

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2004-49213

(P2004-49213A)

(43) 公開日 平成16年2月19日(2004.2.19)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 N 15/09</b>	C 1 2 N 15/00	Z N A A
<b>A 6 1 K 45/00</b>	A 6 1 K 45/00	2 G O 4 5
<b>A 6 1 P 1/00</b>	A 6 1 P 1/00	4 B O 2 4
<b>A 6 1 P 3/00</b>	A 6 1 P 3/00	4 B O 6 3
<b>A 6 1 P 5/00</b>	A 6 1 P 5/00	4 B O 6 4
		4 B O 6 5
	審査請求 未請求 請求項の数 36 O L	(全 97 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2002-321021 (P2002-321021)	(71) 出願人	000002934
(22) 出願日	平成14年11月5日 (2002. 11. 5)		武田薬品工業株式会社
(31) 優先権主張番号	特願2001-340189 (P2001-340189)		大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号
(32) 優先日	平成13年11月6日 (2001. 11. 6)	(74) 代理人	100114041
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		弁理士 高橋 秀一
(31) 優先権主張番号	特願2002-159448 (P2002-159448)	(74) 代理人	100106323
(32) 優先日	平成14年5月31日 (2002. 5. 31)		弁理士 関口 陽
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)	(72) 発明者	池田 夏樹
			茨城県つくば市松代3丁目12番地1 武田松代レジデンス414号
		(72) 発明者	三輪 真敬
			茨城県つくば市松代3丁目12番地1 武田松代レジデンス513号
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質およびそのDNA

## (57) 【要約】

【課題】 アゴニスト/アンタゴニストのスクリーニング等に有用な新規蛋白質の提供。

【解決手段】 ヒト由来の蛋白質またはその塩、該蛋白質をコードするDNA、該蛋白質に対するリガンドの決定方法、リガンドと該蛋白質との結合性を变化させる化合物のスクリーニング方法/スクリーニング用キット、該スクリーニングで得られる化合物またはその塩など。

【効果】 本発明のヒト由来の蛋白質またはそれをコードするDNAは、(1) 本発明の蛋白質に対するリガンドの決定、(2) 本発明の蛋白質の機能不全に関連する疾患の予防および/または治療剤、(3) 本発明の蛋白質とリガンドとの結合性を变化させる化合物等のスクリーニングなどに用いることができる。

【選択図】 なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

配列番号：1 または配列番号：7 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とする G 蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩。

## 【請求項 2】

配列番号：1、配列番号：3、配列番号：7 または配列番号：9 で表されるアミノ酸配列からなる G 蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩。

## 【請求項 3】

請求項 1 記載の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチド。 10

## 【請求項 4】

DNA である請求項 3 記載のポリヌクレオチド。

## 【請求項 5】

配列番号：2、配列番号：4、配列番号：5、配列番号：6、配列番号：8、配列番号：10、配列番号：11 または配列番号：12 で表される塩基配列からなる DNA。

## 【請求項 6】

請求項 3 記載のポリヌクレオチドを含有する組換えベクター。

## 【請求項 7】

請求項 6 記載の組換えベクターで形質転換させた形質転換体。 20

## 【請求項 8】

請求項 7 記載の形質転換体を培養し、請求項 1 記載の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質を生成せしめることを特徴とする請求項 1 記載の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩の製造法。

## 【請求項 9】

請求項 1 記載の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩に対する抗体。

## 【請求項 10】

請求項 1 記載の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質のシグナル伝達を不活性化する中和抗体である請求項 9 記載の抗体。

## 【請求項 11】

請求項 9 記載の抗体を含有してなる診断薬。 30

## 【請求項 12】

請求項 1 記載の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩を用いることにより得られうる請求項 1 記載の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩に対するリガンド。

## 【請求項 13】

請求項 12 記載の G 蛋白質共役型レセプターのリガンドを含有してなる医薬。

## 【請求項 14】

請求項 1 記載の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩を用いることを特徴とする請求項 1 記載の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩に対するリガンドの決定方法。 40

## 【請求項 15】

請求項 1 記載の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩を用いることを特徴とするリガンドと請求項 1 記載の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を变化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法。

## 【請求項 16】

請求項 1 記載の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩を含有することを特徴とするリガンドと請求項 1 記載の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を变化させる化合物またはその塩のスクリーニング用キット。

## 【請求項 17】

50

請求項 1 5 記載のスクリーニング方法または請求項 1 6 記載のスクリーニング用キットを用いて得られうるリガンドと請求項 1 記載の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩。

【請求項 1 8】

請求項 1 5 記載のスクリーニング方法または請求項 1 6 記載のスクリーニング用キットを用いて得られうるリガンドと請求項 1 記載の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩を含有してなる医薬。

【請求項 1 9】

請求項 3 記載のポリヌクレオチドとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド。

10

【請求項 2 0】

請求項 3 記載のポリヌクレオチドと相補的な塩基配列またはその一部を含有してなるポリヌクレオチド。

【請求項 2 1】

請求項 3 記載のポリヌクレオチドまたはその一部を用いることを特徴とする請求項 1 記載の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質の mRNA の定量方法。

【請求項 2 2】

請求項 9 記載の抗体を用いることを特徴とする請求項 1 記載の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩の定量方法。

