分離 (Beckman type 30ローター、30,000 rpm、1時間) し、ヒト由来GPR34発現CHO細胞膜画分を沈殿物として得る。

40

(7-3) 1 - [9 , 1 0 - $^3\text{H}_2$] - ステアロイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホ - L - セリン (以下、[^3H] - lysoPSと略記する) およびヒト由来GPR34発現CHO細胞膜画分とを用いた受容体結合実験

上記(7-2)で調製された細胞膜画分を、アッセイ用バッファー (25 mM Tris - HCl、5 mM EDTA、0.05% CHAPS (3 - [(3 - コラミドプロピル)ジメチルアンモニオ] - 1 - プロパン硫酸)、0.1% BSA、0.5 mM PMSF、 $1 \mu\text{g/ml}$ ペプスタチン、 $20 \mu\text{g/ml}$ ロイペプチン、 $4 \mu\text{g/ml}$ E - 64、pH7.4) で各種濃度に希釈後、ポリプロピレン製試験管 (Falcon 2053) に200 μl ずつ分注する。最大結合量を測定するために2 μl のDMSOと80 nMの[3

50

H] - l y s o P S 2 μ l を膜画分溶液に添加する。また、非特異的結合を測定するために10mMリゾホスファチジルセリンのDMSO溶液2μlと80nMの[³H] - l y s o P S 2 μ l を膜画分溶液に添加する。25℃で75分間反応させた後、ポリエチレンイミン処理したワットマングラスフィルター(GF-F)を用いて反応液を吸引ろ過し、さらにフィルターを洗浄用バッファー(25mM Tris-HCl、5mMEDTA、0.05%CHAPS、0.1%BSA、pH7.4)1.5mlで2回洗浄する。その後、シンチレーションカウンターを用いてろ紙に残った放射活性を測定し、最大結合量を与える放射活性(TB)から非特異的結合量を与える放射活性を減じて特異的結合量(SB)を見積る。

【0154】

(7-4)受容体結合実験によるGPR34とリゾホスファチジルセリンとの結合性を变化させる化合物のスクリーニング

上記(7-3)において、2μlの試験化合物のDMSO溶液と80nMの[³H] - l y s o P S 2 μ l を膜画分溶液に添加し、25℃で75分間反応させた後、ポリエチレンイミン処理したワットマングラスフィルター(GF-F)を用いて反応液を吸引ろ過し、さらにフィルターを洗浄用バッファー(25mM Tris-HCl、5mMEDTA、0.05%CHAPS、0.1%BSA、pH7.4)1.5mlで2回洗浄する。その後、シンチレーションカウンターを用いてろ紙に残った放射活性を測定する。この放射活性をXとすると試験化合物の結合阻害活性は、(TB-X)/SB×100(%)として表される。

結合阻害活性を示した試験化合物について、種々の濃度に調製した試験化合物を用いて結合阻害活性を測定し、50%阻害濃度(IC₅₀値)を求めることができる。より低いIC₅₀値を与える化合物をGPR34とリゾホスファチジルセリンとの結合をより強く阻害する化合物として選択する。

一方、結合阻害活性の値として負の値が得られる化合物をGPR34とリゾホスファチジルセリンとの結合を促進する化合物として選択する。

【0155】

【発明の効果】

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットで得られうる化合物またはその塩、本発明の受容体などは、例えば、神経変性疾患(例、アルツハイマー病、パーキンソン病、ダウン症、筋萎縮性側索硬化症、プリオン病、クロイツフェルト-ヤコブ病、ハンチントン舞蹈病、糖尿病性ニューロパチー、多発性硬化症など)、免疫疾患(例、炎症性疾患(例、下垂体腫瘍、甲状腺炎、腹膜炎、クローン病、潰瘍性大腸炎、結節性紅斑、慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーデスなど)、アレルギー、喘息、滲出性中耳炎、メニエール病、アレルギー性結膜炎、接触皮膚炎、アレルギー性鼻炎、アナフィラキシー、蕁麻疹、重症筋無力症、糸球体腎炎、シェーグレン症候群、インスリン抵抗性糖尿病、アトピー性皮膚炎、白血球異常など)、浮腫、胃酸過多などの予防・治療剤、ヒスタミン遊離抑制剤、神経成長因子活性増強剤などとして有用である。

