

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) **公開特許公報** (A) (11)特許出願公開番号

特開2001 - 352986

(P2001 - 352986A)

(43)公開日 平成13年12月25日(2001.12.25)

(51) Int.Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マ-コ-ト* (参考)
C 1 2 N 15/09	ZNA	A 0 1 H 5/00	A 2 B 0 3 0
A 0 1 H 5/00		A 0 1 K 67/027	2 G 0 4 5
A 0 1 K 67/027		67/033 501	4 B 0 2 4
67/033 501		A 6 1 K 39/395	D 4 B 0 6 3
A 6 1 K 38/00			N 4 B 0 6 4

審査請求 未請求 請求項の数 56 O L (全 52数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2000 - 175475(P2000 - 175475)

(22)出願日 平成12年6月12日(2000.6.12)

(71)出願人 000001029

協和醗酵工業株式会社

東京都千代田区大手町1丁目6番1号

(72)発明者 小畑 長英

東京都町田市旭町3丁目6番6号 協和醗酵工業株式会社東京研究所内

(72)発明者 西 達也

東京都千代田区大手町一丁目6番1号 協和醗酵工業株式会社本社内

(72)発明者 太田 紀夫

東京都町田市旭町3丁目6番6号 協和醗酵工業株式会社東京研究所内

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 新規ポリペプチド

(57)【要約】

【課題】NF - Bの活性化が関与する疾患の治療薬、予防薬および診断薬の探索、開発に有用なポリペプチド、該ポリペプチドをコードするDNA、該DNAのアンチセンスDNA/RNA、該DNAを用いた遺伝子治療、該ポリペプチドを認識する抗体、該ポリペプチドの活性上昇改変体、該ポリペプチドのドミナントネガティブ変異体、およびこれらの利用法を提供する。

【解決手段】NF - Bを活性化するポリペプチドを同定し、該ポリペプチドをコードするDNA、および該ポリペプチドを認識する抗体を製造する。これらはNF - Bの活性化が関与する疾患の治療薬の探索ならびに診断に利用することができる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列番号1～5のいずれかで表されるアミノ酸配列からなる群より選ばれるアミノ酸配列を有するポリペプチド。

【請求項2】 配列番号1～5のいずれかで表されるアミノ酸配列からなる群より選ばれるアミノ酸配列において1以上のアミノ酸が欠失、置換および/または付加されたアミノ酸配列からなり、かつNF-Bの活性を上昇させる活性を有するポリペプチド。

【請求項3】 配列番号1～5のいずれかで表されるアミノ酸配列からなる群より選ばれるアミノ酸配列と60%以上の相同性を有するアミノ酸配列を含み、かつNF-Bの活性を上昇させる活性を有するポリペプチド。

【請求項4】 請求項1～3のいずれか1項に記載のポリペプチドをコードするDNA。

【請求項5】 配列番号6～10のいずれかで表される塩基配列を有するDNA。

【請求項6】 請求項4または5に記載のDNAとストリンジентな条件下でハイブリダイズするDNAであり、かつ転写因子NF-Bの活性を上昇させる活性を有するポリペプチドをコードするDNA。

【請求項7】 請求項4～6のいずれか1項に記載のDNAをベクターに組み込んで得られる組換え体ベクター。

【請求項8】 請求項4～6のいずれか1項に記載のDNAと相同な配列からなるRNAをベクターに組み込んで得られる組換え体ベクター。

【請求項9】 RNAが1本鎖である請求項8記載の組換え体ベクター。

【請求項10】 請求項7記載の組換え体ベクターを保有する形質転換体。

【請求項11】 形質転換体が、微生物、動物細胞、植物細胞、および昆虫細胞からなる群より選ばれる形質転換体である、請求項10記載の形質転換体。

【請求項12】 微生物が、Escherichia属に属する微生物である、請求項11記載の形質転換体。

【請求項13】 動物細胞が、マウス・ミエローマ細胞、ラット・ミエローマ細胞、マウス・ハイブリドーマ細胞、CHO細胞、BHK細胞、アフリカミドリザル腎臓細胞、Namalwa細胞、Namalwa KJM-1細胞、ヒト胎児腎臓細胞およびヒト白血病細胞から選ばれる動物細胞である、請求項11記載の形質転換体。

【請求項14】 昆虫細胞が、Spodoptera frugiperdaの卵巣細胞、Trichoplusia niの卵巣細胞およびカイコの卵巣細胞から選ばれる昆虫細胞である、請求項11記載の形質転換体。

【請求項15】 形質転換体が、非ヒトトランスジェニック動物またはトランスジェニック植物である、請求項

10記載の形質転換体。

【請求項16】 請求項10～14のいずれか1項に記載の形質転換体を培地に培養し、培養物中に請求項1～3のいずれか1項に記載のポリペプチドを生成、蓄積させ、該培養物から該ポリペプチドを採取することを特徴とする、該ポリペプチドの製造方法。

【請求項17】 請求項7記載の組換え体DNAを保有する非ヒトトランスジェニック動物を飼育し、請求項1～3のいずれか1項に記載のポリペプチドを該動物中に生成、蓄積させ、該動物中より該ポリペプチドを採取することを特徴とする、該ポリペプチドの製造方法。

【請求項18】 蓄積が動物のミルク中であることを特徴とする、請求項17記載の製造法。

【請求項19】 請求項7記載の組換え体DNAを保有するトランスジェニック植物を栽培し、請求項1～3のいずれか1項に記載のポリペプチドを該植物中に生成、蓄積させ、該植物中より該ポリペプチドを採取することを特徴とする、該ポリペプチドの製造法。

【請求項20】 請求項4～6のいずれか1項に記載のDNAを用い、in vitroでの転写・翻訳系により、該DNAのコードするポリペプチドを合成することを特徴とする、該ポリペプチドの製造法。

【請求項21】 請求項1～3のいずれか1項に記載のポリペプチドを認識する抗体。

【請求項22】 請求項4～6のいずれか1項に記載のDNAの塩基配列中の連続した5～60塩基からなる配列を有するオリゴヌクレオチドまたは該ヌクレオチドと相補的な配列を有するオリゴヌクレオチド。

【請求項23】 請求項4～6のいずれか1項に記載のDNAまたは請求項22記載のオリゴヌクレオチドをプローブとして用いてハイブリダイゼーションを行うことを含む、請求項1～3のいずれか1項に記載のポリペプチドをコードするDNAの発現を検出する方法。

【請求項24】 請求項22記載のオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いたポリメラーゼ・チェーン・リアクションを行うことを含む、請求項1～3のいずれか1項に記載のポリペプチドをコードするDNAの発現を検出する方法。

【請求項25】 請求項4～6のいずれか1項に記載のDNAまたは請求項22記載のオリゴヌクレオチドを用い、ハイブリダイゼーション法により、請求項1～3のいずれか1項に記載のポリペプチドをコードするDNAの変異を検出する方法。

【請求項26】 請求項22記載のオリゴヌクレオチドを用いたポリメラーゼ・チェーン・リアクションを行うことを含む、請求項1～3のいずれか1項に記載のポリペプチドをコードするDNAの変異を検出する方法。

【請求項27】 感染や炎症を伴う疾患、異常な平滑筋細胞の分化増殖を伴う疾患、異常な線維芽細胞の活性化を伴う疾患、異常な滑膜組織の活性化を伴う疾患、膵臓

細胞の障害を伴う疾患、異常な破骨細胞の活性化を伴う疾患、異常な免疫細胞の活性化を伴う疾患、または異常な細胞増殖を伴う疾患を検出するために用いる、請求項23～26のいずれか1項に記載の方法。

【請求項28】 感染や炎症を伴う疾患が、微生物感染、HIV感染、慢性B型肝炎に代表される活動性慢性肝炎、慢性関節リウマチ、糸球体腎炎、乾癬、痛風、各種脳脊髄炎、うっ血性心不全、エンドトキシンショック、敗血症、移植片対宿主疾患、インスリン依存性糖尿病、外傷性脳損傷または炎症性腸疾患であり、異常な平滑筋細胞の分化増殖を伴う疾患が動脈硬化または再狭窄であり、異常な線維芽細胞の活性化を伴う疾患が肺線維症であり、異常な滑膜組織の活性化を伴う疾患がリウマチ性関節炎または変形性関節炎であり、脾臓細胞の障害を伴う疾患が糖尿病であり、異常な破骨細胞の活性化を伴う疾患が骨粗鬆症であり、異常な免疫細胞の活性化を伴う疾患がアレルギー、アトピー、喘息、花粉症、気道過敏または自己免疫疾患であり、異常な細胞増殖を伴う疾患が急性骨髄性白血病または悪性腫瘍である、請求項27記載の方法。

【請求項29】 請求項4～6のいずれか1項に記載のDNAまたは請求項22記載のオリゴヌクレオチドを用いることを特徴とする、請求項1～3のいずれか1項に記載のポリペプチドをコードするDNAの転写またはmRNAの翻訳を抑制する方法。

【請求項30】 請求項4～6のいずれか1項に記載のDNAまたは請求項22記載のオリゴヌクレオチドを用いることを特徴とする、請求項1～3のいずれか1項に記載のポリペプチドをコードするDNAのプロモーター領域および転写制御領域を取得する方法。

【請求項31】 請求項1～3のいずれか1項に記載のポリペプチドを含む医薬。

【請求項32】 請求項4～6のいずれか1項に記載のDNA、または請求項8若しくは9のいずれか1項に記載の組換え体ベクターを含む医薬。

【請求項33】 請求項21記載の抗体を含む医薬。

【請求項34】 請求項22記載のオリゴヌクレオチドを含む医薬。

【請求項35】 ポリペプチドが免疫賦活作用を有することを特徴とする請求項31記載の医薬。

【請求項36】 免疫賦活作用を介して抗腫瘍活性および抗ウイルス活性を誘導することを特徴とする請求項35記載の医薬。

【請求項37】 医薬が、感染や炎症を伴う疾患、異常な平滑筋細胞の分化増殖を伴う疾患、異常な線維芽細胞の活性化を伴う疾患、異常な滑膜組織の活性化を伴う疾患、脾臓細胞の障害を伴う疾患、異常な破骨細胞の活性化を伴う疾患、異常な免疫細胞の活性化を伴う疾患、異常な細胞増殖を伴う疾患または神経細胞の障害に基づく疾患の治療および/または予防のための医薬である、

請求項32～34のいずれか1項に記載の医薬。

【請求項38】 医薬が、感染や炎症を伴う疾患、異常な平滑筋細胞の分化増殖を伴う疾患、異常な線維芽細胞の活性化を伴う疾患、異常な滑膜組織の活性化を伴う疾患、脾臓細胞の障害を伴う疾患、異常な破骨細胞の活性化を伴う疾患、異常な免疫細胞の活性化を伴う疾患、または異常な細胞増殖を伴う疾患の診断のための医薬である、請求項32～34のいずれか1項に記載の医薬。

【請求項39】 感染や炎症を伴う疾患が、微生物感染、HIV感染、慢性B型肝炎に代表される活動性慢性肝炎、慢性関節リウマチ、糸球体腎炎、乾癬、痛風、各種脳脊髄炎、うっ血性心不全、エンドトキシンショック、敗血症、移植片対宿主疾患、インスリン依存性糖尿病、外傷性脳損傷または炎症性腸疾患であり、異常な平滑筋細胞の分化増殖を伴う疾患が動脈硬化または再狭窄であり、異常な線維芽細胞の活性化を伴う疾患が肺線維症であり、異常な滑膜組織の活性化を伴う疾患がリウマチ性関節炎または変形性関節炎であり、脾臓細胞の障害を伴う疾患が糖尿病であり、異常な破骨細胞の活性化を伴う疾患が骨粗鬆症であり、異常な免疫細胞の活性化を伴う疾患がアレルギー、アトピー、喘息、花粉症、気道過敏または自己免疫疾患であり、異常な細胞増殖を伴う疾患が急性骨髄性白血病または悪性腫瘍であり、神経細胞の障害に基づく疾患がアルツハイマー病または虚血性脳疾患である、請求項37または38記載の医薬。

【請求項40】 請求項1～3のいずれか1項に記載のポリペプチドを用いることを特徴とする、感染や炎症を伴う疾患、異常な平滑筋細胞の分化増殖を伴う疾患、異常な線維芽細胞の活性化を伴う疾患、異常な滑膜組織の活性化を伴う疾患、脾臓細胞障害を伴う疾患、異常な破骨細胞の活性化を伴う疾患、異常な免疫細胞の活性化を伴う疾患、異常な細胞増殖を伴う疾患または神経細胞の障害に基づく疾患の治療および/または予防のための医薬のスクリーニング方法。

【請求項41】 感染や炎症を伴う疾患が、微生物感染、HIV感染、慢性B型肝炎に代表される活動性慢性肝炎、慢性関節リウマチ、糸球体腎炎、乾癬、痛風、各種脳脊髄炎、うっ血性心不全、エンドトキシンショック、敗血症、移植片対宿主疾患、インスリン依存性糖尿病、外傷性脳損傷または炎症性腸疾患であり、異常な平滑筋細胞の分化増殖を伴う疾患が動脈硬化または再狭窄であり、異常な線維芽細胞の活性化を伴う疾患が肺線維症であり、異常な滑膜組織の活性化を伴う疾患がリウマチ性関節炎または変形性関節炎であり、脾臓細胞の障害を伴う疾患が糖尿病であり、異常な破骨細胞の活性化を伴う疾患が骨粗鬆症であり、異常な免疫細胞の活性化を伴う疾患がアレルギー、アトピー、喘息、花粉症、気道過敏または自己免疫疾患であり、異常な細胞増殖を伴う疾患が急性骨髄性白血病または悪性腫瘍であり、神経細胞の障害に基づく疾患がアルツハイマー病または虚血

性脳疾患である、請求項40記載の医薬のスクリーニング法。

【請求項42】 請求項40または41記載のスクリーニング方法により得られる、請求項1～3のいずれか1項に記載のポリペプチドに特異的に作用する医薬。

【請求項43】 請求項30記載の方法により得られる請求項1～3のいずれか1項に記載のポリペプチドをコードするDNAのプロモーター領域および転写制御領域を用いることを特徴とする、感染や炎症を伴う疾患、異常な平滑筋細胞の分化増殖を伴う疾患、異常な線維芽細胞の活性化を伴う疾患、異常な滑膜組織の活性化を伴う疾患、脾臓細胞障害を伴う疾患、異常な破骨細胞の活性化を伴う疾患、異常な免疫細胞の活性化を伴う疾患、異常な細胞増殖を伴う疾患または神経細胞の障害に基づく疾患の治療および/または予防のための医薬のスクリーニング方法。

【請求項44】 感染や炎症を伴う疾患が、微生物感染、HIV感染、慢性B型肝炎に代表される活動性慢性肝炎、慢性関節リウマチ、糸球体腎炎、乾癬、痛風、各種脳脊髄炎、うっ血性心不全、エンドトキシンショック、敗血症、移植片対宿主疾患、インスリン依存性糖尿病、外傷性脳損傷または炎症性腸疾患であり、異常な平滑筋細胞の分化増殖を伴う疾患が動脈硬化または再狭窄であり、異常な線維芽細胞の活性化を伴う疾患が肺線維症であり、異常な滑膜組織の活性化を伴う疾患がリウマチ性関節炎または変形性関節炎であり、脾臓細胞の障害を伴う疾患が糖尿病であり、異常な破骨細胞の活性化を伴う疾患が骨粗鬆症であり、異常な免疫細胞の活性化を伴う疾患がアレルギー、アトピー、喘息、花粉症、気道過敏または自己免疫疾患であり、異常な細胞増殖を伴う疾患が急性骨髄性白血病または悪性腫瘍であり、神経細胞の障害に基づく疾患がアルツハイマー病または虚血性脳疾患である、請求項43記載の医薬のスクリーニング方法。

【請求項45】 請求項43または44記載のスクリーニング方法により得られる、請求項1～3のいずれか1項に記載のポリペプチドをコードするDNAのプロモーター領域および転写制御領域に特異的に作用する医薬。

【請求項46】 請求項21記載の抗体を用いることを特徴とする、請求項1～3のいずれか1項に記載のポリペプチドの免疫学的検出法。

【請求項47】 請求項21記載の抗体を用いて、請求項1～3のいずれか1項に記載のポリペプチドを検出することを特徴とする免疫組織染色法。

【請求項48】 請求項21記載の抗体を用いることを特徴とする、請求項1～3のいずれか1項に記載のポリペプチドをコードするDNAの転写もしくは翻訳を抑制または促進する物質をスクリーニングする方法。

【請求項49】 請求項1～3のいずれか1項に記載のポリペプチドをコードするDNAの発現が一部または完

*全に抑制されているノックアウト非ヒト動物。

【請求項50】 請求項1～3のいずれか1項に記載のポリペプチドの有する活性が一部または完全に抑制されているノックアウト非ヒト動物。

【請求項51】 請求項1～3のいずれか1項に記載のポリペプチドを用いることを特徴とする、請求項1～3のいずれか1項に記載のポリペプチドのNF- κ B活性化に対してドミナントネガティブ活性を有する変異体ポリペプチドのスクリーニング方法。

【請求項52】 請求項51記載のスクリーニング方法により得られる、請求項1～3のいずれか1項に記載のポリペプチドのNF- κ B活性化に対してドミナントネガティブ活性を有する変異体ポリペプチド。

【請求項53】 請求項52記載の変異体ポリペプチドをコードするDNA。

【請求項54】 請求項1～3のいずれか1項に記載のポリペプチドを用いることを特徴とする、請求項1～3のいずれか1項に記載のポリペプチドのNF- κ B活性化に対して該活性化を上昇させる変異を有する変異体ポリペプチドのスクリーニング方法。

【請求項55】 請求項54記載のスクリーニング方法により取得される、請求項1～3のいずれか1項に記載のポリペプチドのNF- κ B活性化能が上昇した変異体ポリペプチド。

【請求項56】 請求項55記載の変異体ポリペプチドをコードするDNA。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、新規なポリペプチド、該ポリペプチドをコードするDNA、該DNAをベクターに組み込んで得られる組換え体DNA、該組換え体DNAを保有する形質転換体、該形質転換体を利用した該ポリペプチドの製造法、該DNAより得られるオリゴヌクレオチドを用いた該DNAの発現量と変異の解析法、該ポリペプチドを認識する抗体、該抗体を用いた免疫組織染色法、該ポリペプチドに欠失・挿入・置換等により変異を導入した活性上昇改変体、該ポリペプチドに欠失・挿入・置換等により変異を導入したドミナントネガティブ変異体、該ポリペプチドの活性を変動させる化合物のスクリーニング法、該DNAの発現を変動させる化合物のスクリーニング法、該DNAの転写を司るプロモーターDNA、該プロモーターDNAによる転写の効率を変動させる化合物のスクリーニング法、これらのスクリーニング法により得られる化合物、および該DNAを欠損または変異させたノックアウト動物等に関する。

【0002】

【従来技術】nuclear factor- κ B(以下、NF- κ B)は、1986年にB細胞における免疫グロブリン軽鎖(Ig light chain)遺伝子の発現にかかわるエンハンサーに結合する転写因子として同定された[Cell, 4

6, 705-716 (1986)、Cell, 47, 921-928 (1986)]。____
 【0003】NF- κ Bは、Relファミリーに属する
 複数の分子のヘテロダイマーで構成されており、多くの
 細胞で一般に誘導されてくるNF- κ Bは、p50とRe
 lAのヘテロダイマーと考えられる [Mol. Cell. Bio
 l., 12, 674-684 (1992)]。NF- κ Bを制御する因子
 I κ Bの存在も明らかとなっており、I κ Bは、無刺激
 時にはNF- κ Bと複合体を形成しており、NF- κ B
 の核移行シグナルをマスクすることにより、核移行を抑制
 している [Science, 242, 540-546 (1988)、Cell, 6 10
 5, 1281-1289 (1991)、Cell, 68, 1109-1120 (1992)、E
 MBO J., 12, 3893-3901 (1993)、Cell, 78, 773-785 (19
 94)、Cell, 87, 13-20 (1996)]。腫瘍壊死因子 (以
 下、TNF- α) 等で細胞を刺激すると、I κ Bは後述
 するシグナル伝達分子により32および36番目のセリン
 がリン酸化、続いてユビキチン化され、プロテアソーム
 によって分解される。I κ Bが分解されると、NF- κ B
 は核への移行が可能となり、エンハンサーを持った
 様々な遺伝子発現を誘導するようになる [Cell, 80, 529
 -532 (1995)、Cell, 80, 573-582 (1995)]。 20

【0004】NF- κ Bを活性化する物質あるいは刺激
 として、サイトカイン [TNF- α 、腫瘍壊死因子
 (以下、TNF- α)、インターロイキン1 (以下、
 IL-1)、インターロイキン1 (以下、IL-1
)、インターロイキン2 (以下、IL-2)、白血病
 阻止因子 (以下、LIF) 等]、T細胞マイトジェン
 (抗原刺激、レクチン、抗T細胞レセプター抗体、抗C
 D2抗体、抗CD3抗体、抗CD28抗体、Caイオノ
 フォア)、B細胞マイトジェン (抗IgM抗体、ant
 i-CD40)、ロイコトリエン、リポ多糖 (以下、L 30
 PS)、ホルボールミリスチンアセテート (以下、P
 MA)、寄生体感染、ウイルス感染 [ヒト免疫不全症ウ
 イルス (以下、HIV-1)、ヒトT細胞白血病ウイル
 ス1 (以下、HTLV-1)、B型肝炎ウイルス (以
 下、HBV)、エプスタイン-バールウイルス (以下、
 EBV)、サイトメガロウイルス (以下、CMV)、単
 純ヘルペスウイルス1 (以下、HSV-1)、ヒトヘル
 ペスウイルス6 (以下、HHV-6)、ニューカッスル
 病ウイルス (以下、NDV)、センダイウイルス、アデ
 ノウイルス等]、ウイルス産物 (二本鎖RNA、Ta 40
 x、HBx、EBNA-2、LMP-1等)、DNA破
 壊物質類、タンパク質合成インヒビター類 (例えばシク
 ロヘキシミド)、紫外線、放射線、酸化ストレス等が知
 られている [Biochemica et Biophysica Acta, 1072, 6
 3-80 (1991)、Annu. Rev. Cell Biol. 10, 405-455 (19
 94)]。

【0005】また、NF- κ Bの活性化により誘導発現
 される分子としては、(1)炎症反応・免疫応答に関る
 分子群、(2)アポトーシスの抑制に関る分子群、
 (3)発生・分化に関る分子群、(4)ウイルスに関す 50

る分子群等が知られており [Biochemica et Biophysica
 Acta, 1072, 63-80 (1991)、Annu. Rev. Cell Biol.
 10, 405-455 (1994)]、誘導発現は多岐にわたってい
 る。

【0006】誘導発現される分子として、具体的には、
 サイトカイン [IL-1、IL-1、IL-2、イン
 ターロイキン3 (以下、IL-3)、インターロイキ
 ン6 (以下、IL-6)、インターロイキン8 (以下、
 IL-8)、インターロイキン12 (以下、IL-1
 2)、TNF- α 、TNF- β 、インターフェロン
 (以下、IFN- α)]、細胞増殖因子 [マクロファ
 ジコロニー刺激因子 (以下、M-CSF)、顆粒球マク
 ロファージコロニー刺激因子 (以下、GM-CSF)、
 顆粒球コロニー刺激因子 (以下、G-CSF)]、レセ
 プター [インターロイキン1レセプター (以下、IL-
 1R) アンタゴニスト、インターロイキン2レセプター
 (以下、IL-2R)、免疫グロブリン 軽鎖 (以
 下、Ig- κ -LC)、T細胞レセプター、主要組織
 適合抗原 (以下、MHC) クラスI、II、2-ミク
 ログロブリン]、接着因子 [endothelial leucocyte ad
 hesion molecule-1 (以下、ELAM-1)、vascula r ce
 ll adhesion molecule-1 (以下、VCAM-1)、intercellula
 r adhesion molecule-1 (以下、ICAM-1)]、急性
 期タンパク質 (血清アミロイドA前駆タンパク質、アン
 ギオテンシノーゲン、補体因子B、補体因子C3、補体
 因子C4)、誘導型NO合成酵素 (以下、iNOS)、
 シクロオキシゲナーゼ2 (以下、COX-2)、血管内
 皮細胞成長因子受容体 (以下、VEGF-R2)、転写
 因子 [c-Rel、p105、I κ B、c-Myc、
 インターフェロン調節因子 (以下、IRF-1)]、ピ
 メンチン、ウイルス [HIV-1、HIV-2、アカゲ
 ザル免疫不全症ウイルス (以下、SIVmac)、CM
 V、HSV-1、アカゲザルウイルス40 (以下、SV
 40)、アデノウイルス] 等が知られている [蛋白質核
 酸酵素, 41, 1198-1209 (1996)]。

【0007】NF- κ B活性化に関するシグナル伝達
 は、TNF- α およびIL-1について解明が進んでい
 る。TNF- α からの活性化シグナルにおいては、TN
 Fレセプター (TNFR1またはTNFR2)、TNF re
 ceptor-associated death domain protein (以下、TR
 ADD)、TNFR-associated factor-2 (以下、TRAF
 2)、receptor interacting protein (以下、RI
 P)、NF- κ B-inducing kinase (以下、NIK)、I
 B kinase (以下、IKK) [IKK α 、IKK
 β 、IKK γ (NEMO)]、IKK-co mplex-associate
 d protein (以下、IKAP) 等が活性化分子として見
 出されている。 [EMBO J., 14, 2876-2883 (1995)、Sc
 ience, 267, 1485-1489 (1995)、GENES & DEVELOPMENT,
 9, 1586-1597 (1995)、Cell, 84, 853-862 (1996)、Nat 50
 ure, 388, 548-554 (1997)、Cell, 90, 373-383 (199