【請求項 2 3】

請求項 2 1 または請求項 2 2 記載の定量方法を用いることを特徴とする請求項 1 記載の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩の機能が関連する疾患の診断方法。

20

【請求項 2 4】

請求項 2 1 記載の定量方法を用いることを特徴とする請求項 1 記載の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質の発現量を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法。

【請求項 2 5】

請求項 2 2 記載の定量方法を用いることを特徴とする細胞膜における請求項 1 記載の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質量を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法。

【請求項 2 6】

請求項 2 4 記載のスクリーニング方法を用いて得られうる請求項 1 記載の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質の発現量を変化させる化合物またはその塩。

30

【請求項 2 7】

請求項 2 5 記載のスクリーニング方法を用いて得られうる細胞膜における請求項 1 記載の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質量を変化させる化合物またはその塩。

【請求項 2 8】

請求項 2 4 記載のスクリーニング方法を用いて得られうる請求項 1 記載の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質の発現量を変化させる化合物またはその塩を含有してなる医薬。

【請求項 2 9】

請求項 2 5 記載のスクリーニング方法を用いて得られうる細胞膜における請求項 1 記載の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質量を変化させる化合物またはその塩を含有してなる医薬

40

【請求項 3 0】

中枢疾患、内分泌疾患、代謝疾患、炎症性疾患、循環器系疾患、呼吸器系疾患、消化器系疾患、免疫系疾患、骨・軟骨疾患、泌尿器疾患、生殖器疾患、感染症または癌の予防・治療剤である請求項 1 8、2 8 または 2 9 記載の医薬。

【請求項 3 1】

哺乳動物に対して、請求項 1 5 記載のスクリーニング方法または請求項 1 6 記載のスクリーニング用キットを用いて得られうるリガンドと請求項 1 記載の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩の有効量を投与することを特徴とする中枢疾患、内分泌疾患、代謝疾患、炎症性疾患、循環器系疾患、呼吸器系

50

疾患、消化器系疾患、免疫系疾患、骨・軟骨疾患、泌尿器疾患、生殖器疾患、感染症または癌の予防・治療方法。

【請求項 3 2】

哺乳動物に対して、請求項 2 4 記載のスクリーニング方法を用いて得られうる請求項 1 記載の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質の発現量を変化させる化合物またはその塩の有効量を投与することを特徴とする中枢疾患、内分泌疾患、代謝疾患、炎症性疾患、循環器系疾患、呼吸器系疾患、消化器系疾患、免疫系疾患、骨・軟骨疾患、泌尿器疾患、生殖器疾患、感染症または癌の予防・治療方法。

【請求項 3 3】

哺乳動物に対して、請求項 2 5 記載のスクリーニング方法を用いて得られうる細胞膜における請求項 1 記載の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質量を変化させる化合物またはその塩の有効量を投与することを特徴とする中枢疾患、内分泌疾患、代謝疾患、炎症性疾患、循環器系疾患、呼吸器系疾患、消化器系疾患、免疫系疾患、骨・軟骨疾患、泌尿器疾患、生殖器疾患、感染症または癌の予防・治療方法。

10

【請求項 3 4】

中枢疾患、内分泌疾患、代謝疾患、炎症性疾患、循環器系疾患、呼吸器系疾患、消化器系疾患、免疫系疾患、骨・軟骨疾患、泌尿器疾患、生殖器疾患、感染症または癌の予防・治療剤を製造するための請求項 1 5 記載のスクリーニング方法または請求項 1 7 記載のスクリーニング用キットを用いて得られうるリガンドと請求項 1 記載の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩の使用。

20

【請求項 3 5】

中枢疾患、内分泌疾患、代謝疾患、炎症性疾患、循環器系疾患、呼吸器系疾患、消化器系疾患、免疫系疾患、骨・軟骨疾患、泌尿器疾患、生殖器疾患、感染症または癌の予防・治療剤を製造するための請求項 2 4 記載のスクリーニング方法を用いて得られうる請求項 1 記載の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質の発現量を変化させる化合物またはその塩の使用。

【請求項 3 6】

中枢疾患、内分泌疾患、代謝疾患、炎症性疾患、循環器系疾患、呼吸器系疾患、消化器系疾患、免疫系疾患、骨・軟骨疾患、泌尿器疾患、生殖器疾患、感染症または癌の予防・治療剤を製造するための請求項 2 5 記載のスクリーニング方法を用いて得られうる細胞膜における請求項 1 記載の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質量を変化させる化合物またはその塩の使用。

30

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、ヒト脾臓由来の新規 G 蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩およびそれをコードするポリヌクレオチド等に関する。さらには、本発明の新規 G 蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩を用いたスクリーニング方法、スクリーニング用キット、該スクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物およびその塩等に関する。

40

【0002】

【従来技術】

多くのホルモンや神経伝達物質などの生理活性物質は、細胞膜に存在する特異的なレセプター蛋白質を通じて生体の機能を調節している。これらのレセプター蛋白質のうち多くは共役している guanine nucleotide-binding protein (以下、G 蛋白質と略称する場合がある)の活性化を通じて細胞内のシグナル伝達を行ない、また、7 個の膜貫通領域を有する共通した構造をもっていることから、G 蛋白質共役型レセプター蛋白質あるいは 7 回膜貫通型レセプター蛋白質 (7 TMR) と総称される。G 蛋白質共役型レセプター蛋白質は生体の細胞や臓器の各機能細胞表面に存在し、それら細胞や臓器の機能を調節する分子、例えば、ホルモン、神経伝達物質および生理活性物質