さらに詳しくは、本発明の受容体アゴニスト、本発明の受容体、本発明のDNAなどは、例えば、神経成長因子活性増強剤、神経変性疾患(例、アルツハイマー病、パーキンソン病、ダウン症、筋萎縮性側索硬化症、プリオン病、クロイツフェルト-ヤコブ病、ハンチントン舞蹈病、糖尿病性ニューロパチー、多発性硬化症など)などの安全で低毒性な予防・治療剤などの医薬として有用である。本発明の受容体アンタゴニスト、本発明の抗体、本発明のアンチセンスポリヌクレオチドなどは、例えば、ヒスタミン遊離抑制剤や、免疫疾患(例、炎症性疾患(例、下垂体腫瘍、甲状腺炎、腹膜炎、クローン病、潰瘍性大腸炎、結節性紅斑、慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーデスなど)、アレルギー、喘息、滲出性中耳炎、メニエール病、アレルギー性結膜炎、接触皮膚炎、アレルギー性鼻炎、アナフィラキシー、蕁麻疹、重症筋無力症、糸球体腎炎、シェーグレン症候群、インスリン抵抗性糖尿病、アトピー性皮膚炎、白血球異常など)、浮腫、胃酸過多などの予防・治療剤などとして有用である。

10

20

30

40

50

Tyr Ile Ser Ser Gln Leu Asn Val Ser Ser Cys Tyr Trp Lys Glu Ile
 290 295 300
 Val His Lys Thr Asn Glu Ile Met Leu Val Leu Ser Ser Phe Asn Ser
 305 310 315 320
 Cys Leu Asp Pro Val Met Tyr Phe Leu Met Ser Ser Asn Ile Arg Lys
 325 330 335
 Ile Met Cys Gln Leu Leu Phe Arg Arg Phe Gln Gly Glu Pro Ser Arg
 340 345 350
 Ser Glu Ser Thr Ser Glu Phe Lys Pro Gly Tyr Ser Leu His Asp Thr
 355 360 365
 Ser Val Ala Val Lys Ile Gln Ser Ser Ser Lys Ser Thr
 370 375 380

10

<210> 2

20

<211> 1143

<212> DNA

<213> Human

<400> 2

atgagaagtc ataccataac aatgacgaca acttcagtcg gcagctggcc ttactcctcc 60
 cacagaatgc gctttataac caatcatagc gaccaaccgc cacaaaactt ctacagcaaca 120
 ccaaatgta ctacctgtcc catggatgaa aaattgctat ctactgtgtt aaccacatcc 180
 tactctgta ttttcatcgt gggactgggt gggaacataa tcgccctcta tgtatttctg 240
 ggtattcacc gtaaaagaaa ttccattcaa atttatctac ttaacgtagc cattgcagac 300
 ctctactca tcttcigcct cctttccga ataatgtatc atattaacca aaacaagtgg 360
 acactaggtg tgattctgtg caaggttgtg ggaacactgt tttatatgaa catgtacatt 420
 agcattattt tgcttggatt catcagtttg gatcgctata taaaaattaa tcggtctata 480
 cagcaacgga aggcaataac aaccaacaa agtatttatg tctgttgtat agtatggatg 540
 ctgtctcttg gtggattcct aactatgatt attttaacac ttaagaaagg agggcataat 600

