

(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2002 - 330769

(P2002 - 330769A)

(43)公開日 平成14年11月19日(2002.11.19)

(51) Int. Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マコード* (参考)
C 1 2 N 15/09	ZNA	A 0 1 K 67/027	2 G 0 4 5
A 0 1 K 67/027		A 6 1 K 45/00	4 B 0 2 4
A 6 1 K 45/00		A 6 1 P 3/10	4 B 0 6 4
A 6 1 P 3/10		9/00	4 B 0 6 5
9/00		9/02	4 C 0 8 4

審査請求 有 請求項の数 18 O L (全 26数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001 - 151887(P2001 - 151887)

(22)出願日 平成13年5月22日(2001.5.22)

(31)優先権主張番号 60/208156

(32)優先日 平成12年5月31日(2000.5.31)

(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 000204343

ファイザー製薬株式会社

東京都新宿区西新宿2丁目1番1号

(72)発明者 新庄 勝浩

愛知県知多郡武豊町字五号地2 ファイザー

製薬株式会社中央研究所内

(72)発明者 藪内 光

神奈川県相模原市東林間4 - 14 - 3 - 202

(74)代理人 100096666

弁理士 室伏 良信

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ヒトバニロイド受容体様タンパク質

(57)【要約】

【課題】 バニロイド受容体様タンパク質 2 (V R L - 2) 関連疾病の治療剤のスクリーニング系を構築するのに有用なポリペプチド、それをコードするポリヌクレオチド、ポリヌクレオチドプローブ又はプライマー、前記 DNA 分子を含む発現ベクター及び宿主細胞、前記ポリペプチドの製造方法、前記ポリペプチドに免疫特異的な抗体、 V R L - 2 受容体に関連する疾病を診断するための診断キット、前記ポリペプチドを調節する調節物質を同定するためのスクリーニング方法、前記スクリーニング方法によって得ることのできる調節物質、前記ポリペプチドの生物学的機能に関連する症状の治療用医薬組成物、及びバニロイド受容体様遺伝子に関する非ヒトトランスジェニック動物モデルを提供する。

【解決手段】 前記ポリペプチドは、ヒト V R L - 2 である。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 (a) 配列番号2又は配列番号4で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチド又はその変異体；及び(b) 配列番号1又は配列番号3で表されるポリヌクレオチド配列から翻訳される推定アミノ酸配列を有するポリペプチド又はその変異体から選択されるポリペプチド。

【請求項2】 配列番号2又は配列番号4で表されるアミノ酸配列と少なくとも75%の同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項1に記載のポリペプチド。

【請求項3】 配列番号2又は配列番号4で表されるアミノ酸配列と少なくとも85%の同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項1に記載のポリペプチド。

【請求項4】 配列番号2又は配列番号4で表されるアミノ酸配列と少なくとも95%の同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項1に記載のポリペプチド。

【請求項5】 (a) 配列番号2又は配列番号4で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；

(b) 配列番号1で表されるヌクレオチド配列における第85番～第2700番のヌクレオチド配列、若しくは配列番号3で表されるヌクレオチド配列における第43番～第1851番のヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチド、又はその変異体；

(c) 前記ポリヌクレオチド(a)又は(b)と少なくとも70%の同一性を有するヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド；

(d) 前記ポリヌクレオチド(a)～(c)のいずれか1つのポリヌクレオチドに対する相補体；

(e) 前記ポリヌクレオチド(a)～(d)のいずれか1つのポリヌクレオチドにハイブリダイズ可能なヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド；及び

(f) 前記ポリヌクレオチド(a)～(e)のいずれか1つのポリヌクレオチドのポリヌクレオチド断片から選択される、単離及び/又は精製ポリヌクレオチド。

【請求項6】 前記ポリヌクレオチド(b)のヌクレオチド配列と少なくとも75%の同一性を有するヌクレオチド配列を含む、請求項5に記載のポリヌクレオチド。

【請求項7】 前記ポリヌクレオチド(b)のヌクレオチド配列と少なくとも85%の同一性を有するヌクレオチド配列を含む、請求項5に記載のポリヌクレオチド。

【請求項8】 前記ポリヌクレオチド(b)のヌクレオチド配列と少なくとも95%の同一性を有するヌクレオチド配列を含む、請求項5に記載のポリヌクレオチド。

【請求項9】 請求項5に記載のいずれか1つのポリヌクレオチドの少なくとも15個の隣接するヌクレオチドを含む、ポリヌクレオチドプローブ又はプライマー。

【請求項10】 発現ベクターが請求項5に記載のポリヌクレオチドを含有する、組換え宿主細胞におけるヒトパニロイド受容体様タンパク質の発現のための発現ベク

*ター。

【請求項11】 宿主細胞が請求項10に記載の発現ベクターを含有する、ヒトパニロイド受容体様タンパク質を発現する宿主細胞。

【請求項12】 請求項11に記載の宿主細胞を、請求項1に記載のポリペプチドの製造に十分な条件下で培養すること、及びその培養培地から前記ポリペプチドを回収することを含む、前記ポリペプチドの製造方法。

10 【請求項13】 請求項1に記載のポリペプチドに免疫特異的な抗体。

【請求項14】 請求項5に記載のポリヌクレオチド又は請求項1に記載のポリペプチドに対する抗体を含む、ヒトパニロイド受容体様タンパク質の生物学的機能に関連する疾病又は前記疾病に対する感受性を診断するための診断キット。

【請求項15】 試験化合物又は試料と、請求項1に記載のポリペプチドとを接触させること、及び前記ポリペプチドの機能を調節する前記試験化合物又は試料の活性を検出することを含む、前記ポリペプチドの機能を調節する調節物質を同定するためのスクリーニング方法。

【請求項16】 請求項15に記載のスクリーニング方法によって得ることのできる調節物質。

【請求項17】 治療に有効な量の請求項16に記載の調節物質と、薬剂的に許容することのできる担体とを含む、ヒトパニロイド受容体様タンパク質の生物学的機能に関連する症状の治療用医薬組成物。

【請求項18】 同種の正常な動物に対して、パニロイド受容体様機能に関して変化を有する、パニロイド受容体様遺伝子機能に関する非ヒトトランスジェニック動物モデル。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、ヒトパニロイド受容体様タンパク質2(vanilloid receptor-like protein 2; VRL-2)ポリペプチド、前記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、ポリヌクレオチドプローブ又はプライマー、前記DNA分子を含む発現ベクター及び宿主細胞に関する。更に、本発明は、前記ポリペプチドの製造方法；前記ポリペプチドに免疫特異的な抗体；VRL-2受容体に関連する疾病を診断するための診断キット；前記ポリペプチドを調節する調節物質(modulator)を同定するためのスクリーニング方法；前記スクリーニング方法によって得ることのできる調節物質；前記ポリペプチドの生物学的機能に関連する症状の治療用医薬組成物；及びパニロイド受容体様遺伝子に関する非ヒトトランスジェニック動物モデルに関する。

【0002】

【従来技術】カプサイシン及びカプサイシノイド(capsaicinoid)の鎮痛性作用は、種々の障

害、例えば、痛み、慢性の痛み、神経障害性の痛み、術後の痛み、慢性関節リウマチの痛み、神経痛、神経障害、痛覚過敏、神経傷害、虚血、神経変性、発作、失禁、及び炎症性障害の治療における使用において公知である[例えば、Campbellら, "Clinical Applications of Capsaicin and Its Analogues" in Capsaicin in the Study of Pain, Academic Press, 第255-272頁(1993)]。カプサイシン受容体は、イオンチャンネルファミリーに属するポリペプチドであると考えられている。これらの受容体は、カプサイシン(バニロイド化合物)の作用機構に関連するものと考えられている。カプサイシンは、有害な刺激に関する情報を中枢神経系に伝える感覚ニューロンを選択的に活性化することによって、強烈な痛みの感覚を引き出す[例えば、Caterina, M. J. ら, "The Capsaicin Receptor: A Heat Activated Ion Channel In the Pain Pathway", Nature, 389, 816-824(1997); 及びCaterina, M. J. ら, "A Capsaicin-Receptor Homologue with a High Threshold For Noxious Heat", Nature, 398, 436-441(1999)]。前記チャンネルは、カチオン透過性であり、二価カチオン(特にカルシウムイオン)に関して顕著な選択性を示す。カルシウムイオン透過性のレベルは、ほとんどの非選択性カチオンチャンネルで観察されるレベルを上回っており、NMDA型グルタミン酸受容体及び7ニコチン性アセチルコリン受容体で観察される値と同様である。

【0003】バニロイド受容体又はバニロイド様受容体をコードするいくつかのポリヌクレオチドがクローニングされ、同定されている[Caterina, M. J. ら, Nature, 389, 816-824(1997); 及びCaterina, M. J. ら, Nature, 398, 436-441(1999)]。PCT出願国際公開公報WO99/37765号は、バニロイド受容体ポリペプチド及びバニロイド受容体関連ポリペプチド(特にカプサイシン受容体サブタイプVR1及びVR2)並びにコードするポリヌクレオチド配列を開示する。PCT出願国際公開公報WO99/37765号は、VANILREP2ポリペプチド及びポリヌクレオチド、組換え体、並びにそれらの製造方法を開示する。

【0004】カプサイシン受容体の他のサブタイプが見出され、同定されたとすれば、例えば、カプサイシン受容体に関する新規リガンドを見出すために前記サブタイプを使用することは有用であろう。

【0005】

【発明が解決しようとする課題及び課題を解決するための手段】本発明は、(a)配列番号2又は配列番号4で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチド又はその変異体;及び(b)配列番号1又は配列番号3で表されるポリヌクレオチド配列から翻訳される推定アミノ酸配列を有するポリペプチド又はその変異体から選択されるポリペプチドを提供する。前記ポリペプチドは、新規のヒトバニロイド受容体様タンパク質2ポリペプチドとして同定された。本明細書において、新規ヒトバニロイド受容体様タンパク質2を「VRL-2」又は「VRL-2タンパク質」と称する。本明細書において、これらのポリペプチドを「VRL-2ポリペプチド」又は「VRL-2受容体ポリペプチド」と称することができる。

【0006】また、本発明は、

(a)配列番号2又は配列番号4で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチド;
(b)配列番号1で表されるヌクレオチド配列における第85番~第2700番のヌクレオチド配列、若しくは配列番号3で表されるヌクレオチド配列における第43番~第1851番のヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチド、又はその変異体;

(c)前記ポリヌクレオチド(a)又は(b)と少なくとも70%の同一性を有するヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド;

(d)前記ポリヌクレオチド(a)~(c)のいずれか1つのポリヌクレオチドに対する相補体;

(e)前記ポリヌクレオチド(a)~(d)のいずれか1つのポリヌクレオチドにハイブリダイズ可能なヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド;及び

(f)前記ポリヌクレオチド(a)~(e)のいずれか1つのポリヌクレオチドのポリヌクレオチド断片から選択される、単離及び/又は精製ポリヌクレオチドを提供する。

【0007】また、本発明は、前記ポリヌクレオチドの少なくとも15個の隣接するヌクレオチドを含む、ポリヌクレオチドプローブ若しくはプライマー、又はその相補体を提供する。また、本発明は、発現ベクターが前記DNA分子を含有する、組換え宿主細胞におけるVRL-2タンパク質の発現のための発現ベクター、そして、宿主細胞が前記発現ベクターを含有する、組換えVRL-2タンパク質を発現する宿主細胞を提供する。また、本発明は、前記宿主細胞を、前記VRL-2受容体ポリペプチドの製造に十分な条件下で培養すること、及びその培養培地から前記ポリペプチドを回収することを含む、前記ポリペプチドの製造方法を提供する。