7)、Science, 278, 860-866 (1997)、Science, 278, 866-869 (1997)、Cell, 91, 243-252 (1997)、Nature, 395, 292-296 (1998)。

【0008】IL-1からの活性化シグナルにおいては、IL-1 receptor 1(以下、IL-1RI)、IL-1 receptor accessory protein(以下、IL-1RAP)、Myd88、IL-1 receptor-associated kinase(以下、IRAK)、TNF receptor-associated factor 6(以下、TRAF6)、TAK1 binding protein 1(以下、TAB1)、Transforming growth factor- β -activated kinase 1(TAK1)等が活性化分子として見出されている〔Science, 270, 2008-2011 (1995)、Nature, 398, 252-256 (1999)〕。

【0009】一方、NF- κ Bをリン酸化する酵素(NF- κ Bキナーゼ)がNF- κ Bシグナルの増強に関わっているとも考えられてきた〔J. Biol. Chem. 268, 26790-26795 (1993)、EMBO J. 13, 4597-4607 (1994)〕。以上のように、NF- κ Bの活性化には非常に多くの分子が関与していることは知られているが、同定された全ての分子の役割が解明されているわけではない。紫外線や酸化ストレス等のTNF- α やIL-1以外の刺激では、NF- κ Bの活性化に関わる分子は、ほとんど解明されていないのが実状である。さらに、Relファミリー分子の組織特異的発現を見ても、組織特異的なNF- κ Bの活性化機構が予想される〔Science, 284, 313-316 (1999)、Science, 284, 316-320 (1999)、Science, 284, 321-325 (1999)、Immunity, 10, 421-429 (1999)、Nature Genet, 22, 74-77 (1999)〕。

【0010】以上より、NF- κ Bの活性化に関わっている未知の分子は、生体内にまだ多く存在すると考えられ、これらの遺伝子を発見し利用することは、病態の解明あるいはNF- κ Bが関与する疾患の治療にとって、大変有用である。前述したNF- κ Bを活性化する分子群あるいはNF- κ Bの活性化によって誘導発現する分子群からもわかるように、NF- κ Bは生体内の免疫応答の昂進において非常に重要な役割を担っている。抗腫瘍あるいは抗ウイルス活性を有するTNF- α やIL-1等のサイトカインは、その作用の主要部分をNF- κ Bの活性化を通して発揮している。また、NF- κ Bにより誘導発現するIL-1、IL-2、IL-12、TNF- α 、IFN- γ 等のサイトカインも、生体や組織における免疫反応を昂進し、抗腫瘍あるいは抗ウイルス活性を有している。

【0011】このように、実際の疾患においてNF- κ Bの活性化が、腫瘍やウイルスを抑制することは周知の事実であり、生体内あるいは生体の一部組織においてNF- κ Bの活性を人為的に上昇させることは、免疫応答の昂進あるいは抗腫瘍・抗ウイルス活性の増強において非常に効果があると考えられる。従って、NF- κ Bを活性化するポリペプチドおよびそれをコードするDNA

の発見および取得、さらにはNF- κ B活性化上昇変異体の発見および取得は、抗腫瘍・抗ウイルスをターゲットとした医薬において大変有用である。

【0012】一方で、NF- κ Bによって誘導発現するIL-1、IL-6、IL-8、TNF- α 等のサイトカインは、炎症性サイトカインとも呼ばれ、これらのサイトカインによって過度に昂進された免疫応答が各種疾患の原因ともなっている。これらのサイトカインは、マクロファージ、好中球、リンパ球等を活性化し、炎症組織において増悪の方向に働く。また、NF- κ Bにより誘導されたELAM-1、VCAM-1、ICAM-1等の接着分子は、白血球の組織への浸潤を促進し、炎症組織での白血球の集積を昂進する〔Mol. Cell. Biol., 14, 5701 (1994)、Mol. Cell. Biol., 14, 5820 (1994)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 3943 (1993)〕。iNOSやCOX-2等の酵素は、それぞれ一酸化窒素(以下、NO)やプロスタグランジンE2を産生し、急性炎症や血管の拡張に作用する。

【0013】すなわち、NF- κ Bは、これらの細胞あるいは分子を介して、急性炎症および慢性炎症において中心的役割を担っていると考えられる。実際に、慢性関節リウマチの滑膜、クローン病の腸管、喘息の肺組織等では、NF- κ Bの活性化が報告されている。したがって、アレルギー、アトピー、喘息、花粉症、気道過敏、自己免疫疾患、慢性B型肝炎、慢性C型肝炎、移植片対宿主疾患、インスリン依存性・非依存性糖尿病、外傷性脳損傷、炎症性腸疾患、敗血症、微生物感染等、炎症が関与する疾患全般において、NF- κ Bは、病態解明および治療薬開発の重要なターゲットである。

【0014】癌との関連では、バーキットリンパ腫(Burkitt lymphoma)、ホジキン(Hodgkin)病、T、B、NK細胞リンパ腫、EBV関連胃癌等が、EBVが原因とされる。特にEBVがコードするlatent membrane protein(以下、LMP1)は、TRADDやTRAFと結合が可能で、宿主のNF- κ Bを活性化し、不死化に関与していると考えられる〔EMBO J., 16, 6478-6485 (1997)、J. Virology, 69, 2168-2174 (1995)、Oncogene, 18, 7161-7167 (1999)、Gene Therapy, 5, 905-912 (1998)〕。また、成人T細胞白血病(adult T-cell leukemia: ATL)は、HTLV-1による感染が原因であり、特にHTLV-1がコードするTaxが、IL-6への結合あるいはIKKの活性化を通じて、NF- κ Bを活性化し、アポトーシスを阻害していると考えられる〔J. Biol. Chem., 273, 15891-15894 (1999)、J. Biol. Chem., 274, 34417-34424 (1999)〕。NF- κ Bが誘導する各種接着分子は、癌細胞の転移に関与しているし、NF- κ Bによるアポトーシス阻害活性やVEGF-R2を介した血管新生は、癌細胞の増殖に関与している。以上のように、NF- κ Bは、癌の分野においても重要な創薬あるいは治療ターゲットである。

【0015】さらに、エイズ等、癌以外のNF- Bを転写因子として含むウイルス性疾患においても、NF- Bは重要な創薬あるいは治療ターゲットである。また、虚血性脳疾患等の虚血再還流障害もNF- B活性化による細胞浸潤、アポトーシスの抑制等が原因という報告があり、動脈硬化、再狭窄等も含め、平滑筋細胞の異常な分化増殖を伴う疾患の発症にNF- Bが重要な役割を果たしていると考えられる。

【0016】近年ステロイドの抗炎症作用やアスピリンの抗炎症作用等がNF- Bの阻害によるものであることが明らかにされてきたが〔Science, 270, 283-286 (1995)、Science, 270, 286-290 (1995)、Molecular and Cellular Biology, 15, 943-953 (1995)〕、NF- Bを特異的に阻害するものとしてスクリーニングされた薬剤はない。既存のNF- Bの阻害に関わるものとして知られてきた薬剤は副作用が強いことや選択性・特異性が低い等、問題点も多く、強力かつ副作用の少ない新しい抗炎症薬の開発を目的として、NF- Bをターゲットにした化合物探索が行われている。以上より、NF- Bを活性化する新規ポリペプチドは産業上有用であり、これらポリペプチドおよびそれをコードするDNAの取得が求められてきた。

【0017】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、アレルギー、アトピー、喘息、花粉症、気道過敏、自己免疫疾患、移植片対宿主疾患等の異常な免疫細胞の活性化を伴う疾患、エンドトキシンショック、敗血症、微生物感染、慢性B型肝炎、慢性C型肝炎、インスリン依存性・非依存性糖尿病、糸球体腎炎、乾癬、痛風、各種脳脊髄炎、うっ血性心不全、外傷性脳損傷、炎症性腸疾患等の感染や炎症を伴う疾患、パーキットリンパ腫、ホジキン病、各種リンパ腫、成人T細胞白血病、悪性腫瘍等の異常な細胞増殖を伴う疾患、関節リウマチ、変形性関節炎等の異常な線維芽細胞や滑膜組織の活性化を伴う疾患、エイズ等のウイルス性疾患、虚血性脳疾患の神経細胞の障害に基づく疾患、アルツハイマー病、パーキンソン病等の神経細胞の障害に基づく疾患、動脈硬化・再狭窄等の平滑筋細胞の異常な分化増殖を伴う疾患、多臓器不全、全身性炎症反応症候群（SIRS：systemic inflammatory response syndrome）、成人呼吸窮迫症候群（ARDS：adult respiratory distress syndrome）等の治療薬、予防薬および診断薬の探索、開発に有用なポリペプチド、該ポリペプチドをコードするDNA、該DNAのアンチセンスDNA/RNA、該DNAを用いた遺伝子治療、該ポリペプチドを認識する抗体、該ポリペプチドの活性上昇改変体、該ポリペプチドのドミナントネガティブ変異体、およびこれらの利用法を提供することにある。

【0018】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記課題

を解決するべく鋭意検討を行った結果、新規なアミノ酸配列を含むNF- Bの活性化を促す因子および該因子をコードするDNAを取得することに成功し、本発明を完成させるに至った。即ち、本発明は以下の(1)～(54)に関する。

【0019】(1) 配列番号1～5のいずれかで表されるアミノ酸配列からなる群より選ばれるアミノ酸配列を有するポリペプチド。

(2) 配列番号1～5のいずれかで表されるアミノ酸配列からなる群より選ばれるアミノ酸配列において1以上のアミノ酸が欠失、置換および/または付加されたアミノ酸配列からなり、かつNF- Bの活性を上昇させる活性を有するポリペプチド。

【0020】(3) 配列番号1～5のいずれかで表されるアミノ酸配列からなる群より選ばれるアミノ酸配列と60%以上の相同性を有するアミノ酸配列を含み、かつNF- Bの活性を上昇させる活性を有するポリペプチド。

(4) (1)～(3)のいずれか一項に記載のポリペプチドをコードするDNA。

(5) 配列番号6～10のいずれかで表される塩基配列を有するDNA。

【0021】(6) (4)または(5)に記載のDNAとストリンジентな条件下でハイブリダイズするDNAであり、かつ転写因子NF- Bの活性を上昇させる活性を有するポリペプチドをコードするDNA。

(7) (4)～(6)のいずれか1項に記載のDNAをベクターに組み込んで得られる組換え体ベクター。

(8) (4)～(6)のいずれか1項に記載のDNAと相同な配列からなるRNAをベクターに組み込んで得られる組換え体ベクター。

【0022】(9) RNAが1本鎖である(8)記載の組換え体ベクター。

(10) (7)記載の組換え体ベクターを保有する形質転換体。

(11) 形質転換体が、微生物、動物細胞、植物細胞、および昆虫細胞からなる群より選ばれる形質転換体である、(10)記載の形質転換体。

(12) 微生物が、*Escherichia*属に属する微生物である、(11)記載の形質転換体。

【0023】(13) 動物細胞が、マウス・ミエローマ細胞、ラット・ミエローマ細胞、マウス・ハイブリドーマ細胞、CHO細胞、BHK細胞、アフリカミドリザル腎臓細胞、*Namalwa*細胞、*Namalwa* KJM-1細胞、ヒト胎児腎臓細胞およびヒト白血病細胞から選ばれる動物細胞である、(11)記載の形質転換体。

(14) 昆虫細胞が、*Spodoptera frugiperda*の卵巣細胞、*Trichoplusia ni*の卵巣細胞およびカイコの卵巣細胞から選ばれる昆虫細胞である、(11)記載の形質

転換体。

【0024】(15) 形質転換体が、非ヒトトランスジェニック動物またはトランスジェニック植物である、(10)記載の形質転換体。

(16) (10)~(14)のいずれか1項に記載の形質転換体を培地に培養し、培養物中に(1)~(3)のいずれか1項に記載のポリペプチドを生成、蓄積させ、該培養物から該ポリペプチドを採取することを特徴とする、該ポリペプチドの製造方法。

【0025】(17) (7)記載の組換え体DNAを10 保有する非ヒトトランスジェニック動物を飼育し、(1)~(3)のいずれか1項に記載のポリペプチドを該動物中に生成、蓄積させ、該動物中より該ポリペプチドを採取することを特徴とする、該ポリペプチドの製造方法。

(18) 蓄積が動物のミルク中であることを特徴とする、(17)記載の製造法。

【0026】(19) (7)記載の組換え体DNAを10 保有するトランスジェニック植物を栽培し、(1)~(3)のいずれか1項に記載のポリペプチドを該植物中に生成、蓄積させ、該植物中より該ポリペプチドを採取することを特徴とする、該ポリペプチドの製造法。

(20) (4)~(6)のいずれか1項に記載のDNAを用い、*in vitro*での転写・翻訳系により、該DNAのコードするポリペプチドを合成することを特徴とする、該ポリペプチドの製造法。

【0027】(21) (1)~(3)のいずれか1項に記載のポリペプチドを認識する抗体。

(22) (4)~(6)のいずれか1項に記載のDNAの塩基配列中の連続した5~60塩基からなる配列を30 有するオリゴヌクレオチドまたは該ヌクレオチドと相補的な配列を有するオリゴヌクレオチド。

(23) (4)~(6)のいずれか1項に記載のDNAまたは(22)記載のオリゴヌクレオチドをプローブとして用いてハイブリダイゼーションを行うことを含む、(1)~(3)のいずれか1項に記載のポリペプチドをコードするDNAの発現を検出する方法。

【0028】(24) (22)記載のオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いたポリメラーゼ・チェーン・リアクションを行うことを含む、(1)~(3)のい40 ずれか1項に記載のポリペプチドをコードするDNAの発現を検出する方法。

(25) (4)~(6)のいずれか1項に記載のDNAまたは(22)記載のオリゴヌクレオチドを用い、ハイブリダイゼーション法により、(1)~(3)のい40 ずれか1項に記載のポリペプチドをコードするDNAの変異を検出する方法。

【0029】(26) (22)記載のオリゴヌクレオチドを用い、ポリメラーゼ・チェーン・リアクションを行うことを含む、(1)~(3)のいずれか1項に記載50

のポリペプチドをコードするDNAの変異を検出する方法。

(27) 感染や炎症を伴う疾患、異常な平滑筋細胞の分化増殖を伴う疾患、異常な線維芽細胞の活性化を伴う疾患、異常な滑膜組織の活性化を伴う疾患、脾臓細胞の障害を伴う疾患、異常な破骨細胞の活性化を伴う疾患、異常な免疫細胞の活性化を伴う疾患、または異常な細胞増殖を伴う疾患を検出するために用いる、(23)~(26)のいずれか1項に記載の方法。

【0030】(28) 感染や炎症を伴う疾患が、微生物感染、HIV感染、慢性B型肝炎に代表される活動性慢性肝炎、慢性関節リウマチ、糸球体腎炎、乾癬、痛風、各種脳脊髄炎、うっ血性心不全、エンドトキシンショック、敗血症、移植片対宿主疾患、インスリン依存性糖尿病、外傷性脳損傷または炎症性腸疾患であり、異常な平滑筋細胞の分化増殖を伴う疾患が動脈硬化または再狭窄であり、異常な線維芽細胞の活性化を伴う疾患が肺線維症であり、異常な滑膜組織の活性化を伴う疾患がリウマチ性関節炎または変形性関節炎であり、脾臓細胞の障害を伴う疾患が糖尿病であり、異常な破骨細胞の活性化を伴う疾患が骨粗鬆症であり、異常な免疫細胞の活性化を伴う疾患がアレルギー、アトピー、喘息、花粉症、気道過敏または自己免疫疾患であり、異常な細胞増殖を伴う疾患が急性骨髄性白血病または悪性腫瘍である、(27)記載の方法。

【0031】(29) (4)~(6)のいずれか1項に記載のDNAまたは(22)記載のオリゴヌクレオチドを用いることを特徴とする、(1)~(3)のいずれか1項に記載のポリペプチドをコードするDNAの転写またはmRNAの翻訳を抑制する方法。

(30) (4)~(6)のいずれか1項に記載のDNAまたは(22)記載のオリゴヌクレオチドを用いることを特徴とする、(1)~(3)のいずれか1項に記載のポリペプチドをコードするDNAのプロモーター領域および転写制御領域を取得する方法。

【0032】(31) (1)~(3)のいずれか1項に記載のポリペプチドを含む、医薬。

(32) (4)~(6)のいずれか1項に記載のDNA、または(8)若しくは(9)のいずれか1項に記載の組換え体ベクターを含む医薬。

(33) (21)記載の抗体を含む医薬。

(34) (22)記載のオリゴヌクレオチドを含む医薬。

【0033】(35) ポリペプチドが免疫賦活作用を有することを特徴とする(31)記載の医薬。

(36) 免疫賦活作用を介して抗腫瘍活性および抗ウイルス活性を誘導することを特徴とする(35)記載の医薬。

(37) 医薬が、感染や炎症を伴う疾患、異常な平滑筋細胞の分化増殖を伴う疾患、異常な線維芽細胞の活性

化を伴う疾患、異常な滑膜組織の活性化を伴う疾患、膵臓細胞の障害を伴う疾患、異常な破骨細胞の活性化を伴う疾患、異常な免疫細胞の活性化を伴う疾患、異常な細胞増殖を伴う疾患または神経細胞の障害に基づく疾患の治療および/または予防のための医薬である、(32)~(34)のいずれか1項に記載の医薬。

【0034】(38) 医薬が、感染や炎症を伴う疾患、異常な平滑筋細胞の分化増殖を伴う疾患、異常な線維芽細胞の活性化を伴う疾患、異常な滑膜組織の活性化を伴う疾患、膵臓細胞の障害を伴う疾患、異常な破骨細胞の活性化を伴う疾患、異常な免疫細胞の活性化を伴う疾患、または異常な細胞増殖を伴う疾患の診断のための医薬である、(32)~(34)のいずれか1項に記載の医薬。

【0035】(39) 感染や炎症を伴う疾患が、微生物感染、HIV感染、慢性B型肝炎に代表される活動性慢性肝炎、慢性関節リウマチ、糸球体腎炎、乾癬、痛風、各種脳脊髄炎、うっ血性心不全、エンドトキシンショック、敗血症、移植片対宿主疾患、インスリン依存性糖尿病、外傷性脳損傷または炎症性腸疾患であり、異常な平滑筋細胞の分化増殖を伴う疾患が動脈硬化または再狭窄であり、異常な線維芽細胞の活性化を伴う疾患が肺線維症であり、異常な滑膜組織の活性化を伴う疾患がリウマチ性関節炎または変形性関節炎であり、膵臓細胞の障害を伴う疾患が糖尿病であり、異常な破骨細胞の活性化を伴う疾患が骨粗鬆症であり、異常な免疫細胞の活性化を伴う疾患がアレルギー、アトピー、喘息、花粉症、気道過敏または自己免疫疾患であり、異常な細胞増殖を伴う疾患が急性骨髄性白血病または悪性腫瘍であり、神経細胞の障害に基づく疾患がアルツハイマー病または虚血性脳疾患である、(37)または(38)記載の医薬。

【0036】(40) (1)~(3)のいずれか1項に記載のポリペプチドを用いることを特徴とする、感染や炎症を伴う疾患、異常な平滑筋細胞の分化増殖を伴う疾患、異常な線維芽細胞の活性化を伴う疾患、異常な滑膜組織の活性化を伴う疾患、膵臓細胞障害を伴う疾患、異常な破骨細胞の活性化を伴う疾患、異常な免疫細胞の活性化を伴う疾患、異常な細胞増殖を伴う疾患または神経細胞の障害に基づく疾患の治療および/または予防のための医薬のスクリーニング方法。

【0037】(41) 感染や炎症を伴う疾患が、微生物感染、HIV感染、慢性B型肝炎に代表される活動性慢性肝炎、慢性関節リウマチ、糸球体腎炎、乾癬、痛風、各種脳脊髄炎、うっ血性心不全、エンドトキシンショック、敗血症、移植片対宿主疾患、インスリン依存性糖尿病、外傷性脳損傷または炎症性腸疾患であり、異常な平滑筋細胞の分化増殖を伴う疾患が動脈硬化または再狭窄であり、異常な線維芽細胞の活性化を伴う疾患が肺線維症であり、異常な滑膜組織の活性化を伴う疾患がリ

ウマチ性関節炎または変形性関節炎であり、膵臓細胞の障害を伴う疾患が糖尿病であり、異常な破骨細胞の活性化を伴う疾患が骨粗鬆症であり、異常な免疫細胞の活性化を伴う疾患がアレルギー、アトピー、喘息、花粉症、気道過敏または自己免疫疾患であり、異常な細胞増殖を伴う疾患が急性骨髄性白血病または悪性腫瘍であり、神経細胞の障害に基づく疾患がアルツハイマー病または虚血性脳疾患である、(40)記載の医薬のスクリーニング法。

【0038】(42) (40)または(41)記載のスクリーニング方法により得られる、(1)~(3)のいずれか1項に記載のポリペプチドに特異的に作用する医薬。

(43) (30)記載の方法により得られる(1)~(3)のいずれか1項に記載のポリペプチドをコードするDNAのプロモーター領域および転写制御領域を用いることを特徴とする、感染や炎症を伴う疾患、異常な平滑筋細胞の分化増殖を伴う疾患、異常な線維芽細胞の活性化を伴う疾患、異常な滑膜組織の活性化を伴う疾患、膵臓細胞障害を伴う疾患、異常な破骨細胞の活性化を伴う疾患、異常な免疫細胞の活性化を伴う疾患、異常な細胞増殖を伴う疾患または神経細胞の障害に基づく疾患の治療および/または予防のための医薬のスクリーニング方法。

【0039】(44) 感染や炎症を伴う疾患が、微生物感染、HIV感染、慢性B型肝炎に代表される活動性慢性肝炎、慢性関節リウマチ、糸球体腎炎、乾癬、痛風、各種脳脊髄炎、うっ血性心不全、エンドトキシンショック、敗血症、移植片対宿主疾患、インスリン依存性糖尿病、外傷性脳損傷または炎症性腸疾患であり、異常な平滑筋細胞の分化増殖を伴う疾患が動脈硬化または再狭窄であり、異常な線維芽細胞の活性化を伴う疾患が肺線維症であり、異常な滑膜組織の活性化を伴う疾患がリウマチ性関節炎または変形性関節炎であり、膵臓細胞の障害を伴う疾患が糖尿病であり、異常な破骨細胞の活性化を伴う疾患が骨粗鬆症であり、異常な免疫細胞の活性化を伴う疾患がアレルギー、アトピー、喘息、花粉症、気道過敏または自己免疫疾患であり、異常な細胞増殖を伴う疾患が急性骨髄性白血病または悪性腫瘍であり、神経細胞の障害に基づく疾患がアルツハイマー病または虚血性脳疾患である、(43)記載の医薬のスクリーニング方法。

【0040】(45) (43)または(44)記載のスクリーニング方法により得られる、(1)~(3)のいずれか1項に記載のポリペプチドをコードするDNAのプロモーター領域および転写制御領域に特異的に作用する医薬。

(46) (21)記載の抗体を用いることを特徴とする、(1)~(3)のいずれか1項に記載のポリペプチドの免疫学的検出法。

(47) (21)記載の抗体を用いて、(1)～(3)のいずれか1項に記載のポリペプチドを検出することを特徴とする免疫組織染色法。

【0041】(48) (21)記載の抗体を用いることを特徴とする、(1)～(3)のいずれか1項に記載のポリペプチドをコードするDNAの転写もしくは翻訳を抑制または促進する物質をスクリーニングする方法。

(49) (1)～(3)のいずれか1項に記載のポリペプチドをコードするDNAの発現が一部または完全に抑制されているノックアウト非ヒト動物。

(50) (1)～(3)のいずれか1項に記載のポリペプチドの有する活性が一部または完全に抑制されているノックアウト非ヒト動物。

【0042】(51) (1)～(3)のいずれか1項に記載のポリペプチドを用いることを特徴とする、

(1)～(3)のいずれか1項に記載のポリペプチドのNF-B活性化に対してドミナントネガティブ活性を有する変異体ポリペプチドのスクリーニング方法。

(52) (51)記載のスクリーニング方法により取得される、(1)～(3)のいずれか1項に記載のポリペプチドのNF-B活性化に対してドミナントネガティブ活性を有する変異体ポリペプチド。

(53) (52)記載の変異体ポリペプチドをコードするDNA。

【0043】(54) (1)～(3)のいずれか1項に記載のポリペプチドを用いることを特徴とする、

(1)～(3)のいずれか1項に記載のポリペプチドのNF-B活性化に対して該活性化を上昇させる変異を有する変異体ポリペプチドのスクリーニング方法。

(55) (54)記載のスクリーニング方法により取得される、(1)～(3)のいずれか1項に記載のポリペプチドのNF-B活性化能が上昇した変異体ポリペプチド。

(56) (55)記載の変異体ポリペプチドをコードするDNA。

【0044】

【発明の実施の形態】本発明のポリペプチドとしては、
1. 配列番号1～5のいずれかで表されるアミノ酸配列からなる群より選ばれるアミノ酸配列を有するポリペプチド

2. 配列番号1～5で表されるアミノ酸配列からなる群より選ばれるアミノ酸配列において1以上のアミノ酸が欠失、置換および/または付加されたアミノ酸配列からなり、かつNF-Bの活性を上昇させる活性を有するポリペプチド

3. 配列番号1～5のいずれかで表されるアミノ酸配列からなる群より選ばれるアミノ酸配列と60%以上の相同性を有するアミノ酸配列を含み、かつNF-Bの活性を上昇させる活性を有するポリペプチドを挙げることができる。