30

40

tccacaatgt gtttccatta cagagataag cataacgcaa aaggagaagc catttttaac 660
 ttcatctctg tggtaatggt ctggctaatt ttcttactaa taatccttc atatattaag 720
 attgggaaga atctattgag gatttctaaa aggaggtaaa aatttctaa ttctggtaaa 780
 tatgccacta cagctcgtaa ctccctttatt gtacttatca tttttactat atgttttgtt 840
 ccctatcatg cctttcgatt catctacatt tcttcacagc taaatgtatc atcttgctac 900
 tggaaagaaa ttgttcacaa aaccaatgag atcatgctgg ttctctcacc ttccaatagt 960
 tgcttagatc cagtcattga ttctctgatg tccagtaaca ttgcacaaat aatgtgccaa 1020
 cttcttttta gacgatttca aggtgaacca agtaggagtg aaagcacttc agaattttaa 1080
 ccaggatact ccttgcattg tacatctgtg gcagtgaaaa tacagctctag ttctaaaagt 1140
 act 1143

10

<210> 3

<211> 27

<212> DNA

20

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify DNA encoding GPR34

<400> 3

atctgtcgac atgagaagtc ataccat

27

30

<210> 4

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

40

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify DNA encoding GPR34

⟨400⟩ 4		
tatgactagt tcaagtactt ttagaactag	30	
⟨210⟩ 5		
⟨211⟩ 20		
⟨212⟩ DNA		10
⟨213⟩ Artificial Sequence		
⟨220⟩		
⟨223⟩ Designed oligonucleotide primer to amplify DNA encoding GPR34		
⟨400⟩ 5		
tcagtcagca gctggcctta	20	20
⟨210⟩ 6		
⟨211⟩ 18		
⟨212⟩ DNA		
⟨213⟩ Artificial Sequence		
⟨220⟩		30
⟨223⟩ Designed oligonucleotide primer to amplify DNA encoding GPR34		
⟨400⟩ 6		
ggcggttggt cgctaiga	18	
⟨210⟩ 7		
⟨211⟩ 28		40
⟨212⟩ DNA		

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide probe (labeled with FAM and TAMRA)

<400> 7

tcctcccaca gaatgcgctt tataacca

28

10

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

20

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify DNA encoding rat GPR34

<400> 8

taaattctga agtgctttca

20

<210> 9

<211> 20

30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify DNA encoding rat GPR34

<400> 9

40

attcaccgta aaagaaattc

20

<210> 10
 <211> 749
 <212> DNA
 <213> Rat

<400> 10		10
ggctgttgca gaccttctac tcattctctg cctcccttcc cgcataatgt atcacatcaa	60	
ccaaaatagg tggacactag gttgtattct ttgcaaagtt gttggggacac tattttacat	120	
gaacatgtac attagtatta ttctgcttgg gtttatcagt ttggatcgat atataaaaaat	180	
caaccggctc atacaacaaa gaagggcaat aaccaccaag caaagtggtt acgtttgctg	240	
tgtagtcctg acagttgctc tagctggatt tttacaatg atcattttga cactgaagaa	300	
gggagggcac aattccacaa tgggtttcca ttacagagat aagcataatg caaagggaga	360	
agcgatcttt aactttgctc ttgtagtaat gttctggctc attttctac tgataatcct	420	20
ttcatatatt aagattggca agaattctact gaggatttct aaaaggaggt caaaatttcc	480	
taactctggc aaatatgcca cgacagcccg gaactccttc attgtactaa tcatttttac	540	
tatatgcttc gtgccittac atgcccttctg attcatttac atttcttcac agctaaatgc	600	
atctttctgc tactggaagg aaatcattca taaaaccaat gagatcatgt tggttctctc	660	
ctctttcaac agctgcttgg atcctgctat gtatttctta atgtccagta atattcgcaa	720	
aatcatgtgt caacttcttt ttagaagat	749	

30

<210> 11
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Designed oligonucleotide primer to amplify DNA encoding rat GPR34