50

等の標的として生理的に重要な役割を担っている。レセプターは生理活性物質との結合を介してシグナルを細胞内に伝達し、このシグナルにより細胞の賦活や抑制といった種々の反応が惹起される。

各種生体の細胞や臓器の内の複雑な機能を調節する物質と、その特異的レセプター蛋白質、特にG蛋白質共役型レセプター蛋白質との関係を明らかにすることは、各種生体の細胞や臓器の機能を解明し、それら機能と密接に関連した医薬品開発に非常に重要な手段を提供することとなる。

【0003】

例えば、生体の種々の器官では、多くのホルモン、ホルモン様物質、神経伝達物質あるいは生理活性物質による調節のもとで生理的な機能の調節が行なわれている。特に、生理活性物質は生体内の様々な部位に存在し、それぞれに対応するレセプター蛋白質を通してその生理機能の調節を行っている。生体内には未知のホルモンや神経伝達物質その他の生理活性物質も多く、それらのレセプター蛋白質の構造に関しても、これまで報告されていないものが多い。さらに、既知のレセプター蛋白質においてもサブタイプが存在するかどうかについても分かっていないものが多い。

10

生体における複雑な機能を調節する物質と、その特異的レセプター蛋白質との関係を明らかにすることは、医薬品開発に非常に重要な手段である。また、レセプター蛋白質に対するアゴニスト、アンタゴニストを効率よくスクリーニングし、医薬品を開発するためには、生体内で発現しているレセプター蛋白質の遺伝子の機能を解明し、それらを適当な発現系で発現させることが必要であった。

20

近年、生体内で発現している遺伝子を解析する手段として、cDNAの配列をランダムに解析する研究が活発に行なわれており、このようにして得られたcDNAの断片配列がExpressed Sequence Tag (EST)としてデータベースに登録され、公開されている。しかし、多くのESTは配列情報のみであり、その機能を推定することは困難である。

非特許文献1には、配列番号：7で表わされる塩基配列が記載され、その塩基配列がコードするアミノ酸配列(配列番号：8)が非特許文献2に記載されており、該アミノ酸配列は非特許文献3に記載されているG protein-coupled receptor 48 (GPR48)、非特許文献4に記載されているorphan G protein-coupled receptor HG38とそれぞれ約43%及び52%の相

30

同性を示す。しかしながら、該アミノ酸配列はGPR48及びHG38のN末端部分に認められるシグナル配列と考えられる疎水領域部分を有していないことから、非特許文献1に記載されている塩基配列は全長DNAの塩基配列ではないと考えられ、機能も解明されていない。

また、配列番号：1で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質が開示されている(特許文献1)。

【0004】

【特許文献1】

WO2001/85768号

【0005】

【非特許文献1】

GenBank AB049405

【0006】

【非特許文献2】

GenBank BAB39854

【0007】

【非特許文献3】

GenBank XP\_\_006549

【0008】

【非特許文献4】

40

50

GenBank AAC28019

【0009】

【発明が解決しようとする課題】

従来、G蛋白質共役型レセプターと生理活性物質（すなわち、リガンド）との結合を阻害する物質や、結合して生理活性物質（すなわち、リガンド）と同様なシグナル伝達を引き起こす物質は、これらレセプターの特異的なアンタゴニストまたはアゴニストとして、生体機能を調節する医薬品として活用されてきた。従って、このように生体内での生理発現において重要であるばかりでなく、医薬品開発の標的ともなりうるG蛋白質共役型レセプター蛋白質を新規に見出し、その遺伝子（例えばcDNA）をクローニングすることは、新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質の特異的リガンドや、アゴニスト、アンタゴニスト

10

を見出す際に、非常に重要な手段となる。しかし、G蛋白質共役型レセプターはその全てが見出されているわけではなく、現時点でもなお、未知のG蛋白質共役型レセプター、また対応するリガンドが同定されていない、いわゆるオーファンレセプターが多数存在しており、新たなG蛋白質共役型レセプターの探索および機能解明が切望されている。

G蛋白質共役型レセプターは、そのシグナル伝達作用を指標とする、新たな生理活性物質（すなわち、リガンド）の探索、また、該レセプターに対するアゴニストまたはアンタゴニストの探索に有用である。一方、生理的なリガンドが見出されなくても、該レセプターの不活化実験（ノックアウト動物）から該レセプターの生理作用を解析することにより、該レセプターに対するアゴニストまたはアンタゴニストを作製することも可能である。これら該レセプターに対するリガンド、アゴニストまたはアンタゴニストなどは、G蛋白質共役型レセプターの機能不全に関連する疾患の予防/治療薬や診断薬として活用することが期待できる。さらにまた、G蛋白質共役型レセプターの遺伝子変異に基づく、生体での該レセプターの機能の低下または昂進が、何らかの疾患の原因となっている場合も多い。この場合には、該レセプターに対するアンタゴニストやアゴニストの投与だけでなく、該レセプター遺伝子の生体内（またはある特定の臓器）への導入や、該レセプター遺伝子に対するアンチセンス核酸の導入による、遺伝子治療に応用することもできる。この場合には該レセプターの塩基配列は遺伝子上の欠失や変異の有無を調べるために必要不可欠な情報であり、該レセプターの遺伝子は、該レセプターの機能不全に関連する疾患の予防/治療薬や診断薬に応用することもできる。