【0045】上記のアミノ酸配列を有するポリペプチドにおいて1以上のアミノ酸が欠失、置換および/または付加されたアミノ酸配列を有するポリペプチドは、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 (以下、モレキュラー・クローニング第2版と略す)、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, 1987-1997 (以下、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジーと略す)、Nucleic Acids Research, 10, 6487, (1982)、Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 79, 6409 (1982)、Gene, 34, 315 (1985)、Nucleic Acids Research, 13, 4431 (1985)、Proc. Natl. Acad. Sci USA, 82, 488 (1985)等に記載の部位特異的変異導入法を用いて、例えば配列番号1～5のいずれかのアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするDNAに部位特異的変異を導入することにより行うことができる。欠失、置換および/または付加されるアミノ酸の数は1から数個であり、その数は特に限定されないが、上記の部位特異的変異導入法等の周知の技術により、欠失、置換もしくは付加できる程度の数であり、例えば、1～数十個、好ましくは1～20個、より好ましくは1～10個、さらに好ましくは1～5個である。

【0046】また、本発明のポリペプチドとしては、配列番号1～5のいずれかに記載のアミノ酸配列と60%以上の相同性を有するアミノ酸配列を含む。配列番号1～5のいずれかに記載のアミノ酸配列との相同性は、BLAST [J. Mol. Biol., 215, 403 (1990)] やFASTA (Methods in Enzymology, 183, 63-69)等の解析ソフトで、デフォルト(初期設定)のパラメータを用いて計算したときに、少なくとも60%以上、好ましくは70%以上、より好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上、特に好ましくは95%以上、最も好ましくは97%以上が好ましい。

【0047】本発明のDNAとしては、

1. 請求項1～3のいずれか一項に記載のポリペプチドをコードするDNA

2. 請求項4記載のDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAであり、かつ転写因子NF-Bの活性を上昇させる活性を有するポリペプチドをコードするDNA

3. 配列番号6～10のいずれかで表される塩基配列を有するDNAを挙げることができる。

【0048】一般に1つのアミノ酸に対して複数種の遺伝暗号が存在するため、配列番号6～10のいずれかとは異なる塩基配列を有するDNAであっても本発明のポリペプチドをコードしていれば本発明のDNAに含まれる。ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAとは、例えば配列番号6、7、8、9または10で表される塩基配列を有するDNA等の本発明のDNAま

たはその一部の断片をプローブとして、コロニー・ハイブリダイゼーション法、ブラク・ハイブリダイゼーション法あるいはサザンプロットハイブリダイゼーション法を用いることにより得られるDNAを意味し、具体的には、コロニーあるいはブラク由来のDNAを固定化したフィルターを用いて、 $0.7 \sim 1.0 \text{ mol/l}$ の塩化ナトリウム存在下、 65°C でハイブリダイゼーションを行った後、 $0.1 \sim 2$ 倍濃度のSSC溶液（1倍濃度のSSC溶液は、 150 mmol/l 塩化ナトリウム、 15 mmol/l クエン酸ナトリウムよりなる）を用い、 65°C 条件下でフィルターを洗浄することにより同定できるDNAを挙げることができる。ハイブリダイゼーションは、モレキュラー・クローニング第2版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、DNA Cloning 1: Core Techniques, A Practical Approach, Second Edition, Oxford University, 1995等に記載されている方法に準じて行うことができる。

【0049】ハイブリダイズ可能なDNAとして具体的には、BLASTやFASTA等の解析ソフトで、デフォルト（初期設定）のパラメータを用いて計算したときに、配列番号6、7、8、9または10で表される塩基配列と少なくとも60%以上の相同性を有するDNA、好ましくは70%以上、より好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上、特に好ましくは95%以上、最も好ましくは98%以上の相同性を有するDNAを挙げることができる。

【0050】以下、本発明を詳細に説明する。

1. 本発明のDNAの調製
ヒトmRNAは、市販のもの（例えば、Clontech社製）を用いてもよいし、以下のごとくヒト組織から調製してもよい。組織から全RNAを調製する方法としては、チオシアン酸グアニジン・トリフルオロ酢酸セシウム法〔Methods in Enzymology, 154, 3 (1987)〕、酸性チオシアン酸グアニジン・フェノール・クロロフォルム（AGPC）法〔Analytical Biochemistry, 162, 156 (1987)、実験医学, 9, 1937 (1991)〕等が挙げられる。また、全RNAからpolyA⁺RNAとしてmRNAを調製する方法としては、オリゴ（dT）固定化セルロースカラム法（モレキュラー・クローニング第2版）等が挙げられる。さらに、FastTrack mRNA Isolation Kit（Invitrogen社製）、Quick Prep mRNA Purification Kit（Pharmacia社製）等のキットを用いることによりmRNAを調製できる。

【0051】調製したヒト組織mRNAからcDNAライブラリーを作製する。cDNAライブラリー作製法としては、モレキュラー・クローニング第2版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、A Laboratory Manual, 2nd Ed., 1989等に記載された方法、あるいは市販のキット、例えばSuperScript

Plasmid System for cDNA Synthesis and Plasmid Cloning (Life Technologies社製)、ZAP-cDNA Synthesis Kit (STRATAGENE社製)を用いる方法等が挙げられる。

【0052】cDNAライブラリーを作製するためのクローニングベクターとしては、大腸菌K12株中で自立複製できるものであれば、ファージベクター、プラスミドベクター等いずれでも使用できる。具体的には、ZAP Express [STRATAGENE社製、Strategies, 5, 58, (1992)]、pBluescript II SK(+) [Nucleic Acids Research, 17, 9494 (1989)]、Lambda ZAP II (STRATAGENE社製)、gt10、gt11 [DNA cloning, A Practical Approach, 1, 49 (1985)]、TriplEx (Clontech社製)、ExCell (Pharmacia社製)、pT7T318U (Pharmacia社製)、pcD2 [Mol. Cell. Biol., 3, 280 (1983)]およびpUC18 [Gene, 33, 103 (1985)]等を挙げることができる。

【0053】宿主微生物としては、大腸菌に属する微生物であればいずれでも用いることができる。具体的には、Escherichia coli XL1-Blue MRF' [STRATAGENE社製、Strategies, 5, 81 (1992)]、Escherichia coli C600 [Genetics, 39, 440 (1954)]、Escherichia coli Y1088 [Science, 222, 778 (1983)]、Escherichia coli Y1090 [Science, 222, 778 (1983)]、Escherichia coli NM522 [J. Mol. Biol., 166, 1 (1983)]、Escherichia coli K802 [J. Mol. Biol., 16, 118 (1966)]、Escherichia coli JM105 [Gene, 38, 275 (1985)]等が用いられる。

【0054】このcDNAライブラリーを、そのまま以下の解析に用いてもよいが、不完全長cDNAの割合を下げ、なるべく完全長cDNAを効率よく取得するために、菅野らが開発したオリゴキャップ法 [Gene, 138, 171, (1994)、Gene, 200, 149 (1997)、蛋白質核酸酵素, 41, 603 (1996)、実験医学, 11, 2491 (1993)]、cDNAクローニング、羊土社 (1996)、遺伝子ライブラリーの作製法、羊土社 (1994)]を用いて調製したcDNAライブラリーを以下の解析に用いてもよい。

【0055】作製したcDNAライブラリーから各クローンを単離し、それぞれのクローンについてcDNAの塩基配列を末端から、通常用いられる塩基配列解析方法、例えばサンガー (Sanger) らのジデオキシ法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5463 (1977)]あるいはABI PRISM 377 DNAシーケンサー (PEBiosystem社製)等の塩基配列分析装置を用いて分析することにより、該DNAの塩基配列を決定する。得られた塩基配列をアミノ酸配列に翻訳することにより、このDNAがコードするポリペプチドのアミノ酸配列を得ることができる。

【0056】また、得られた塩基配列をGenBank、EMBL等の塩基配列データベース中の塩基配列とBLAST、FASTA等の相同性解析プログラムを用

いて比較することにより、得られた塩基配列が新規な塩基配列かどうか、また得られた塩基配列と相同性をもつ塩基配列を検索することができる。また塩基配列より得られたアミノ酸配列をSwissProt、PIR、GenPept等のアミノ酸配列データベースと比較することにより、その塩基配列がコードするポリペプチドと相同性をもつポリペプチド、例えばラットとは別の生物種での相当する遺伝子に由来するポリペプチドや同じような活性や機能をもつと推定されるファミリータンパク質を検索することができる。

【0057】データベース検索で明らかになった相同遺伝子の塩基配列を基に、該遺伝子に特異的なプライマーを設計し、上記のようにして取得した一本鎖cDNAまたはcDNAライブラリーを鋳型としてPCRを行う。増幅断片が得られた際には、該断片を適当なプラスミドにサブクローニングする。サブクローニングは、増幅断片をそのまま、あるいは制限酵素やDNAポリメラーゼで処理後、定法によりベクターに組込むことにより行うことができる。ベクターとしては、pBluescript SK(-) (Stratagene社製)、pBluescript II SK(+)(Stratagene社製)、pDIRECT [Nucreic Acid s Research, 18, 60 69 (1990)]、pCR-Script Amp SK(+)(Stratagene社製)、pT7Blue (Novagen社製)、pCRII (Invitrogen社製)、pCR-TRAP (Genehunter社製)、pNo TA₇ (5' 3'社製)等を挙げることができる。

【0058】配列番号6~10のいずれかの塩基配列からなるDNAが一旦取得され、その塩基配列が決定された後は、該塩基配列の5'端および3'端の塩基配列に基づいたプライマーを調製し、ヒトまたは非ヒト動物の組織または細胞に含まれるmRNAから合成したcDNAあるいはcDNAライブラリーを用いてDNAの増幅を行うことにより、本発明のDNAを取得することができる。

【0059】また、配列番号6~10のいずれかの塩基配列よりなるDNAの全長あるいは一部をプローブとして、ヒトまたは非ヒト動物の組織または細胞に含まれるmRNAから合成したcDNAあるいはcDNAライブラリーに対してコロニーハイブリダイゼーションやブランクハイブリダイゼーション(モレキュラー・クローニング第2版)を行うことにより、本発明のDNAを取得することができる。

【0060】決定されたDNAの塩基配列に基づいて、ホスフォアミダイト法を利用したパーキン・エルマー社のDNA合成機(model 392)等のDNA合成機で化学合成することにより、本発明のDNAを取得することもできる。本発明のオリゴヌクレオチドとしては、オリゴDNA、オリゴRNA等のオリゴヌクレオチド、および該オリゴヌクレオチドの誘導体(以下、誘導体オリゴヌクレオチド)等が挙げられる。

【0061】該オリゴヌクレオチドまたは該オリゴヌク

レオチドと相補的な配列に相当するオリゴヌクレオチド(以下、アンチセンスオリゴヌクレオチド)として、例えば、検出したいmRNAの一部の塩基配列において、5'末端側の塩基配列に相当するセンスプライマー、3'末端側の塩基配列に相当するアンチセンスプライマー等を挙げるることができる。ただし、mRNAにおいてウラシルに相当する塩基は、オリゴヌクレオチドプライマーにおいてはチミジンとなる。

【0062】センスプライマーおよびアンチセンスプライマーとしては、両者の融解温度(T_m)および塩基数が極端に変わることはないオリゴヌクレオチドで、5~60塩基、好ましくは10~50塩基数のものが挙げられる。誘導体オリゴヌクレオチドとしては、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がホスフォロチオエート結合に交換されたもの、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がN3'-P5'ホスフォアミデート結合に変換されたもの、オリゴヌクレオチド中のリボースとリン酸ジエステル結合がペプチド核酸結合に変換されたもの、オリゴヌクレオチド中のウラシルがC-5プロピニルウラシルで置換されたもの、オリゴヌクレオチド中のウラシルがC-5チアゾールウラシルで置換されたもの、オリゴヌクレオチド中のシトシンがC-5プロピニルシトシンで置換されたもの、オリゴヌクレオチド中のシトシンがフェノキサジン修飾シトシン(phenoxazine-modified cytosine)で置換されたもの、オリゴヌクレオチド中のリボースが2'-メトキシエトキシリボースで置換されたもの等が挙げられる〔細胞工学, 16, 14 63 (1997)〕。

【0063】2. 本発明のDNAのNF-B活性化の検出法

(1) 活性検出に用いる宿主細胞

本発明において、DNAの活性を検出するために用いる宿主細胞としては、DNAを細胞内に導入できる細胞ならいかなる細胞も用いることができる。該細胞として、例えば、細菌・古細菌、藻類、菌類、植物、動物等に由来した細胞が挙げられる。具体的には、下記生物由来の細胞が挙げられる。

【0064】細菌・古細菌としては*Escherichia coli*や*Bacillus subtilis*等が挙げられる。藻類としては*Synechococcus*属や*Synechocystis*属の藍藻等が挙げられる。植物としてはタバコ、アラビドプシス、トマト、ジャガイモ、ナタネ、ワタ、ダイズ、イネまたはトウモロコシ等が挙げられる。菌類としては*Saccharomyces cerevisiae*や*Aspergillus niger*等が挙げられる。動物としては哺乳動物、節足動物等が挙げられる。

【0065】哺乳動物としてはヒト、サル、マウス、ラット、モルモットまたはミンク等が挙げられる。具体的には、ヒトの細胞としてはT細胞株Jurkat〔アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション(以下、ATCCと略記する)の番号TIB-512の細胞株〕、B細胞株N

ama1wa (ATCC CRL-1432)、子宮癌細胞株 HeLa (ATCC CCL-2)、腎細胞株 293 [J. Gen. Virol. 36, 59-72 (1977)] 等を用いることができる。ヒト以外の哺乳動物の細胞としては、サル腎細胞株 COS-1 (ATCC CRL-1650)、サル腎細胞株 COS-7 (ATCC CRL-1651)、チャイニーズ・ハムスター卵巣 (Chinese Hamster Ovary) 細胞株 CHO (ATCC CRL-9096、ATCC CCL-61)、マウス細胞株 Ba/F3 (RIKEN Cell Bank RCB0805)、マウス細胞株 L929 (RIKEN Cell Bank RCB0081)、ラット細胞株 NRK-49F (ATCC CRL-1570)、ミンク細胞株 Mv1Lu (ATCC CCL-64) 等を用いることができる。節足動物としては、カイコが挙げられる。具体的には、*Spodoptera frugiperda* Sf9 株や Sf21 株等を用いることができる。治療用タンパク性医薬品や医薬品のスクリーニングターゲットとなる DNA の探索が目的の場合は、哺乳動物の細胞、特にヒトの細胞を宿主とすることが好ましい。

【0066】(2) 宿主細胞への遺伝子導入法

本発明の DNA を宿主細胞に導入する方法としては、宿主細胞に遺伝子を導入する方法であればどのような方法でも用いることができる。例えば、エレクトロポレーション法 (羊土社 バイオマニュアルシリーズ 4, 23)、リン酸カルシウム法 (羊土社 バイオマニュアルシリーズ 4, 13)、DEAEデキストラン法 (羊土社 バイオマニュアルシリーズ 4, 16)、リポフェクション法 (羊土社 バイオマニュアルシリーズ 4, 28)、マイクロインジェクション法 (羊土社 バイオマニュアルシリーズ 4, 36)、アデノウイルス法 (羊土社 バイオマニュアルシリーズ 4, 43)、ワクシニアウイルス法 (羊土社 バイオマニュアルシリーズ 4, 59)、レトロウイルスベクター法 (羊土社 バイオマニュアルシリーズ 4, 74) 等の公知の方法を用いることができる。

【0067】(3) 本発明の DNA を取得する方法

本発明の DNA は、細胞で発現させることにより NF- κ B を活性化できるため、細胞における NF- κ B の活性化を検出することが可能な方法を用いることにより本発明の DNA を取得することができる。NF- κ B の活性化を検出する方法として、以下の方法が挙げられる。

【0068】例えば、細胞抽出液を用いる方法として、転写制御領域への結合をゲルシフト法 (羊土社 バイオマニュアルシリーズ 5, 107) 等により解析する方法、I κ B のリン酸化やユビキチン化をウエスタンブロット法 (羊土社 バイオマニュアルシリーズ 7, 179) 等により検出する方法が挙げられる。また、さらに効率よく検出する方法として、レポーター遺伝子を用いて検出する方法を挙げることができる。レポーター遺伝子としては、ルシフェラーゼ、ヒト胎盤アルカリ・ホスファターゼ、 β -ガラクトシダーゼ、ウロキナーゼ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ、ヒト成長ホルモン、各種 Green fluorescent protein (以下、GFP) 50

等をコードする遺伝子を用いることができる。レポーター遺伝子に連結するプロモーターとしては、NF- κ B により転写されるプロモーターであるならいかなるプロモーターも用いることができる。例えば、NF- κ B の活性化により発現が制御されている遺伝子のプロモーター領域を染色体 DNA から制限酵素消化によって切り出すことにより単離したプロモーター DNA 断片、染色体 DNA を鋳型として PCR 法によって増幅することによって得られるプロモーター DNA 断片、または該プロモーターの塩基配列を有する合成 DNA 断片等が挙げられる。

【0069】具体的には、IL-1、IL-1、IL-2、IL-3、IL-6、IL-8、IL-12、TNF- α 、TNF- β 、IFN- γ 、M-CSF、GM-CSF、G-CSF、L-2R、IgG、IL-1R、T細胞レセプター、MHCクラス1、2-ミクログロブリン、LAM-1、VCAM-1、ICAM-1、血清アミロイドA前駆タンパク質、アンジオテンシノーゲン、補体因子B、補体因子C3、補体因子C4、iNOS、COX-2、VEGF-R2、c-Rel、p105、I κ B、c-Myc、IRF-1、HIV-1、HIV-2、SIVmac、CMV、HSV-1、SV40、アデノウイルス等のプロモーターやそれらのコンセンサス配列を1個あるいは複数個有した合成プロモーター等が挙げられる。

【0070】レポーター遺伝子を用いた検出方法では、上記プロモーターにレポーター遺伝子を連結した転写ユニットを作製した後、その転写ユニットを宿主細胞の染色体に組み込んだ細胞株を作製する。この細胞内に本発明の DNA を発現するユニットを導入し本発明の DNA を発現させた後、レポーター遺伝子の発現量を測定することにより、NF- κ B の活性化を検出できる。あるいは、上記プロモーターにレポーター遺伝子を連結した転写ユニットを作製した後、該転写ユニットと本発明の DNA を発現するユニットの二つのユニットを同時に宿主細胞に導入し、レポーター遺伝子の発現量を測定することにより、NF- κ B の活性化を検出できる。

【0071】3. 本発明のポリペプチドの製造

本発明のポリペプチドは、モレキュラー・クロニング 第2版やカレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー等に記載された方法等を用い、例えば以下の方法により、本発明の DNA を宿主細胞中で発現させて、製造することができる。

【0072】全長 cDNA をもとにして、必要に応じて、該ポリペプチドをコードする部分を含む適当な長さの DNA 断片を調製する。該 DNA 断片、または全長 cDNA を適当な発現ベクターのプロモーターの下流に挿入することにより、組換えベクターを作製する。該組換えベクターを、該発現ベクターに適合した宿主細胞に導入することにより、本発明のポリペプチドを生産する形

質転換体を得ることができる。

【0073】宿主細胞としては、細菌、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞等、目的とする遺伝子を発現できるものであればいずれも用いることができる。発現ベクターとしては、上記宿主細胞において自律複製可能ないは染色体中への組み込みが可能で、本発明のポリペプチドをコードするDNAを転写できる位置にプロモーターを含有しているものが用いられる。

【0074】細菌等の原核生物を宿主細胞として用いる場合は、本発明のポリペプチドをコードするDNAを含有してなる組換えベクターは原核生物中で自律複製可能であると同時に、プロモーター、リボソーム結合配列、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子、および転写終結配列より構成されたベクターであることが好ましい。尚、ベクターには、プロモーターを制御する遺伝子が含まれていてもよい。

【0075】発現ベクターとしては、例えば、pBTrp2 (Boehringer Mannheim社製)、pBTac1 (Boehringer Mannheim社製)、pBTac2 (Boehringer Mannheim社製)、pKK233-2 (Pharmacia社製)、pSE280 (Invitrogen社製)、pGEMEX-1 (Promega社製)、pQE-8 (QIAGEN社製)、pKYP10 (特開昭58-110600号)、pKYP200 [Agricultural. Biological. Chemistry., 48, 669 (1984)], pLSA1 [Agric. Biol. Chem., 53, 277 (1989)], pGEL1 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 4306 (1985)], pBluescript II SK(-) (Stratagene社製)、pTrS30 [Escherichia coli JM109/pTrS30 (FERM BP-5407)より調製]、pTrS32 [Escherichia coli JM109/pTrS32 (FERM BP-5408)より調製]、pGHA2 [Escherichia coli IGHA2 (FERM BP-400)より調製、特開昭60-221091号]、pGKA2 [Escherichia coli IGKA2 (FERM BP-6798)より調製、特開昭60-221091号]、pTerm2 (米国特許第4,686,191号、米国特許第4,939,094号、および米国特許第5,160,735号)、pSupex、pUB110、pTP5、pC194、pEG400 [J. Bacteriol., 172, 2392 (1990)]、pGEX (Pharmacia社製)、pETシステム (Novagen社製)等を挙げることができる。発現ベクターとしては、リボソーム結合配列であるシャイン - ダルガーノ (Shine-Dalgarno) 配列と開始コドンとの間を適当な距離 (例えば6~18塩基) に調節したものをを用いることが好ましい。

【0076】プロモーターとしては、宿主細胞中で発現できるものであればいかなるものでもよい。例えば、trpプロモーター (P_{trp})、lacプロモーター、 P_L プロモーター、 P_R プロモーター、T7プロモーター等の、大腸菌やファージ等に由来するプロモーターおよび、SP01プロモーター、SP02プロモーター、penPプロモーター等を挙げることができる。また、 P_{trp} を2つ直列させたプロモーター ($P_{trp} \times 2$)、tacプロモーター、lacT7プロモーター、letIプロモーター [Gene, 44, 29 (1986)] のように人為的に設計改変されたプロモーター等も用いること

ができる。

【0077】本発明のポリペプチドをコードする部分の塩基配列を、宿主の発現に最適なコドンとなるように、塩基を置換することにより、目的とするポリペプチドの生産率を向上させることができる。本発明の組換えベクターにおいては、本発明のDNAの発現には転写終結配列は必ずしも必要ではないが、構造遺伝子の直下に転写終結配列を配置することが好ましい。

【0078】宿主細胞としては、エシェリヒア属、セラチア属、バチルス属、プレバクテリウム属、コリネバクテリウム属、ミクロバクテリウム属、シュードモナス属等に属する微生物、例えば、Escherichia coli XL1-Blue、Escherichia coli XL2-Blue、Escherichia coli DH1、Escherichia coli MC1000、Escherichia coli KY3276、Escherichia coli W1485、Escherichia coli JM109、Escherichia coli HB101、Escherichia coli No. 49、Escherichia coli W3110、Escherichia coli NY49、Serratia ficaria、Serratia fonticola、Serratia liquefaciens、Serratia marcescens、Bacillus subtilis、Bacillus amyloliquefacines、Brevibacterium ammoniagenes、Brevibacterium immariophilum ATCC14068、Brevibacterium saccharolyticum ATCC14066、Brevibacterium flavum ATCC14067、Brevibacterium lactofermentum ATCC13869、Corynebacterium glutamicum ATCC13032、Microbacterium ammoniaphilum ATCC15354、Pseudomonas sp. D-0110等を挙げることができる。

【0079】組換えベクターの導入方法としては、上記宿主細胞へDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、カルシウムイオンを用いる方法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 2110 (1972)]、プロトプラスト法 (特開昭63-248394号)、または、Gene, 17, 107 (1982) や Molecular & General Genetics, 168, 111 (1979) に記載の方法等を挙げることができる。

【0080】酵母を宿主細胞として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、YEP13 (ATCC37115)、YEP24 (ATCC37051)、YCp50 (ATCC37419)、pHS19、pHS15等を挙げることができる。プロモーターとしては、酵母菌株中で発現できるものであればいずれのものを用いてもよく、例えば、ヘキソースキナーゼ等の解糖系の遺伝子のプロモーター、PH05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、gal1プロモーター、gal10プロモーター、ヒートショックタンパク質プロモーター、MF1プロモーター、CUP1プロモーター等を挙げることができる。

【0081】宿主細胞としては、サッカロミセス属、クリュイペロミセス属、トリコスポロン属、シュワニオミセス属等に属する微生物、例えば、Saccharomyces cerevisiae、Schizosaccharomyces pombe、Kluyveromyces lactis、Trichosporon pullulans、Schwanniomyces all

uvius等を挙げることができる。組換えベクターの導入方法としては、酵母にDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法〔Methods. Enzymol., 194, 182 (1990)〕、スフェロプラスト法〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 1929 (1978)〕、酢酸リチウム法〔J. Bacteriology, 153, 163 (1983)〕、〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 1929 (1978)〕記載の方法等を挙げることができる。

【0082】動物細胞を宿主として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、pcDNA1、pcDM8 (フナコ社製)、pAGE107〔特開平3-22979; Cytotechnology, 3, 133(1990)〕、pAS3-3 (特開平2-227075)、pCDM8〔Nature, 329, 840 (1987)〕、pcDNA1/Amp (Invitrogen社製)、pREP4 (Invitrogen社製)、pAGE103〔J. Biochemistry, 101, 1307 (1987)〕、pAGE210等を挙げることができる。

【0083】プロモーターとしては、動物細胞中で発現できるものであればいずれも用いることができ、例えば、サイトメガロウイルス(CMV)のIE(immediate early)遺伝子のプロモーター、SV40の初期プロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒートショックプロモーター、SRプロモーター等を挙げることができる。また、ヒトCMVのIE遺伝子のエンハンサーをプロモーターと共に用いてもよい。