40

<400> 11

gcttcgtgcc ttatcatgcc tttcg 25

<210> 12

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence 10

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify DNA encoding rat GPR34

<400> 12

ctctctctt tcaacagctg ctgg 25

20

<210> 13

<211> 300

<212> DNA

<213> Rat

<400> 13

ttcaaagtga cacaagcaga agtgaaagca cticagaatt taagccagga taticcttgc 60 30

atgatctatc tgtgacggtc aaaatgcagt acagcactaa gggtaactga ggcacatgca 120

gtaaaatgaa caacataaac cagcctcttc attccttgag gtiggtaaaa ttatggaaca 180

aattcctagc atgttcaaaa accagatctt tagaagtggc ctttcaacttg ctttaactgca 240

aaatagtcca aggcaaagaa aagccttacac taatccctag atttitagaac tataatgtaga 300

<210> 14

<211> 24

<212> DNA

40

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify DNA encoding rat GPR34

<400> 14

gcccttcctt gttgtataga ccgg 24 10

<210> 15

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

20

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify DNA encoding rat GPR34

<400> 15

gcaaagaatc acacctagtgc tccacc 26

<210> 16

<211> 500

30

<212> DNA

<213> Rat

<400> 16

cggatggaag agtccagctg acacgacctg gtcgagggag ctttgggttt cctcctttac 60
 ttcagcaaag cctcaactca gticcctgiga cticigaagt atggccigaa tagattcaat 120
 cattattagt ccattatcat ataggaaaat ctgaagacac caagaagtat aaaaagcatg 180
 tcatttagca cccctgicctg atagttacag aagacattga gaagttacag tgaacaatg 240

40

acgactacag ttgacagctg gctttgctcc tctcctggaa tgcactttat aactaatgac 300
 agtgaccaag tctcacaaaa tttctcagga gtgtcaaatg tcactagctg tccaatggat 360
 gaaaaattac tgtctactgt gtaacaact tctactctg tgatattcat cgtgggactg 420
 gtggaaaca tcattgccct ttatgtattt ctgggcatcc accgcaaaag aaattccatt 480
 caaatttate tacttaatgt 500

<210> 17

10

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify DNA encoding rat GPR34

20

<400> 17

tcagttacce ttagtgctgt 20

<210> 18

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify DNA encoding rat GPR34

<400> 18

atgacgacta cagttgacag 20

40

<210> 19

Ser Thr Met Cys Phe His Tyr Arg Asp Lys His Asn Ala Lys Gly Glu	
195	200
Ala Ile Phe Asn Phe Ala Leu Val Val Met Phe Trp Leu Ile Phe Leu	
210	215
Leu Ile Ile Leu Ser Tyr Ile Lys Ile Gly Lys Asn Leu Leu Arg Ile	
225	230
Ser Lys Arg Arg Ser Lys Phe Pro Asn Ser Gly Lys Tyr Ala Thr Thr	10
245	250
Ala Arg Asn Ser Phe Ile Val Leu Ile Ile Phe Thr Ile Cys Phe Val	
260	265
Pro Tyr His Ala Phe Arg Phe Ile Tyr Ile Ser Ser Gln Leu Asn Ala	
275	280
Ser Ser Cys Tyr Trp Lys Glu Ile Ile His Lys Thr Asn Glu Ile Met	20
290	295
Leu Val Leu Ser Ser Phe Asn Ser Cys Leu Asp Pro Val Met Tyr Phe	
305	310
Leu Met Ser Ser Asn Ile Arg Lys Ile Met Cys Gln Leu Leu Phe Arg	
325	330
Arg Phe Gln Ser Asp Thr Ser Arg Ser Glu Ser Thr Ser Glu Phe Lys	
340	345
Pro Gly Tyr Ser Leu His Asp Leu Ser Val Thr Val Lys Met Gln Tyr	30
355	360
Ser Thr Lys Gly Asn	
370	