【0008】VRL-2受容体ポリペプチド、前記VRL-2受容体をコードするDNA、前記発現ベクター、及び組換えVRL-2を発現する組換え宿主細胞は、VRL-2受容体の機能を調節する調節物質の同定に有用である。従って、本発明は、更に、試験化合物又は試料

とVRL-2受容体ポリペプチドとを接触させること、及び前記VRL-2受容体ポリペプチドの機能を調節する前記化合物又は試料の活性を検出することを含む、前記VRL-2受容体ポリペプチドを調節(例えば、結合)する調節物質を同定するためのスクリーニング方法を提供する。

【0009】また、本発明は、前記スクリーニング方法により得ることのできるVRL-2受容体調節物質(例えば、アゴニスト及びアンタゴニスト)を提供する。これらのVRL-2受容体調節物質は、不適当なVRL-2受容体活性、又はVRL-2受容体の機能に関連する疾病又は症状の治療に有用である。前記疾病には、痛み、侵害受容の痛み、慢性の痛み、神経障害性の痛み、術後の痛み、癌の痛み、慢性関節リウマチの痛み、骨関節症、糖尿病性神経障害、神経痛、神経障害、痛覚過敏、神経傷害、筋肉-骨格の痛み、腰痛、神経変性、発作、炎症性障害、喘息、アレルギー、尿生殖器障害、失禁、高血圧症、低血圧症、及び血管周囲の疾病(perivascular disease)などが含まれる。

【0010】従って、VRL-2受容体調節物質は、前記疾病の治療に有用である。加えて、VRL-2受容体ポリペプチド及びVRL-2受容体をコードするポリヌクレオチドは、VRL-2受容体-関連疾病を検出するための診断アッセイに有用である。また、本発明は、前記ポリヌクレオチド又はVRL-2受容体ポリペプチドに対する抗体を含む、ヒトパニロイド受容体様タンパク質の生物学的機能に関連する疾病又は前記疾病に対する感受性を診断するための診断キットを提供する。加えて、本発明は、VRL-2受容体ポリペプチドに免疫特異的な抗体、そして、同種の正常な動物に対して、VRL-2受容体機能に関して変化を有する、VRL-2受容体遺伝子機能に関する非ヒトトランスジェニック動物モデルを提供する。

【0011】

【発明の実施の形態】本明細書において、用語「ヌクレオチド配列」とは、オリゴヌクレオチド配列又はポリヌクレオチド配列、並びに変異体、相同体、断片、及びそれらの誘導体(例えば、それらの部分)を意味する。前記ヌクレオチド配列は、ゲノム又は合成又は組換え起源のDNA又はRNAであることができ、更に、二重鎖、あるいは、センス鎖又はアンチセンス鎖のいずれかに相当する一重鎖であることができる。好ましくは、前記用語「ヌクレオチド配列」はDNAを意味する。更に好ましくは、前記用語「ヌクレオチド配列」は、組換えDNA技術の使用により調製したDNA(すなわち、組換えDNA)を意味する。

【0012】本明細書において、「アミノ酸配列」とは、ペプチド若しくはタンパク質配列又はその部分を意味する。本明細書において、用語「単離された(iso-

lated)」及び「精製された(purified)」とは、天然環境から移され、天然で関連する少なくとも1つの他の成分から単離又は分離された分子(核酸又はアミノ酸配列のいずれか)を意味する。

【0013】本発明の好適ポリペプチドにおけるアミノ酸配列に関する用語「変異体(variant)」には、前記配列における、アミノ酸1又はそれ以上の任意の置換(substitution)、変異(variation)、改変(modification)、置換(replacement)、欠失(deletion)、又は付加(addition)が含まれる(但し、得られたポリペプチドがVRL-2活性を有する)。

【0014】本発明の好適ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列に関する用語「変異体(variant)」又は「断片」には、前記配列における、核酸1又はそれ以上の任意の置換(substitution)、変異(variation)、改変(modification)、置換(replacement)、欠失(deletion)、又は付加(addition)が含まれる(但し、得られたヌクレオチド配列が、VRL-2活性を有するポリペプチドをコードするか、あるいは、コードすることができる)。相対的配列相同性(relative sequence homology)[すなわち、配列同一性(sequence identity)]は、2又はそれ以上の配列間の「%相同性」を計算することのできる市販のコンピュータプログラムによって決定することができる。前記コンピュータプログラムの代表的な例は、「CLUSTAL」である。用語「変異体」には、ストリンジェント(stringent)な条件下[例えば、65及び0.1×SSC(1×SSC=0.15M-NaCl, 0.015Mクエン酸Na₃, pH7.0)]で、本明細書に記載のヌクレオチド配列とハイブリダイズ可能な配列に相捕的な配列が含まれる。

【0015】用語「発現ベクター」とは、インピボ又はインピトロ発現が可能な構築物を意味する。本明細書において、用語「抗体」には、ポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体、キメラ抗体、単鎖抗体、並びにヒト化抗体が含まれる。用語「免疫特異的」とは、抗体が、他の関連ポリペプチドに対するアフィニティーと比較して、発明のポリペプチドに対して、実質的に強いアフィニティーを有することを意味する。

【0016】以下、本発明を更に説明する。本発明は、新規のヒトパニロイド受容体様タンパク質2(VRL-2)ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を同定したことに基づく。前記ポリヌクレオチドを単離及び精製し、そのヌクレオチド配列を決定した。

【0017】《VRL-2受容体ポリペプチド》第1の観点によれば、本発明は、(a)配列番号2又は配列番

号4で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチド又はその変異体；及び(b)配列番号1又は配列番号3で表されるポリヌクレオチド配列から翻訳される推定アミノ酸配列を有するポリペプチド又はその変異体から選択されるポリペプチドを提供する。

【0018】本発明のVRL-2受容体ポリペプチドは、イオンチャネルファミリーのポリペプチドに属するものと考えられる。前記チャネルは、カチオン透過性であり、二価カチオン(特にカルシウムイオン)に関して顕著な選択性を示す。VRL-2受容体のカチオン透過性及びシグナル伝達活性は、VRL-2受容体ポリペプチドの機能を調節(例えば、結合、阻害、及び活性化)するリガンドによって影響される。以下、これらの性質を「VRL-2受容体活性」と称する。

【0019】好ましくは、前記ポリペプチド又は変異体は、配列番号2又は配列番号4で表されるアミノ酸配列と少なくとも75%(より好ましくは少なくとも85%、更に好ましくは少なくとも95%)の同一性(identity)を有するアミノ酸配列を含む。前記変異体は、好ましくは、前記VRL-2活性の少なくとも1つを示す。より具体的には、前記ポリペプチドは、或る残基を、VRL-2活性を有する別の酸基に置換する保存性アミノ酸置換によって、これまで述べたものから変化することができる。前記置換は、アラニン、バリン、ロイシン、及びイソロイシンの間で；セリン及びトレオニンの間で；酸性残基であるアスパラギン酸及びグルタミン酸の間で；アスパラギン及びグルタミンの間で；塩基性残基であるリシン及びアルギニンの間で；あるいは、芳香族残基であるフェニルアラニン及びチロシンの間で；実施することができる。従って、本発明は、配列番号2又は配列番号4で表されるアミノ酸配列において、アミノ酸1~10、好ましくは1~5、より好ましくは1~3、更に好ましくは1~2、特に好ましくは1が、置換、欠失、又は付加(任意の組み合わせで)されたポリペプチドの変異体を含む。

【0020】本発明のポリペプチドは、「成熟(mature)」タンパク質の形であることもできるし、あるいは、より大きなタンパク質(例えば、前駆体又は融合タンパク質)の一部であることもできる。付加的なアミノ酸配列、例えば、分泌若しくはリーダー配列、プロ配列、精製に役立つ配列(例えば、多重ヒスチジン残基)、又は組換え製造中の安定性のための付加的配列を含むことが、多くの場合、有利である。

【0021】本発明のポリペプチドは、任意の適当な方法により調製することができる。前記ポリペプチドには、単離された天然ポリペプチド、組換えにより製造されたポリペプチド、合成により製造されたポリペプチド、あるいは、これらの方法の組み合わせにより製造されたポリペプチドが含まれる。前記ポリペプチドの調製方法は、当業者には周知である。本発明のVRL-2受

容体ポリペプチドは、前記ポリペプチドのアミノ酸配列をコードするDNA分子を用いて調製することができる。

【0022】《ポリヌクレオチド/DNA分子》別の観点によれば、本発明は、

(a)配列番号2又は配列番号4で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；

(b)配列番号1で表されるヌクレオチド配列における第85番~第2700番のヌクレオチド配列、若しくは配列番号3で表されるヌクレオチド配列における第43番~第1851番のヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチド、又はその変異体；

(c)前記ポリヌクレオチド(a)又は(b)と少なくとも70%の同一性を有するヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド；

(d)前記ポリヌクレオチド(a)~(c)のいずれか1つのポリヌクレオチドに対する相補体；

(e)前記ポリヌクレオチド(a)~(d)のいずれか1つのポリヌクレオチドにハイブリダイズ可能なヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド；及び

(f)前記ポリヌクレオチド(a)~(e)のいずれか1つのポリヌクレオチドのポリヌクレオチド断片

から選択される、単離及び/又は精製ポリヌクレオチドに関する。好ましくは、前記ポリヌクレオチドは、前記ポリヌクレオチド(b)のヌクレオチド配列と少なくとも75%(より好ましくは少なくとも85%、更に好ましくは少なくとも95%)の同一性を有するヌクレオチド配列を含む。

【0023】配列番号1及び配列番号3で表されるヌクレオチド配列は、ラットバニロイド受容体1(VR1)(M. J. Caterinaら, Nature, 389, 816-824, 1997)、ラット/ヒトバニロイド受容体様タンパク質1(VRL-1)(M. J. Caterinaら, Nature, 398, 436-441, 1999)、ラットストレッチ-活性化(stretch-activated)チャネル(SIC)(J. Biol. Chem., 274, 6330-6335, 1999)、及びマウス増殖因子調節(growth-factor-regulated)チャネル(GRC)(Nature Cell Biol., 1, 165-170)と相同性(homology)を示す。配列番号1及び配列番号3で表されるヌクレオチド配列は、それぞれ、VRL-2a及びVRL-2bポリペプチドをコードする全長cDNAであることを見出した。アミノ酸配列に関して、ヒトVRL-2aの、ラットVR1、ラットVRL-1、ヒトVRL-1、ラットSIC、及びマウスGRCに対する類似性(similarity)は、それぞれ、51%、46%、47%、59%、及び47%であった。アミノ酸配列に関して、ヒトVRL-2bの、ラットVR1、ラットVRL

- 1、ヒトVRL-1、ラットSIC、及びマウスGRCに対する類似性は、それぞれ、50%、45%、46%、59%、及び45%であった。VR1は、熱、プロトン、及びカプサイシン活性化カチオンチャネルである。ラットVRL-1は、熱活性化カチオンチャネルである。ラットSICは、機械受容カチオンチャネルである。マウスGRCは、IGF-1調節(IGF-1-regulated)カチオンチャネルである。従って、ヒトVRL-2a及びVRL-2bの両者は、刺激(例えば、熱、プロトン、化学物質、膜の機械刺激、増殖因子)により活性化されるカチオンチャネルであると予想される。

【0024】本発明のポリヌクレオチド(DNA分子)は、標準的なクローニング及びスクリーニング技術を使用して、ヒト胎盤、脳、心臓、メラノサイト、肝臓、脾臓、包皮、肺、上皮小体、扁桃、胚全体、ジャーキット(Jurkat)T細胞、B細胞、及び精巢の細胞中のmRNAに由来するcDNAライブラリーから取得することができる[例えば、Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)]。また、本発明のDNA分子は、天然源(例えば、ゲノムDNAライブラリー)から取得することもできるし、あるいは、周知及び市販の技術を用いて合成することもできる。