【0084】宿主細胞としては、ヒトの細胞であるナマルバ(Namala)細胞、サルの細胞であるCOS細胞、チャイニーズ・ハムスターの細胞であるCHO細胞、HBT5637 (特開昭63-299)等を挙げることができる。組換えベクターの導入方法としては、動物細胞にDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法〔Cytotechnology, 3, 133 (1990)〕、リン酸カルシウム法(特開平2-227075)、リポフェクション法〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413 (1987)〕等を挙げることができる。

【0085】昆虫細胞を宿主として用いる場合には、例えばカレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー・サプリメント1-38 (1987-1997)、Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual, W. H. Freeman and Company, New York (1992)、Bio/Technology, 6, 47 (1988)等に記載された方法によって、本発明のポリペプチドを発現することができる。

【0086】即ち、組換え遺伝子導入ベクターおよびバキュロウイルスを昆虫細胞に共導入して昆虫細胞培養上清中に組換えウイルスを得た後、さらに組換えウイルスを昆虫細胞に感染させ、本発明のポリペプチドを発現させることができる。該方法において用いられる遺伝子導入ベクターとしては、例えば、pVL1392、pVL1393、pBlueBac111 (ともにInvitrogen社製)等を挙げることができる。

【0087】バキュロウイルスとしては、例えば、夜盗蛾科昆虫に感染するウイルスであるアウトグラフィ・カリフォルニカ・ヌクレアー・ポリヘドロシス・ウイルス(Autographa californica nuclear polyhedrosis virus)等を用いることができる。昆虫細胞としては、*Spodoptera frugiperda*の卵巣細胞であるSf9、Sf21〔Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual, W. H. Freeman and Company, New York (1992)〕、*Trichoplusia ni*の卵巣細胞であるHigh5 (Invitrogen社製)等を用いることができる。

【0088】組換えウイルスを調製するための、昆虫細胞への上記組換え遺伝子導入ベクターと上記バキュロウイルスの共導入方法としては、例えば、リン酸カルシウム法(特開平2-227075)、リポフェクション法〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413 (1987)〕等を挙げることができる。植物細胞を宿主細胞として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、Tiプラスミド、タバコモザイクウイルスベクター等を挙げることができる。

【0089】プロモーターとしては、植物細胞中で発現できるものであればいずれのものを用いてもよく、例えば、カリフラワーモザイクウイルス(CaMV)の35Sプロモーター、イネアクチン1プロモーター等を挙げることができる。宿主細胞としては、タバコ、ジャガイモ、トマト、ニンジン、ダイズ、アブラナ、アルファルファ、イネ、コムギ、オオムギ等の植物細胞等を挙げることができる。

【0090】組換えベクターの導入方法としては、植物細胞にDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、アグロバクテリウム(*Agrobacterium*) (特開昭59-140885、特開昭60-70080、W094/00977)、エレクトロポレーション法(特開昭60-251887)、パーティクルガン(遺伝子銃)を用いる方法(特許第2606856、特許第2517813)等を挙げることができる。

【0091】遺伝子の発現方法としては、直接発現以外に、モレキュラー・クローニング第2版に記載されている方法等に準じて、分泌生産、融合ポリペプチド発現等を行うことができる。酵母、動物細胞、昆虫細胞または植物細胞により発現させた場合には、糖あるいは糖鎖が付加されたポリペプチドを得ることができる。

【0092】本発明のDNAを組み込んだ組換え発現ベクターを保有する形質転換体を培地に培養し、培養物中に本発明のポリペプチドを生成蓄積させ、該培養物より該ポリペプチドを採取することにより、該ポリペプチドを製造することができる。大腸菌等の原核生物あるいは酵母等の真核生物を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、該生物が資化し得る炭素源、窒素源、無機塩類等を含有し、形質転換体の培養を効率的に行える培地であれば天然培地、合成培地のいずれを用いてもよい。

【0093】炭素源としては、該生物が資化し得るものであればよく、グルコース、フラクトース、スクロース、これらを含む糖蜜、デンプンあるいはデンプン加水分解物等の炭水化物、酢酸、プロピオン酸等の有機酸、エタノール、プロパノール等のアルコール類等を用いることができる。窒素源としては、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等の無機酸もしくは有機酸のアンモニウム塩、その他の含窒素化合物、ならびに、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーンステープリカー、カゼイン加水分解物、大豆粕および大豆粕加水分解物、各種発酵菌体およびその消化物等を用いることができる。

【0094】無機塩としては、リン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸銅、炭酸カルシウム等を用いることができる。培養は、通常振盪培養または深部通気攪拌培養等の好気的条件下で行う。培養温度は15~40℃がよく、培養時間は、通常16時間~7日間である。培養中のpHは3.0~9.0に保持する。pHの調整は、無機または有機の酸、アルカリ溶液、尿素、炭酸カルシウム、アンモニア等を用いて行う。

【0095】また、培養中に必要に応じて、アンピシリンやテトラサイクリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。プロモーターとして誘導性のプロモーターを用いた組換えベクターで形質転換した微生物を培養するときには、必要に応じてインデューサーを培地に添加してもよい。例えば、*lac*プロモーターを用いた組換えベクターで形質転換した微生物を培養するときにはイソプロピル-D-チオガラクトピラノシド(IPTG)等を、*trp*プロモーターを用いた組換えベクターで形質転換した微生物を培養するときにはインドールアクリル酸(IAA)等を培地に添加してもよい。

【0096】動物細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているRPMI 1640培地〔The Journal of the American Medical Association, 199, 519 (1967)〕、EagleのMEM培地〔Science, 122, 501 (1952)〕、ダルベッコ改変MEM培地〔Virology, 8, 396 (1959)〕、199培地〔Proceeding of the Society for the Biological Medicine, 73, 1 (1950)〕またはこれら培地に牛胎児血清等を添加した培地等を用いることができる。培養は、通常pH6~8、30~40℃、5%CO₂存在下等の条件下で1~7日間行う。また、培養中に必要に応じて、カナマイシン、ペニシリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

【0097】昆虫細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているTNM-FH培地(Pharmingen社製)、Sf-900 IISFM培地(Life Technologies社製)、ExCell400、

ExCell405(いずれもJRH Biosciences社製)、Grace's Insect Medium〔Nature, 195, 788 (1962)〕等を用いることができる。培養は、通常pH6~7、25~30℃等の条件下で、1~5日間行う。また、培養中に必要に応じて、ゲンタマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

【0098】植物細胞を宿主として得られた形質転換体は、細胞として、または植物の細胞や器官に分化させて培養することができる。該形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているムラシゲ・アンド・スコーグ(MS)培地、ホワイト(White)培地、またはこれら培地にオーキシン、サイトカイニン等、植物ホルモンを添加した培地等を用いることができる。培養は、通常pH5~9、20~40℃の条件下で3~60日間行う。また、培養中に必要に応じて、カナマイシン、ハイグロマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

【0099】本発明のポリペプチドの生産方法としては、宿主細胞内に生産させる方法、宿主細胞外に分泌させる方法、あるいは宿主細胞外膜上に生産させる方法があり、使用する宿主細胞や、生産させるポリペプチドの構造を変えることにより、該方法を選択することができる。本発明のポリペプチドが宿主細胞内あるいは宿主細胞外膜上に生産される場合、ポールソンらの方法〔J. Biol. Chem., 264, 17619 (1989)〕、ロウらの方法〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 8227 (1989)〕、Genes Development, 4, 1288 (1990)〕、または特開平5-336963、W094/23021等に記載の方法を準用することにより、該ポリペプチドを宿主細胞外に積極的に分泌させることができる。

【0100】すなわち、遺伝子組換えの手法を用いて、本発明のポリペプチドの活性部位を含むポリペプチドの手前にシグナルペプチドを付加した形で発現させることにより、本発明のポリペプチドを宿主細胞外に積極的に分泌させることができる。また、特開平2-227075に記載されている方法に準じて、ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子等を用いた遺伝子増幅系を利用して生産量を上昇させることもできる。

【0101】さらに、遺伝子導入した動物または植物の細胞を再分化させることにより、遺伝子が導入された動物個体(トランスジェニック非ヒト動物)または植物個体(トランスジェニック植物)を造成し、これらの個体を用いて本発明のポリペプチドを製造することもできる。形質転換体が動物個体または植物個体の場合は、通常の方法に従って、飼育または栽培し、該ポリペプチドを生成蓄積させ、該動物個体または植物個体より該ポリペプチドを採取することにより、該ポリペプチドを製造することができる。

【0102】動物個体を用いて本発明のポリペプチドを製造する方法としては、例えば公知の方法〔American Journal of Clinical Nutrition, 63, 639S (1996)〕、Ame

rican Journal of Clinical Nutrition, 63, 627S (1996)、Bio/Technology, 9, 830 (1991))に準じて遺伝子を導入して作成した動物中に本発明のポリペプチドを生産する方法が挙げられる。

【0103】動物個体の場合は、例えば、本発明のポリペプチドをコードするDNAを導入したトランスジェニック非ヒト動物を飼育し、該ポリペプチドを該動物中に生成・蓄積させ、該動物中より該ポリペプチドを採取することにより、該ポリペプチドを製造することができる。該動物中の蓄積場所としては、例えば、該動物のミルク(特開昭63-309192)、卵等を挙げることができる。この際に用いられるプロモーターとしては、動物で発現できるものであればいずれも用いることができるが、例えば、乳腺細胞特異的なプロモーターであるカゼインプロモーター、カゼインプロモーター、ラクトグロブリンプロモーター、ホエー酸性プロテインプロモーター等が好適に用いられる。

【0104】植物個体を用いて本発明のポリペプチドを製造する方法としては、例えば本発明のポリペプチドをコードするDNAを導入したトランスジェニック植物を公知の方法〔組織培養、20(1994)、組織培養、21(1995)、Trends in Biotechnology, 15, 45 (1997)〕に準じて栽培し、該ポリペプチドを該植物中に生成・蓄積させ、該植物中より該ポリペプチドを採取することにより、該ポリペプチドを生産する方法が挙げられる。

【0105】本発明の形質転換体により製造されたポリペプチドは、例えば本発明のポリペプチドが、細胞内に溶解状態で発現した場合には、培養終了後、細胞を遠心分離により回収し、水系緩衝液にけん濁後、超音波破砕機、フレンチプレス、マントンガウリンホモゲナイザー、ダイノミル等により細胞を破砕し、無細胞抽出液を得る。該無細胞抽出液を遠心分離することにより得られる上清から、通常の酵素の単離精製法、即ち、溶媒抽出法、硫酸等による塩析法、脱塩法、有機溶媒による沈殿法、ジエチルアミノエチル(DEAE)-セファロース、DIAIONHPA-75(三菱化成社製)等レジンをを用いた陰イオン交換クロマトグラフィー法、S-Sepharose FF(Pharmacia社製)等のレジンをを用いた陽イオン交換クロマトグラフィー法、ブチルセファロース、フェニルセファロース等のレジンをを用いた疎水性クロマトグラフィー法、分子篩を用いたゲルろ過法、アフィニティークロマトグラフィー法、クロマトフォーカシング法、等電点電気泳動等の電気泳動法等の手法を単独あるいは組み合わせて用い、精製標品を得ることができる。

【0106】また、該ポリペプチドが細胞内に不溶体を形成して発現した場合は、同様に細胞を回収後破砕し、遠心分離を行うことにより、沈殿画分としてポリペプチドの不溶体を回収する。回収したポリペプチドの不溶体をタンパク質変性剤で可溶化する。該可溶化液を希釈ま

たは透析することにより、該ポリペプチドを正常な立体構造に戻した後、上記と同様の単離精製法により該ポリペプチドの精製標品を得ることができる。

【0107】本発明のポリペプチドあるいはその糖修飾体等の誘導体が細胞外に分泌された場合には、培養上清に該ポリペプチドあるいはその糖鎖付加体等の誘導体を回収することができる。即ち、該培養物を上記と同様の遠心分離等の手法により処理することにより可溶性画分を取得し、該可溶性画分から、上記と同様の単離精製法を用いることにより、精製標品を得ることができる。

【0108】また、本発明のポリペプチドは、Fmoc法(フルオレニルメチルオキシカルボニル法)、tBoc法(t-ブチルオキシカルボニル法)等の化学合成法によっても製造することができる。また、Advanced ChemTech社、Perkin-Elmer社、Amersham Pharmacia Biotech社、Protein Technology Instrument社、Synthecell-Vega社、PerSeptive社、島津製作所等のペプチド合成機を利用して化学合成することもできる。

【0109】4. 本発明のポリペプチドを認識する抗体の調製

本発明のポリペプチドまたは該ポリペプチドの部分断片ポリペプチドの精製標品、あるいは本発明のポリペプチドの一部のアミノ酸配列を有する合成ペプチドを抗原として用いることにより、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体等、本発明のポリペプチドを認識する抗体を作製することができる。

【0110】(1)ポリクローナル抗体の作製
本発明のポリペプチドの全長または該ポリペプチドの部分断片ポリペプチドの精製標品、あるいは本発明のポリペプチドの一部のアミノ酸配列を有するペプチドを抗原として用い、適当なアジュバント〔例えば、フロイントの完全アジュバント(Complete Freund's Adjuvant)または水酸化アルミニウムゲル、百日咳ワクチン等〕とともに、動物の皮下、静脈内または腹腔内に投与することによりポリクローナル抗体を作製することができる。

【0111】投与する動物として、ウサギ、ヤギ、3~20週令のラット、マウス、ハムスター等を用いることができる。該抗原の投与量は動物1匹当たり50~100μgが好ましい。ペプチドを用いる場合は、ペプチドをスカシガイヘモシアニン(keyhole limpet haemocyanin)や牛チログロブリン等のキャリア蛋白に共有結合させたものを抗原とするのが望ましい。抗原とするペプチドは、ペプチド合成機で合成することができる。

【0112】該抗原の投与は、1回目の投与の後、1~2週間おきに3~10回行う。各投与後、3~7日目に眼底静脈叢より採血し、該血清が免疫に用いた抗原と反応することを酵素免疫測定法〔酵素免疫測定法(ELISA法):医学書院刊(1976年)、Antibodies-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)〕等で確認する。

【0113】免疫に用いた抗原に対し、その血清が十分な抗体価を示した非ヒト哺乳動物より血清を取得し、該血清を分離、精製することによりポリクローナル抗体を取得することができる。分離、精製する方法としては、遠心分離、40～50%飽和硫酸アンモニウムによる塩析、カプリル酸沈殿〔Antibodies, A Laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory, (1988)〕、またはDEAE-セファロースカラム、陰イオン交換カラム、プロテインAまたはG-カラムあるいはゲル濾過カラム等を用いるクロマトグラフィー等を、単独または組み合わせて処理する方法が挙げられる。

【0114】(2)モノクローナル抗体の作製

(a)抗体産性細胞の調製

免疫に用いた本発明のポリペプチドの部分断片ポリペプチドに対し、その血清が十分な抗体価を示したラットを抗体産生細胞の供給源として供する。該抗体価を示したラットに抗原物質を最終投与した後3～7日目に、脾臓を摘出する。

【0115】該脾臓をMEM培地(日水製薬社製)中で細断し、ピンセットでほぐし、1,200rpmで5分間遠心分離した後、上清を捨てる。得られた沈殿画分の脾細胞をトリス-塩化アンモニウム緩衝液(pH7.65)で1～2分間処理し赤血球を除去した後、MEM培地で3回洗浄し、得られた脾細胞を抗体産生細胞として用いる。

【0116】(b)骨髄腫細胞の調製

骨髄腫細胞としては、マウスまたはラットから取得した株化細胞を使用する。例えば、8-アザグアニン耐性マウス(BALB/c由来)骨髄腫細胞株P3-X63Ag8-U1(以下、P3-U1と略す)〔Curr. Topics. Microbiol. Immunol., 81, 1 (1978), Europ. J. Immunol., 6, 511 (1976)〕、SP2/0-Ag14(SP-2)〔Nature, 276, 269 (1978)〕、P3-X63-Ag8653(653)〔J. Immunol., 123, 1548 (1979)〕、P3-X63-Ag8(X63)〔Nature, 256, 495 (1975)〕等を用いることができる。これらの細胞株は、8-アザグアニン培地〔RPMI-1640培地にグルタミン(1.5mmol/l)、2-メルカプトエタノール(5×10⁻⁵mol/l)、ジェンタマイシン(10μg/ml)および牛胎児血清(FCS)(CSL社製、10%)を加えた培地(以下、正常培地という)に、さらに8-アザグアニン(15μg/ml)を加えた培地〕で継代するが、細胞融合の3～4日前に正常培地で培養し、融合には該細胞を2×10⁷個以上用いる。

【0117】(c)ハイブリドーマの作製

(b)で取得した抗体産生細胞と(b)で取得した骨髄腫細胞をMEM培地またはPBS(リン酸二ナトリウム1.83g、リン酸一カリウム0.21g、食塩7.65g、蒸留水1リットル、pH7.2)でよく洗浄し、細胞数が、抗体産生細胞:骨髄腫細胞=5～10:1になるよ

う混合し、1,200rpmで5分間遠心分離した後、上清を捨てる。

【0118】得られた沈殿画分の細胞群をよくほぐし、該細胞群に、攪拌しながら、37℃で、10⁸抗体産生細胞あたり、ポリエチレングリコール-1000(PEG-1000)2g、MEM2mlおよびジメチルスルホキシド(DMSO)0.7mlを混合した溶液を0.2～1ml添加し、さらに1～2分間毎にMEM培地1～2mlを数回添加する。

【0119】添加後、MEM培地を加えて全量が50mlになるように調製する。該調製液を900rpmで5分間遠心分離後、上清を捨てる。得られた沈殿画分の細胞を、ゆるやかにほぐした後、メスピペットによる吸込み、吹出しでゆるやかにHAT培地〔正常培地にヒポキサンチン(10⁻⁴mol/l)、チミジン(1.5×10⁻⁵mol/l)およびアミノプテリン(4×10⁻⁷mol/l)を加えた培地〕100ml中に懸濁する。

【0120】該懸濁液を96穴培養用プレートに100μl/穴ずつ分注し、5%CO₂インキュベーター中、37℃で7～14日間培養する。培養後、培養上清の一部をとりアンチボディーズ〔Antibodies, A Laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Chapter 14 (1988)〕等に述べられている酵素免疫測定法により、本発明のポリペプチドの部分断片ポリペプチドに特異的に反応するハイブリドーマを選択する。

【0121】酵素免疫測定法の具体的例として、以下の方法を挙げることができる。免疫の際、抗原に用いた本発明のポリペプチドの部分断片ポリペプチドを適当なプレートにコートし、ハイブリドーマ培養上清もしくは後述の(d)で得られる精製抗体を第一抗体として反応させ、さらに第二抗体としてビオチン、酵素、化学発光物質あるいは放射線化合物等で標識した抗ラットまたは抗マウスイムノグロブリン抗体を反応させた後に標識物質に応じた反応を行ない、本発明のポリペプチドに特異的に反応するものを本発明のモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマとして選択する。

【0122】該ハイブリドーマを用いて、限界希釈法によりクローニングを2回繰り返す〔1回目は、HAT培地(HAT培地からアミノプテリンを除いた培地)、2回目は、正常培地を使用する〕、安定して強い抗体価の認められたものを本発明のモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマ株として選択する。

(d)モノクローナル抗体の調製

プリスタン処理〔2,6,10,14-テトラメチルペンタデカン(Pristane)0.5mlを腹腔内投与し、2週間飼育する〕した8～10週令のマウスまたはヌードマウスに、(c)で取得した本発明のポリペプチドに対するモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ細胞5～20×10⁶細胞/匹を腹腔内に注射する。10～21日間でハイブリドーマは腹水癌化する。

【0123】該腹水癌化したマウスから腹水を採取し、3,000rpmで5分間遠心分離して固形分を除去する。得られた上清より、ポリクローナルで用いた方法と同様の方法でモノクローナル抗体を精製、取得することができる。抗体のサブクラスの決定は、マウスモノクローナル抗体タイピングキットまたはラットモノクローナル抗体タイピングキットを用いて行う。タンパク質量は、ローリー法あるいは280nmでの吸光度より算出する。

【0124】5.本発明のポリペプチドを生産する組換えウイルスベクターの調製法

以下に、本発明のポリペプチドを特定のヒト組織内で生産するための組換えウイルスベクターの調製法について述べる。本発明のDNAの完全長cDNAをもとに、必要に応じて、該ポリペプチドをコードする部分を含む適当な長さのDNA断片を調製する。

【0125】完全長cDNA、あるいは該DNA断片をウイルスベクター内のプロモーターの下流に挿入することにより、組換えウイルスベクターを造成する。RNAウイルスベクターの場合には、本発明のDNAの完全長cDNAに相関するcRNA、若しくは該ポリペプチドをコードする部分を含む適当な長さのDNA断片に相関するRNA断片を調整し、それらを、ウイルスベクター内のプロモーターの下流に挿入することにより、組換えウイルスベクターを造成する。RNA断片は、2本鎖の他、ウイルスベクターの種類に応じて、センス鎖若しくはアンチセンス鎖のどちらか一方の1本鎖を選択する。例えば、レトロウイルスベクターの場合には、センス鎖に相関するRNAを、センダイウイルスベクターの場合には、逆にアンチセンス鎖に相関するRNAを選択する。

【0126】該組換えウイルスベクターを、該ベクターに適合したパッケージング細胞に導入する。パッケージング細胞はウイルスのパッケージングに必要なポリペプチドをコードするDNAの少なくとも1つを欠損している組換えウイルスベクターの該欠損するポリペプチドを補給できる細胞は全て用いることができ、例えばヒト腎臓由来のHEK293細胞、マウス繊維芽細胞NIH3T3等を用いることができる。パッケージング細胞で補給するポリペプチドとしては、レトロウイルスベクターの場合にはマウスレトロウイルス由来のgag、pol、env等のポリペプチドが、レンチウイルスベクターの場合にはHIVウイルス由来のgag、pol、env、vpr、vpu、vif、tat、rev、nef等のポリペプチド、アデノウイルスベクターの場合にはアデノウイルス由来のE1A、E1B等のポリペプチドが、アデノ随伴ウイルスの場合にはRep(p5、p19、p40)、Vp(Cap)等のポリペプチドが、センダイウイルスの場合にはNP、P/C、L、M、F、HN等のポリペプチドが挙げられる。

【0127】ウイルスベクターとしては上記パッケージ

ング細胞において組換えウイルスが生産でき、標的細胞で本発明のDNAを転写できる位置にプロモーターを含有しているものが用いられる。プラスミドベクターとしてはMFG [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92, 6733-6737 (1995)]、pBabePuro [Nucleic Acids Res., 18, 3587-3596 (1990)]、LL-CG、CL-CG、CS-CG、CLG [Journal of Virology, 72, 8150-8157 (1998)]、pAdex1 [Nucleic Acids Res., 23, 3816-3821 (1995)]等が用いられる。

【0128】プロモーターとしては、ヒト組織中で発現できるものであればいずれも用いることができ、例えば、サイトメガロウイルス(ヒトCMV)のIE(immediate early)遺伝子のプロモーター、SV40の初期プロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒートショックタンパク質プロモーター、SRプロモーター等を挙げることができる。また、ヒトCMVのIE遺伝子のエンハンサーをプロモーターと共に用いてもよい。

【0129】パッケージング細胞への組換えウイルスベクターの導入法としては、例えば、リン酸カルシウム法 [特開平2-227075号公報]、リポフェクション法 [Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 84, 7413 (1987)]等を挙げることができる。

6.本発明のDNA、ポリペプチドまたは抗体の利用
(1)本発明のDNAの発現を検出する方法
本発明のDNAを用いて、検体における本発明のDNAのmRNA発現量、該mRNAの構造変化を検出することができる。

【0130】検体としては、本発明のDNAの発現変化が原因となっている疾患を有する患者ならびに健常者より取得した組織、血清、唾液等の生体試料、該生体試料から細胞を取得して試験管内の適当な培地中で培養した初代培養細胞試料、または生体試料から取得した組織を、パラフィンあるいはクリオスタット切片として単離したものと等から取得したmRNAあるいは全RNA等が用いられる(以後、該mRNAおよび全RNAを検体由来RNAと称する)。

【0131】検出する方法としては、例えば(1)ノーザンブロット法(2)in situハイブリダイゼーション法、(3)定量的PCR法、(4)デファレンシャル・ハイブリダイゼーション法 [Trends in Genetics 7, 314, (1991)]、(5)DNAチップ法 [Genome Research, 6, 639, (1996)]、(6)RNAase保護アッセイ法等の方法等が挙げられる。以下、各検出法について詳述する。

【0132】ノーザンブロット法
検体由来RNAをゲル電気泳動で分離後、ナイロンフィルター等の支持体に転写する。転写後、本発明のDNAより調製した標識プローブを用いて、ハイブリダイゼーションならびに洗浄を行う。洗浄後、該プローブと特異的に結合したRNAのバンドを検出する。健常者と患者

由来の検体RNAについて該検出結果を比較することにより、該RNAの発現量ならびに構造の変化を検出することができる。ハイブリダイゼーションを行う際には、プローブと検体由来RNA中の目的とするmRNAが安定なハイブリッドを形成する条件でインキュベーションする。偽陽性を防ぐためには、ハイブリダイゼーションならびに洗浄工程をモレキュラー・クロニング第2版に記載の方法に準じて高ストリンジェントな条件で行うことが望ましい。