<210> 20

<211> 1119

<212> DNA

<213> Rat

<400> 20

atgacgacta cagttgacag ciggctttgc tcctctcctg gaatgcactt tataactaat	60	
gacagtgacc aagtctcaca aaatttctca ggagigtcaa atgtcactag ctgtccaatg	120	
gatgaaaaat tactgtctac tigtgtaaca actttctact ctgtgatatt catcgtggga	180	
ctggttggaa acatcattgc cctttatgta tttctgggca tccaccgcaa aagaaatcc	240	
attcaaattt atctacttaa tgtggctgtt gcagacctc tactcatctt ctgcctccct	300	10
ttccgcataa tgtatccat caacccaaaat aggtggacac taggtgtgat tctttgcaa	360	
gttgtgggga cactatitta catgaacaig tacattagta ttattctgct tgggtttatc	420	
agtttggatc gatataaaa aatcaaccgg tctatacaac aaagaagggc aataaccacc	480	
aagcaaagtg tttacgtttg ctgtgtagtc tggacagttg ctctagctgg atttttaaca	540	
atgatcattt tgacactgaa gaagggaggg cacaattcca caatgtgttt ccattacaga	600	
gataagcata atgcaaaggg agaagcgatc ttttaactttg ctcttgtagt aatgttctgg	660	
ctcattttcc tactgataat cctttcatal attaagattg gcaagaatct actgaggatt	720	20
tctaaaagga ggtcaaaaatt tcttaactct ggcaaatatg ccacgacagc ccggaactcc	780	
ttcattgtac taatcatttt tactatatgc ttctgtcctt atcatgcctt tegtattcatt	840	
tacatttctt cacagctaaa tgcattctct tgcctactgga aggaaatcat tcataaaacc	900	
aatgagatca tgttggttct ctctctttc aacagctgct tggatcctgt catgtatttc	960	
ctaattgcca gtaatatctg caaaatcatg tgtcaacttc tttttagaag atttcaaagt	1020	
gacacaagca gaagtgaag cacttcagaa ttttaagccag gatattcctt gcatgatcta	1080	30
tctgtgacgg tcaaaatgca gtacagcact aagggtaac	1119	

<210> 21

<211> 1122

<212> DNA

<213> Rat

<400> 21

atgacgacta cagttgacag ciggctttgc tcctctcctg gaatgcactt tataactaat	60	40
---	----	----

gacagtgacc aagtcicaca aaatttctca ggagigtcaa atgtcactag ctgtccaatg 120
gatgaaaaat tactgtctac tgtgttaaca actttctact ctgtgatatt catcgtggga 180
ctggttggaa acatcattgc cctttatgta tttctgggca tccaccgcaa aagaaattcc 240
attcaaatti atctacttaa tgtggctgtt gcagacctc tactcatctt ctgcctccct 300
ttccgcataa tgtatcacat caacccaaaat aggtggacac taggtgtgat tctttgcaaa 360
gttgtgggga cactatitta catgaacatg tacattagta ttattctgct tgggtttatc 420
agtttggatc gatataataa aatcaaccgg tctatacaac aaagaagggc aataaccacc 480
aagcaaagtg tttacgtttg ctgtgtagtc tggacagttg ctctagctgg atttttaaca 540
atgatcatti tgacactgaa gaagggaggg cacaattcca caatgtgttt ccattacaga 600
gataagcata atgcaaaggg agaagcgatc tttaacittg ctcttgtagt aatgttctgg 660
ctcattttcc tactgataat cctttcatal attaagattg gcaagaatct actgaggatt 720
tctaaaagga ggtcaaaatt tcttaactct ggcaaatatg ccacgacagc ccggaactcc 780
ttcattgtac taatcatttt tactatatgc ttctgtcctt atcatgcctt tcatcatt 840
tacatttctt cacagctaaa tgcattctct tgcctactgga aggaaatcat tcataaaacc 900
aatgagatca tgttggttct ctctctttc aacagctgct tggatcctgt catgtatttc 960
ctaattgcca gtaatatctg caaaatcatg tgtcaacttc tttttagaag atttcaaagt 1020
gacacaagca gaagtgaag cacttcagaa ttttaagccag gatattcctt gcatgatcta 1080
ctgtgacgg tcaaaatgca gtacagcact aagggttaact ga 1122