【0025】また、他の細胞及びセルラインも、VRL-2 cDNAを単離するための使用に適していることができる。適当な細胞の選択は、細胞表面上のVRL-2のスクリーニングにより行なうことができる。VRL-2活性の検出方法は、当業者に周知であり、放射性同位元素で標識された受容体特異的リガンドの結合を測定する。このアッセイにおけるVRL-2活性を有する細胞は、VRL-2 cDNAの単離に適していることができる。

【0026】VRL-2 cDNAをクローニングするのに、任意の種々の手法を用いることができる。これらの方法には、特に限定されるものではないが、適当な発現ベクター系におけるVRL-2含有cDNAライブラリー構築後のVRL-2 cDNAの直接的機能発現が含まれる。別の方法は、VRL-2タンパク質のアミノ酸配列から設計した標識オリゴヌクレオチドプローブを用いる、バクテリオファージ又はプラスミドシャトルベクターにおいて構築したVRL-2含有cDNAライブラリーのスクリーニングである。好適な方法には、VRL-2タンパク質をコードする部分cDNAを用いる、バクテリオファージ又はプラスミドシャトルベクターにおいて構築したVRL-2含有cDNAライブラリーのスクリーニングが含まれる。この部分cDNAは、他のカプ

サイシン受容体において公知のアミノ酸配列由来の縮重オリゴヌクレオチドプライマーの設計を通して、VRL-2 DNA断片の特異的PCR増幅により得られる。

【0027】その他のタイプのライブラリー及び他の細胞又はセルラインから構築したライブラリーが、VRL-2をコードするDNAを単離するのに有用であることができることは、当業者にとって容易に明らかである。他のタイプのライブラリーには、特に限定されるものではないが、ゲノムDNAライブラリー、及びヒト赤白血病細胞(erythroleukemia cell)以外の他の細胞又はセルライン由来のcDNAライブラリーが含まれる。

【0028】VRL-2活性を有する細胞又はセルラインから、適当なcDNAライブラリーを調製することができることは、当業者にとって容易に明らかである。VRL-2を単離するためのcDNAライブラリー調製に使用する細胞又はセルラインの選択は、先に引用し、本明細書において使用する公知の標識リガンド結合アッセイを用いて、細胞関連VRL-2活性の最初の測定によって行なうことができる。

【0029】cDNAライブラリーの調製は、当業者に周知の標準的技術によって行なうことができる。周知のcDNAライブラリー構築技術は、例えば、Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1982)に見出すことができる。

【0030】また、VRL-2をコードするDNAが、適当なゲノムDNAライブラリーからも単離することができることは、当業者にとって容易に明らかである。ゲノムDNAライブラリーの構築は、当業者に周知の標準的技術により行なうことができる。周知のゲノムDNAライブラリー構築技術は、Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1982)に見出すことができる。

【0031】好適方法の1つによりVRL-2遺伝子をクローニングするために、VRL-2又は相同タンパク質のアミノ酸配列又はDNA配列が必要である。これを達成するために、VRL-2タンパク質又は相同タンパク質を精製し、自動シーケンサーにより部分アミノ酸配列を決定することができる。完全なアミノ酸配列を決定することは必要でないが、部分VRL-2 DNA断片のPCR増幅のために、アミノ酸6~8個の領域2つの一次配列を決定することができる。

【0032】一度適当なアミノ酸配列が同定されると、それらをコードすることのできるDNA配列を合成する。遺伝暗号は縮重であるので、特定アミノ酸をコードするのに1を越えるコドンを用いることができ、従って、任意の同様のDNAオリゴヌクレオチドセットによりアミノ酸配列をコードすることができる。前記セットの1つだけがVRL-2配列と同一であろうが、前記セットのその他も、ミスマッチを有するDNAオリゴヌクレオチドの存在にもかかわらず、VRL-2 DNAとハイブリダイズ可能であろう。前記ミスマッチDNAオリゴヌクレオチドは、まだ十分に、VRL-2 DNAとハイブリダイズすることができ、VRL-2をコードするDNAの同定及び単離を可能にする。

【0033】好適方法の1つを用いて、VRL-2ポリペプチドをコードするcDNAクローンを、2段階アプローチ[ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)に基づく技術とcDNAライブラリースクリーニングとを使用する]により単離する。第1段階では、精製したVRL-2又は相同タンパク質由来のNH₂末端及び内部アミノ酸配列を、VRL-2-特定DNA断片の増幅用縮重オリゴヌクレオチドプライマーを設計するのに用いる。第2段階では、これらの断片をクローニングし、ヒト赤白血球由来のcDNAライブラリーから全長cDNAを単離するためのプローブとして使用する。

【0034】本発明のポリヌクレオチドは、本発明のポリペプチドをコードする全長cDNA及びゲノムクローンを単離するために、そして、配列番号1又は配列番号3と高い配列類似性を有する他の遺伝子[ヒト材料(source)由来のパラログ(paralog)並びにヒト以外の種由来のオーソログ(ortholog)及びパラログをコードする遺伝子を含む]のcDNA及びゲノムクローンを単離するために、cDNA及びゲノムDNA用のハイブリダイゼーションプローブとして、あるいは、核酸増幅(PCR)反应用プライマーとして、用いることができる。

【0035】本発明のプローブ又はプライマーは、少なくとも15ヌクレオチド(好ましくは少なくとも30ヌクレオチド)を一般的に含み、少なくとも50ヌクレオチドを含むことができる。特に好適なプローブは、30~50ヌクレオチドを有するであろう。特に好適なプライマーは、20~25ヌクレオチドを有するであろう。

【0036】本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド(ヒト以外の種由来の相同体を含む)は、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で、配列番号1又は配列番号3で表される配列を有する標識プローブ又はその断片を用いて、適当なライブラリーをスクリーニングする工程と、前記ポリヌクレオチド配列を含有する全長cDNA及びゲノムクローンを単離する工程とを含む方法により、取得することができる。前記ハイブリダイゼーション技術は、当業者に周知である。好

ましいストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下には、溶液[50%ホルムアミド, 5×SSC(150 mM-NaCl, 15 mMクエン酸三ナトリウム), 50 mMリン酸ナトリウム(pH 7.6), 5×Denhardt's溶液, 10%硫酸デキストラン, 及び20 µg/mL変性及び剪断サケ精子DNAを含む]中の42での一晩のインキュベーションの後、約65の0.1×SSC中でのフィルターの洗浄が含まれる。従って、本発明には、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で、配列番号1又は配列番号3で表される配列を有する標識プローブ又はその断片を用いて、適当なライブラリーをスクリーニングすることによって得ることのできるポリヌクレオチドも含まれる。

【0037】多くの場合、単離されたcDNA配列が不完全であり、前記cDNAの5'端においてポリペプチドをコードする領域が短いことを、当業者は認めるであろう。これは、第1鎖cDNA合成の際に、逆転写酵素がmRNA鋳型のDNAコピーを完全に行なうことができなかったことの結果である。なお、逆転写酵素は、本来、「processivity」(重合反応の際に、酵素が鋳型に結合し続ける能力の程度)が低い酵素である。

【0038】全長cDNAを取得、あるいは、短いcDNAを伸張させるために、当業者が利用可能で、且つ周知ないくつかの方法、例えば、RACE(Rapid Amplification of cDNA ends)法に基づく方法が存在する(例えば、Frohmanら, PNAS USA, 85, 8998-9002, 1988参照)。前記方法の最近の改法[例えば、Marathon™ technology(Clontech Laboratories Inc.)により例示される]は、より長いcDNAに関する研究を十分に簡易化した。

【0039】《発現ベクター》本発明の組換えVRL-2ポリペプチドは、当業者に周知の方法により、発現ベクターを含む遺伝子工学的に作製した宿主細胞から調製することができる。従って、本発明は、組換え宿主細胞(発現ベクターが前記DNA分子を含有する)におけるヒトバニロイド受容体様タンパク質発現用の発現ベクターに関する。

【0040】先述した方法により得られたクローン化VRL-2 cDNAは、適当なプロモーター及び他の適当な転写調節要素を含有する発現ベクターに分子クローニングし、原核又は真核宿主細胞中に転移させて組換えVRL-2ポリペプチドを製造することにより、組換え的に発現させることができる。前記操作に関する技術は、先述のManiatis, T,らの文献に見出すことができ、当業者に周知である。

【0041】本明細書において、発現ベクターは、適当な宿主におけるクローン化DNAの転写及びそのmRN

Aの翻訳に必要とされるDNA配列として規定される。前記ベクターは、種々の宿主、例えば、細菌、藍藻、植物細胞、昆虫細胞、及び動物細胞における真核性DNAの発現に用いることができる。

【0042】特別に設計されたベクターは、宿主間、例えば、細菌-酵母間又は細菌-動物細胞間の往復を可能にする。適当に構築された発現ベクターは、宿主細胞における自立複製用の複製起点、選択マーカー、限定数の有用な制限酵素部位、高いコピー数の潜在性、及び活性プロモーターを含有すべきである。プロモーターは、RNAポリメラーゼをDNAに結合させ、RNA合成を開始させるDNA配列として規定される。強力なプロモーターは、高頻度でmRNAを始動させるプロモーターである。発現ベクターには、特に限定されるものではないが、クローニングベクター、改変クローニングベクター、特別に設計されたプラスミド又はウイルスが含まれる。

【0043】種々の哺乳動物発現ベクターを、哺乳動物細胞における組換えVRL-2の発現に用いることができる。組換えVRL-2発現に適することができる市販の哺乳動物発現ベクターには、特に限定されるものではないが、pMC1neo (Stratagene)、pXT1 (Stratagene)、pSG5 (Stratagene)、pcDNA1、pcDNA3.1 (Invitrogen)、EBO-pSV2-neo (ATCC 37593)、pBPV-1 (8-2) (ATCC 37110)、pDBPV-MMTneo (342-12) (ATCC 37224)、pRSVgpt (ATCC 37199)、pRSVneo (ATCC 37198)、pSV2-dhfr (ATCC 37146)、pUCTag (ATCC 37460)、及びIZD35 (ATCC 37565)が含まれる。

【0044】《発現ベクターを含有する宿主細胞》また、VRL-2ポリペプチドをコードするDNAは、宿主細胞における発現用の発現ベクターにクローニングすることができる。宿主細胞は、原核細胞又は真核細胞であることができ、特に限定されるものではないが、細菌、真菌、昆虫、動物(哺乳動物を含む)、及び植物細胞が含まれる。適当な細菌細胞には、連鎖球菌 (Streptococci)、ブドウ球菌 (Staphylococci)、大腸菌 (E. coli)、放線菌 (Streptomyces)、及び枯草菌 (Bacillus subtilis) 細胞が含まれる。適当な真菌細胞には、酵母 (yeast) 細胞及びコウジカビ (Aspergillus) 細胞が含まれる。動物細胞には、ヒト、ウシ、ブタ、サル、及び齧歯動物起源のセルラインが含まれる。適当な昆虫細胞には、ショウジョウバエ (Drosophila) S2及びスポドプテラ (Spodoptera) Sf9細胞が含まれる。適当な動物細胞には、CHO、COS、HeLa、C127、3T