20

30

本発明は、上記のように有用な新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質を提供するものである。すなわち、新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩、該G蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチド（DNA、RNAおよびそれらの誘導体）を含有するポリヌクレオチド（DNA、RNAおよびそれらの誘導体）、該ポリヌクレオチドを含有する組換えベクター、該組換えベクターを保持する形質転換体、該G蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩の製造法、該G蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体、該G蛋白質共役型レセプター蛋白質の発現量を変化させる化合物、該G蛋白質共役型レセプターに対するリガンドの決定方法、リガンドと該G蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合性を変化させる化合物（アンタゴニスト、アゴニスト）またはその塩のスクリーニング方法、該スクリーニング用キット、該スクリーニング方法もしくはスクリーニングキットを用いて得られうるリガンドと該G蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合性を変化させる化合物（アンタゴニスト、アゴニスト）またはその塩、およびリガンドと該G蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合性を変化させる化合物（アンタゴニスト、アゴニスト）もしくは該G蛋白質共役型レセプター蛋白質の発現量を変化させる化合物またはその塩を含有してなる医薬品などを提供する。

40

【0010】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、鋭意研究を重ねた結果、ヒト脾臓由来の新規なG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするcDNAを単離し、その全塩基配列を解析することに成功した。そし

50

て、この塩基配列をアミノ酸配列に翻訳したところ、第1～第7膜貫通領域が疎水性プロット上で確認され、これらのcDNAにコードされる蛋白質が7回膜貫通型のG蛋白質共役型レセプター蛋白質であることを確認した。本発明者らは、これらの知見に基づいて、さらに研究を重ねた結果、本発明を完成するに至った。

【0011】

すなわち、本発明は、

(1) 配列番号：1または配列番号：7で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩、

(2) 配列番号：1、配列番号：3、配列番号：7または配列番号：9で表されるアミノ酸配列からなるG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩、 10

(3) 上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチド、

(4) DNAである上記(3)記載のポリヌクレオチド、

(5) 配列番号：2、配列番号：4、配列番号：5、配列番号：6、配列番号：8、配列番号：10、配列番号：11または配列番号：12で表される塩基配列からなるDNA、

(6) 上記(3)記載のポリヌクレオチドを含有する組換えベクター、

(7) 上記(6)記載の組換えベクターで形質転換させた形質転換体、

(8) 上記(7)記載の形質転換体を培養し、上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を生成せしめることを特徴とする上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩の製造法、 20

(9) 上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩に対する抗体、

(10) 上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質のシグナル伝達を不活性化する中和抗体である上記(9)記載の抗体、

(11) 上記(9)記載の抗体を含有してなる診断薬、

(12) 上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩を用いることにより得られうる上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩に対するリガンド、

(13) 上記(12)記載のG蛋白質共役型レセプターのリガンドを含有してなる医薬、

(14) 上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩を用いることを特徴とする上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩に対するリガンドの決定方法、 30

(15) 上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩を用いることを特徴とするリガンドと上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を变化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

(16) 上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩を含有することを特徴とするリガンドと上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を变化させる化合物またはその塩のスクリーニング用キット、

(17) 上記(15)記載のスクリーニング方法または上記(16)記載のスクリーニング用キットを用いて得られうるリガンドと上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を变化させる化合物またはその塩、 40

(18) 上記(15)記載のスクリーニング方法または上記(16)記載のスクリーニング用キットを用いて得られうるリガンドと上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を变化させる化合物またはその塩を含有してなる医薬、