10

20

<210> 22

<211> 375

<212> PRT

<213> Mouse

30

<400> 22

Met Thr Thr Thr Ser Val Asp Ser Trp Leu Cys Ser Ser His Gly Met
 5 10 15
His Phe Ile Thr Asn Tyr Ser Asp Gln Ala Ser Gln Asn Phe Ser Gly
 20 25 30

40

Val	Pro	Asn	Val	Thr	Ser	Cys	Pro	Met	Asp	Glu	Lys	Leu	Leu	Ser	Thr	
		35					40					45				
Val	Leu	Thr	Thr	Phe	Tyr	Ser	Val	Ile	Phe	Leu	Val	Gly	Leu	Val	Gly	
		50				55						60				
Asn	Ile	Ile	Ala	Leu	Tyr	Val	Phe	Leu	Gly	Ile	His	Arg	Lys	Arg	Asn	
		65			70					75					80	
Ser	Ile	Gln	Ile	Tyr	Leu	Leu	Asn	Val	Ala	Val	Ala	Asp	Leu	Leu	Leu	10
				85					90					95		
Ile	Phe	Cys	Leu	Pro	Phe	Arg	Ile	Met	Tyr	His	Ile	Asn	Gln	Asn	Lys	
			100					105						110		
Trp	Thr	Leu	Gly	Val	Ile	Leu	Cys	Lys	Val	Val	Gly	Thr	Leu	Phe	Tyr	
			115				120							125		
Met	Asn	Met	Tyr	Ile	Ser	Ile	Ile	Leu	Leu	Gly	Phe	Ile	Ser	Leu	Asp	
		130				135					140					20
Arg	Tyr	Ile	Lys	Ile	Asn	Arg	Ser	Ile	Gln	Gln	Arg	Arg	Ala	Ile	Thr	
		145			150						155				160	
Thr	Lys	Gln	Ser	Ile	Tyr	Val	Cys	Cys	Ile	Val	Trp	Thr	Val	Ala	Leu	
				165						170					175	
Ala	Gly	Phe	Leu	Thr	Met	Ile	Ile	Leu	Thr	Leu	Lys	Lys	Gly	Gly	His	
			180					185							190	
Asn	Ser	Thr	Met	Cys	Phe	His	Tyr	Arg	Asp	Arg	His	Asn	Ala	Lys	Gly	30
			195					200						205		
Glu	Ala	Ile	Phe	Asn	Phe	Val	Leu	Val	Val	Met	Phe	Trp	Leu	Ile	Phe	
			210				215							220		
Leu	Leu	Ile	Ile	Leu	Ser	Tyr	Ile	Lys	Ile	Gly	Lys	Asn	Leu	Leu	Arg	
				225			230					235			240	
Ile	Ser	Lys	Arg	Arg	Ser	Lys	Phe	Pro	Asn	Ser	Gly	Lys	Tyr	Ala	Thr	
				245					250						255	40
Thr	Ala	Arg	Asn	Ser	Phe	Ile	Val	Leu	Ile	Ile	Phe	Thr	Ile	Cys	Phe	