3、BHK、HEK293、及びボーズメラノーマ (Bowes melanoma) 細胞が含まれる。適していることができ、且つ市販されている哺乳動物種由来のセルラインには、CV-1 (ATCC CCL 70)、COS-1 (ATCC CRL 1650)、COS-7 (ATCC CRL 1651)、CHO-K1 (ATCC CCL 61)、3T3 (ATCC CCL 92)、NIH/3T3 (ATCC CRL 1658)、HeLa (ATCC CCL 2)、C1271 (ATCC CRL 1616)、BS-C-1 (ATCC CCL 26)、及びMRC-5 (ATCC CCL 171)が含まれる。

【0045】発現ベクターは、いくつかの技術(特に限定されるものではないが、トランスフォーメーション、トランスフェクション、プロトプラスト融合、及びエレクトロポレーションが含まれる)のいずれか1つにより、宿主細胞に導入することができる。発現ベクターを含有する細胞は、個別に分析して、VRL-2タンパク質を製造するかどうかを決定する。VRL-2発現細胞の同定は、いくつかの方法(特に限定されるものではないが、抗VRL-2抗体による免疫学的反応性、及び宿主細胞関連VRL-2活性の存在が含まれる)により行なうことができる。

【0046】また、VRL-2 DNAの発現は、インビトロで製造した合成mRNAを用いて行なうことができる。合成mRNAは、種々のセルフリー (cell-free) 系(特に限定されるものではないが、コムギ胚芽抽出物及び網状赤血球抽出物が含まれる)において効率的に翻訳することができ、また、細胞に基づく系(特に限定されるものではないが、カエル卵母細胞へのマイクロインジェクションが含まれる)において効率的に翻訳することができる。カエル卵母細胞へのマイクロインジェクションによることが好ましい。

【0047】至適レベルの受容体活性及び/又はVRL-2を得るVRL-2 cDNA配列を決定するために、VRL-2 cDNA分子(特に限定されるものではないが、以下が含まれる)を構築することができる: VRL-2 cDNAの全長オープンリーディングフレーム、及び受容体タンパク質の特定ドメインのみ又は前記タンパク質の再配置したドメインをコードするcDNAの一部を含有する種々の構築物。全ての構築物は、VRL-2 cDNAの5'及び/又は3'非翻訳領域の全部又は一部を含有するように、あるいは、全く含有しないように、設計することができる。VRL-2活性及びタンパク質の発現レベルは、適当な宿主細胞へのこれらの構築物の導入(単独及び組み合わせの両方)の後に、決定することができる。一過性(transient)アッセイにおいて最適発現をもたらすVRL-2 cDNAカセットの決定に続いて、このVRL-2 cDNA構築物を、種々の発現ベクター(組換えウイルスを含む)(特

に限定されるものではないが、哺乳動物細胞、植物細胞、昆虫細胞、卵母細胞、大腸菌、及び酵母細胞用のベクターを含む)に転移させる。

【0048】VRL-2受容体活性のレベル及びVRL-2タンパク質のレベルの両方について、哺乳動物細胞トランスフェクタント(transfectant)を以下の方法によりアッセイする。VRL-2受容体活性の評価は、細胞に対する標識リガンドの直接導入と、VRL-2発現細胞への前記リガンドの特異的結合量の決定とを含む。受容体活性に関する結合アッセイは、当業者10に公知である(Freyら, 1993, Eur. J. Pharmacol., 244, pp239-250)。

【0049】宿主細胞中のVRL-2タンパク質レベルは、種々の技術(特に限定されるものではないが、イムノアフィニティー及び/又はリガンドアフィニティー技術を含む)により定量される。VRL-2特異的アフィニティービーズ又はVRL-2特異的抗体は、³⁵S-メチオニン標識又は非標識VRL-2タンパク質を単離するの15に使用される。標識VRL-2タンパク質は、SDS-PAGEにより分析される。非標識VRL-2タンパク質は、VRL-2特異的抗体を用いるウエスタンブロットティング、ELISA、又はRIAアッセイにより検出される。

【0050】宿主細胞におけるVRL-2の発現の後に、VRL-2タンパク質を回収することにより、VRL-2特異的リガンドを結合可能な活性型の形で、VRL-2を得ることができる。いくつかのVRL-2精製方法が可能であり、使用に適している。

【0051】組換えVRL-2は、細胞溶解物及び抽出物から、あるいは、馴化(conditioned)培養培地から、塩分別(salt fractionation)、イオン交換クロマトグラフィー、サイズ排除(size exclusion)クロマトグラフィー、ヒドロキシアパタイト吸着クロマトグラフィー、及び疎水性相互作用(hydrophobic interaction)クロマトグラフィーの単独の適用又は種々の組み合わせにより、精製することができる。30

【0052】従って、本発明は、前記DNA分子を含有する発現ベクターを含む宿主細胞を、VRL-2受容体ポリペプチドの製造に十分な条件下で培養すること、そして、前記培養培地から前記ポリペプチドを回収することを含む、前記ポリペプチドの製造方法も提供する。ポリペプチド製造の条件は、当業者により、容易に設計することができる。ポリペプチドが細胞内合成、単離、及び/又は精製の際に変性した場合には、活性コンフォメーションを再生するために、タンパク質のリフォールディングに関する周知技術を使用することができる。40

【0053】《抗体》また、本発明は、VRL-2受容体ポリペプチドに免疫特異的な抗体を提供する。前記抗50

体は、公知技術に従って、ポリペプチド又はエピトープ担持断片、類似体、又は細胞を動物(好ましくは非ヒト動物)に投与することによって得ることができる。モノクローナル抗体の調製のために、継代セルライン培養により製造される抗体を提供する任意の技術を用いることができる。例示には、ハイブリドーマ技術[Kohler, G.及びMilstein, C., Nature (1975) 256: 495-497]、トリオーマ(trioma)技術、ヒトB細胞ハイブリドーマ技術[Kozborら, Immunology Today (1983) 4: 72]、及びEBV-ハイブリドーマ技術(Coleら, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, 77-96, Alan R. Liss, Inc., 1985)が含まれる。また、単鎖抗体の製造技術(例えば、米国特許4,946,778号明細書に記載の技術)を、本発明のポリペプチドに対する単鎖抗体を製造するのに適合させることができる。また、トランスジェニックマウス又は他の生物(他の哺乳動物を含む)を、ヒト化抗体を発現させるのに使用することができる。これまで述べた抗体は、ポリペプチドを発現するクローンの単離又は同定するのに、あるいは、アフィニティークロマトグラフィーによりポリペプチドを精製するのに使用することができる。また、本発明のポリペプチドに対する抗体は、特に、疾病の治療に用いることができる。

【0054】《診断ツール》本発明のDNA分子は、診断試薬として用いることができる。本発明のポリヌクレオチドにより特徴づけられる遺伝子の変異型(機能不全に関連する)の検出は、疾病(遺伝子の発現不足、過剰発現、あるいは、空間的又は時間的に変化した発現に起因する)、又は疾病に対する感受性の診断の一助に、あるいは、明らかにすることができる診断ツールを提供する。遺伝子変異を担持する個体は、種々の技術によって、DNAレベルで検出することができる。

【0055】診断用核酸は、対象の細胞(例えば、血液、尿、唾液、組織生検、又は解剖材料に由来)から得ることができる。ゲノムDNAを、検出に直接用いることができるし、あるいは、分析前にPCR又は他の増幅技術により酵素的に増幅させることもできる。また、RNA又はcDNAを同様に用いることができる。正常の遺伝子型と比較して、増幅産物の大きさの変化によって、欠失及び挿入を検出することができる。増幅DNAを標識VRL-2ヌクレオチド配列とハイブリダイズさせることによって、点変異を同定することができる。RNAアーゼ消化により、あるいは、融点の違いにより、完全にマッチする配列と、ミスマッチの二重鎖とを区別することができる。また、ゲル中のDNA断片の電気泳動移動度における変化(変性剤の存在下又は不在下)により、あるいは、直接的なDNA配列決定により、DNA配列の違いを検出することができる[例えば、Mye

rsら, Science (1985) 230:1242 参照]。

【0056】また、特定位置での配列変化を、ヌクレアーゼプロテクションアッセイ（例えば、RNアーゼ及びS1プロテクション）又は化学的切断法[Cottonら, Proc Natl Acad Sci USA (1985) 85:4397-4401] 参照]によって、明らかにすることができる。別の実施態様では、例えば、遺伝子変異を効率的にスクリーニングするために、VRL-2ヌクレオチド配列又はその断片を含むオリゴヌクレオチドプローブのアレイ(array)を構築することができる。アレイ技術方法は、周知であり、広く一般に適用可能である。また、アレイ技術方法は、分子遺伝学における種々の問題（遺伝子発現、遺伝的連鎖、及び遺伝的多様性を含む）に取り組むのに用いることができる[例えば、M. Cheeら, Science, Vol. 274, pp. 610-613 (1996) 参照]。

【0057】診断アッセイは、先述の方法によりVRL-2遺伝子中の変異を検出することによって、VRL-2関連疾病に対する感受性を診断又は決定する方法を提供する。加えて、前記疾病は、ポリペプチド又はmRNAレベルの異常な減少又は増加を、対象由来の試料から決定することを含む方法により診断することができる。発現の減少又は増加は、ポリヌクレオチドの定量に関する当業者に周知の任意の方法[例えば、核酸増幅(例えば、PCR、RT-PCR)、RNアーゼプロテクション、ノーザンブロットング、及び他のハイブリダイゼーション法]を用いて、RNAレベルで測定することができる。ホスト(host)由来の試料中のタンパク質(例えば、本発明のポリペプチド)のレベルを決定するのに用いることのできるアッセイ技術は、当業者に周知である。前記アッセイ方法には、ラジオイムノアッセイ、競合的結合アッセイ、ウェスタンブロット分析、及びELISAアッセイが含まれる。

【0058】別の観点によれば、本発明は、本発明のDNA分子又は本発明のポリペプチドに対する抗体を含む診断キットに関する。所望により、前記診断キットは、公知の診断キットで用いることのできる他の材料を含むことができる。前記キットは、特に、疾病又は疾病に対する感受性(好ましくは、痛み、慢性の痛み、神経障害性の痛み、術後の痛み、慢性関節リウマチの痛み、神経痛、神経障害、痛覚過敏、神経傷害、虚血、神経変性、発作、失禁、及び炎症性障害)を診断するのに用いることができる。

【0059】《スクリーニング方法》本発明による新規のVRL-2受容体は、VRL-2受容体活性の機能を調節する(modulate)調節物質を同定するためのアッセイ方法における使用に適している。従って、また、本発明は、VRL-2ポリペプチドの機能を調節す

る調節物質のスクリーニング方法を提供する。本明細書において、「受容体の機能の調節」又は「受容体活性の調節」には、受容体の阻害又は活性化が含まれ、更に、受容体活性の正常な調整(regulation)に直接的又は間接的に影響を与えることが含まれる。本明細書において、用語「調節物質」は、受容体活性の調整に直接的又は間接的に影響を与える化合物、アゴニスト、アンタゴニスト、リガンド、基質、及び酵素を意味する。

【0060】本発明のVRL-2受容体は、受容体調節物質を同定するためのアッセイ方法で使用するための天然及び組換え材料(source)の両方から得ることができる。一般に、VRL-2受容体調節物質を同定するためのアッセイ方法は、本発明のVRL-2ポリペプチド(あるいは、前記ポリペプチドを担持する細胞又は膜)と、VRL-2受容体調節物質を含有することが予想される試験化合物又は試料とを接触させること、そして、VRL-2受容体の機能(例えば、結合活性)を調節する活性を検出することを含むことができる。試験化合物又は試料を、例えば、精製受容体、受容体製造細胞の細胞画分(subcellular fraction)、及び/又は受容体発現細胞の全体について、直接、試験することができる。試験化合物又は試料を、公知の標識又は非標識受容体リガンドの存在又は不在で、受容体に添加することができる。更に、これらのスクリーニング方法は、ポリペプチドを担持する細胞に適した検出系を用いることによって、ポリペプチドの活性化又は阻害により生じるシグナルを候補化合物が引き起こすか否かを試験することができる。試験化合物又は試料の調節活性は、例えば、受容体への結合、受容体の活性化、受容体活性の阻害、受容体への他の化合物の結合の阻害又は増強、受容体調整の調節、又は細胞内活性の調節に関する試験化合物又は試料の各能力を分析することによって決定することができる。