(19) 上記(3)記載のポリヌクレオチドとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド、

(20) 上記(3)記載のポリヌクレオチドと相補的な塩基配列またはその一部を含有してなるポリヌクレオチド、

(21) 上記(3)記載のポリヌクレオチドまたはその一部を用いることを特徴とする上 50

- 記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質のmRNAの定量方法、
- (22)上記(9)記載の抗体を用いることを特徴とする上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩の定量方法、
- (23)上記(21)または上記(22)記載の定量方法を用いることを特徴とする上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩の機能が関連する疾患の診断方法、
- (24)上記(21)記載の定量方法を用いることを特徴とする上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の発現量を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、
- (25)上記(22)記載の定量方法を用いることを特徴とする細胞膜における上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質量を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、 10
- (26)上記(24)記載のスクリーニング方法を用いて得られうる上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の発現量を変化させる化合物またはその塩、
- (27)上記(25)記載のスクリーニング方法を用いて得られうる細胞膜における上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質量を変化させる化合物またはその塩、
- (28)上記(24)記載のスクリーニング方法を用いて得られうる上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の発現量を変化させる化合物またはその塩を含有してなる医薬、
- (29)上記(25)記載のスクリーニング方法を用いて得られうる細胞膜における上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質量を変化させる化合物またはその塩を含有してなる医薬、 20
- (30)中枢疾患、内分泌疾患、代謝疾患、炎症性疾患、循環器系疾患、呼吸器系疾患、消化器系疾患、免疫系疾患、骨・軟骨疾患、泌尿器疾患、生殖器疾患、感染症または癌の予防・治療剤である上記(18)、(28)または(29)記載の医薬、
- (31)哺乳動物に対して、上記(15)記載のスクリーニング方法または上記(16)記載のスクリーニング用キットを用いて得られうるリガンドと上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩の有効量を投与することを特徴とする中枢疾患、内分泌疾患、代謝疾患、炎症性疾患、循環器系疾患、呼吸器系疾患、消化器系疾患、免疫系疾患、骨・軟骨疾患、泌尿器疾患、生殖器疾患、感染症または癌の予防・治療方法、 30
- (32)哺乳動物に対して、上記(24)記載のスクリーニング方法を用いて得られうる上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の発現量を変化させる化合物またはその塩の有効量を投与することを特徴とする中枢疾患、内分泌疾患、代謝疾患、炎症性疾患、循環器系疾患、呼吸器系疾患、消化器系疾患、免疫系疾患、骨・軟骨疾患、泌尿器疾患、生殖器疾患、感染症または癌の予防・治療方法、
- (33)哺乳動物に対して、上記(25)記載のスクリーニング方法を用いて得られうる細胞膜における上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質量を変化させる化合物またはその塩の有効量を投与することを特徴とする中枢疾患、内分泌疾患、代謝疾患、炎症性疾患、循環器系疾患、呼吸器系疾患、消化器系疾患、免疫系疾患、骨・軟骨疾患、泌尿器疾患、生殖器疾患、感染症または癌の予防・治療方法、 40
- (34)中枢疾患、内分泌疾患、代謝疾患、炎症性疾患、循環器系疾患、呼吸器系疾患、消化器系疾患、免疫系疾患、骨・軟骨疾患、泌尿器疾患、生殖器疾患、感染症または癌の予防・治療剤を製造するための上記(15)記載のスクリーニング方法または上記(16)記載のスクリーニング用キットを用いて得られうるリガンドと上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩の使用、
- (35)中枢疾患、内分泌疾患、代謝疾患、炎症性疾患、循環器系疾患、呼吸器系疾患、消化器系疾患、免疫系疾患、骨・軟骨疾患、泌尿器疾患、生殖器疾患、感染症または癌の予防・治療剤を製造するための上記(24)記載のスクリーニング方法を用いて得られう 50



る上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の発現量を変化させる化合物またはその塩の使用、

(36) 中枢疾患、内分泌疾患、代謝疾患、炎症性疾患、循環器系疾患、呼吸器系疾患、消化器系疾患、免疫系疾患、骨・軟骨疾患、泌尿器疾患、生殖器疾患、感染症または癌の予防・治療剤を製造するための上記(25)記載のスクリーニング方法を用いて得られうる細胞膜における上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質量を変化させる化合物またはその塩の使用等に関する。

【0012】

さらには、

(37) 蛋白質が、 1 配列番号：1または配列番号：7で表されるアミノ酸配列、配列番号：1または配列番号：7で表されるアミノ酸配列中の1または2個以上(好ましくは、1~30個程度、より好ましくは1~9個程度、さらに好ましくは数個(1~5個))のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、 2 配列番号：1または配列番号：7で表されるアミノ酸配列に1または2個以上(好ましくは、1~30個程度、より好ましくは1~10個程度、さらに好ましくは数個(1~5個))のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、 3 配列番号：1または配列番号：7で表されるアミノ酸配列中の1または2個以上(好ましくは、1~30個程度、より好ましくは1~10個程度、さらに好ましくは数個(1~5個))のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、または 4 それらを組み合わせたアミノ酸配列を含有する蛋白質である上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩、

(38) 上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩と、試験化合物とを接触させることを特徴とする上記(14)記載のリガンドの決定方法、

(39) リガンドが、例えば、アンギオテンシン、ボンベシン、カナビノイド、コレシストキニン、グルタミン、セロトニン、メラトニン、ニューロペプチドY、オピオイド、プリン、バソプレッシン、オキシトシン、PACAP(例、PACAP27、PACAP38)、セクレチン、グルカゴン、カルシトニン、アドレノメジュリン、ソマトスタチン、GHRH、CRF、ACTH、GRP、PTH、VIP(バソアクティブインテスティナルポリペプチド)、ソマトスタチン、ドーパミン、モチリン、アミリン、ブラジキニン、CGRP(カルシトニンジーンリレーティッドペプチド)、ロイコトリエン、パンクレアスタチン、プロスタグランジン、トロンボキサン、アデノシン、アドレナリン、ケモカインスーパーファミリー(例、IL-8、GRO<sub>α</sub>、GRO<sub>β</sub>、GRO<sub>γ</sub>、NAP-2、ENA-78、GCP-2、PF4、IP-10、Mig、PBSF/SDF-1などのCXCKeモカインサブファミリー；MCAF/MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、eotaxin、RANTES、MIP-1<sub>α</sub>、MIP-1<sub>β</sub>、HCC-1、MIP-3<sub>α</sub>/LARC、MIP-3<sub>β</sub>/ELC、I-309、TARC、MIPF-1、MIPF-2/eotaxin-2、MDC、DC-CK1/PARC、SLCなどのCCKeモカインサブファミリー；lymphotactinなどのCケモカインサブファミリー；fractalkinなどのCX3CKeモカインサブファミリー等)、エンドセリン、エンテロガストリン、ヒスタミン、ニューロテンシン、TRH、パンクレアティックポリペプチド、ガラニン、リゾホスファチジン酸(LPA)またはスフィンゴシン1-リン酸である上記(38)記載のリガンドの決定方法、