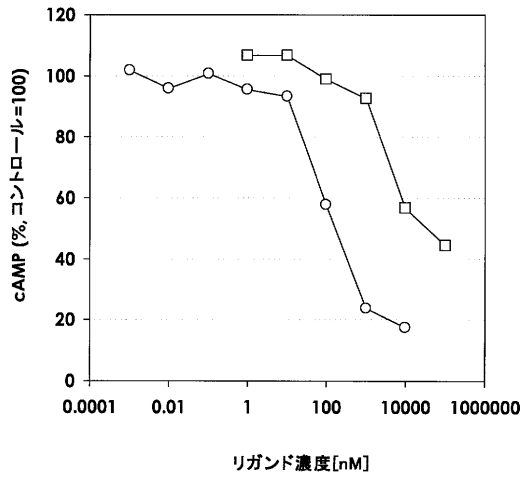
iccattcaaa tttatctact taatgtggct gttgcagacc ttctactcat cttctgcctc	300	
cctttccgca taatgtatca catcaaccaa aacaagigga cactagggtg gattctttgt	360	
aaagtgtggt ggacactatt ttacatgaac atgtacatta gcattatitit gcttgggttt	420	
atcagtttgg atcgcitatat aaaaatcaat cggctctatac aacaaagaag ggcaataacc	480	
accaagcaaa gtatttatgt ttgctgtata gtatggacgg ttgctcttgc tggatttcta	540	
actatgatca ttttgacact gaagaagggg ggtcataatt ccacaatgtg ttccattac	600	
agagacagac ataatgcaaa gggagaagca atttttaact ttgttcttgt agtaatgttc	660	10
tggcttattt tectactgat aatcctctca tatattaaga ttggcaagaa tctactgagg	720	
atttctaaac ggaggicaaa atttccaaac tctggcaaat atgctacaac agcccggaac	780	
tcctttattg tactgatcat ttttactata tgccttgtgc cttaccatgc ctttcgggtc	840	
atttacattt cttcacagct aaatgtgtcc tcttgttatt ggaaggaaat cattcacaaa	900	
actaacgaga tcatgtctgt tttctctctt ttcaacagtt gcctggatcc tgtcatgtat	960	
ttcctgatgt ccagtaatat tgcgcaaaatc atgigtcaac ttcttttttag aaggtttcaa	1020	
agtgaagcaa gcagaagtga aagcatttca gaatttaagc caggacattc cttgcatgat	1080	20
ctgtccgtga cagtcaaaat gccccagtac agcactaagg gtaat	1125	

【図面の簡単な説明】

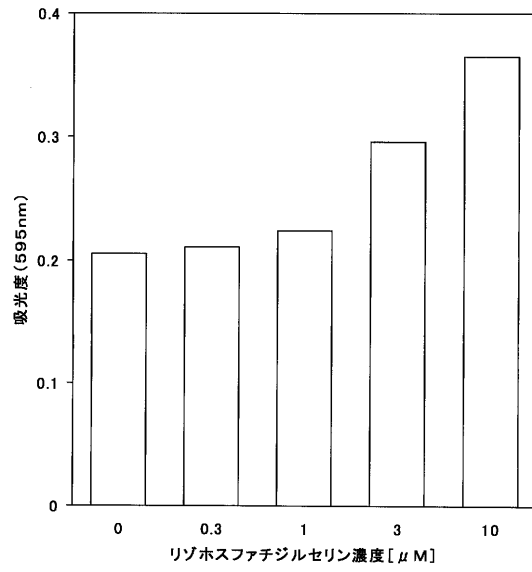
【図 1】リゾホスファチジルセリンおよびホスファチジルセリンの G P R 3 4 発現 C H O 細胞に対する c A M P 産生抑制活性を示す図である。図中、- - は、リゾホスファチジルセリンを投与した場合を、- - は、ホスファチジルセリンを投与した場合を示す。

【図 2】リゾホスファチジルセリンの G P R 3 4 発現 C H O 細胞に対する遊走刺激活性を示す図である。

【 図 1 】



【 図 2 】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)		A 6 1 K 39/395	D
A 6 1 P 37/00 (2006.01)		A 6 1 P 37/00	
C 0 7 K 14/705 (2006.01)		C 0 7 K 14/705	
C 0 7 K 16/28 (2006.01)		C 0 7 K 16/28	
C 1 2 P 21/02 (2006.01)		C 1 2 P 21/02	C

- (72)発明者 佐藤 秀司
茨城県つくば市花畑3丁目19番地9 メルモ301号
- (72)発明者 南祇 利実
茨城県つくば市春日2丁目36-3号棟201号
- (72)発明者 周郷 司
茨城県つくば市花畑2丁目7番地26 テクノタウン筑波301号