【0061】本発明においては、他の公知のスクリーニング方法を使用することができる。前記公知方法は、PCT国際公開公報WO99/37765号第13頁第5行~第14頁第31行に見出すことができる。加えて、本発明のスクリーニング方法は、VRL-2調節活性を有しない或る化合物を同定するカウンターアッセイをその範囲に含む。前記スクリーニング方法は、本発明のポリペプチドに関する調節物質を同定するためのスクリーニングキットの使用により、実施することができる。前記キットは、(a)本発明のポリペプチド；(b)本発明のポリペプチドを発現する組換え細胞；又は(c)本発明のポリペプチドを発現する細胞膜を含む。スクリーニングキットに用いることのできる任意の公知の材料又は成分を、本発明のスクリーニングキットに加えることができる。VRL-2受容体活性の調節物質は、これまで述べたように、VRL-2受容体活性に関連する疾病

状態を治療するのに有用である。

【0062】《医薬組成物》更に、本発明は、治療に有効な量の前記スクリーニング方法で得られた調節物質（例えば、アゴニスト又はアンタゴニスト）と薬剤学的に許容することのできる担体とを含む、ヒトバニロイド受容体様タンパク質の生物学的機能に関連する症状の治療用医薬組成物を提供する。VRL-2受容体の生物学的機能に関連する症状には、痛み、侵害受容の痛み、慢性の痛み、神経障害性の痛み、術後の痛み、癌の痛み、慢性関節リウマチの痛み、骨関節症、糖尿病性神経障害、神経痛、神経障害、痛覚過敏、神経傷害、筋肉-骨格の痛み、腰痛、神経変性、発作、炎症性障害、喘息、アレルギー、尿生殖器官障害、失禁、高血圧症、低血圧症、及び血管周囲の疾病などが含まれる。従って、本発明の医薬組成物は、前記疾病の治療用医薬として有用である。

【0063】本発明の医薬組成物は、経口、非経口、又は局所のいずれかの経路で哺乳動物に投与することができる。通常、これらの化合物は、最も望ましくは、1日当たり0.1mg~750mg（好ましくは1日当たり10mg~500mg）の投与範囲でヒトに投与するが、治療対象の体重及び状態、治療される疾病の状態、及び選択される特定の投与経路に応じて、必要な変更が行なわれるであろう。

【0064】本発明の化合物は、先述の前記経路のいずれかにより、単独で、あるいは、薬剤学的に許容することのできる担体又は希釈剤との組み合わせで、投与することができる。前記投与は、単回又は複数回投与で実施することができる。より具体的には、本発明の新規治療剤は、幅広い種々の剤形で投与することができる。すなわち、錠剤、カプセル剤、ロゼンジ剤、トローチ剤、ハードキャンディー剤、散剤、スプレー剤、クリーム剤、塗剤、坐剤、ゼリー剤、ゲル剤、ペースト剤、ローション剤、軟膏剤、水性懸濁液、注射溶液、エリキシル剤、及びシロップ剤などの形で、種々の薬剤学的に許容されることのできる不活性担体と組み合わせることができる。前記担体には、固体希釈剤若しくは充填剤、滅菌水性媒体、及び種々の非毒性有機溶媒などが含まれる。更に、経口医薬組成物には、適当な甘味及び/又は香気を付与することができる。通常、治療に有効な本発明の化合物は、前記剤形中に、5重量%~70重量%（好ましくは10重量%~50重量%）の範囲の濃度レベルで存在する。

【0065】経口投与用では、種々の賦形剤（例えば、微結晶セルロース、クエン酸ナトリウム、炭酸カルシウム、リン酸二カリウム、及びグリシン）を含有する錠剤を、種々の崩壊剤〔例えば、デンプン（好ましくはコーン、ポテト、又はタピオカスターチ）、アルギン酸、及び或るケイ酸複合体〕と一緒に、顆粒化結合剤（例えば、ポリビニルピロリドン、スクロース、ゼラチン、及びアラビアゴム）と一緒に用いることができる。加え

て、滑沢剤（例えば、ステアリン酸マグネシウム、ラウリル硫酸ナトリウム、及びタルク）が、多くの場合、錠剤形成用に非常に有用である。また、同型の固体組成物をゼラチンカプセルにおける充填剤として用いることができる。これに関連する好適材料には、ラクトース（乳糖）及び高分子量ポリエチレングリコールが含まれる。経口投与用に水性懸濁液及び/又はエリキシル剤が望まれる場合には、活性成分を、種々の甘味量若しくは香料、着色剤、又は色素と組み合わせることができ、所望により、更に乳化剤及び/又は懸濁剤と、前記希釈剤（例えば、水、エタノール、プロピレングリコール、グリセリン、及びそれらの種々の組み合わせ）と一緒に組み合わせることができる。

【0066】非経口投与用では、ゴマ若しくはピーナツオイル又は水性プロピレングリコールのいずれかにおける本発明の化合物の溶液を用いることができる。所望に応じて、前記水溶液を適当に緩衝化（好ましくはpH>8）すべきであり、液体希釈剤を最初に等張性にするべきである。これらの水溶液は、静脈注射用に適している。油性溶液は、関節内、筋内、及び皮下注射用に適している。滅菌条件下におけるこれらの全ての溶液の調製は、当業者に周知の標準的薬剤学的技術により、容易に達成される。加えて、また、皮膚の炎症症状を治療する場合に、本発明の化合物を局所投与することができる。この場合、好ましくは、標準的薬剤学的手法に従って、クリーム剤、ゼリー剤、ゲル剤、ペースト剤、及び軟膏剤により行なうことができる。

【0067】《トランスジェニック動物》本発明のポリペプチド及び/又はDNA分子は、遺伝学的に改変した非ヒト動物、あるいは、セルラインにおける部位特異的遺伝子改変を生じさせるのに用いることができる。用語「トランスジェニック」は、例えば、VRL-2受容体遺伝子活性の欠失又は他のノックアウト、宿主細胞に安定的に転移された外来性VRL-2受容体遺伝子、変化させたVRL-2受容体遺伝子発現を有する「ノックイン(knock-in)」、あるいは、レポーター遺伝子に作動可能に結合させた外来性VRL-2受容体ポリペプチドプロモーターを有する、遺伝学的に改変した動物を含むことを意図する。VRL-2受容体ポリペプチド機能のホモ接合性(homozygous)及びヘテロ接合性(heterozygous)のノックアウト及びノックインが特に好ましい。

【0068】トランスジェニック動物は、当業者に公知の方法に従って作製することができる。例えば、トランスジェニック動物は、内在性VRL-2受容体座を変化させる相同組換えによって作製することができる。あるいは、核酸構築物をゲノムにランダムに組み込む。安定的な組み込み用ベクターには、プラスミド、レトロウイルス及びその他の動物ウイルス、並びにYACなどが含まれる。トランスジェニック動物としては、ハツカネズ

ミ属(Mus)(例えば、マウス)、クマネズミ属(Rattus)(例えば、ラット)、アナウサギ属(Oryctolagus)(例えば、ラビット)、及びゴールデンハムスター属(Mesocricetus)(例えば、ハムスター)からなる群から選んだ属由来の哺乳動物が好ましい。トランスジェニック動物の調製及び使用に関する、より具体的な記載は、WO99/37675号公報第34頁第36行~第37頁第12行に見出すことができる。

【0069】

【実施例】以下、実施例によって本発明を具体的に説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。

【実施例1】《hVRL-2 cDNAのクローニング》ラットバニロイド受容体サブタイプ1(以下、「VR1」と称する)のポリヌクレオチド及びポリペプチド配列を用いて、LifeSeq™データベース(Incyte)に対してBLAST検索を行なった。ラットVR1に対して高い相同性を示すヌクレオチド配列を含有するcDNAクローン6個が得られた。クローン6個の

内、5個は、ラットVR1のヒト相同体、すなわち、ヒトバニロイド受容体様タンパク質1(以下、VRL-1と称する)であった。しかし、cDNAクローン1個は、VR1又はVRL-1のいずれともマッチせず、バニロイド受容体サブタイプに相同な新規のヒト受容体をコードした。このcDNAを「VRL-2」と命名した。このcDNAクローンは、完全なオープンリーディングフレームを含有していなかった。

【0070】更に、ヒトVRL-2の全長cDNAのクローニングを実施した。VRL-2の開始コドンと同定するために、インサイト社のクローン及びヒト膵臓Marathon-Ready™ cDNA(Clontech, Palo Alto, Calif.)の配列データから設計したプライマー2個[5'-GCT GTC GGG GAA GAG GCG GGC ACA CTT G-3'(配列番号5)及び5'-GCA GCA GTT CAT TGA TGG GCT CCA CAG C-3'(配列番号6)]を使用した。5'RACE(rapid amplification of cDNA ends)を、以下の条件下(9

構成した。一方のクローンをVRL-2aと命名し、もう一方をVRL-2bと命名した。

【0071】VRL-2a及びVRL-2bの完全なオープンリーディングフレームを単離するために、アドバンテージ-HF(Advantage-HF)PCRキット(Clontech, Palo Alto, Calif.)及びヒト腎臓cDNAライブラリー(Clontech, Palo Alto, Calif.)を用いてPCRを実施した。5'RACE産物及びインサイト社のクローンの配列データからプライマー2セットを設計した:

VRL-2aフォワード:5'-ATC TGC GCA TGA AGT TCC AG-3'(配列番号7);

VRL-2bフォワード:5'-GAC ATC GCG GAG CGC ACC GGC AAC ATG-3'(配列番号8);及び

VRL-2a, bリバース:5'-GCT GGA CTA GAA ATGAGT GGG CAG AGA A-3'(配列番号9)。

【0072】PCRは、以下の条件下(94で20秒間、58で30秒間、及び72で30秒間を、25サイクル)で実施した。2.6kbのPCR産物(VRL-2a)及び1.9kbのPCR産物(VRL-2b)をクローニングし、自動DNAシーケンサーABI PRISM 310(PE Biosystems, Foster City, Calif.; TOYOBO Gene Analysis製造)により配列決定した。VRL-2a及びVRL-2bのアミノ酸配列を、それぞれ、配列番号2及び配列番号4に示す。

【0073】

【実施例2】《哺乳動物細胞におけるhVRL-2の発現》ヒトVRL-2aをコードするcDNAを、真核性発現ベクターpcDNA3.1(Invitrogen)にサブクローニングした。CHO-K1細胞及びHEK293細胞を、ポリ-L-リシンでコートしたガラス底ディッシュ上に蒔いた後、発現ベクター及びpIRES2-EGFP(Clontech)(合計1.0µg)並びにFuGENE6トランスフェクション試薬(Roche)3µL[35mmディッシュ当たり、OptiMEM培地(Life Technologies)97µL中]を用いて、一過性のトランスフェクションを行なった。

【0074】

【実施例3】《hVRL-2の機能解析》カチオンチャンネルとしてのVRL-2の活性は、蛍光色素及び通常の顕微鏡を用いて容易に検出される。ガラスのカバーガラス上に載せたVRL-2発現細胞(実施例2で得られたもの)に、ハンクスバランス塩緩衝液(Hank's balanced salt buffer)中の膜ポ