(40) (i) 上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩と、リガンドとを接触させた場合と、(ii) 上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩と、リガンドおよび試験化合物とを接触させた場合との比較を行うことを特徴とする上記(14)記載のスクリーニング方法、

(41) (i) 標識したリガンドを上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩に接触させた場合と、(ii) 標識したリガンドおよび試験化合物を上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたは

10

20

30

40

50

その塩に接触させた場合における、標識したリガンドの上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンドと上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を变化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

(42)(i)標識したリガンドを上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞に接触させた場合と、(ii)標識したリガンドおよび試験化合物を上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞に接触させた場合における、標識したリガンドの該細胞に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンドと上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を变化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

10

(43)(i)標識したリガンドを上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞の膜画分に接触させた場合と、(ii)標識したリガンドおよび試験化合物を上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞の膜画分に接触させた場合における、標識したリガンドの該細胞の膜画分に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンドと上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を变化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

(44)(i)標識したリガンドを上記(7)記載の形質転換体を培養することによって該形質転換体の細胞膜に発現したG蛋白質共役型レセプター蛋白質に接触させた場合と、(ii)標識したリガンドおよび試験化合物を上記(7)記載の形質転換体を培養することによって該形質転換体の細胞膜に発現したG蛋白質共役型レセプター蛋白質に接触させた場合における、標識したリガンドの該G蛋白質共役型レセプター蛋白質に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンドと上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を变化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

20

(45)(i)上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩を活性化する化合物を上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞に接触させた場合と、(ii)上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩を活性化する化合物および試験化合物を上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞に接触させた場合における、G蛋白質共役型レセプター蛋白質を介した細胞刺激活性を測定し、比較することを特徴とするリガンドと上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を变化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

30

(46)上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩を活性化する化合物を上記(7)記載の形質転換体を培養することによって該形質転換体の細胞膜に発現したG蛋白質共役型レセプター蛋白質に接触させた場合と、上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩を活性化する化合物および試験化合物を上記(7)記載の形質転換体を培養することによって該形質転換体の細胞膜に発現したG蛋白質共役型レセプター蛋白質に接触させた場合における、G蛋白質共役型レセプター蛋白質を介する細胞刺激活性を測定し、比較することを特徴とするリガンドと上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を变化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

40

(47)上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を活性化する化合物が、アンギオテンシン、ボンベシン、カナビノイド、コレシストキニン、グルタミン、セロトニン、メラトニン、ニューロペプチドY、オピオイド、プリン、バソプレッシン、オキシトシン、PACAP(例、PACAP27、PACAP38)、セクレチン、グルカゴン、カルシトニン、アドレノメジュリン、ソマトスタチン、GHRH、CRF、ACTH、GRP、PTH、VIP(バソアクティブインテスティナルポリペプチド)、ソマトスタチン、ドーパミン、モチリン、アミリン、ブラジキニン、CGRP(カルシトニンジーンリレーティッドペプチド)、ロイコトリエン、パンクレアスタチン、プロスタグランジン、トロンボキサン、アデノシン、アドレナリン、ケモカインスーパーファミリー(例、I

50

L - 8 , G R O , G R O , G R O , N A P - 2 , E N A - 7 8 , G C P - 2 , P F 4 , I P - 1 0 , M i g , P B S F / S D F - 1 などの C X C ケモカインサブファミリー ; M C A F / M C P - 1 , M C P - 2 , M C P - 3 , M C P - 4 , e o t a x i n , R A N T E S , M I P - 1 、 M I P - 1 , H C C - 1 , M I P - 3 / L A R C 、 M I P - 3 / E L C , I - 3 0 9 , T A R C , M I P F - 1 , M I P F - 2 / e o t a x i n - 2 , M D C , D C - C K 1 / P A R C , S L C などの C C ケモカインサブファミリー ; l y m p h o t a c t i n などの C ケモカインサブファミリー ; f r a c t a l k i n e などの C X 3 C ケモカインサブファミリー等)、エンドセリン、エンテロガストリン、ヒスタミン、ニューロテンシン、T R H、パンクレアティックポリペプチド、ガラニン、リゾホスファチジン酸 ( L P A ) またはスフィンゴシン 1 - リン酸である上記 ( 4 5 ) または ( 4 6 ) 記載のスクリーニング方法、

( 4 8 ) 上記 ( 4 0 ) ~ ( 4 7 ) 記載のスクリーニング方法で得られうるリガンドと上記 ( 1 ) 記載の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を变化させる化合物またはその塩、

( 4 9 ) 上記 ( 4 0 ) ~ 上記 ( 4 7 ) 記載のスクリーニング方法で得られうるリガンドと上記 ( 1 ) 記載の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を变化させる化合物またはその塩を含有することを特徴とする医薬、

( 5 0 ) 上記 ( 1 ) 記載の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞を含有することを特徴とする上記 ( 1 6 ) 記載のスクリーニング用キット、

( 5 1 ) 上記 ( 1 ) 記載の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞の膜画分を含有することを特徴とする上記 ( 1 6 ) 記載のスクリーニング用キット、