審査官 横田 倫子

- (56)参考文献 欧州特許出願公開第872550(EP, A2)
欧州特許出願公開第1074617(EP, A2)
国際公開第01/46454(WO, A1)
国際公開第01/57188(WO, A2)
欧州特許出願公開第113094(EP, A2)
国際公開第01/55387(WO, A1)
国際公開第96/40040(WO, A2)
BBA., 1446 (1999) p.57-70
Genomics, 56 (1999) p.12-21
BBRC., 341 (2006) p.1078-1087

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C12N 15/00-15/90
UniProt/GeneSeq
PubMed
JSTPlus(JDreamII)
BIOSIS/WPI(DIALOG)

专利名称(译)	筛选方法
公开(公告)号	JP4378083B2 公开(公告)日 2009-12-02
申请号	JP2002362772 申请日 2002-12-13
申请(专利权)人(译)	武田化学工业有限公司
当前申请(专利权)人(译)	武田化学工业有限公司
[标]发明人	森正明 千勝智子 佐藤秀司 南祇利実 周郷司
发明人	森 正明 千勝 智子 佐藤 秀司 南祇 利実 周郷 司
IPC分类号	C12N15/09 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 A61K39/395 A61P37/00 C07K14/705 C07K16/28 C12P21/02 A01K67/027 A61K38/00 A61K45/00 A61K48/00 A61P25/00 A61P29/00 C12N1 /15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12Q1/02
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D A61K39/395.D A61P37/00 C07K14/705 C07K16/28 C12P21/02.C A01K67/027 A61K37/02 A61K38/00 A61K38/01 A61K38/02 A61K38/16 A61K45/00 A61K48/00 A61P25/00 A61P29/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N15/00. A C12N15/00.AZN.A C12N5/00.A C12N5/00.101 C12N5/10 C12Q1/02
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/AA40 2G045/BB03 2G045/BB20 2G045/CB01 2G045/CB17 2G045/CB21 2G045 /DA12 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/DA77 2G045/FB03 2G045/FB07 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA63 4B024/CA04 4B024/DA02 4B024/DA06 4B024/EA04 4B024/HA20 4B063 /QA01 4B063/QA05 4B063/QA18 4B063/QQ08 4B063/QQ53 4B063/QQ62 4B063/QR45 4B063/QR77 4B063/QS36 4B063/QX01 4B063/QX07 4B064/AG20 4B064/CA02 4B064/CA10 4B064/CC24 4B064 /DA01 4B064/DA13 4B065/AA26X 4B065/AA90X 4B065/AA91Y 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065 /BA02 4B065/CA24 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA01 4C084/AA02 4C084/AA17 4C084/BA02 4C084/BA08 4C084/BA22 4C084/CA23 4C084/NA14 4C084/ZA02 4C084/ZB07 4C084/ZB11 4C085 /AA14 4C085/BB11 4C085/CC04 4C085/DD21 4C085/DD61 4C085/EE01 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA50 4H045/DA75 4H045/EA20 4H045 /EA50 4H045/FA74
代理人(译)	小林 浩 片山英二 小林顺子
优先权	2001382174 2001-12-14 JP 2002200556 2002-07-09 JP
其他公开文献	JP2004089176A JP2004089176A5
外部链接	Espacenet
摘要(译)	

要解决的问题：提供筛选神经退行性疾病，免疫性疾病，水肿，胃酸过多等的预防/治疗剂的方法，以及筛查试剂盒。解决方案：通过使用

(a) 含有相同或基本相同氨基酸序列的蛋白质，提供用于筛选能够改变蛋白质或其盐与配体的结合性质的化合物或其盐的筛选/试剂盒的方法。特定氨基酸序列，其部分肽或其盐和 (b) 具有与蛋白质特异性结合能力的配体。通过筛选获得化合物或其盐。通过含有化合物或其盐来获得药物。