テンシカル指示薬 DiBAC 4 又はカルシウム指示薬 (例えば、fura - 2 又は fluo - 3) を加える。蛍光色素を加えた VRL - 2 発現細胞に、浸透圧刺激、機械刺激、又は熱刺激が加わると、蛍光の変化が、倒立蛍光顕微鏡上に配置した単一細胞画像システム (single cell imaging system) によりモニターされる。

【0075】本実施例では、Ca²⁺測定を、トランスフェクションの24~48時間経過後に実施した。単一細胞におけるCa²⁺測定は、倒立蛍光顕微鏡 (IX70; OLYMPUS) 上に配置した蛍光画像システム MERLIN (OLYMPUS) と一緒に、蛍光Ca²⁺指示薬 fura - 2 を用いて行なった。Ca²⁺イメージングのために、等張 (300 mosmol/L) 測定緩衝液 [88 mM - NaCl, 5 mM - KCl, 1 mM - MgCl₂, 1 mM - CaCl₂, 5.5 mM グルコース及び 10 mM - HEPES (pH 7.4) を含有する] 中において、室温で30分間、5 μM - fura - 2 アセトキシメチルエステル (Dojin) を細胞に加えた。浸透度 (osmolarity) は、適当量のマニトールの添加によって調整した。一連の蛍光画像 (340 nm / 380 nm 励起) を撮ることによって、浸透圧変化の前及び後における、GFPの発現を伴うか、あるいは、伴わない、細胞中のCa²⁺流入応答をモニターした。細胞は、最初に、等張溶液中に維持した。200 mosmol/L 測定緩衝液を用いた灌流により、低張刺激を達成した。マニトール濃度の減少により、より低い浸透度の溶液が得られた。効果的なアッセイ緩衝液の容量は2 mL であり、灌流は3 mL / 分の流速で室温にて実施した。灌流溶液の完全な交換は、2分後と仮定した。トランスフェクションしなかった細胞を対照として使用した。別の対照実験を、pcDNA3.1でトランスフェ*

<110> Pfizer Product Inc.

<120> Human Vanilloid Receptor-Like Proteins

<130> JPC9979A

<140>

<141>

<150> US 60/208,156

<151> 2000-05-31

<160> 9

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 2749

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (85)..(2700)

<400> 1

aaccgcttga ggatttaagc ttgcccactt tggc

tccgga gcaagggcag agggctgagc 60

*クシオンした細胞を用いて実施した。

【0076】実験結果を図1~図4に見ることができ。図1及び図2は、hVRL - 2をトランスフェクションしたCHO - K1細胞において、細胞外浸透度の減少に対する応答におけるCa²⁺増加を示す。図1において、ライン1及びライン2は、発現ベクターを含まない細胞 [モック (mock) トランスフェクション] の応答曲線を示す。図2において、ライン1は、GFPネガティブ細胞 (非トランスフェクション細胞) の応答曲線を示し、ライン2は、GFPポジティブ細胞 (hVRL - 2 a トランスフェクション細胞) の応答曲線を示す。図3及び図4は、hVRL - 2をトランスフェクションしたHEK293細胞において、細胞外浸透度の減少に対する応答におけるCa²⁺増加を示す。図3において、ライン1及びライン2は、発現ベクターを含まない細胞 [モック (mock) トランスフェクション] の応答曲線を示す。図4において、ライン1は、GFPネガティブ細胞 (非トランスフェクション細胞) の応答曲線を示し、ライン2は、GFPポジティブ細胞 (hVRL - 2 a トランスフェクション細胞) の応答曲線を示す。これらの図に示されているように、細胞外浸透度が減少すると、細胞内Ca²⁺は、hVRL - 2 a トランスフェクション細胞では顕著に増加し、対照細胞では増加しなかった。この応答は可逆的であり、浸透度の増加が細胞内Ca²⁺の減少を導いた。

【0077】本明細書で引用した全ての刊行物 (特に限定されるものではないが、特許及び特許出願を含む) の内容 (特に、WO99/37765号公報に記載の技術用語の定義) については、個々の刊行物を参照されたい。

【0078】

【配列表】

agtgcagacg ggcctggggc aggc atg gcg gat
 tcc agc gaa ggc ccc cgc 111
 Met Ala Asp Ser Ser Glu G
 ly Pro Arg
 1 5
 gcg ggg ccc ggg gag gtg gct gag ctc ccc
 ggg gat gag agt ggc acc 159
 Ala Gly Pro Gly Glu Val Ala Glu Leu Pro
 Gly Asp Glu Ser Gly Thr
 10 15 20 25
 cca ggt ggg gag gct ttt cct ctc tcc tcc
 ctg gcc aat ctg ttt gag 207
 Pro Gly Gly Glu Ala Phe Pro Leu Ser Ser
 Leu Ala Asn Leu Phe Glu
 30 35 40
 ggg gag gat ggc tcc ctt tcg ccc tca ccg
 gct gat gcc agt cgc cct 255
 Gly Glu Asp Gly Ser Leu Ser Pro Ser Pro
 Ala Asp Ala Ser Arg Pro
 45 50 55
 gct ggc cca ggc gat ggg cga cca aat ctg
 cgc atg aag ttc cag ggc 303
 Ala Gly Pro Gly Asp Gly Arg Pro Asn Leu
 Arg Met Lys Phe Gln Gly
 60 65 70
 gcc ttc cgc aag ggg gtg ccc aac ccc atc
 gat ctg ctg gag tcc acc 351
 Ala Phe Arg Lys Gly Val Pro Asn Pro Ile
 Asp Leu Leu Glu Ser Thr
 75 80 85
 cta tat gag tcc tcg gtg gtg cct ggg ccc
 aag aaa gca ccc atg gac 399
 Leu Tyr Glu Ser Ser Val Val Pro Gly Pro
 Lys Lys Ala Pro Met Asp
 90 95 100 10
 5
 tca ctg ttt gac tac ggc acc tat cgt cac
 cac tcc agt gac aac aag 447
 Ser Leu Phe Asp Tyr Gly Thr Tyr Arg His
 His Ser Ser Asp Asn Lys
 110 115 120
 agg tgg agg aag aag atc ata gag aag cag
 ccg cag agc ccc aaa gcc 495
 Arg Trp Arg Lys Lys Ile Ile Glu Lys Gln
 Pro Gln Ser Pro Lys Ala
 125 130 135
 cct gcc cct cag ccg ccc ccc atc ctc aaa
 gtc ttc aac cgg cct atc 543
 Pro Ala Pro Gln Pro Pro Pro Ile Leu Lys
 Val Phe Asn Arg Pro Ile
 140 145 150
 ctc ttt gac atc gtg tcc cgg ggc tcc act

Val Leu Phe Phe Phe Thr Asn Ile Lys Asp
 Leu Phe Met Lys Lys Cys
 525 530 535
 cct gga gtg aat tct ctc ttc att gat ggc
 tcc ttc cag ctg ctc tac 1743
 Pro Gly Val Asn Ser Leu Phe Ile Asp Gly
 Ser Phe Gln Leu Leu Tyr
 540 545 550
 ttc atc tac tct gtc ctg gtg atc gtc tca
 gca gcc ctc tac ctg gca 1791
 Phe Ile Tyr Ser Val Leu Val Ile Val Ser
 Ala Ala Leu Tyr Leu Ala
 555 560 565
 ggg atc gag gcc tac ctg gcc gtg atg gtc
 ttt gcc ctg gtc ctg ggc 1839
 Gly Ile Glu Ala Tyr Leu Ala Val Met Val
 Phe Ala Leu Val Leu Gly
 570 575 580 5
 85
 tgg atg aat gcc ctt tac ttc acc cgt ggg
 ctg aag ctg acg ggg acc 1887
 Trp Met Asn Ala Leu Tyr Phe Thr Arg Gly
 Leu Lys Leu Thr Gly Thr
 590 595 600
 tat agc atc atg atc cag aag att ctc ttc
 aag gac ctt ttc cga ttc 1935
 Tyr Ser Ile Met Ile Gln Lys Ile Leu Phe
 Lys Asp Leu Phe Arg Phe
 605 610 615
 ctg ctc gtc tac ttg ctc ttc atg atc ggc
 tac gct tca gcc ctg gtc 1983
 Leu Leu Val Tyr Leu Leu Phe Met Ile Gly
 Tyr Ala Ser Ala Leu Val
 620 625 630
 tcc ctc ctg aac ccg tgt gcc aac atg aag
 gtg tgc aat gag gac cag 2031
 Ser Leu Leu Asn Pro Cys Ala Asn Met Lys
 Val Cys Asn Glu Asp Gln
 635 640 645
 acc aac tgc aca gtg ccc act tac ccc tcg
 tgc cgt gac agc gag acc 2079
 Thr Asn Cys Thr Val Pro Thr Tyr Pro Ser
 Cys Arg Asp Ser Glu Thr
 650 655 660 6
 65
 ttc agc acc ttc ctc ctg gac ctg ttt aag
 ctg acc att ggc atg ggc 2127
 Phe Ser Thr Phe Leu Leu Asp Leu Phe Lys
 Leu Thr Ile Gly Met Gly
 670 675 680
 gac ctg gag atg ctg agc agc acc aag tac
 ccc gtg gtc ttc atc atc 2175
 Asp Leu Glu Met Leu Ser Ser Thr Lys Tyr

atc atc aac gag gac ccg ggc aag aat gag
 acc tac cag tat tat ggc 2511
 Ile Ile Asn Glu Asp Pro Gly Lys Asn Glu
 Thr Tyr Gln Tyr Tyr Gly
 795 800 805
 ttc tcg cat acc gtg ggc cgc ctc cgc agg
 gat cgc tgg tcc tcg gtg 2559
 Phe Ser His Thr Val Gly Arg Leu Arg Arg
 Asp Arg Trp Ser Ser Val
 810 815 820 8
 25
 gta ccc cgc gtg gtg gaa ctg aac aag aac
 tcg aac ccg gac gag gtg 2607
 Val Pro Arg Val Val Glu Leu Asn Lys Asn
 Ser Asn Pro Asp Glu Val
 830 835 840
 gtg gtg cct ctg gac agc atg ggg aac ccc
 cgc tgc gat ggc cac cag 2655
 Val Val Pro Leu Asp Ser Met Gly Asn Pro
 Arg Cys Asp Gly His Gln
 845 850 855
 cag ggt tac ccc cgc aag tgg agg act gat
 gac gcc ccg ctc tag 2700
 Gln Gly Tyr Pro Arg Lys Trp Arg Thr Asp
 Asp Ala Pro Leu
 860 865 870
 ggactgcagc ccagccccag cttctctgcc cact
 catttc tagtccagc 2749

 <210> 2
 <211> 871
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 2
 Met Ala Asp Ser Ser Glu Gly Pro Arg Ala
 Gly Pro Gly Glu Val Ala
 1 5 10 15
 Glu Leu Pro Gly Asp Glu Ser Gly Thr Pro
 Gly Gly Glu Ala Phe Pro
 20 25 30
 Leu Ser Ser Leu Ala Asn Leu Phe Glu Gly
 Glu Asp Gly Ser Leu Ser
 35 40 45
 Pro Ser Pro Ala Asp Ala Ser Arg Pro Ala
 Gly Pro Gly Asp Gly Arg
 50 55 60
 Pro Asn Leu Arg Met Lys Phe Gln Gly Ala
 Phe Arg Lys Gly Val Pro
 65 70 75 80