【0133】ノーザンプロット法に用いる標識プローブは、例えば、公知の方法(ニック・トランスレーション、ランダム・プライミングまたはキナーゼ)により放射性同位体、ビオチン、蛍光基、化学発光基等を、本発明のDNAあるいは該DNAの配列から設計したオリゴヌクレオチドに取り込ませることで調製できる。標識プローブのmRNAへの結合量は該mRNAの発現量を反映することから、結合した標識プローブの量を定量することで該mRNAの発現量を定量することができる。また、標識プローブが結合するフィルター上の部位を分析することで、該mRNAの構造変化を知ることができる。

【0134】in situハイブリダイゼーション法
生体から取得した組織をパラフィンあるいはクリオスタット切片として単離して得られた検体、および記載の標識プローブを用いてハイブリダイゼーションならびに洗浄の工程を行う。洗浄後、と同様の方法により該プローブと特異的に結合したmRNAの発現量を検出することができる。in situハイブリダイゼーション法で、偽陽性を防ぐためには、ハイブリダイゼーションならびに洗浄工程をカレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー等に記載されている方法に準じて高ストリンジェントな条件で行うことが望ましい。

【0135】定量的PCR法
検体由来RNA、オリゴdTプライマーまたはランダムプライマー、および逆転写酵素を用い、cDNAを合成することに基づいた方法を用いることにより目的とするRNAを検出することができる(以後、該cDNAを検体由来cDNAと称する)。検体由来RNAがmRNAの場合は、上記のいずれのプライマーも用いることができるが、該検体由来RNAが全RNAである場合は、オリゴdTプライマーを用いることが必要である。

【0136】定量的PCR法では、検体由来cDNAをテンプレートとし本発明のDNAが有する塩基配列に基づき設計したプライマーを用いてPCRを行うことで、特定のmRNA由来のDNA断片が増幅される。該増幅DNA断片の量は該mRNAの発現量を反映することから、アクチンやG3PDH(glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase)等をコードするDNAを内部コントロールとして置くことで該mRNAの量を定量することが可能である。また、該増幅DNA断片をゲル電気泳動に

より分離することで、該mRNAの構造の変化を知ることができる。本検出法では、標的配列を特異的にかつ効率的に増幅する適当なプライマーを用いることが望ましい。適当なプライマーは、プライマー間の結合やプライマー内の結合を起こさず、アニーリング温度で標的cDNAと特異的に結合して、変性条件で標的cDNAからはずれる等の条件に基づき設計することができる。増幅DNA断片の定量は増幅産物が指数関数的に増加しているPCR反応の内に行うことが必要である。このようなPCR反応は、各反応ごとに生産される該増幅DNA断片を回収してゲル電気泳動で定量分析することで知ることができる。

【0137】デファレンシャル・ハイブリダイゼーション法およびDNAチップ法

に記載された方法で調製した検体由来cDNAをプローブとして、本発明のDNAを固定化させたフィルターあるいはスライドガラスやシリコン等の基盤に対してハイブリダイゼーションならびに洗浄を行う。洗浄後、本発明のDNAと特異的に結合したcDNA量を測定することにより該cDNA由来のmRNAの発現量の変動を検出することができる。デファレンシャル・ハイブリダイゼーション法およびDNAチップ法のいずれの方法もフィルターあるいは基盤上にアクチンやG3PDH等の内部コントロールを固定化することで、対照検体と標的検体の間での該mRNAの発現の違いを正確に検出することができる。また対照検体と標的検体由来のRNAをもとにそれぞれ異なる標識dNTPを用いて標識cDNA合成を行い、1枚のフィルターあるいは1枚の基盤に二つの標識cDNAプローブを同時にハイブリダイズさせることで正確な該mRNAの発現量の定量を行うことができる。

【0138】RNase保護アッセイ法
本発明のDNAの3'端にT7プロモーター、SP6プロモーター等のプロモーター配列を結合し、RNAポリメラーゼを用いたin vitroの転写系により標識したrNTPを用いて、標識したアンチセンスRNAを合成する。該標識アンチセンスRNAを、検体由来RNAと結合させて、RNA-RNAハイブリッドを形成させた後、RNaseで消化し、消化から保護されたRNA断片をゲル電気泳動によりバンドを形成させ検出する。得られたバンドを定量することで、上記標識アンチセンスRNAと結合するmRNAの発現量を定量することができる。

【0139】尚、～のいずれかに記載した方法に用いられるDNAとしては、例えば配列番号6～10のいずれかで表される塩基配列を有するDNAもしくはそれらから得られるDNA断片等が挙げられる。また、当該方法による検出に供する検体としては、アレルギー、アトピー、喘息、花粉症、気道過敏、自己免疫疾患、移植片対宿主疾患等の異常な免疫細胞の活性化を伴う疾患、

エンドトキシンショック、敗血症、微生物感染、慢性B型肝炎、慢性C型肝炎、インスリン依存性・非依存性糖尿病、糸球体腎炎、乾癬、痛風、各種脳脊髄炎、うっ血性心不全、外傷性脳損傷、炎症性腸疾患等の感染や炎症を伴う疾患、パーキットリンパ腫、ホジキン病、各種リンパ腫、成人T細胞白血病、悪性腫瘍等の異常な細胞増殖を伴う疾患、関節リウマチ、変形性関節炎等の異常な線維芽細胞や滑膜組織の活性化を伴う疾患、エイズ等のウイルス性疾患、虚血性脳疾患の神経細胞の障害に基づく疾患、アルツハイマー病、パーキンソン病等の神経細胞の障害に基づく疾患、動脈硬化・再狭窄等の平滑筋細胞の異常な分化増殖を伴う疾患、多臓器不全、全身性炎症反応症候群（SIRS：systemic inflammatory response syndrome）、成人呼吸窮迫症候群（ARDS：adult respiratory distress syndrome）等の疾患が挙げられ、当該検出方法により本発明のDNAの発現を検出することで、上記疾患の診断に利用することができる。

【0140】(2)本発明のDNAの変異を検出する方法

以下、被験者における本発明のDNAの変異の有無を検出する方法について述べる。被験者における該DNAの変異は本発明のDNAと下記方法により直接比較することにより検出することができる。被験者から、組織、血清、唾液等のヒト生体試料あるいは、該生体試料から樹立した初代培養細胞由来の試料を集め、該生体試料あるいは該初代培養細胞由来試料中からDNAを抽出する（以下、該DNAを検体由来DNAと称する）。または、該試料由来のmRNAより常法によりcDNAを取得する（以下、該cDNAを検体由来cDNAと称する）。該検体由来DNAまたはcDNAを鋳型とし、本発明のDNAが有する塩基配列に基づき設計したプライマーを用いてPCR法等によりDNAを増幅する。得られた増幅DNAを試料DNAとして用いる。

【0141】増幅DNAに変異があるかどうかを検出する方法として、野生型対立遺伝子を有するDNA鎖と変異対立遺伝子を有するDNA鎖とのハイブリダイズにより形成されるヘテロ二本鎖を検出する方法を用いることができる。ヘテロ二本鎖を検出する方法には、ポリアクリルアミドゲル電気泳動によるヘテロ二本鎖検出法〔Trends Genet., 7, 5 (1991)〕、一本鎖コンフォメーション多型解析法〔Genomics, 16, 325-332 (1993)〕、 mismatchesの化学的切断法（CCM, chemical cleavage of mismatches）〔Human Molecular Genetics (1996), Tom Strachan and Andrew P. Read (BIOS Scientific Publishers Limited)〕、 mismatchesの酵素的切断法〔Nature Genetics, 9, 103-104 (1996)〕、変性ゲル電気泳動法〔Mutat. Res., 288, 103-112 (1993)〕タンパク質短縮試験（protein truncation test：PTT法）〔Genomics, 20, 1-4 (1994)〕等の方法が挙げられる。以下、上記方法について説明する。

【0142】ポリアクリルアミドゲル電気泳動によるヘテロ二本鎖検出法

検体由来DNAあるいは検体由来cDNAをテンプレートに、該DNAを配列番号6～10のいずれかに記載の塩基配列に基づき設計したプライマーにより、200bpよりも小さいDNA断片として増幅する。本発明のDNAおよび被験者由来の該増幅DNA断片を用い、各々の増幅DNA断片による二本鎖形成処理を常法により行う。処理後、ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行う。該DNAの変異によりヘテロ二本鎖が形成された場合は、変異を持たないホモ二本鎖よりも移動度が遅く、それらはホモ二本鎖とは別のバンドとして検出することができる。特製のゲル（Hydro-link, MDEなど）を用いた方が分離度はよい。200bpよりも小さい断片の検索ならば、挿入、欠失、ほとんどの1塩基置換を検出可能である。ヘテロ二本鎖解析は、次に述べる一本鎖コンフォメーション多型解析と組み合わせた1枚のゲルで行うことが望ましい。

【0143】一本鎖コンフォメーション多型解析法
一本鎖コンフォメーション多型解析（SSCP解析；single strand conformation polymorphism analysis）では、検体由来DNAあるいは検体由来cDNAをテンプレートに、配列番号6～10のいずれかに記載の塩基配列に基づき設計したプライマーにより、200bpよりも小さい断片として増幅した該DNAを変性後、未変性ポリアクリルアミドゲル中で電気泳動する。DNA増幅を行う際にプライマーを放射性同位体あるいは蛍光色素で標識し、該標識を指標とするか、または未標識の増幅産物を電気泳動後、銀染色することにより、増幅した該DNAをバンドとして検出することができる。本発明のDNA由来の増幅DNA断片と、被験者由来のものとを同時に電気泳動することにより、変異を持った断片を移動度の違いから検出できる。

【0144】 mismatchesの化学的切断法
 mismatchesの化学的切断法（CCM法）では、検体由来DNAあるいは検体由来cDNAをテンプレートに、該DNAを配列番号6～10のいずれかに記載の塩基配列に基づき設計したプライマーで増幅したDNA断片を、本発明のDNAに放射性同位体あるいは蛍光色素をとり込ませた標識DNAとハイブリダイズさせ、四酸化オスミウムで処理することで mismatchesしている場所のDNAの一方の鎖を切断させ変異を検出することができる。CCM法は最も感度の高い検出法の1つであり、キロベースの長さの検体にも適応できる。

【0145】 mismatchesの酵素的切断法
上記四酸化オスミウムの代わりにT4ファージリゾルベースとエンドヌクレアーゼV1Iのような細胞内で mismatchesの修復に関与する酵素とRNAse Aと組み合わせることで、酵素的に mismatchesを切断することもできる。

変性ゲル電気泳動法

変性ゲル電気泳動法 (denaturing gradient gel electrophoresis: D G G E 法) では、検体由来 DNA あるいは検体由来 c DNA をテンプレートに、配列番号 6 ~ 10 のいずれかに記載の塩基配列に基づき設計したプライマーで増幅した DNA 断片を化学的変性剤の濃度勾配や温度勾配を有するゲルを用いて電気泳動する。増幅した DNA 断片はゲル内を一本鎖に変性する位置まで移動し、変性後は移動しなくなる。該 DNA に変異がある場合とない場合では増幅した DNA のゲル内での移動度が異なることから、変異の存在を検出することが可能である。検出感度を上げるにはそれぞれのプライマーにポリ (G : C) 末端を付けるとよい。

【0146】 タンパク質短縮試験 (protein truncation test: P T T 法)

該試験によりポリペプチドの欠損を生み出すフレームシフト突然変異、スプライス部位突然変異、ナンセンス突然変異を特異的に検出することができる。P T T 法では、配列番号 6 ~ 10 のいずれかに表された塩基配列を有する DNA の 5' 末端に T 7 プロモーター配列と真核生物翻訳開始配列をつないだ特殊なプライマーを設計し、該プライマーを用いて検体由来 RNA より逆転写 P C R (R T - P C R) 法で c DNA を作成する。該 c DNA を用い、in vitro 転写、翻訳を行うと、ポリペプチドが生産される。該ポリペプチドをゲルに泳動して、該ポリペプチドの泳動位置が完全長ポリペプチドに相当する位置にあれば欠損を生み出す変異は存在せず、該ポリペプチドに欠損がある場合は、完全長ポリペプチドより短い位置に該ポリペプチドは泳動され、該位置より欠損の程度を知ることができる。

【0147】 上記の方法で変異が検出された場合には、本発明の DNA が有する塩基配列に基づいて設計したプライマーを用い、常法により変異を有する検体由来 DNA ならびに検体由来 c DNA の塩基配列を決定することが可能である。決定された塩基配列を解析することにより、検体由来 DNA あるいは検体由来 c DNA が特定の疾患を有する被験者の場合には、該疾患の原因となる変異を特定できる。以後、該変異を検出することにより、疾患の診断に利用することが出来る。

【0148】 上記方法により検出される DNA のコード領域における変異以外の変異の検出には、該 DNA の付近、該 DNA 中のイントロンおよび調節配列のような非コード領域を検査することによって検出し得る。非コード領域中の変異に起因する疾患は、上記に記載した方法に従い対照検体と比較した場合の、疾患患者における異常なサイズの、または異常な生産量の mRNA を検出することで確認することができる。

【0149】 このようにして非コード領域における変異の存在が示唆された該 DNA については、配列番号 6 ~ 10 のいずれかに記載の塩基配列を有する DNA をハイ

ブリダイゼーションのプロープとして用いることにより、クローン化することができる。非コード領域における変異は上述のいずれかの方法に準じて探索することができる。

【0150】 見いだされた変異は、Handbook of Human Genetics Linkage. The John Hopkins University Press, Baltimore (1994) に記載された方法に従い統計処理を行うことで、疾患との連鎖がある S N P s (シングル・ヌクレオチド・ポリモルフィズム) として同定することができる。上記変異を検出する方法で診断可能な被験者としては、アレルギー、アトピー、喘息、花粉症、気道過敏、自己免疫疾患、移植片対宿主疾患等の異常な免疫細胞の活性化を伴う疾患、エンドトキシンショック、敗血症、微生物感染、慢性 B 型肝炎、慢性 C 型肝炎、インスリン依存性・非依存性糖尿病、糸球体腎炎、乾癬、痛風、各種脳脊髄炎、うっ血性心不全、外傷性脳損傷、炎症性腸疾患等の感染や炎症を伴う疾患、パーキットリンパ腫、ホジキン病、各種リンパ腫、成人 T 細胞白血病、悪性腫瘍等の異常な細胞増殖を伴う疾患、関節リウマチ、変形性関節炎等の異常な線維芽細胞や滑膜組織の活性化を伴う疾患、エイズ等のウイルス性疾患、虚血性脳疾患の神経細胞の障害に基づく疾患、アルツハイマー病、パーキンソン病等の神経細胞の障害に基づく疾患、動脈硬化・再狭窄などの平滑筋細胞の異常な分化増殖を伴う疾患、多臓器不全、全身性炎症反応症候群 (S I R S : systemic inflammatory response syndrome)、成人呼吸窮迫症候群 (A R D S : adult respiratory distress syndrome) 等のいずれかの疾患を有する者を挙げることができる。

【0151】 (3) 本発明の DNA またはオリゴヌクレオチドを用いて本発明のポリペプチドをコードする DNA の転写または翻訳を抑制する方法
アンチセンス RNA / DNA 技術 [バイオサイエンスとインダストリー, 50, 322 (1992)、化学, 46, 681 (1991)、Biotechnology, 9, 358 (1992)、Trends in Biotechnology, 10, 87 (1992)、Trends in Biotechnology, 10, 152 (1992)、細胞工学, 16, 1463 (1997)]、トリプル・ヘリックス技術 [Trends in Biotechnology, 10, 132 (1992)] 等により、本発明の DNA を利用して、本発明のポリペプチドをコードする DNA の転写または翻訳を抑制することができる。例えば、本発明の DNA またはオリゴヌクレオチドを、本発明のポリペプチドを発現できる系 (生体を含む) に共存させ、該ポリペプチドの発現を転写、翻訳レベルで抑制できる。

【0152】 該抑制方法は、アレルギー、アトピー、喘息、花粉症、気道過敏、自己免疫疾患、移植片対宿主疾患等の異常な免疫細胞の活性化を伴う疾患、エンドトキシンショック、敗血症、微生物感染、慢性 B 型肝炎、慢性 C 型肝炎、インスリン依存性・非依存性糖尿病、糸球体腎炎、乾癬、痛風、各種脳脊髄炎、うっ血性心不全、

外傷性脳損傷、炎症性腸疾患等の感染や炎症を伴う疾患、パーキッリンパ腫、ホジキン病、各種リンパ腫、成人T細胞白血病、悪性腫瘍等の異常な細胞増殖を伴う疾患、関節リウマチ、変形性関節炎等の異常な線維芽細胞や滑膜組織の活性化を伴う疾患、エイズ等のウイルス性疾患、虚血性脳疾患の神経細胞の障害に基づく疾患、アルツハイマー病、パーキンソン病等の神経細胞の障害に基づく疾患、動脈硬化・再狭窄等の平滑筋細胞の異常な分化増殖を伴う疾患、多臓器不全、全身性炎症反応症候群（SIRS：systemic inflammatory response syndrome）、成人呼吸窮迫症候群（ARDS：adult respiratory distress syndrome）等、本発明のポリペプチドをコードするDNAの変異が原因となっている疾患の治療または予防に利用することができる。

【0153】（4）本発明のDNAまたはオリゴヌクレオチドを用いて本発明のポリペプチドをコードするDNAのプロモーター領域および転写制御領域を取得する方法

本発明のDNAまたはオリゴヌクレオチドをプローブとして用い、公知の方法〔モレキュラー・クローニング第2版、東京大学医科学研究所制癌研究部編、新細胞工学実験プロトコル、秀潤社（1993年）〕により、本発明のポリペプチドをコードするDNAのプロモーター領域および転写制御領域を取得することが可能である。例えば、以下の方法で、ラットあるいはヒト由来のものを取得することができる。

【0154】ラットあるいはヒトの細胞や組織から単離した染色体DNAを用いて作製したゲノムDNAライブラリーに対して、本発明のDNAまたはオリゴヌクレオチド（特にcDNAの5'側の部分）をプローブとして、ブランクハイブリダイゼーション等の方法でスクリーニングする。該スクリーニングにより、ハイブリダイズするゲノムDNAを取得する。該DNAよりプロモーター領域および転写制御領域を得ることができる。また、得られたゲノムDNAの塩基配列とcDNAの塩基配列を比較することによりエキソン/イントロン構造を明らかにすることができる。

【0155】尚、同様の方法を用いて、他の非ヒトほ乳動物においても該DNAのプロモーター領域および転写制御領域を取得することができる。プロモーター領域としては、哺乳動物細胞において本発明のポリペプチドをコードするDNAの基本転写に關与する領域が挙げられ、転写制御領域としては、本発明のポリペプチドをコードするDNAの基本転写を増強するエンハンサー配列および減弱するサイレンサー配列等を含む領域が挙げられる。例えば、ヒトの骨髄で、本発明のポリペプチドをコードするDNAの転写に關与するプロモーター領域および転写制御領域を挙げるることができる。得られたプロモーターおよび転写制御領域は後述のスクリーニング方法に利用することができる他、該DNAの転写の制御機

構を解析するために有用である。

【0156】（5）本発明のポリペプチドをコードするDNAを用いたスクリーニングにより、該DNAの転写を制御する医薬を取得する方法

患者由来の細胞株に種々の被験化合物を添加し、本発明のDNAを用いて、mRNAの発現の増減を検定することで該DNAの転写もしくは翻訳を抑制または促進する物質をスクリーニングすることができる。該DNAのmRNAの発現の増減は、上記したPCR法、ノーザンブロット法、RNAse保護アッセイ法により検出できる。

【0157】患者由来細胞株に種々の被験化合物を添加し、本発明のポリペプチドを特異的に認識する抗体を用いて、該ポリペプチドの発現の増減を検定することで該DNAの転写もしくは翻訳を促進する物質をスクリーニングすることができる。該ポリペプチドの発現の増減は、上記した蛍光抗体法、酵素免疫測定法（ELISA法）、放射性物質標識免疫抗体法（RIA）、免疫組織染色法、免疫細胞染色法等の免疫組織化学染色法（ABC法、CASA法等）、ウェスタンブロットティング法、ドットブロットティング法、免疫沈降法、サンドイッチELISA法により検出できる。

【0158】また、本発明のポリペプチドをコードするDNAのプロモーター領域および転写制御領域の下流に、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（CAT）遺伝子やルシフェラーゼ遺伝子をレポーター遺伝子として連結したレポータープラスミドを構築し、適当な細胞宿主に導入して形質転換体を得た後、その形質転換体に種々の被験物質を添加し、レポーター遺伝子の発現の増減を解析することにより、本発明のポリペプチドをコードするDNAの発現を転写レベルで制御する医薬をスクリーニングすることができる。

【0159】（6）本発明のポリペプチドを用いたスクリーニング方法により本発明のポリペプチドに作用する医薬を取得する方法。

本発明のポリペプチドあるいは該ポリペプチドの部分ペプチドを発現した形質転換体と種々の被験物質とを共存させ、該形質転換体におけるNF- κ Bの活性化の変動を解析することにより、本発明のポリペプチドに作用する医薬をスクリーニングすることができる。また、精製した該ポリペプチドあるいは該ポリペプチドの部分ペプチドも該ポリペプチドに特異的に作用する医薬のスクリーニングに利用することができる。該スクリーニングによって得られた物質は、本発明のDNAおよびポリペプチドが關与した疾患の治療のための医薬として有用である。

【0160】以下、2種のスクリーニング法について説明する。

スクリーニング法（1）

本発明のポリペプチドあるいは該ポリペプチドの部分ペ

プチドを生産するように形質転換した微生物、動物細胞、または昆虫細胞（以後探索用形質転換体と称する）と被験物質とを水性媒体中で共存させる。共存後、上記2.に記載の方法に準じてNF-Bの活性を測定する。形質転換していない宿主の微生物、動物細胞、または昆虫細胞を対照群として比較し、該形質転換体におけるNF-Bの活性化の程度を変動させる被験物質を選択することで目的の物質を取得することができる。また、該探索用形質転換体に特異的に結合する化合物あるいはポリペプチドの、該探索用形質転換体に対する結合を阻害することを指標にして、上記と同様の方法により、標的化合物を競合スクリーニングすることができる。

【0161】精製した本発明のポリペプチドまたは該ポリペプチドの一部を構成するポリペプチドは、該ポリペプチドに特異的に結合する標的化合物を選択するのに用いることができる。標的化合物を定量するには、本発明のポリペプチドを特異的に認識する抗体を用いて上記の免疫学的方法により行うことができる。また、該ポリペプチドあるいは該ポリペプチドのポリペプチドに結合する標的化合物の結合を阻害することを指標に、標的化合物を競合スクリーニングすることができる。

【0162】スクリーニング法(2)

該ポリペプチドの一部を構成するペプチドを多数、プラスチックピンまたはある種の固体支持体上で高密度に合成し、該ペプチドに選択的に結合する化合物あるいはポリペプチドを効率的にスクリーニングすることができる(W084/03564)。尚、本発明のポリペプチドを発現する形質転換体を用いて、遺伝子の発現を解析することにより、本発明のポリペプチドにより転写制御を受ける遺伝子をスクリーニングすることができる。

【0163】(7)本発明のDNA、または該DNAと相同な配列からなるRNAを含有する遺伝子治療剤
本発明のDNA、または該DNAと相同な配列からなるRNAを含有するウイルスベクターを用いた遺伝子治療剤は、上記の5.で作製した組換えウイルスベクターおよび遺伝子治療剤に用いる基剤を調合することにより製造することができる[Nature Genet., 8, 42 (1994)]。遺伝子治療剤に用いる基剤としては、通常注射剤に用いる基剤であればどのようなものでもよく、蒸留水、塩化ナトリウムまたは塩化ナトリウムと無機塩との混合物等の塩溶液、マンニトール、ラクトース、デキストラン、グルコース等の糖溶液、グリシン、アルギニン等のアミノ酸溶液、有機酸溶液又は塩溶液とグルコース溶液との混合溶液等があげられる。また常法に従い、これらの基剤に浸透圧調整剤、pH調整剤、ゴマ油、ダイズ油等の植物油又はレシチンもしくは非イオン界面活性剤等の界面活性剤等の助剤を用いて、溶液、懸濁液、分散液として注射剤を調製してもよい。これらの注射剤を、粉末化、凍結乾燥等の操作により用時溶解用製剤と

して調製することもできる。本発明の遺伝子治療剤は、液体の場合はそのまま、個体の場合は必要により滅菌処理をした上記の基剤に遺伝子治療の直前に溶解して治療に使用することができる。本発明の遺伝子治療剤の投与方法としては、患者の治療部位に吸収されるように、局所的に投与方法をあげることができる。

【0164】適当なサイズの本発明のDNAを、アデノウイルス・ヘキソン・タンパク質に特異的なポリリジン-コンジュゲート抗体と組み合わせてコンプレックスを作製し、得られたコンプレックスをアデノウイルスベクターに結合させることにより、ウイルスベクターを調製することができる。該ウイルスベクターは安定に標的細胞に到達し、エンドソームにより細胞内に取り込まれ、細胞内で分解され効率的にDNAを発現させることができる。

【0165】(-)鎖RNAウイルスであるセンダイウイルスをベースにしたウイルスベクターも開発されており(特願平9-517213、特願平9-517214)、遺伝子治療を目的としてKRGF-1遺伝子を組み込んだセンダイウイルスベクターを作製することができる。該DNAは、非ウイルス遺伝子移入法によっても病巣に輸送することができる。