( 5 2 ) 上記 ( 7 ) 記載の形質転換体を培養することによって該形質転換体の細胞膜に発現した G 蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有することを特徴とする上記 ( 1 6 ) 記載のスクリーニング用キット、

( 5 3 ) 上記 ( 5 0 ) ~ ( 5 2 ) 記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる、リガンドと上記 ( 1 ) 記載の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を变化させる化合物またはその塩、

( 5 4 ) 上記 ( 5 0 ) ~ ( 5 2 ) 記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる、リガンドと上記 ( 1 ) 記載の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を变化させる化合物またはその塩を含有することを特徴とする医薬、

( 5 5 ) 上記 ( 9 ) 記載の抗体と、上記 ( 1 ) 記載の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩とを接触させることを特徴とする上記 ( 1 ) の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩の定量法、

( 5 6 ) 上記 ( 9 ) 記載の抗体と、被検液および標識化された上記 ( 1 ) 記載の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩とを競合的に反応させ、該抗体に結合した標識化された上記 ( 1 ) 記載の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩の割合を測定することを特徴とする被検液中の上記 ( 1 ) 記載の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩の定量法、および

( 5 7 ) 被検液と担体上に不溶化した上記 ( 9 ) 記載の抗体および標識化された上記 ( 9 ) 記載の抗体とを同時あるいは連続的に反応させたのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することを特徴とする被検液中の上記 ( 1 ) 記載の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩の定量法等を提供する。

【 0 0 1 3 】

【 発明の実施の形態 】

本発明の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質 ( 以下、レセプター蛋白質と略記する場合がある ) は、配列番号 : 1 または配列番号 : 7 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するレセプター蛋白質である。本発明のレセプター蛋白質は、例えば、哺乳動物 ( 例えば、ヒト、モルモット、ラット、マウス、ウサギ、ブタ、ヒツジ、ウシ、サルなど ) のあらゆる細胞 ( 例えば、脾細胞、神経細胞、グリア細胞、膵臓細胞、骨髓細胞、メサングウム細胞、ランゲルハンス細胞、表皮細胞、上皮細胞、内皮細

胞、繊維芽細胞、繊維細胞、筋細胞、脂肪細胞、免疫細胞（例、マクロファージ、T細胞、B細胞、ナチュラルキラー細胞、肥満細胞、好中球、好塩基球、好酸球、単球）、巨核球、滑膜細胞、軟骨細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、乳腺細胞、肝細胞もしくは間質細胞、またはこれら細胞の前駆細胞、幹細胞もしくはガン細胞など）や血球系の細胞、またはそれらの細胞が存在するあらゆる組織、例えば、脳、脳の各部位（例、嗅球、扁頭核、大脳基底核、海馬、視床、視床下部、視床下核、大脳皮質、延髄、小脳、後頭葉、前頭葉、側頭葉、被殻、尾状核、脳染、黒質）、脊髄、下垂体、胃、膵臓、腎臓、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆のう、骨髄、副腎、皮膚、筋肉、肺、消化管（例、大腸、小腸）、血管、心臓、胸腺、脾臓、顎下腺、末梢血、末梢血球、前立腺、睾丸、精巣、卵巣、胎盤、子宮、骨、関節、骨格筋などに由来する蛋白質であってもよく、また合成蛋白質であってもよい。

10

#### 【0014】

配列番号：1で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、例えば、配列番号：1で表されるアミノ酸配列と約50%以上、好ましくは約60%以上、さらに好ましくは約70%以上、特に好ましくは約80%以上、なかでも好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有するアミノ酸配列などが挙げられる。

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

20

配列番号：7で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、例えば、配列番号：7で表されるアミノ酸配列と約50%以上、好ましくは約60%以上、さらに好ましくは約70%以上、特に好ましくは約80%以上、なかでも好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有するアミノ酸配列などが挙げられる。

本発明の配列番号：7で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質としては、例えば、配列番号：7で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有し、配列番号：7で表されるアミノ酸配列と実質的に同質の活性を有する蛋白質などが好ましい。

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

30

#### 【0015】

また、本発明のレセプター蛋白質としては、（1）配列番号：1または配列番号：7で表されるアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1~30個程度、より好ましくは1~10個程度、さらに好ましくは数個（1~5個））のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、（2）配列番号：1または配列番号：7で表されるアミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは、1~30個程度、より好ましくは1~10個程度、さらに好ましくは数個（1~5個））のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、（3）配列番号：1または配列番号：7で表されるアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1~30個程度、より好ましくは1~10個程度、さらに好ましくは数個（1~5個））のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、または（4）それらを組み合わせたアミノ酸配列を含有する蛋白質なども用いられる。

40

本発明の配列番号：1で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質としては、例えば、配列番号：3で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質などが用いられる。

50

本発明の配列番号：7で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質としては、例えば、配列番号：9で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質などが用いられる。

また、配列番号：1、配列番号：3、配列番号：7または配列番号：9で表わされるアミノ酸配列の第1番目から第23番目のアミノ酸配列はシグナル配列と予想され、本発明のレセプター蛋白質からこのシグナル配列を除去した蛋白質も本発明のレセプター蛋白質に含まれる。