 Asn Pro Ile Asp Leu Leu Glu Ser Thr Leu
 Tyr Glu Ser Ser Val Val
 85 90 95

Glu Phe Ile Asn Ser Pro Phe Arg Asp Ile
 Tyr Tyr Arg Gly Gln Thr
 225 230 235 2
 40
 Ala Leu His Ile Ala Ile Glu Arg Arg Cys
 Lys His Tyr Val Glu Leu
 245 250 255
 Leu Val Ala Gln Gly Ala Asp Val His Ala
 Gln Ala Arg Gly Arg Phe
 260 265 270
 Phe Gln Pro Lys Asp Glu Gly Gly Tyr Phe
 Tyr Phe Gly Glu Leu Pro
 275 280 285
 Leu Ser Leu Ala Ala Cys Thr Asn Gln Pro
 His Ile Val Asn Tyr Leu
 290 295 300
 Thr Glu Asn Pro His Lys Lys Ala Asp Met
 Arg Arg Gln Asp Ser Arg
 305 310 315 3
 20
 Gly Asn Thr Val Leu His Ala Leu Val Ala
 Ile Ala Asp Asn Thr Arg
 325 330 335
 Glu Asn Thr Lys Phe Val Thr Lys Met Tyr
 Asp Leu Leu Leu Lys
 340 345 350
 Cys Ala Arg Leu Phe Pro Asp Ser Asn Leu
 Glu Ala Val Leu Asn Asn
 355 360 365
 Asp Gly Leu Ser Pro Leu Met Met Ala Ala
 Lys Thr Gly Lys Ile Gly
 370 375 380
 Ile Phe Gln His Ile Ile Arg Arg Glu Val
 Thr Asp Glu Asp Thr Arg
 385 390 395 4
 00
 His Leu Ser Arg Lys Phe Lys Asp Trp Ala
 Tyr Gly Pro Val Tyr Ser
 405 410 415
 Ser Leu Tyr Asp Leu Ser Ser Leu Asp Thr
 Cys Gly Glu Glu Ala Ser
 420 425 430
 Val Leu Glu Ile Leu Val Tyr Asn Ser Lys
 Ile Glu Asn Arg His Glu
 435 440 445
 Met Leu Ala Val Glu Pro Ile Asn Glu Leu
 Leu Arg Asp Lys Trp Arg
 450 455 460
 Lys Phe Gly Ala Val Ser Phe Tyr Ile Asn
 Val Val Ser Tyr Leu Cys
 465 470 475 4
 80
 Ala Met Val Ile Phe Thr Leu Thr Ala Tyr

Met Ile Gly Tyr Ala Ser Ala Leu Val Ser
 Leu Leu Asn Pro Cys Ala
 625 630 635 6
 40
 Asn Met Lys Val Cys Asn Glu Asp Gln Thr
 Asn Cys Thr Val Pro Thr
 645 650 655
 Tyr Pro Ser Cys Arg Asp Ser Glu Thr Phe
 Ser Thr Phe Leu Leu Asp
 660 665 670
 Leu Phe Lys Leu Thr Ile Gly Met Gly Asp
 Leu Glu Met Leu Ser Ser
 675 680 685
 Thr Lys Tyr Pro Val Val Phe Ile Ile Leu
 Leu Val Thr Tyr Ile Ile
 690 695 700
 Leu Thr Phe Val Leu Leu Leu Asn Met Leu
 Ile Ala Leu Met Gly Glu
 705 710 715 7
 20
 Thr Val Gly Gln Val Ser Lys Glu Ser Lys
 His Ile Trp Lys Leu Gln
 725 730 735
 Trp Ala Thr Thr Ile Leu Asp Ile Glu Arg
 Ser Phe Pro Val Phe Leu
 740 745 750
 Arg Lys Ala Phe Arg Ser Gly Glu Met Val
 Thr Val Gly Lys Ser Ser
 755 760 765
 Asp Gly Thr Pro Asp Arg Arg Trp Cys Phe
 Arg Val Asp Glu Val Asn
 770 775 780
 Trp Ser His Trp Asn Gln Asn Leu Gly Ile
 Ile Asn Glu Asp Pro Gly
 785 790 795 8
 00
 Lys Asn Glu Thr Tyr Gln Tyr Tyr Gly Phe
 Ser His Thr Val Gly Arg
 805 810 815
 Leu Arg Arg Asp Arg Trp Ser Ser Val Val
 Pro Arg Val Val Glu Leu
 820 825 830
 Asn Lys Asn Ser Asn Pro Asp Glu Val Val
 Val Pro Leu Asp Ser Met
 835 840 845
 Gly Asn Pro Arg Cys Asp Gly His Gln Gln
 Gly Tyr Pro Arg Lys Trp
 850 855 860
 Arg Thr Asp Asp Ala Pro Leu
 865 870

	25	30	35
	gag aac ccc cac aag aag gcg gac atg cgg		
	cgc cag gac tcg cga ggc 198		
	Glu Asn Pro His Lys Lys Ala Asp Met Arg		
	Arg Gln Asp Ser Arg Gly		
	40	45	50
	aac aca gtg ctg cat gcg ctg gtg gcc att		
	gct gac aac acc cgt gag 246		
	Asn Thr Val Leu His Ala Leu Val Ala Ile		
	Ala Asp Asn Thr Arg Glu		
	55	60	65
	aac acc aag ttt gtt acc aag atg tac gac		
	ctg ctg ctg ctc aag tgt 294		
	Asn Thr Lys Phe Val Thr Lys Met Tyr Asp		
	Leu Leu Leu Leu Lys Cys		
	70	75	80
	gcc cgc ctc ttc ccc gac agc aac ctg gag		
	gcc gtg ctc aac aac gac 342		
	Ala Arg Leu Phe Pro Asp Ser Asn Leu Glu		
	Ala Val Leu Asn Asn Asp		
	85	90	95
	0		
	ggc ctc tcg ccc ctc atg atg gct gcc aag		
	acg ggc aag att ggg atc 390		
	Gly Leu Ser Pro Leu Met Met Ala Ala Lys		
	Thr Gly Lys Ile Gly Ile		
	105	110	115
	ttt cag cac atc atc cgg cgg gag gtg acg		
	gat gag gac aca cgg cac 438		
	Phe Gln His Ile Ile Arg Arg Glu Val Thr		
	Asp Glu Asp Thr Arg His		
	120	125	130
	ctg tcc cgc aag ttc aag gac tgg gcc tat		
	ggg cca gtg tat tcc tcg 486		
	Leu Ser Arg Lys Phe Lys Asp Trp Ala Tyr		
	Gly Pro Val Tyr Ser Ser		
	135	140	145
	ctt tat gac ctc tcc tcc ctg gac acg tgt		
	ggg gaa gag gcc tcc gtg 534		
	Leu Tyr Asp Leu Ser Ser Leu Asp Thr Cys		
	Gly Glu Glu Ala Ser Val		
	150	155	160
	ctg gag atc ctg gtg tac aac agc aag att		
	gag aac cgc cac gag atg 582		
	Leu Glu Ile Leu Val Tyr Asn Ser Lys Ile		
	Glu Asn Arg His Glu Met		
	165	170	175
	80		
	ctg gct gtg gag ccc atc aat gaa ctg ctg		
	cgg gac aag tgg cgc aag 630		
	Leu Ala Val Glu Pro Ile Asn Glu Leu Leu		
	Arg Asp Lys Trp Arg Lys		
	185	190	195

Val Ser Ala Ala Leu Tyr Leu Ala Gly Ile
 Glu Ala Tyr Leu Ala Val
 295 300 305
 atg gtc ttt gcc ctg gtc ctg ggc tgg atg
 aat gcc ctt tac ttc acc 1014
 Met Val Phe Ala Leu Val Leu Gly Trp Met
 Asn Ala Leu Tyr Phe Thr
 310 315 320
 cgt ggg ctg aag ctg acg ggg acc tat agc
 atc atg atc cag aag att 1062
 Arg Gly Leu Lys Leu Thr Gly Thr Tyr Ser
 Ile Met Ile Gln Lys Ile
 325 330 335 3
 40
 ctc ttc aag gac ctt ttc cga ttc ctg ctc
 gtc tac ttg ctc ttc atg 1110
 Leu Phe Lys Asp Leu Phe Arg Phe Leu Leu
 Val Tyr Leu Leu Phe Met
 345 350 355
 atc ggc tac gct tca gcc ctg gtc tcc ctc
 ctg aac ccg tgt gcc aac 1158
 Ile Gly Tyr Ala Ser Ala Leu Val Ser Leu
 Leu Asn Pro Cys Ala Asn
 360 365 370
 atg aag gtg tgc aat gag gac cag acc aac
 tgc aca gtg ccc act tac 1206
 Met Lys Val Cys Asn Glu Asp Gln Thr Asn
 Cys Thr Val Pro Thr Tyr
 375 380 385
 ccc tcg tgc cgt gac agc gag acc ttc agc
 acc ttc ctc ctg gac ctg 1254
 Pro Ser Cys Arg Asp Ser Glu Thr Phe Ser
 Thr Phe Leu Leu Asp Leu
 390 395 400
 ttt aag ctg acc atc ggc atg ggc gac ctg
 gag atg ctg agc agc acc 1302
 Phe Lys Leu Thr Ile Gly Met Gly Asp Leu
 Glu Met Leu Ser Ser Thr
 405 410 415 4
 20
 aag tac ccc gtg gtc ttc atc atc ctg ctg
 gtg acc tac atc atc ctc 1350
 Lys Tyr Pro Val Val Phe Ile Ile Leu Leu
 Val Thr Tyr Ile Ile Leu
 425 430 435
 acc ttt gtg ctg ctc ctc aac atg ctc att
 gcc ctc atg ggc gag aca 1398
 Thr Phe Val Leu Leu Leu Asn Met Leu Ile
 Ala Leu Met Gly Glu Thr
 440 445 450
 gtg ggc cag gtc tcc aag gag agc aag cac
 atc tgg aag ctg cag tgg 1446
 Val Gly Gln Val Ser Lys Glu Ser Lys His

aag aac tcg aac ccg gac gag gtg gtg gtg
 cct ctg gac agc atg ggg 1782
 Lys Asn Ser Asn Pro Asp Glu Val Val Val
 Pro Leu Asp Ser Met Gly
 565 570 575 5
 80
 aac ccc cgc tgc gat ggc cac cag cag ggt
 tac ccc cgc aag tgg agg 1830
 Asn Pro Arg Cys Asp Gly His Gln Gln Gly
 Tyr Pro Arg Lys Trp Arg
 585 590 595
 act gat gac gcc ccg ctc tag ggactgcagc
 ccagccccag cttctctgcc 1881
 Thr Asp Asp Ala Pro Leu
 600
 cactcatttc tagtccagc
 1900

 <210> 4
 <211> 602
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 4
 Met Arg Glu Phe Ile Asn Ser Pro Phe Arg
 Asp Ile Tyr Tyr Arg Gly
 1 5 10 15
 Glu Leu Pro Leu Ser Leu Ala Ala Cys Thr
 Asn Gln Pro His Ile Val
 20 25 30
 Asn Tyr Leu Thr Glu Asn Pro His Lys Lys
 Ala Asp Met Arg Arg Gln
 35 40 45
 Asp Ser Arg Gly Asn Thr Val Leu His Ala
 Leu Val Ala Ile Ala Asp
 50 55 60
 Asn Thr Arg Glu Asn Thr Lys Phe Val Thr
 Lys Met Tyr Asp Leu Leu
 65 70 75 80