【0166】当該分野で公知の非ウイルス遺伝子移入法には、リン酸カルシウム共沈法[Virology, 52, 456-467 (1973); Science, 209, 1414-1422 (1980)]、マイクロインジェクション法[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 5399-5403 (1980); Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 7380-7384 (1980); Cell, 27, 223-231 (1981); Nature, 294, 92-94 (1981)]、リボソームを介した膜融合-介在移入法[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413-7417 (1987); Biochemistry, 28, 9508-9514 (1989); J. Biol. Chem., 264, 12126-12129 (1989); Hum. Gene Ther., 3, 267-275 (1992); Science, 249, 1285-1288 (1990); Circulation, 83, 2007-2011 (1992)]あるいは直接DNA取り込みおよび受容体-媒介DNA移入法[Science, 247, 1465-1468 (1990); J. Biol. Chem., 266, 14338-14342 (1991); Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 3655-3659 (1991); J. Biol. Chem., 264, 16985-16987 (1989); BioTechniques, 11, 474-485 (1991); Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 3410-3414 (1990); Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 4255-4259 (1991); Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 4033-4037 (1990); Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 8850-8854 (1991); Hum. Gene Ther., 3, 147-154 (1991)]等を挙げることができる。

【0167】リボソームを介した膜融合-介在移入法ではリボソーム調製物を標的とする組織に直接投与することにより、当該組織の局所的な遺伝子の取り込みおよび発現が可能であることが腫瘍に関する研究において報告されている[Hum. Gene Ther., 3, 399-410 (1992)]。

したがって同様の効果が本発明のDNAおよびポリペプチドが関与する疾患病巣でも期待される。DNAを病巣に直接ターゲティングするには、直接DNA取り込み技術が好ましい。受容体-媒介DNA移入は、例えば、ポリリジンを介して、ポリペプチドリガンドにDNA(通常、共有的に閉環したスーパーコイル化プラスミドの形態をとる)をコンジュゲートすることによって行う。リガンドは、標的細胞または組織の細胞表面上の対応するリガンド受容体の存在に基づいて選択する。当該リガンド-DNAコンジュゲートは、所望により、血管に直接注射することができ、受容体結合およびDNA-タンパク質コンプレックスの内在化が起こる標的組織に指向し得る。DNAの細胞内破壊を防止するために、アデノウイルスを同時感染させて、エンドソーム機能を崩壊させることもできる。

【0168】(8)本発明の抗体を用いて本発明のポリペプチドを免疫学的に検出する方法

本発明のポリペプチドを特異的に認識する抗体を用い、抗原抗体反応を行わせることにより、本発明のポリペプチドまたは該ポリペプチドを含む組織を免疫学的に検出することができる。該検出法は、アレルギー、アトピー、喘息、花粉症、気道過敏、自己免疫疾患、移植片対宿主疾患等の異常な免疫細胞の活性化を伴う疾患、エンドトキシンショック、敗血症、微生物感染、慢性B型肝炎、慢性C型肝炎、インスリン依存性・非依存性糖尿病、糸球体腎炎、外傷性脳損傷、変形性関節炎、乾癬、痛風、各種脳脊髄炎、うっ血性心不全、炎症性腸疾患等の感染や炎症を伴う疾患、パーキッリンパ腫、ホジキン病、各種リンパ腫、成人T細胞白血病、悪性腫瘍等の異常な細胞増殖を伴う疾患、慢性関節リウマチ、肺線維症等の異常な線維芽細胞や滑膜組織の活性化を伴う疾患、エイズ等のウイルス性疾患、虚血性脳疾患の神経細胞の障害に基づく疾患、アルツハイマー病、パーキンソン病等の神経細胞の障害に基づく疾患、動脈硬化・再狭窄等の平滑筋細胞の異常な分化増殖を伴う疾患、多臓器不全、全身性炎症反応症候群(SIRS: systemic inflammatory response syndrome)、成人呼吸窮迫症候群(ARDS: adult respiratory distress syndrome)等、本発明のポリペプチドをコードするDNAの変異が原因となっている疾患の診断に利用することができる。また、該検出方法は、ポリペプチドの定量にも用いられる。

【0169】免疫学的に検出および定量する方法としては、蛍光抗体法、酵素免疫測定法(ELISA法)、放射性物質標識免疫抗体法(RIA)、免疫組織染色法や免疫細胞染色法等の免疫組織化学染色法(ABC法、CASA法等)、ウェスタンブロットティング法、ドットブロットティング法、免疫沈降法、サンドイッチELISA法〔単クローン抗体実験マニュアル(講談社サイエンティフィック)(1987)、続生化学実験講座5、免疫生化学研

究法(東京化学同人)(1986)]等が挙げられる。

【0170】蛍光抗体法とは、本発明のポリペプチドを細胞内あるいは細胞外に発現した微生物、動物細胞あるいは昆虫細胞または組織に、本発明の抗体を反応させ、さらにフルオレシニン・イソチオシアネート(FITC)等の蛍光物質でラベルした抗マウスIgG抗体あるいはその断片を反応させた後、蛍光色素をフローサイトメーターで測定する方法である。

【0171】酵素免疫測定法(ELISA法)とは、該ポリペプチドを細胞内あるいは細胞外に発現した微生物、動物細胞あるいは昆虫細胞または組織に、本発明の抗体を反応させ、さらにペルオキシダーゼ、ビオチン等の酵素標識等を施した抗マウスIgG抗体あるいは結合断片を反応させた後、発色色素を吸光度計で測定する方法である。

【0172】放射性物質標識免疫抗体法(RIA)とは、該ポリペプチドを細胞内あるいは細胞外に発現した微生物、動物細胞あるいは昆虫細胞または組織に、本発明の抗体を反応させ、さらに放射線標識を施した抗マウスIgG抗体あるいはその断片を反応させた後、シンチレーションカウンター等で測定する方法である。免疫細胞染色法、免疫組織染色法とは、該ポリペプチドを細胞内あるいは細胞外に発現した微生物、動物細胞あるいは昆虫細胞または組織に、該ポリペプチドを特異的に認識する抗体を反応させ、さらにFITC等の蛍光物質、ペルオキシダーゼ、ビオチン等の酵素標識を施した抗マウスIgG抗体あるいはその断片を反応させた後、顕微鏡を用いて観察する方法である。

【0173】ウェスタンブロットティング法とは、該ポリペプチドを細胞内あるいは細胞外に発現した微生物、動物細胞あるいは昆虫細胞または組織の抽出液をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動〔Antibodies-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, (1988)〕で分画した後、該ゲルをPVDf膜あるいはニトロセルロース膜にブロットティングし、該膜に本発明の該ポリペプチドを特異的に認識する抗体を反応させ、さらにFITC等の蛍光物質、ペルオキシダーゼ、ビオチン等の酵素標識を施した抗マウスIgG抗体あるいはその断片を反応させた後、確認する方法である。

【0174】ドットブロットティング法とは、該ポリペプチドを細胞内あるいは細胞外に発現した微生物、動物細胞あるいは昆虫細胞または組織の抽出液をニトロセルロース膜にブロットティングし、該膜に本発明の抗体を反応させ、さらにFITC等の蛍光物質、ペルオキシダーゼ、ビオチン等の酵素標識を施した抗マウスIgG抗体あるいは結合断片を反応させた後、確認する方法である。

【0175】免疫沈降法とは、本発明のポリペプチドを細胞内あるいは細胞外に発現した微生物、動物細胞あるいは昆虫細胞または組織の抽出液を該ポリペプチドを特

異的に認識する抗体と反応させた後、プロテインG - セファロース等イムノグロブリンに特異的な結合能を有する担体を加えて抗原抗体複合体を沈降させる方法である。

【0176】サンドイッチELISA法とは、本発明のポリペプチドを特異的に認識する抗体で、抗原認識部位の異なる2種類の抗体のうち、あらかじめ一方の抗体をプレートに吸着させ、もう一方の抗体をFITC等の蛍光物質、ペルオキシダーゼ、ビオチン等の酵素で標識しておき、抗体吸着プレートに、該ポリペプチドを細胞内あるいは細胞外に発現した微生物、動物細胞あるいは昆虫細胞または組織の抽出液を反応させた後、標識した抗体を反応させ、標識物質に応じた反応を行う方法である。

【0177】(9)本発明のポリペプチドを特異的に認識する抗体を用いて疾患を診断する方法

ヒト生体試料ならびヒト初代培養細胞での、該ポリペプチドの発現量の変化ならびに発現しているポリペプチドの構造変化を同定することは、将来、疾患を発症する危険性や既に発症した疾患の原因を知る上で有用である。該ポリペプチドの発現量や構造変化を検出して診断する方法としては、上記した、蛍光抗体法、酵素免疫測定法(ELISA法)、放射性物質標識免疫抗体法(RIA)、免疫組織染色法や免疫細胞染色法等の免疫組織化学染色法(ABC法、CASA法等)、ウェスタンブロットティング法、ドットブロットティング法、免疫沈降法、サンドイッチELISA法等が挙げられる。

【0178】上記方法による診断に供する検体としては、アレルギー、アトピー、喘息、花粉症、気道過敏、自己免疫疾患、移植片対宿主疾患等の異常な免疫細胞の活性化を伴う疾患、エンドトキシンショック、敗血症、微生物感染、慢性B型肝炎、慢性C型肝炎、インスリン依存性・非依存性糖尿病、糸球体腎炎、外傷性脳損傷、変形性関節炎、乾癬、痛風、各種脳脊髄炎、うっ血性心不全、炎症性腸疾患等の感染や炎症を伴う疾患、パーキンソン病、ホジキン病、各種リンパ腫、成人T細胞白血病、悪性腫瘍等の異常な細胞増殖を伴う疾患、慢性関節リウマチ、肺線維症等の異常な線維芽細胞や滑膜組織の活性化を伴う疾患、エイズ等のウイルス性疾患、虚血性脳疾患の神経細胞の障害に基づく疾患、アルツハイマー病、パーキンソン病等の神経細胞の障害に基づく疾患、動脈硬化・再狭窄等の平滑筋細胞の異常な分化増殖を伴う疾患、多臓器不全、全身性炎症反応症候群(SIRS: systemic inflammatory response syndrome)、成人呼吸窮迫症候群(ARDS: adult respiratory distress syndrome)等、本発明のポリペプチドをコードするDNAの変異が原因となっている疾患の患者より取得した組織、血液、血清、尿、便、唾液等の生体試料そのものあるいは、該生体試料から取得した細胞ならびに細胞抽出液が用いられる。また、生体試料から取得した

組織を、パラフィンあるいはクリオスタット切片として単離したものをを用いることもできる。

【0179】免疫学的に検出する方法としては、マイクロタイプレートを用いるELISA法・蛍光抗体法、ウェスタンブロット法、免疫組織染色法等が挙げられる。免疫学的に定量する方法としては、液相中で本発明のポリペプチドと反応する抗体のうちエピトープが異なる2種類のモノクローナル抗体を用いたサンドイッチELISA法、¹²⁵I等の放射性同位体で標識した本発明のポリペプチドと本発明のポリペプチドを認識する抗体とを用いるラジオイムノアッセイ法等が挙げられる。

【0180】(10)本発明のDNAを用いたノックアウト非ヒト動物の作製

本発明のDNAを含有してなる組換えベクターを用い、目的とする非ヒト動物、例えばウシ、ヒツジ、ヤギ、ブタ、ウマ、マウス、ニワトリ等の胚性幹細胞(embryonic stem cell)において、染色体上の本発明のポリペプチドをコードするDNAを公知の相同組換えの手法〔例えば、Nature, 326, 295 (1987)、Cell, 51, 503 (1987)等〕により不活化または任意の配列と置換した変異クローンを作製する〔例えば、Nature, 350, 243 (1991)〕。胚性幹細胞の変異クローンを用い、動物の受精卵の胚盤胞(blastocyst)への注入キメラ法または集合キメラ法等の手法により、胚性幹細胞クローンと正常細胞からなるキメラ個体を調製することができる。このキメラ個体と正常個体の掛け合わせにより、全身の細胞の染色体上の本発明のポリペプチドをコードするDNAに任意の変異を有する個体を得ることができ、さらにその個体の掛け合わせにより相同染色体の双方に変異が入ったホモ個体の中から、本発明のポリペプチドをコードするDNAの発現が一部または完全に抑制された個体としてノックアウト非ヒト動物を得ることができる。

【0181】また、染色体上の本発明のポリペプチドをコードするDNAの任意の位置へ変異を導入することにより、ノックアウト非ヒト動物を作製することも可能である。例えば染色体上の本発明のポリペプチドをコードするDNAの翻訳領域中へ塩基を置換、欠失、挿入等させて変異を導入することにより、その産物の活性を改変させることも可能である。また、その発現制御領域への同様な変異を導入することにより、発現の程度、時期、組織特異性等を改変させることも可能である。さらにCre-loxP系との組合せにより、より積極的に発現時期、発現部位、発現量等を制御することも可能である。このような例として、脳のある特定の領域で発現されるプロモータを利用して、その領域でのみ目的遺伝子を欠失させた例〔Cell, 87, 1317, (1996)〕やCreを発現するアデノウィルスを用いて、目的の時期に、臓器特異的に目的遺伝子を欠失させた例〔Science, 278, 5335(1997)〕が知られている。

【0182】従って、染色体上の本発明のポリペプチド

をコードするDNAについても、このように任意の時期や組織で発現を制御できる、または任意の挿入、欠失、置換をその翻訳領域や発現制御領域に有する、ノックアウト非ヒト動物を作製することができる。ノックアウト非ヒト動物は、任意の時期、任意の程度または任意の部位で、本発明のポリペプチドに起因する種々の疾患の症状を誘導することができる。このように、本発明のノックアウト非ヒト動物は、本発明のポリペプチドに起因する種々の疾患の治療や予防において極めて有用な動物モデルとなる。特にその治療薬、予防薬、また機能性食品、健康食品等の評価用モデルとして非常に有用である。

【0183】7. 本発明のポリペプチドの変異導入および機能改変変異体の選択

(1) 本発明のポリペプチドの変異導入

該ポリペプチドに変異を導入する方法としては、欠失・挿入・置換のいかなる方法を用いてもよい。ポリペプチドの欠失・挿入は、該ポリペプチドをコードするDNAをモレキュラークローニング第2版やカレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー等に記載された方法により当なDNA断片を欠失させる、あるいは適当なDNA断片を挿入させることにより可能である。

【0184】例えば、欠失変異体であれば、該DNAの中で適当な同じあるいは異なる制限酵素サイトを2個見出し、該DNAを含んだプラスミド等を市販の該制限酵素により消化後、平滑末端であればそのまま、突出末端であればKlenow Fragment (TaKaRa社製)等のDNAポリメラーゼにより平滑化し、再連結させることにより得ることができる。挿入変異体であれば、平滑末端化後に適当な二本鎖DNAを挿入し、連結させることにより得ることができる。置換変異体は、ランダムに変異を導入する方法として、例えばError Prone PCR法 [Trends In Biotechnology, 16, 76 (1998)] 等を用いることができる。目的的位置に変異を導入する方法として、変異を有したプライマーを用いたPCR法 [Mutagenesis and Synthesis of Novel Recombinant Genes Using PCR, PCR PRIMER A LABORATORY MANUAL, 603 (1994)] あるいはQuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit (STRATAGENE社製) 等を用いることができる。

【0185】(2) 本発明のポリペプチドの機能改変変異体の選択

(1) で作製した該ポリペプチドの変異体より、上記2.に記載した方法に準じて、NF- β 活性化に対する活性上昇改変変異体の選択が可能である。具体的には、該ポリペプチドおよび該ポリペプチドの変異体のそれぞれをレポーター細胞に導入し、該ポリペプチドよりレポーター活性を上昇させた変異体を選択することにより、NF- β 活性化機能を上昇した機能改変変異体を得ることができる。また、NF- β を活性化する刺激

存在下でNF- β 活性化を抑制する該ポリペプチドの変異体を選択することにより、ドミナントネガティブ変異体を得ることができる。

【0186】具体的には、該ポリペプチドの変異体をレポーター細胞に導入し、サイトカイン (TNF- α 、TNF- β 、IL-1、IL-1 β 、IL-2、LIF等)、T細胞マイトジェン (抗原刺激、レクチン、抗T細胞レセプター抗体、抗CD2抗体、抗CD3抗体、抗CD28抗体、Caイオノフォア)、B細胞マイトジェン (抗IgM抗体、anti-CD40)、ロイコトリエン、LPS、PMA、寄生体感染、ウイルス感染 (HIV-1、HTLV-1、HBV、EBV、CMV、HSV-1、HHV-6、NDV、センダイウイルス、アデノウイルス等)、ウイルス産物 (二本鎖RNA、Tax、HBX、EBNA-2、LMP-1等)、DNA破壊物質類、タンパク質合成インヒビター類 (例えばシクロヘキシミド)、紫外線、放射線、酸化ストレス等のNF- β を活性化する刺激を与え、レポーター活性が変異体を導入していない時よりも低下した該ポリペプチドの変異体を選択することにより、ドミナントネガティブ変異体を得ることができる。

【0187】尚、得られたドミナントネガティブ変異体 (Dominant Negative mutants; 優性機能抑制変異体) は、炎症応答抑制や悪性細胞の増殖抑制に応用可能であり、該ドミナントネガティブ変異体をコードするDNAは、NF- β の活性化を伴う疾患の遺伝子治療に利用できる可能性がある。以下に実施例をあげて、本発明を具体的に説明する。ただし、これらの実施例は説明のためのものであり、本発明の技術的範囲を制限するものではない。

【0188】

【実施例】 [実施例1] ヒト大腸およびヒト脂肪組織由来完全長cDNAライブラリーの作製

ヒトの大腸および脂肪組織より、モレキュラー・クローニング第2版に記載の方法によりmRNAを抽出した。さらに、オリゴdTセルロースでpolyA⁺RNAを精製した。それぞれのpolyA⁺RNAよりオリゴキャップ法 [Gene, 138, 171-174 (1994)] によりcDNAライブラリーを作製した。Oligo-cap linker (配列番号11) およびOligo dT primer (配列番号12) を用い、蛋白質核酸酵素, 41, 197-201 (1996) またはGene, 200, 149-156 (1997) に記載の方法に従って、BAP (Bacterial Alkaline Phosphatase) 処理、TAP (Tobacco Acid Phosphatase) 処理、RNAライゲーション、第一鎖cDNAの合成とRNAの除去を行った。得られた第一鎖cDNAを鋳型として、5'末端側のセンスプライマー (配列番号13) と3'末端側のアンチセンスプライマー (配列番号14) の2種のプライマーを用いるPCRにより二本鎖cDNAを増幅し、SfiIで切断した。PCRは、市販のキット: Gene Amp X

L PCRキット (Perkin Elmer社製) を使用して、95 で5分間熱処理後、95 で1分間、58 で1分間および72 で10分間の反応サイクルを12回繰り返し、その後4 で保持することにより行った。

【0189】 DraIII で切断したベクターpME18SFL3 (GeneBank AB009864、発現ベクター、3392bp) に上記増幅cDNAを挿入し、cDNAライブラリーを作製した。得られたクローンのプラスミドDNA各々について、cDNAの5'端と3'端の塩基配列を、DNAシーケンシング試薬 (Dye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit, dRhodamine Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction KitまたはBigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit, PE Biosystems社製) を用い、マニュアルにしたがってシーケンス反応を行った後、DNAシーケンサー (ABI PRISM 377, PE Biosystems社製) を用いて塩基配列を決定した。

【0190】 [実施例2] NF- β エンハンサーによりルシフェラーゼ活性が発現制御されるレポーター細胞株の樹立

IFN- γ 中のNF- β 認識配列 (配列番号15) を3回繰り返した人工プロモーターを作製し、ルシフェラーゼレポーターベクター (pAGE-luc; 特開平3-22979、実験医学、7、96-103 (1989)) のルシフェラーゼ遺伝子の5'上流域に挿入した (以後、pIF-lucとよぶ)。該プラスミド 4 μ g を1 μ g/ μ lとなるようにTE緩衝液 [10 mmol/l トリス-HCl (pH 8.0)、1 mmol/l EDTA (エチレンジアミン4酢酸ナトリウム)] に溶解し、エレクトロポレーション法 (BIO-RAD社製: Gene PulserTM) によって、ヒト腎細胞株293 (Clontech社製) 1.6 \times 10⁶個に遺伝子導入した。pIF-lucは、ハイグロマイシン (Hygromycin) 耐性遺伝子を含んでおり、遺伝子導入後は、ハイグロマイシン0.2 g/lを添加したRPMI培地 [RPMI 1640 (日本水産社製)、10% 子牛血清、0.05 mmol/l -メルカプトエタノール、25 U/ml ペニシリンG、25 U/ml ストレプトマイシン] で培養、ハイグロマイシンを遺伝子導入の選択マーカーとして安定形質転換株を樹立した。安定形質転換株のうち、TNF- α 刺激によって、無刺激と比較して670倍と40という高いルシフェラーゼ活性を誘導した株を選択 (以後、293/IF-LUCとよぶ) し、以下の発現アッセイに用いた。

【0191】 [実施例3] 293/IF-LUCを用いた完全長DNAのNF- β 活性化に対する解析
実施例1で塩基配列を決定したクローンを、アンピシリン (100 mg/l) を添加した2 \times YT培地 (Yeast extract 10 g/l、Trypton 16 g/l、NaCl 5g/l) 2 ml中、37 で、16時間、各々振盪培養した。培養後、菌体を遠心分離機で回収し、プラスミド調製キット 50

(QIAPrep96 Turbo Miniprep Kit, QIAGEN社製) を用いて添付資料の方法で各々プラスミドを調製した。96ウエルプレートに293/IF-LUC細胞を1ウエルあたり20,000個となるように分注し、37 で、16時間、CO₂インキュベーター中で培養した。この培養細胞に、上記プラスミド約0.25 μ gをそれぞれリポフェクション試薬 (LIPOFECT AMINE 2000TM Reagent, GIBCO BRL社製) を用いて、添付資料の方法に従って導入した。37 で、16時間、CO₂インキュベーター中で培養後、ルシフェラーゼ活性測定試薬 (LucLiteTM, Packar社製) とルシフェラーゼ活性測定装置 (ARVO 1420 MULTILABEL COUNTER, WALLAC社製) を用いて、ルシフェラーゼ活性を測定した。

【0192】 その結果、COL03279 (配列番号6の塩基配列を有するDNAクローン)、COL06772 (配列番号7の塩基配列を有するDNAクローン)、ADKA01604 (配列番号8の塩基配列を有するDNAクローン)、ADSU00701 (配列番号9の塩基配列を有するDNAクローン)、CAS01989 (配列番号10の塩基配列を有するDNAクローン) の各クローンのプラスミドを導入した場合において、それぞれネガティブコントロール (pME18SFL3を使用) と比較して12.5倍、6.3倍、4.4倍、2.7倍、3.0倍の活性が確認された。該クローンより、本発明のDNAを各々取得した。

【0193】 [実施例4] 本発明のDNAの各種臓器における発現量の検出

COL03279、COL06772、ADKA01604、ADSU00701の各クローンに認められる本発明のDNAの各種臓器における発現量の定量を、定法 [PCR Protocols, Academic Press (1990)等] に従い、半定量的PCR法を用い、以下のように行った。また、どの細胞でも同程度発現していると考えられるグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; GAPDH) の転写産物の定量を同時に行ない、細胞間でのmRNA量の違いや、サンプル間での逆転写酵素によるmRNAから一本鎖cDNAへの変換効率に大差ないことを確認した。

【0194】 ヒト臓器由来のmRNA (Clontech社製: 1副腎、2脳、3尾状核、4海馬、5黒質、6視床、7腎臓、8脾臓、9脳下垂体、10小腸、11骨髄、12扁桃腺、13小脳、14脳梁、15胎児脳、16胎児腎臓、17胎児肝臓、18胎児肺、19心臓、20肝臓、21肺、22リンパ節、23乳腺、24胎盤、25前立腺、26唾液腺、27骨格筋、28脊髄、29脾臓、30胃、31精巣、32胸腺、33甲状腺、34気管、35子宮) からcDNA合成キット (SUPERSRIPTTM Pre-amplification System; BRL社製) を用いて、一本鎖cDNAを合成した。1 μ gのmRNAから一本鎖cDNAを合成し、水で240倍希釈してPCRの鋳型として使

用した。PCR用プライマーとしては、COL03279からの塩基配列情報に基づいた配列番号16および17、COL06772からの塩基配列情報に基づいた配列番号18および19、ADKA01604からの塩基配列情報に基づいた配列番号20および21、ADSU00701からの塩基配列情報に基づいた配列番号22および23に記載の合成DNAを用いた。PCR反応は、ニッポンジーン社製のRecombinant Taq DNA Polymerase (GeneTaq) と添付の10×Gene Taq Universal Bufferおよび2.5 mmol/l dNTP Mixtureを用いて、説明書に従って行った。MJ RESEARCH社製のサーマル・サイクラーを用いて、94 で30秒間、60 で1分間、72 で2分間の反応を26~30サイクル行った。反応液をアガロースゲル電気泳動法およびエチジウムブロマイド染色により解析した。

【0195】結果を図1~4に示す。COL03279、COL06772、ADKA01604、ADSU00701の各クローンに認められる本発明のDNAは、各クローン、各臓器によって強弱の差はあるものの、検討した35種全ての臓器で発現していた。

【0196】

【発明の効果】本発明によれば、アレルギー、アトピー、喘息、花粉症、気道過敏、自己免疫疾患、移植片対宿主疾患等の異常な免疫細胞の活性化を伴う疾患、エンドトキシンショック、敗血症、微生物感染、慢性B型肝炎、慢性C型肝炎、インスリン依存性・非依存性糖尿病、糸球体腎炎、外傷性脳損傷、乾癬、痛風、各種脳脊髄炎、うっ血性心不全、炎症性腸疾患等の感染や炎症を伴う疾患、パーキットリンパ腫、ホジキン病、各種リンパ腫、成人T細胞白血病、悪性腫瘍等の異常な細胞増殖を伴う疾患、慢性関節リウマチ、変形性関節炎等の異常な線維芽細胞や滑膜組織の活性化を伴う疾患、エイズ等のウイルス性疾患、虚血性脳疾患の神経細胞の障害に基づく疾患、アルツハイマー病、パーキンソン病等の神経*

SEQUENCE LISTING

<110> KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.

<120> Novel polypeptide

<130> H12-0641J5

<140>

<141>

<160> 21

【0199】<170> Patent In Ver. 2.1

<210> 1

<211> 780

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Ala Ser Ala Glu Leu Gln Gly Lys Tyr

Gln Lys Leu Ala Gln Glu

1

5

*細胞の障害に基づく疾患、動脈硬化・再狭窄等の平滑筋細胞の異常な分化増殖を伴う疾患、多臓器不全、全身性炎症反応症候群 (SIRS: systemic inflammatory responses syndrome)、成人呼吸窮迫症候群 (ARDS: adult respiratory distress syndrome) 等の治療薬の探索、開発に有用なポリペプチド、該ポリペプチドをコードするDNA、該DNAのアンチセンスDNA/RNA、該DNAを用いた遺伝子治療、該ポリペプチドを認識する抗体、該ポリペプチドの活性上昇改変体、該ポリペプチドのドミナントネガティブ変異体、およびこれらの利用法を提供することができる。

【0197】

【配列表フリーテキスト】

配列番号11 - 人工配列の説明: 合成RNA (オリゴキャップリンカー配列)

配列番号12 - 人工配列の説明: 合成DNA (オリゴdTプライマー配列)

配列番号13 - 人工配列の説明: 合成DNA (5'末端側のセンスプライマー配列)

20 配列番号14 - 人工配列の説明: 合成DNA (3'末端側のアンチセンスプライマー配列)

配列番号15 - 人工配列の説明 (転写因子NF-結合配列)

配列番号16 - 人工配列の説明: 合成DNA (組織発現分布を検討した合成プライマー配列)

配列番号17 - 人工配列の説明: 合成DNA

配列番号18 - 人工配列の説明: 合成DNA

配列番号19 - 人工配列の説明: 合成DNA

配列番号20 - 人工配列の説明: 合成DNA

30 配列番号21 - 人工配列の説明: 合成DNA

配列番号22 - 人工配列の説明: 合成DNA

配列番号23 - 人工配列の説明: 合成DNA

【0198】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.

<120> Novel polypeptide

<130> H12-0641J5

<140>

<141>

<160> 21

<170> Patent In Ver. 2.1

<210> 1

<211> 780

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Ala Ser Ala Glu Leu Gln Gly Lys Tyr

Gln Lys Leu Ala Gln Glu

1

5

10

15

Tyr Ser Lys Leu Arg Ala Gln Asn Gln Val
 Leu Lys Lys Gly Val Val
 20 25 30

Asp Glu Gln Ala Asn Ser Ala Ala Leu Lys
 Glu Gln Leu Lys Met Lys
 35 40 45

Asp Gln Ser Leu Arg Lys Leu Gln Gln Glu
 Met Asp Ser Leu Thr Phe
 50 55 60

Arg Asn Leu Gln Leu Ala Lys Arg Val Glu
 Leu Leu Gln Asp Glu Leu
 65 70 75 80

Ala Leu Ser Glu Pro Arg Gly Lys Lys Asn
 Lys Lys Ser Gly Glu Ser
 85 90 95

Ser Ser Gln Leu Ser Gln Glu Gln Lys Ser
 Val Phe Asp Glu Asp Leu
 100 105 110

Gln Lys Lys Ile Glu Glu Asn Glu Arg Leu
 His Ile Gln Phe Phe Glu
 115 120 125

Ala Asp Glu Gln His Lys His Val Glu Ala
 Glu Leu Arg Ser Arg Leu
 130 135 140

Ala Thr Leu Glu Thr Glu Ala Ala Gln His
 Gln Ala Val Val Asp Gly
 145 150 155 1
 60

Leu Thr Arg Lys Tyr Met Glu Thr Ile Glu
 Lys Leu Gln Asn Asp Lys
 165 170 175

Ala Lys Leu Glu Val Lys Ser Gln Thr Leu
 Glu Lys Glu Ala Lys Glu
 180 185 190

Cys Arg Leu Arg Thr Glu Glu Cys Gln Leu
 Gln Leu Lys Thr Leu His
 195 200 205

Glu Asp Leu Ser Gly Arg Leu Glu Glu Ser
 Leu Ser Ile Ile Asn Glu
 210 215 220

Lys Val Pro Phe Asn Asp Thr Lys Tyr Ser
 Gln Tyr Asn Ala Leu Asn
 225 230 235 2
 40

Val Pro Leu His Asn Arg Arg His Gln Leu
 Lys Met Arg Asp Ile Ala
 245 250 255

Gly Gln Ala Leu Ala Phe Val Gln Asp Leu
 Val Thr Ala Leu Leu Asn
 260 265 270

Phe His Thr Tyr Thr Glu Gln Arg Ile Gln

Tyr Ile Ala Leu Leu Ala Leu Pro Ser Thr
 Glu Pro Asp Gly Leu Leu
 405 410 415
 Arg Thr Asn Tyr Ser Ser Val Leu Thr Asn
 Val Gly Ala Ala Leu His
 420 425 430
 Gly Phe His Asp Val Met Lys Asp Ile Ser
 Lys His Tyr Ser Gln Lys
 435 440 445
 Ala Ala Ile Glu His Glu Leu Pro Thr Ala
 Thr Gln Lys Leu Ile Thr
 450 455 460
 Thr Asn Asp Cys Ile Leu Ser Ser Val Val
 Ala Leu Thr Asn Gly Ala
 465 470 475 4
 80
 Gly Lys Ile Ala Ser Phe Phe Ser Asn Asn
 Leu Asp Tyr Phe Ile Ala
 485 490 495

 Ser Leu Ser Tyr Gly Pro Lys Ala Ala Ser
 Gly Phe Ile Ser Pro Leu
 500 505 510
 Ser Ala Glu Cys Met Leu Gln Tyr Lys Lys
 Lys Ala Ala Ala Tyr Met
 515 520 525
 Lys Ser Leu Arg Lys Pro Leu Leu Glu Ser
 Val Pro Tyr Glu Glu Ala
 530 535 540
 Leu Ala Asn Arg Arg Ile Leu Leu Ser Ser
 Thr Glu Ser Arg Glu Gly
 545 550 555 5
 60
 Leu Ala Gln Gln Val Gln Gln Ser Leu Glu
 Lys Ile Ser Lys Leu Glu
 565 570 575
 Gln Glu Lys Glu His Trp Met Leu Glu Ala
 Gln Leu Ala Lys Ile Lys
 580 585 590
 Leu Glu Lys Glu Asn Gln Arg Ile Ala Asp
 Lys Leu Lys Asn Thr Gly
 595 600 605
 Ser Ala Gln Leu Val Gly Leu Ala Gln Glu
 Asn Ala Ala Val Ser Asn
 610 615 620
 Thr Ala Gly Gln Asp Glu Ala Thr Ala Lys
 Ala Val Leu Glu Pro Ile
 625 630 635 6
 40 57
 Gln Ser Thr Ser Leu Ile Gly Thr Leu Thr
 Arg Thr Ser Asp Ser Glu
 645 650 655
 Val Pro Asp Val Glu Ser Arg Glu Asp Leu

<210> 2
 <211> 153
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 2
 Met Leu Lys Ala Ser Ala Ala Ser Pro Ala
 Val Ala Leu Lys Ala Leu
 1 5 10 15
 Glu Val Gln Ile Val Glu Glu Ala Thr Gln
 Asn Ala Glu Glu Gln Pro
 20 25 30
 Ser Thr Phe Ser Glu Asn Glu Tyr Asp Ala
 Ser Trp Ser Pro Ser Trp
 35 40 45
 Val Met Trp Leu Gly Leu Pro Ser Thr Leu
 His Ser Cys His Asp Ile
 50 55 60
 Val Leu Arg Arg Ser Tyr Leu Gly Ser Trp
 Gly Phe Ser Ile Val Gly
 65 70 75 80

 Gly Tyr Glu Glu Asn His Thr Asn Gln Pro
 Phe Phe Ile Lys Thr Ile
 85 90 95
 Val Leu Gly Thr Pro Ala Tyr Tyr Asp Gly
 Arg Leu Lys Cys Gly Asp
 100 105 110
 Met Ile Val Ala Val Asn Gly Leu Ser Thr
 Met Ser His Ser
 <212> PRT15 120 125
 <213> Homo sapiens
~~Met Leu Val Pro Met Leu Lys Glu Gln Arg~~
~~Met Ala Val Phe Leu Phe Gln Gly Phe Ser~~
~~Cys Leu Ser Arg Phe Leu~~ 135 140
 Val Ile Cys Trp Pro Gly Ser Leu Val 10 15
~~Met Trp Trp Phe Arg Cys~~ 50 Pro Val Leu Val
 Thr Gln Ser Ala Ala Ile
 20 25 30
 Val Pro Val Arg Thr Lys Lys Arg Phe Thr
 Pro Pro Ile Tyr Gln Pro
 35 40 45
 Lys Phe Lys Thr Glu Lys Glu Phe Met Gln
 His Ala Arg Lys Ala Gly
 50 55 60
 Leu Val Ile Pro Pro Glu Lys Ser Asp Arg
 Ser Ile His Leu Ala Cys
 65 70 75 80

 Thr Ala Gly Ile Phe Asp Ala Tyr Val Pro
 Pro Glu Gly Asp Ala Arg
 85 90 95
 Ile Ser Ser Leu Ser Lys Glu Gly Leu Ile

【 0 2 0 1 】

130 135 140
Phe Ile Glu Ala His Leu Cys Leu Asn Asn
Ser Asp His Asp Arg Leu
145 150 155 1
60
His Thr Leu Val Thr Glu His Cys Phe Pro
Asp Met Thr Trp Asp Ile
165 170 175
Lys Tyr Lys Thr Val Arg Trp Ser Phe Val
Glu Ser Leu Glu Pro Ser
180 185 190
His Val Val Gln Val Arg Cys Ser Ser Met
Met Asn Gln Gly Asn Val
195 200 205
Tyr Gly Gln Ile Thr Val Arg Met His Thr
Arg Gln Thr Leu Ala Ile
210 215 220
Tyr Asp Arg Phe Gly Arg Leu Met Tyr Gly
Gln Glu Asp Val Pro Lys
225 230 235 2
40

【0202】

Asp Val Leu Glu Tyr Val Val Phe Glu Lys
Gln Leu ~~30~~ Asn Pro Tyr
245 250 255
~~G210Se4~~ Trp Arg Met His Thr Lys Ile Val
~~R201Br06~~ Trp Ala Pro Pro
<212> PRT 260 265 270
~~L243SiH00sa1pebeu~~ Lys Thr Val Met Ile
~~R400Sl4~~ Pro Gln Leu Lys
Met Lys 275 Arg Lys Ala Glu 280 His Ser 285
Phe Arg Glu Gys Val Phe Glu Ala Gln Gly
Glu Ala Gln Lys Pro Gln 10 15
Arg 290 Lys Pro Pro Val 295 Ala Val Cys 300
Lys ~~300~~ Thr Ile Asp Gly
305 20 25 30

Thr Gly Val Ser Cys Arg Val Cys Lys Val
Ala Thr His Arg Lys Cys
35 40 45
Glu Ala Lys Val Thr Ser Ala Cys Gln Ala
Leu Pro Pro Val Glu Leu
50 55 60
Arg Arg Asn Thr Ala Pro Val Arg Arg Ile
Glu His Leu Gly Ser Thr
65 70 75 80
Lys Ser Leu Asn His Ser Lys Gln Arg Ser
Thr Leu Pro Arg Ser Phe
85 90 95
Ser Leu Asp Pro Leu Met Glu Arg Arg Trp
Asp Leu Asp Leu Thr Tyr
100 105 110

【0203】

145 150 155 1
60
Asp Leu Thr Arg Leu Asn Pro Lys Val Gln
Asp Phe Gly Trp Pro Glu
165 170 175
Leu His Ala Pro Pro Leu Asp Lys Leu Cys
Ser Ile Cys Lys Ala Met
180 185 190
Glu Thr Trp Leu Ser Ala Asp Pro Gln His
Val Val Val Leu Tyr Cys
195 200 205
Lys Val Gly Gln Asp Leu Gly Phe Pro Gly
Ala Trp Arg Phe Gln Val
210 215 220
Ser Leu ~~60~~ Leu Pro Asp Pro His Pro Cys
Leu Ser Val Cys Gln Gly
225> 5 230 235 2
4011> 615
~~Asn2LysBRT~~ Gly Lys Leu Gly Val Ile Val Ser
~~A213TyrHOMetsHpsenTyr~~ Ser
<400> 5 245 250 255
~~Lys~~ ~~Gla~~ ~~Ser~~ ~~Ala~~ ~~Gly~~ Lys Leu Gln Asn Asp
Lys Ala Lys ~~260~~ Glu Val
1 5 10 15
Lys Ser Gln Thr Leu Glu Lys Glu Ala Lys
Glu Cys Arg Leu Arg Thr
20 25 30
Glu Glu Cys Gln Leu Gln Leu Lys Thr Leu
His Glu Asp Leu Ser Gly
35 40 45
Arg Leu Glu Glu Ser Leu Ser Ile Ile Asn
Glu Lys Val Pro Phe Asn
50 55 60
Asp Thr Lys Tyr Ser Arg Tyr Asn Ala Leu
Asn Val Pro Leu His Asn
65 70 75 80
Arg Arg His Gln Leu Lys Met Arg Asp Ile
Ala Gly Gln Ala Leu Ala
85 90 95
Phe Val Gln Asp Leu Val Thr Ala Leu Leu
Asn Phe His Thr Tyr Thr
100 105 110
Glu Gln Arg Ile Gln Ile Phe Pro Val Asp
Ser Ala Ile Asp Thr Ile
115 120 125
Ser Pro Leu Asn Gln Lys Phe Ser Gln Tyr
Leu His Glu Asn Ala Ser
130 135 140
Tyr Val Arg Pro Leu Glu Glu Gly Met Leu
His Leu Phe Glu Ser Ile
145 150 155 1
60

Lys Met Thr Ala Val Phe Glu Lys Leu Gln
 Thr Tyr Ile Ala Leu Leu
 225 230 235 2
 40
 Ala Leu Pro Ser Thr Glu Pro Asp Gly Leu
 Leu Arg Thr Asn Tyr Ser
 245 250 255
 Ser Val Leu Thr Asn Val Gly Ala Ala Leu
 His Gly Phe His Asp Val
 260 265 270
 Met Lys Asp Ile Ser Lys His Tyr Ser Gln
 Lys Ala Ala Ile Glu His
 275 280 285
 Glu Leu Pro Thr Ala Thr Gln Lys Leu Ile
 Thr Thr Asn Asp Cys Ile
 290 295 300
 Leu Ser Ser Val Val Ala Ser Thr Asn Gly
 Ala Gly Lys Ile Ala Ser
 305 310 315 3
 20
 Phe Phe Ser Asn Asn Leu Asp Tyr Phe Ile
 Ala Ser Leu Ser Tyr Gly
 325 330 335

 Pro Lys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Ser Pro
 Leu Ser Ala Glu Cys Met
 340 345 350
 Leu Gln Tyr Lys Lys Lys Ala Ala Ala Tyr
 Met Lys Ser Leu Arg Lys
 355 360 365
 Pro Leu Leu Glu Ser Val Pro Tyr Glu Glu
 Ala Leu Ala Asn Arg Arg
 370 375 380
 Ile Leu Leu Ser Ser Thr Glu Ser Arg Glu
 Gly Leu Ala Gln Gln Val
 385 390 395 4
 00
 Gln Gln Ser Leu Glu Lys Ile Ser Lys Leu
 Glu Gln Glu Lys Glu His
 405 410 415
 Trp Met Leu Glu Ala Gln Leu Ala Lys Ile
 Lys Leu Glu Lys Glu Asn
 420 425 430
 Gln Arg Ile Ala Asp Lys Leu Lys Asn Thr
 Gly Ser Ala Gln Leu Val
 435 440 445
 Gly Leu Ala Gln Glu Asn Ala Ala Val Ser
 Asn Thr Ala Gly Gln Asp
 450 455 460
 Glu Ala Thr Ala Lys Ala Val Leu Glu Pro
 Ile Gln Ser Thr Ser Leu
 465 470 475 4
 80

【0204】

610 61

<210> 6
 <211> 3168
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> CDS
 <222> (158)..(2497)
 <400> 6
 aa gtggagga ggaggcgcgg cggcggcggc ggc
 ggcggct gcggtg gcc a gcaggcaga 60
 tactgcctga cccgttccc ggagcgtgtc tggg
 tttggg ggcgggagac aggctgagcc 120
 gcctgggagg cctggcctgt acggggcggg ggag
 gcc atg gcc tcg gct gag ttg 175

Met Ala Ser Ala G

Iu Leu

1 5

cag ggg aag tac cag aag ctg gct cag gag
 tac tcg aag ctt cgg gct 223

Gln Gly Lys Tyr Gln Lys Leu Ala Gln Glu
 Tyr Ser Lys Leu Arg Ala

10 15 20

cag aat cag gtt ctg aaa aag ggt gtt gtg
 gat gaa caa gca aat tct 271

Gln Asn Gln Val Leu Lys Lys Gly Val Val
 Asp Glu Gln Ala Asn Ser

25 30 35

gca gct tta aag gag caa ctg aaa atg aag
 gat cag tca ttg aga aaa 319

Ala Ala Leu Lys Glu Gln Leu Lys Met Lys
 Asp Gln Ser Leu Arg Lys

40 45 50

cta caa cag gaa atg gac agt ttg aca ttt
 cga aat ctg cag ctt gcc 367

Leu Gln Gln Glu Met Asp Ser Leu Thr Phe
 Arg Asn Leu Gln Leu Ala

55 60 65 70

aag agg gta gaa cta ctt caa gat gaa cta
 gct cta agt gaa cca cga 415

Lys Arg Val Glu Leu Leu Gln Asp Glu Leu
 Ala Leu Ser Glu Pro Arg

75 80 85

ggc aag aaa aac aag aaa agt gga gaa tct
 tct tct cag ttg agt caa 463

Gly Lys Lys Asn Lys Lys Ser Gly Glu Ser
 Ser Ser Gln Leu Ser Gln

90 95 100

gag cag aag agt gtc ttt gat gaa gat ctg
 caa aag aag ata gaa gag 511

Ser Gln Thr Leu Glu Lys Glu Ala Lys Glu
 Cys Arg Leu Arg Thr Glu
 185 190 195
 gaa tgt caa tta cag tta aag act ctt cat
 gaa gat ttg tca ggt aga 799
 Glu Cys Gln Leu Gln Leu Lys Thr Leu His
 Glu Asp Leu Ser Gly Arg
 200 205 210
 tta gag gaa tcc tta tca atc atc aat gaa
 aaa gta cct ttt aat gat 847
 Leu Glu Glu Ser Leu Ser Ile Ile Asn Glu
 Lys Val Pro Phe Asn Asp
 215 220 225 2
 30
 aca aaa tat agt cag tac aac gct ctg aac
 gtt cca ctc cac aat agg 895
 Thr Lys Tyr Ser Gln Tyr Asn Ala Leu Asn
 Val Pro Leu His Asn Arg
 235 240 245
 aga cac cag ctg aag atg cga gat att gct
 ggg cag gcc ctg gct ttt 943
 Arg His Gln Leu Lys Met Arg Asp Ile Ala
 Gly Gln Ala Leu Ala Phe
 250 255 260
 gtt cag gat ctt gtg acg gct ctt cta aac
 ttt cat acc tac aca gaa 991
 Val Gln Asp Leu Val Thr Ala Leu Leu Asn
 Phe His Thr Tyr Thr Glu
 265 270 275
 cag agg att caa att ttt cct gtt gat tct
 gcc att gac act ata tct 1039
 Gln Arg Ile Gln Ile Phe Pro Val Asp Ser
 Ala Ile Asp Thr Ile Ser
 280 285 290
 cca ttg aat cag aag ttc tca caa tac ctt
 cat gaa aat gcg tcc tat 1087
 Pro Leu Asn Gln Lys Phe Ser Gln Tyr Leu
 His Glu Asn Ala Ser Tyr
 295 300 305 3
 10
 gtc cgc cct ctt gag gaa gga atg ctt cat
 tta ttt gaa agt atc act 1135
 Val Arg Pro Leu Glu Glu Gly Met Leu His
 Leu Phe Glu Ser Ile Thr
 315 320 325
 gag gat act gtg act gtc ttg gag aca act
 gtg aaa ttg aaa act ttt 1183
 Glu Asp Thr Val Thr Val Leu Glu Thr Thr
 Val Lys Leu Lys Thr Phe
 330 335 340
 tca gaa cac tta acc tcc tac ata tgt ttt
 ctt agg aag att ctt ccc 1231
 Ser Glu His Leu Thr Ser Tyr Ile Cys Phe

440 445 450
 ctt cca aca gca aca cag aag ctg ata aca
 act aat gac tgt atc ctg 1567
 Leu Pro Thr Ala Thr Gln Lys Leu Ile Thr
 Thr Asn Asp Cys Ile Leu
 455 460 465 4
 70
 tca tca gta gtg gca tta aca aat gga gca
 gga aag att gca tcc ttc 1615
 Ser Ser Val Val Ala Leu Thr Asn Gly Ala
 Gly Lys Ile Ala Ser Phe
 475 480 485
 ttc agc aac aat ttg gac tac ttc att gct
 tca ctg agc tat gga cct 1663
 Phe Ser Asn Asn Leu Asp Tyr Phe Ile Ala
 Ser Leu Ser Tyr Gly Pro
 490 495 500
 aag gca gcg agt gga ttc att agt cct ctt
 tca gct gaa tgc atg cta 1711
 Lys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Ser Pro Leu
 Ser Ala Glu Cys Met Leu
 505 510 515

 cag tat aag aaa aaa gct gct gcc tat atg
 aag tct ttg aga aag ccc 1759
 Gln Tyr Lys Lys Lys Ala Ala Ala Tyr Met
 Lys Ser Leu Arg Lys Pro
 520 525 530
 ctc ttg gag tct gtg cct tat gaa gaa gca
 ctg gca aac cgc cgc atc 1807
 Leu Leu Glu Ser Val Pro Tyr Glu Glu Ala
 Leu Ala Asn Arg Arg Ile
 535 540 545 5
 50
 ctt ctc agc tct act gaa agt cga gaa ggc
 ctt gca cag caa gtt caa 1855
 Leu Leu Ser Ser Thr Glu Ser Arg Glu Gly
 Leu Ala Gln Gln Val Gln
 555 560 565
 cag agt ttg gaa aag att tct aaa ctg gag
 cag gaa aaa gaa cat tgg 1903
 Gln Ser Leu Glu Lys Ile Ser Lys Leu Glu
 Gln Glu Lys Glu His Trp
 570 575 580
 atg ttg gaa gca caa tta gcc aaa atc aag
 cta gag aaa gaa aac cag 1951
 Met Leu Glu Ala Gln Leu Ala Lys Ile Lys
 Leu Glu Lys Glu Asn Gln
 585 590 595
 cga att gca gat aag ctg aag aat aca ggt
 agt gcc cag ctg gtt ggg 1999
 Arg Ile Ala Asp Lys Leu Lys Asn Thr Gly
 Ser Ala Gln Leu Val Gly

<222> (22)..(939)

<400> 8

ggcggccttt gcggaacaa g atg gca gcc cc

c ata cct caa ggg ttc tct 51

Met Ala Ala Pro Ile Pro Gl

n Gly Phe Ser

1

5

10

tgt tta tcg agg ttt ttg ggc tgg tgg ttt

cgg cag cca gtt ctg gtg 99

Cys Leu Ser Arg Phe Leu Gly Trp Trp Phe

Arg Gln Pro Val Leu Val

15

20

25

act cag tcc gca gct ata gtt cca gta aga

act aaa aaa cgt ttc aca 147

Thr Gln Ser Ala Ala Ile Val Pro Val Arg

Thr Lys Lys Arg Phe Thr

30

35

40

cct cct att tat caa cct aaa ttt aaa aca

gaa aag gag ttt atg caa 195

Pro Pro Ile Tyr Gln Pro Lys Phe Lys Thr

Glu Lys Glu Phe Met Gln

45

50

55

cat gcc cgg aaa gca gga ttg gtt att cct

cca gaa aaa tcg gac cgt 243

His Ala Arg Lys Ala Gly Leu Val Ile Pro

Pro Glu Lys Ser Asp Arg

60

65

70

tcc ata cat ctg gcc tgt aca gct ggt ata

ttt gat gcc tat gtt cct 291

Ser Ile His Leu Ala Cys Thr Ala Gly Ile

Phe Asp Ala Tyr Val Pro

75

80

85

90

cct gag ggt gat gca cgc ata tca tct ctt

tca aag gag gga ctg ata 339

Pro Glu Gly Asp Ala Arg Ile Ser Ser Leu

Ser Lys Glu Gly Leu Ile

95

100

105

gag aga act gaa cga atg aag aag act atg

gca tca caa gtg tca atc 387

Glu Arg Thr Glu Arg Met Lys Lys Thr Met

Ala Ser Gln Val Ser Ile

110

115

120

cgg agg ata aaa gac tat gat gcc aac ttt

aaa ata aag gac ttc cct 435

Arg Arg Ile Lys Asp Tyr Asp Ala Asn Phe

Lys Ile Lys Asp Phe Pro

125

130

135

gga aaa gct aag gat atc ttt att gaa gct

cac ctt tgt cta aat aac 483

Gly Lys Ala Lys Asp Ile Phe Ile Glu Ala

Gln Glu Asp Val Pro Lys Asp Val Leu Glu
 Tyr Val Val Phe Glu Lys
 235 240 245 2
 50

cag ttg aca aac ccc tat gga agc tgg aga
 atg cat acc aag atc gtt 819
 Gln Leu Thr Asn Pro Tyr Gly Ser Trp Arg
 Met His Thr Lys Ile Val
 255 260 265

ccc cca tgg gca ccc cct aag cag ccc atc
 ctt aag acg gtg atg atc 867
 Pro Pro Trp Ala Pro Pro Lys Gln Pro Ile
 Leu Lys Thr Val Met Ile
 270 275 280

cct ggc cct cag ctg aaa cca gaa gaa gaa
 tat gaa gag gca caa gga 915
 Pro Gly Pro Gln Leu Lys Pro Glu Glu Glu
 Tyr Glu Glu Ala Gln Gly
 285 290 295

gag gcc cag aag cct cag cta gcc tgatgac
 aaa aatgacttct agggatgaagc 969
 Glu Ala Gln Lys Pro Gln Leu Ala
 300 305

ctgggtgatg aggcctgctgg aagctttgaa gtct
 cccatt cccctcatgc tataaaaaga 1029
 actacctttttttctctcca tctgtctcag gtct
 tttcag cagtctcatic atcagcaacc 1089
 aatgatg actgggccct agcaggtggc aggt
 aatcaatccatgga cactcttctt 1149
 ttaaaat tatgtctagc ttctgagct agat
 gaaagaaagtatcscagagaacat 1209
 tttatcag tttttccac agcagggact gtga
 gaaacacacagcagca tctcttttgt 1269
 <222> (55)..(837)

aacaggg caggatcag agttgaaat gaaa
 agtctcaggggcgtgggaaagatgctgaagg
 gagagtgatcaggagatagcccatggttgg gctg
 ggcacg gaccagcctt cagatggcag 1389
 aagtgaaga tgagcctact tgtgagcagat gtga
 aatgatgggaaagaggcacagggaagcaaaagc ttc
 aggagagaggggttatagaggattttagag gcc
 lysteacoaagaclygaalacatctgctgaH1509er Phe
 AtgagcattysgcattPheargaaaaatata aatg
 caaaga aataatt5aa aaaaaaaaa 156910
 aagaaaa cct cca gtc tgt gca gta tgt aag
 g1574cc atc gat ggg aca 153