 Leu Leu Lys Cys Ala Arg Leu Phe Pro Asp
 Ser Asn Leu Glu Ala Val
 85 90 95
 Leu Asn Asn Asp Gly Leu Ser Pro Leu Met
 Met Ala Ala Lys Thr Gly
 100 105 110
 Lys Ile Gly Ile Phe Gln His Ile Ile Arg
 Arg Glu Val Thr Asp Glu
 115 120 125
 Asp Thr Arg His Leu Ser Arg Lys Phe Lys
 Asp Trp Ala Tyr Gly Pro
 130 135 140
 Val Tyr Ser Ser Leu Tyr Asp Leu Ser Ser
 Leu Asp Thr Cys Gly Glu

Ser Leu Phe Ile Asp Gly Ser Phe Gln Leu
 Leu Tyr Phe Ile Tyr Ser
 275 280 285
 Val Leu Val Ile Val Ser Ala Ala Leu Tyr
 Leu Ala Gly Ile Glu Ala
 290 295 300
 Tyr Leu Ala Val Met Val Phe Ala Leu Val
 Leu Gly Trp Met Asn Ala
 305 310 315 3
 20
 Leu Tyr Phe Thr Arg Gly Leu Lys Leu Thr
 Gly Thr Tyr Ser Ile Met
 325 330 335
 Ile Gln Lys Ile Leu Phe Lys Asp Leu Phe
 Arg Phe Leu Leu Val Tyr
 340 345 350
 Leu Leu Phe Met Ile Gly Tyr Ala Ser Ala
 Leu Val Ser Leu Leu Asn
 355 360 365
 Pro Cys Ala Asn Met Lys Val Cys Asn Glu
 Asp Gln Thr Asn Cys Thr
 370 375 380
 Val Pro Thr Tyr Pro Ser Cys Arg Asp Ser
 Glu Thr Phe Ser Thr Phe
 385 390 395 4
 00
 Leu Leu Asp Leu Phe Lys Leu Thr Ile Gly
 Met Gly Asp Leu Glu Met
 405 410 415
 Leu Ser Ser Thr Lys Tyr Pro Val Val Phe
 Ile Ile Leu Leu Val Thr
 420 425 430
 Tyr Ile Ile Leu Thr Phe Val Leu Leu Leu
 Asn Met Leu Ile Ala Leu
 435 440 445
 Met Gly Glu Thr Val Gly Gln Val Ser Lys
 Glu Ser Lys His Ile Trp
 450 455 460
 Lys Leu Gln Trp Ala Thr Thr Ile Leu Asp
 Ile Glu Arg Ser Phe Pro
 465 470 475 4
 80
 Val Phe Leu Arg Lys Ala Phe Arg Ser Gly
 Glu Met Val Thr Val Gly
 485 490 495
 Lys Ser Ser Asp Gly Thr Pro Asp Arg Arg
 Trp Cys Phe Arg Val Asp
 500 505 510
 Glu Val Asn Trp Ser His Trp Asn Gln Asn
 Leu Gly Ile Ile Asn Glu
 515 520 525
 Asp Pro Gly Lys Asn Glu Thr Tyr Gln Tyr
 Tyr Gly Phe Ser His Thr

<210> 6
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 6
 gcagcagttc attgatgggc tccacagc
 28

<210> 7
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 7
 atctgcgcat gaagttccag
 20

<210> 8
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 8
 gacatcgagg agcgcaccgg caacatg
 27

<210> 9
 <211> 28
 <212> DN#25

26

【図面の簡単な説明】213> Homo sapiens

【図1】発現ベクターを含まないCHO-K1細胞 [モック (mock) トランスフェクション] において、細胞外浸透度の減少に対する応答における Ca^{2+} 増加を示すグラフである。

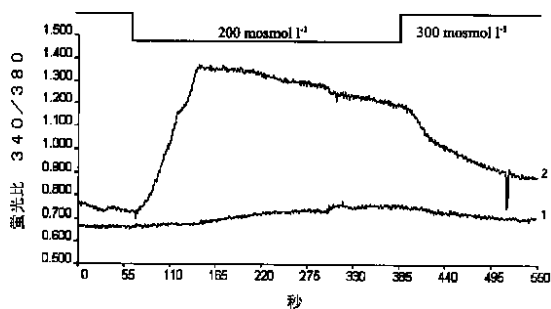
【図2】hVRL-2をトランスフェクションしたCHO-K1細胞 (hVRL-2 aトランスフェクション細胞 / 非トランスフェクション細胞) において、細胞外浸透度の減少に対する応答における Ca^{2+} 増加を示すグラフである。

10

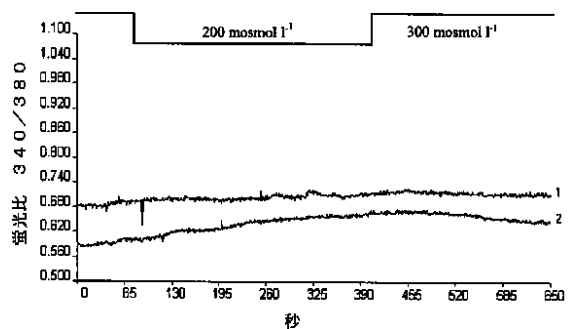
【図3】発現ベクターを含まないHEK293細胞 [モック (mock) トランスフェクション] において、細胞外浸透度の減少に対する応答における Ca^{2+} 増加を示すグラフである。

【図4】hVRL-2をトランスフェクションしたHEK293細胞 (hVRL-2 aトランスフェクション細胞 / 非トランスフェクション細胞) において、細胞外浸透度の減少に対する応答における Ca^{2+} 増加を示すグラフである。

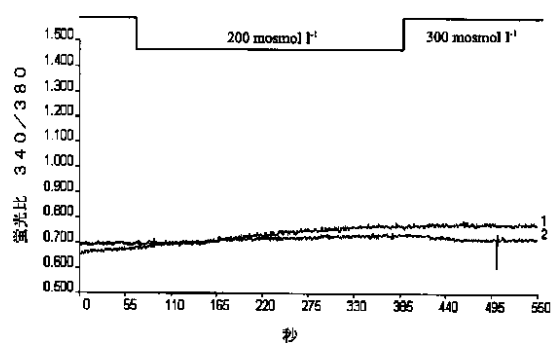
【図2】



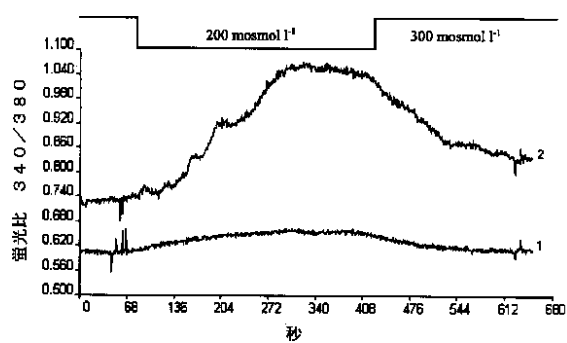
【図3】



【図1】



【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-ト' (参考)
A 6 1 P 9/02		A 6 1 P 9/12	4 H 0 4 5
9/12		11/06	
11/06		13/02	
13/02		15/00	
15/00		19/02	
19/02		21/00	
21/00		25/00	
25/00		25/02	1 0 1
25/02	1 0 1	25/04	
25/04		29/00	
29/00			1 0 1
	1 0 1	35/00	
35/00		37/08	
37/08		41/00	
41/00		43/00	1 1 1
43/00	1 1 1	C 0 7 K 14/705	
C 0 7 K 14/705		16/28	
16/28		C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/15		1/19	
1/19		1/21	
1/21		C 1 2 P 21/02	C
5/10		G 0 1 N 33/15	Z
C 1 2 P 21/02		33/50	Z
G 0 1 N 33/15		33/53	D
33/50			M
33/53		33/566	
		C 1 2 N 15/00	Z N A A
33/566		5/00	A

F ターム(参考) 2G045 AA40 BA11 BB50 DA12 DA13
DA14 DA36 FB02
4B024 AA01 AA11 BA63 BA80 CA04
CA09 CA20 DA02 DA03 EA04
GA13 HA11 HA14
4B064 AG01 AG20 CA10 CA19 DA01
DA13
4B065 AA01X AA58X AA72X AA90X
AA93X AA93Y AB01 AC14
BA02 BA05 CA24 CA44 CA46
4C084 AA17 NA14 ZA01 ZA08 ZA21
ZA36 ZA59 ZA81 ZA94 ZA96
ZB11 ZB13 ZB15 ZB26 ZC35
ZC42
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10
CA40 DA50 DA75 EA20 EA50

专利名称(译)	人类香草素受体样蛋白		
公开(公告)号	JP2002330769A	公开(公告)日	2002-11-19
申请号	JP2001151887	申请日	2001-05-22
[标]申请(专利权)人(译)	美国辉瑞有限公司		
申请(专利权)人(译)	ファイザー製薬株式会社		
[标]发明人	新庄勝浩 藪内光		
发明人	新庄 勝浩 藪内 光		
IPC分类号	A01K67/027 A61K36/81 A61K38/00 A61K45/00 A61P3/10 A61P9/00 A61P9/02 A61P9/12 A61P11/06 A61P13/02 A61P15/00 A61P19/02 A61P21/00 A61P23/00 A61P25/00 A61P25/02 A61P25/04 A61P29/00 A61P35/00 A61P37/08 A61P41/00 A61P43/00 C07K14/705 C07K16/28 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12P21/02 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/566		
CPC分类号	A01K2217/05 A61K38/00 A61P3/10 A61P11/06 A61P13/02 A61P15/00 A61P19/02 A61P21/00 A61P23/00 A61P25/00 A61P25/02 A61P25/04 A61P29/00 A61P35/00 C07K14/705		
FI分类号	A01K67/027 A61K45/00 A61P3/10 A61P9/00 A61P9/02 A61P9/12 A61P11/06 A61P13/02 A61P15/00 A61P19/02 A61P21/00 A61P25/00 A61P25/02.101 A61P25/04 A61P29/00 A61P29/00.101 A61P35/00 A61P37/08 A61P41/00 A61P43/00.111 C07K14/705 C07K16/28 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02.C G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566 C12N15/00.ZNA.A C12N5/00.A C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A C12N5/00.101 C12N5/10		
F-TERM分类号	2G045/AA40 2G045/BA11 2G045/BB50 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/FB02 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA63 4B024/BA80 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/CA20 4B024/DA02 4B024/DA03 4B024/EA04 4B024/GA13 4B024/HA11 4B024/HA14 4B064/AG01 4B064/AG20 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA01X 4B065/AA58X 4B065/AA72X 4B065/AA90X 4B065/AA93X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/BA05 4B065/CA24 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA17 4C084/NA14 4C084/ZA01 4C084/ZA08 4C084/ZA21 4C084/ZA36 4C084/ZA59 4C084/ZA81 4C084/ZA94 4C084/ZA96 4C084/ZB11 4C084/ZB13 4C084/ZB15 4C084/ZB26 4C084/ZC35 4C084/ZC42 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA50 4H045/DA75 4H045/EA20 4H045/EA50		
代理人(译)	枸杞庆喜		
优先权	60/208156 2000-05-31 US		
其他公开文献	JP3501775B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

解决的问题：包括可用于构建与类香草体受体样蛋白2 (VRL-2) 有关的疾病的治疗剂的筛选系统的多肽，编码该多肽的多核苷酸，多核苷酸探针或引物以及DNA分子。 表达载体和宿主细胞，多肽的生产方法，对该多肽具有免疫特异性的抗体，用于诊断VRL-2受体相关疾病的诊断试剂盒以及鉴定调节该多肽的物质 筛选方法，可通过该筛选方法获得的调节剂，用于治疗与该多肽的生物学功能有关的病症的药物组合物以及类香草素受体样基因的非人转基因动物模型。 提供。 该多肽是人VRL-2。

【图2】