Lys Lys Pro Pro Val Cys Ala Val Cys Lys
 Val Thr Ile Asp Gly Thr
 20 25 30
 ggc gtt tcg tgc aga gtc tgc aag gtg gcg
 acg cac aga aaa tgc gaa 201
 Gly Val Ser Cys Arg Val Cys Lys Val Ala
 Thr His Arg Lys Cys Glu

【 0 2 0 7 】

Met
1

15

cga aac acg gcc cca gtc agg cgc ata gag
 cac ctg gga tcc acc aaa 297
 Arg Asn Thr Ala Pro Val Arg Arg Ile Glu
 His Leu Gly Ser Thr Lys
 70 75 80
 tct ctg aac cac tca aag cag cgc agc act
 ctg ccc agg agc ttc agc 345
 Ser Leu Asn His Ser Lys Gln Arg Ser Thr
 Leu Pro Arg Ser Phe Ser
 85 90 95
 ctg gac ccg ctc atg gag cgg cgc tgg gac
 tta gac ctc acc tac gtg 393
 Leu Asp Pro Leu Met Glu Arg Arg Trp Asp
 Leu Asp Leu Thr Tyr Val
 100 105 110
 acg gag cgc atc ttg gcc gcc gcc ttc ccc
 gcg cgg ccc gat gaa cag 441
 Thr Glu Arg Ile Leu Ala Ala Ala Phe Pro
 Ala Arg Pro Asp Glu Gln
 115 120 125
 cgg cac cgg ggc cac ctg cgc gag ctg gcc
 cat gtg ctg caa tcc aag 489
 Arg His Arg Gly His Leu Arg Glu Leu Ala
 His Val Leu Gln Ser Lys
 130 135 140 1
 45
 cac cgg gac aag tac ctg ctc ttc aac ctt
 tca gag aaa agg cat gac 537
 His Arg Asp Lys Tyr Leu Leu Phe Asn Leu
 Ser Glu Lys Arg His Asp
 150 155 160
 ctg acc cgc tta aac ccc aag gtt caa gac
 ttc ggc tgg cct gag ctg 585
 Leu Thr Arg Leu Asn Pro Lys Val Gln Asp
 Phe Gly Trp Pro Glu Leu
 165 170 175
 cat gct cca ccc ctg gac aag ctg tgc tcc
 atc tgc aaa gcc atg gag 633
 His Ala Pro Pro Leu Asp Lys Leu Cys Ser
 Ile Cys Lys Ala Met Glu
 180 185 190
 aca tgg ctc agt gct gac cca cag cac gtg
 gtc gta cta tac tgc aag 681
 Thr Trp Leu Ser Ala Asp Pro Gln His Val
 Val Val Leu Tyr Cys Lys
 195 200 205
 gtg ggc cag gac ctc ggg ttc cct ggt gcc
 tgg agg ttc cag gtc agc 729
 Val Gly ~~Gln~~ Asp Leu Gly Phe Pro Gly Ala
 Trp Arg Phe Gln Val Ser
 210 215 220 2
 25
 ctg gag ctc cca gac cct cat ccc tgt ctc

<210> 10
 <211>
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> CDS
 <222> (160)..(2004)
 <400> 10
 gcaaaagaga tagaagagaa tgaacggttg cata
 tacaat ttttgaagc tgatgagcag 60
 cacaagcatg tggaagcaga gctgaggagt cgac
 tggcca ctctggagac agaagcagcc 120
 cagcaccaag ctgtggttga cggctcacc cgga
 agtac atg gaa acc att gag 174

 Met Glu Thr Ile

 Glu

 1 5

 aag ctg cag aac gac aag gct aaa cta gag
 gtg aaa tct cag act cta 222
 Lys Leu Gln Asn Asp Lys Ala Lys Leu Glu
 Val Lys Ser Gln Thr Leu
 10 15 20
 gaa aag gaa gcc aag gaa tgt cga ctt cga
 acg gaa gaa tgt caa tta 270
 Glu Lys Glu Ala Lys Glu Cys Arg Leu Arg
 Thr Glu Glu Cys Gln Leu
 25 30 35
 cag tta aag act ctt cat gaa gat ttg tca
 ggt aga tta gag gaa tcc 318
 Gln Leu Lys Thr Leu His Glu Asp Leu Ser
 Gly Arg Leu Glu Glu Ser
 40 45 50

 tta tca atc atc aat gaa aaa gta cct ttt
 aat gat aca aaa tat agt 366
 Leu Ser Ile Ile Asn Glu Lys Val Pro Phe
 Asn Asp Thr Lys Tyr Ser
 55 60 65
 cgg tac aac gct ctg aac gtt cca ctc cac
 aat agg aga cac cag ctg 414
 Arg Tyr Asn Ala Leu Asn Val Pro Leu His
 Asn Arg Arg His Gln Leu
 70 75 80 85

 aag atg cga gat att gct ggg cag gcc ctg
 gct ttt gtt cag gat ctt 462
 Lys Met Arg Asp Ile Ala Gly Gln Ala Leu
 Ala Phe Val Gln Asp Leu
 90 95 100
 gtg acg gct ctt cta aac ttt cat acc tac
 aca gaa cag agg att caa 510
 Val Thr Ala Leu Leu Asn Phe His Thr Tyr
 Thr Glu Gln Arg Ile Gln

185 190 195
 agt tta gaa gaa gaa tgt gaa tcc tct ctt
 tgc aca tct gcg tta aga 798
 Ser Leu Glu Glu Glu Cys Glu Ser Ser Leu
 Cys Thr Ser Ala Leu Arg
 200 205 210
 gcc agg aat cta gag ctg tcc cag gac atg
 aaa aaa atg aca gct gtg 846
 Ala Arg Asn Leu Glu Leu Ser Gln Asp Met
 Lys Lys Met Thr Ala Val
 215 220 225
 ttt gag aag ctg cag act tac ata gct ctt
 ctt gcc ttg cca agt aca 894
 Phe Glu Lys Leu Gln Thr Tyr Ile Ala Leu
 Leu Ala Leu Pro Ser Thr
 230 235 240 2
 45
 gag cca gat gga ctc ctt cgg aca aac tac
 agt tct gtg tta aca aat 942
 Glu Pro Asp Gly Leu Leu Arg Thr Asn Tyr
 Ser Ser Val Leu Thr Asn
 250 255 260
 gtt ggt gct gct ctg cat gga ttt cat gac
 gtt atg aaa gat att tcc 990
 Val Gly Ala Ala Leu His Gly Phe His Asp
 Val Met Lys Asp Ile Ser
 265 270 275
 aaa cat tat agt caa aaa gct gca ata gag
 cat gaa ctt cca aca gca 1038
 Lys His Tyr Ser Gln Lys Ala Ala Ile Glu
 His Glu Leu Pro Thr Ala
 280 285 290
 aca cag aag ctg ata aca act aat gac tgc
 atc ctg tca tca gta gtg 1086
 Thr Gln Lys Leu Ile Thr Thr Asn Asp Cys
 Ile Leu Ser Ser Val Val
 295 300 305
 gca tca aca aat gga gca gga aag att gca
 tcc ttc ttc agc aac aat 1134
 Ala Ser Thr Asn Gly Ala Gly Lys Ile Ala
 Ser Phe Phe Ser Asn Asn
 310 315 320 3
 25
 ttg gac tac ttc att gct tca ctg agc tat
 gga cct aag gca gcg agt 1182
 Leu Asp Tyr Phe Ile Ala Ser Leu Ser Tyr
 Gly Pro Lys Ala Ala Ser
 330 335 340
 gga ttc att agt cct ctt tca gct gaa tgc
 atg cta cag tat aag aaa 1230
 Gly Phe Ile Ser Pro Leu Ser Ala Glu Cys
 Met Leu Gln Tyr Lys Lys
 345 350 355

- <210> 12
 <211> 42
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <22 0>
 <223> an artificially synthesized oligo(dT)primer sequence
 <400> 12 67
- 【 0 2 1 1 】** gcggctgaag acggcctatg tggcctttt tttt
~~tttt~~tttt 42
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> an artificially synthesized primer sequence
 <400> 13
- 【 0 2 1 2 】** agcatcgagt cggccttggt g
 <210> 14 21
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> an artificially synthesized primer sequence
 <400> 14
- 【 0 2 1 3 】** gcggctgaag acggcctatg t
 <210> 15 21
 <211> 10
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> an artificially synthesized NF-kappaB-binding-site sequence
 <400> 15
- 【 0 2 1 4 】** gggaaattcc
 <210> 16
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> an artificially synthesized primer sequence
 <400> 16
- 【 0 2 1 5 】** aatcactaca tggcaaggat ag
 <210> 17 22
 <211> 21
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> an artificially synthesized primer sequence
 <400> 17 68
【 0 2 1 6 】 catttactgc cgacatcaac t
 <210> 18 21
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> an artificially synthesized primer sequence
 <400> 18
【 0 2 1 7 】 gcgaaaatga gtatgatgcc a
 <210> 19 21
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> an artificially synthesized primer sequence
 <400> 19
【 0 2 1 8 】 gctcctaaac cacaacaca at
 <210> 20 22
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> an artificially synthesized primer sequence
 <400> 20
【 0 2 1 9 】 acgaatgaag aagactatgg c
 <210> 21 21
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> an artificially synthesized primer sequence
 <400> 21
【 0 2 2 0 】 aggatcatc accgtctta
 <210> 22 20
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> an artificially synthesized primer sequence
 <400> 22
 ctcatcctg tctctctgtc

【0221】

<210> 23
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> an artificially synthesized primer sequence
 <400> 23

【図面の簡単な説明】ttcaagca ttctcctgcc

【図1】は、PCR法を用いて、35種のヒト組織（臓器）におけるCOL03279転写物の発現量を調べた結果である。

【図2】は、PCR法を用いて、35種のヒト組織（臓器）におけるCOL06772転写物の発現量を調べた結果である。

【図3】は、PCR法を用いて、35種のヒト組織（臓器）におけるADKA01604転写物の発現量を調べた結果である。

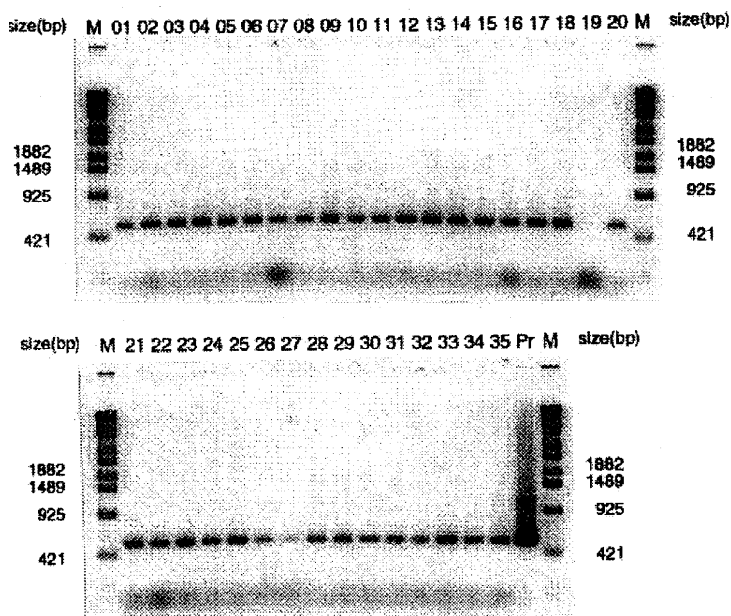
【図4】は、PCR法を用いて、35種のヒト組織（臓器）におけるADSU00701転写物の発現量を調べた結果である。

【符号の説明】

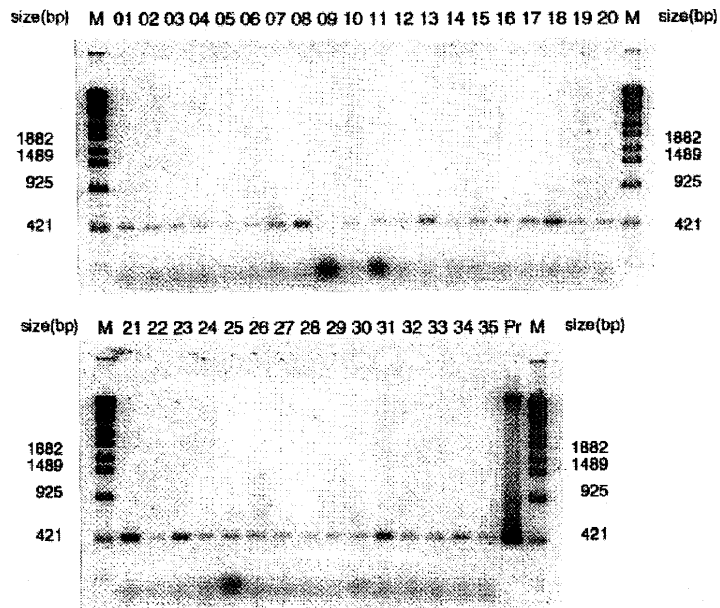
全図中に記載の数字、英字は以下の通りである。

- 01：副腎、02：脳、03：尾状核、04：海馬、05：黒質、06：視床、07：腎臓、08：脾臓、09：脳下垂体、10：小腸、11：骨髄、12：扁桃腺、13：小脳、14：脳梁、15：胎児脳、16：胎児腎臓、17：胎児肝臓、18：胎児肺、19：心臓、20：肝臓、21：肺、22：リンパ節、23：乳腺、24：胎盤、25：前立腺、26：唾液腺、27：骨格筋、28：脊髄、29：脾臓、30：胃、31：精巣、32：胸腺、33：甲状腺、34：気管、35：子宮、Pr：プラスミド、M：分子量マーカー

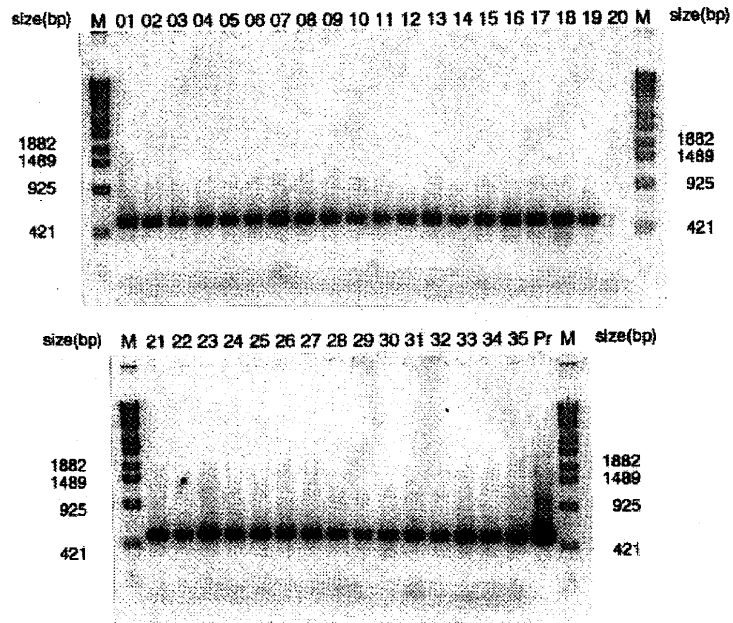
【図1】



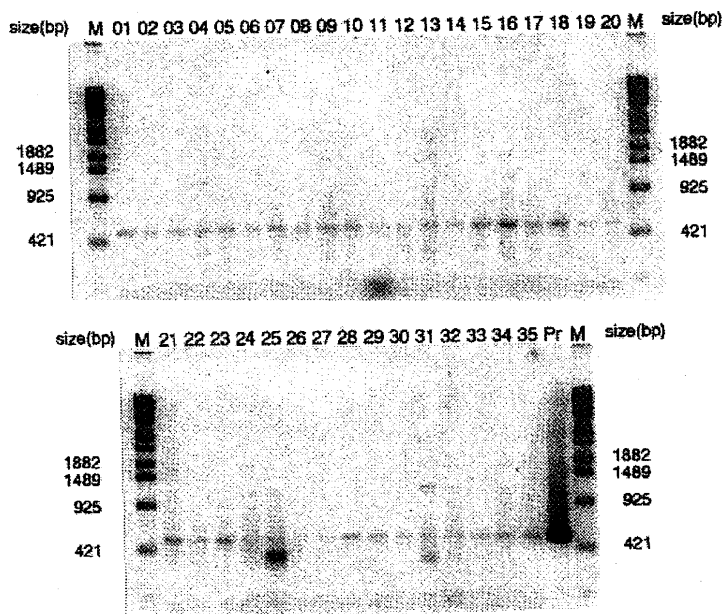
【図2】



【図3】



【図4】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁷

識別記号

F I

テ-マコード(参考)

A 6 1 K 39/395

A 6 1 K 48/00

4 B 0 6 5

48/00

A 6 1 P 3/10

4 C 0 8 4

A 6 1 P 3/10

9/04

4 C 0 8 5

9/04

9/10

4 H 0 4 5

9/10

11/00

11/00

11/02

11/02

11/04

11/04

11/06

11/06

13/12

13/12

17/06

17/06

19/02

17/06

19/06

19/02

19/10

19/06

31/00

19/10

31/12

31/00

31/18

31/12

35/00

31/18

35/02

35/00

37/04

35/02

37/08

37/04

43/00

37/08

C 0 7 K 14/47

1 0 1

43/00

1 0 1

16/18

C 0 7 K 14/47

C 1 2 N 1/21

16/18

C 1 2 P 21/02

C

C 1 2 N	1/21	C 1 2 Q	1/68	A
	5/10	G 0 1 N	33/15	Z
C 1 2 P	21/02		33/50	Z
C 1 2 Q	1/68		33/53	D
G 0 1 N	33/15			M
	33/50		33/566	
	33/53	C 1 2 P	21/08	
		(C 1 2 N	1/21	
	33/566	C 1 2 R	1:19)	
// C 1 2 P	21/08		1:91)	
(C 1 2 N	1/21	C 1 2 N	15/00	Z N A A
C 1 2 R	1:19)	A 6 1 K	37/02	
(C 1 2 N	5/10	C 1 2 N	5/00	A
C 1 2 R	1:91)	C 1 2 R	1:91)	

(72)発明者 中村 祐輔
神奈川県横浜市青葉区あざみ野 1 - 17 - 33

(72)発明者 菅野 純夫
東京都杉並区南荻窪 4 - 8 - 13

Fターム(参考) 2B030 AB03 AD05 CA06 CA17 CA19
2G045 AA34 AA35 BB20 CB01 CB02
CB17 DA12 DA13 DA14 DA36
FB02 FB03
4B024 AA01 AA11 BA80 CA04 CA05
CA20 DA03 EA04 FA02 FA06
GA13 GA14 GA18 HA11
4B063 QA01 QA13 QA17 QA19 QQ43
QR55 QR62 QS16 QS25 QS34
QX01
4B064 AG01 AG26 AG27 CA02 CA10
CA11 CA19 CA20 CC01 CC24
DA01 DA13
4B065 AA26X AA93X AA93Y AB01
AC14 AC16 BA03 BA05 BA25
BB01 BC03 BC07 BD50 CA24
CA44 CA46
4C084 AA01 AA13 AA16 CA23 CA49
NA14 ZA361 ZA362 ZA451
ZA452 ZA591 ZA592 ZA751
ZA752 ZA891 ZA892 ZA971
ZA972 ZB131 ZB132 ZB151
ZB152 ZB261 ZB262 ZB331
ZB332 ZB351 ZB352 ZC351
ZC352 ZC551 ZC552
4C085 AA11 DD62
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10
CA40 DA75 EA20 EA50 FA71
FA74

专利名称(译)	新型多肽		
公开(公告)号	JP2001352986A	公开(公告)日	2001-12-25
申请号	JP2000175475	申请日	2000-06-12
申请(专利权)人(译)	协和醱酵工业株式会社		
[标]发明人	小畑長英 西達也 太田紀夫 中村祐輔 菅野純夫		
发明人	小畑 長英 西 達也 太田 紀夫 中村 祐輔 菅野 純夫		
IPC分类号	A01H5/00 A01K67/027 A01K67/033 A61K38/00 A61K39/395 A61K48/00 A61P3/10 A61P9/04 A61P9/10 A61P11/00 A61P11/02 A61P11/04 A61P11/06 A61P13/12 A61P17/06 A61P19/02 A61P19/06 A61P19/10 A61P31/00 A61P31/12 A61P31/18 A61P35/00 A61P35/02 A61P37/04 A61P37/08 A61P43/00 C07K14/47 C07K16/18 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12P21/02 C12P21/08 C12Q1/68 C12R1/19 C12R1/91 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/566		
FI分类号	A01H5/00.A A01K67/027 A01K67/033.501 A61K39/395.D A61K39/395.N A61K48/00 A61P3/10 A61P9/04 A61P9/10 A61P11/00 A61P11/02 A61P11/04 A61P11/06 A61P13/12 A61P17/06 A61P19/02 A61P19/06 A61P19/10 A61P31/00 A61P31/12 A61P31/18 A61P35/00 A61P35/02 A61P37/04 A61P37/08 A61P43/00.101 C07K14/47 C07K16/18 C12N1/21 C12P21/02.C C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566 C12P21/08 C12R1/19 C12R1/91 C12N15/00.ZNA.A A61K37/02 C12N5/00.A A61K38/00 A61K38/01 C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A C12N5/00.101 C12N5/10		
F-TERM分类号	2B030/AB03 2B030/AD05 2B030/CA06 2B030/CA17 2B030/CA19 2G045/AA34 2G045/AA35 2G045/BB20 2G045/CB01 2G045/CB02 2G045/CB17 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/FB02 2G045/FB03 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA80 4B024/CA04 4B024/CA05 4B024/CA20 4B024/DA03 4B024/EA04 4B024/FA02 4B024/FA06 4B024/GA13 4B024/GA14 4B024/GA18 4B024/HA11 4B063/QA01 4B063/QA13 4B063/QA17 4B063/QA19 4B063/QQ43 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QS16 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QX01 4B064/AG01 4B064/AG26 4B064/AG27 4B064/CA02 4B064/CA10 4B064/CA11 4B064/CA19 4B064/CA20 4B064/CC01 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA26X 4B065/AA93X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/AC16 4B065/BA03 4B065/BA05 4B065/BA25 4B065/BB01 4B065/BC03 4B065/BC07 4B065/BD50 4B065/CA24 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA01 4C084/AA13 4C084/AA16 4C084/CA23 4C084/CA49 4C084/NA14 4C084/ZA361 4C084/ZA362 4C084/ZA451 4C084/ZA452 4C084/ZA591 4C084/ZA592 4C084/ZA751 4C084/ZA752 4C084/ZA891 4C084/ZA892 4C084/ZA971 4C084/ZA972 4C084/ZB131 4C084/ZB132 4C084/ZB151 4C084/ZB152 4C084/ZB261 4C084/ZB262 4C084/ZB331 4C084/ZB332 4C084/ZB351 4C084/ZB352 4C084/ZC351 4C084/ZC352 4C084/ZC551 4C084/ZC552 4C085/AA11 4C085/DD62 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA71 4H045/FA74		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供用于筛选和/或开发用于治疗，预防和/或诊断与NF-和κB活化相关的疾病的肽的多肽，编码该多肽的DNA，反义DNA /使用DNA进行基因治疗的DNA的RNA，识别多肽的抗体，来自前述多肽的具有增强活性的修饰多肽，多肽的显性失活变

体，以及利用它们的方法。解决方案：鉴定激活NF-和κB的多肽产生编码多肽的DNA和识别多肽的抗体。这些可用于筛选用于和诊断与NF-和κB活化相关的疾病的药物。

【图 1】