より具体的には、本発明の蛋白質としては、配列番号：1で表されるアミノ酸配列を含有する蛋白質(TGR41A)、配列番号：3で表されるアミノ酸配列を含有する蛋白質(TGR41V)、配列番号：7で表されるアミノ酸配列を含有する蛋白質(TGR41A2)、配列番号：9で表されるアミノ酸配列を含有する蛋白質(TGR41V2)などが用いられる。

10

#### 【0016】

本明細書におけるレセプター蛋白質は、ペプチド標記の慣例に従って、左端がN末端(アミノ末端)、右端がC末端(カルボキシル末端)である。配列番号：5で表されるアミノ酸配列を含有するレセプター蛋白質をはじめとする、本発明のレセプター蛋白質は、C末端がカルボキシル基(-COOH)、カルボキシレート(-COO<sup>-</sup>)、アミド(-CONH<sub>2</sub>)またはエステル(-COOR)の何れであってもよい。

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

20

本発明のレセプター蛋白質がC末端以外にカルボキシル基(またはカルボキシレート)を有している場合、カルボキシル基がアミド化またはエステル化されているものも本発明のレセプター蛋白質に含まれる。この場合のエステルとしては、例えば上記したC末端のエステルなどが用いられる。

さらに、本発明のレセプター蛋白質には、上記した蛋白質において、N末端のメチオニン残基のアミノ基が保護基(例えば、ホルミル基、アセチルなどのC<sub>2-6</sub>アルカノイル基などのC<sub>1-6</sub>アシル基など)で保護されているもの、N端側が生体内で切断され生成したグルタミル基がピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基(例えば、-OH、-SH、アミノ基、イミダゾール基、インドール基、グアニジノ基など)が適当な保護基(例えば、ホルミル基、アセチルなどのC<sub>2-6</sub>アルカノイル基などのC<sub>1-6</sub>アシル基など)で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖蛋白質などの複合蛋白質なども含まれる。

30

本発明のレセプター蛋白質の具体例としては、例えば、配列番号：1で表されるアミノ酸配列を含有するヒト脾臓由来のレセプター蛋白質などが用いられる。

#### 【0017】

本発明のレセプター蛋白質の部分ペプチド(以下、部分ペプチドと略記する場合がある)としては、上記した本発明のレセプター蛋白質の部分ペプチドであれば何れのものであってもよいが、例えば、本発明のレセプター蛋白質分子のうち、細胞膜の外に露出している部位であって、レセプター結合活性を有するものなどが用いられる。

具体的には、配列番号：1、配列番号：3、配列番号：7または配列番号：9で表されるアミノ酸配列を含有するレセプター蛋白質の部分ペプチドとしては、疎水性プロット解析において細胞外領域(親水性部位)であると分析された部分を含むペプチドである。また、疎水性部位を一部に含むペプチドも同様に用いることができる。個々のドメインを個別に含むペプチドも用い得るが、複数のドメインを同時に含む部分のペプチドでも良い。

本発明の部分ペプチドのアミノ酸の数は、上記した本発明のレセプター蛋白質の構成アミ

40

50

ノ酸配列のうち少なくとも20個以上、好ましくは50個以上、より好ましくは100個以上のアミノ酸配列を有するペプチドなどが好ましい。

実質的に同一のアミノ酸配列とは、これらアミノ酸配列と約50%以上、好ましくは約60%以上、より好ましくは約70%以上、さらに好ましくは約80%以上、なかでも好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有するアミノ酸配列を示す。

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

#### 【0018】

また、本発明の部分ペプチドは、上記アミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～10個程度、さらに好ましくは数個（1～5個））のアミノ酸が欠失し、または、そのアミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは、1～20個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個（1～5個））のアミノ酸が付加し、または、そのアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～10個程度、より好ましくは数個、さらに好ましくは1～5個程度）のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されていてもよい。また、本発明の部分ペプチドはC末端がカルボキシル基（-COOH）、カルボキシレート（-COO<sup>-</sup>）、アミド（-CONH<sub>2</sub>）またはエステル（-COOR）の何れであってもよい。

さらに、本発明の部分ペプチドには、上記した本発明のレセプター蛋白質と同様に、N末端のメチオニン残基のアミノ基が保護基で保護されているもの、N端側が生体内で切断され生成したGlnがピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基が適当な保護基で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖ペプチドなどの複合ペプチドなども含まれる。

本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの塩としては、酸または塩基との生理学的に許容される塩が挙げられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。このような塩としては、例えば、無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸）との塩などが用いられる。本発明のレセプター蛋白質またはその塩は、上記した哺乳動物の細胞または組織から公知のレセプター蛋白質の精製方法によって製造することもできるし、後に記載する本発明のレセプター蛋白質をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによっても製造することができる。また、後に記載する蛋白質合成法またはこれに準じて製造することもできる。

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

#### 【0019】

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

10

20

30

40

50

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

#### 【0020】

保護アミノ酸の活性化や樹脂との縮合に用いられる溶媒としては、蛋白質縮合反応に使用しうることが知られている溶媒から適宜選択されうる。例えば、N,N-ジメチルホルムアミド、N,N-ジメチルアセトアミド、N-メチルピロリドンなどの酸アミド類、塩化メチレン、クロロホルムなどのハロゲン化炭化水素類、トリフルオロエタノールなどのアルコール類、ジメチルスルホキシドなどのスルホキシド類、ピリジン、ジオキサン、テトラヒドロフランなどのエーテル類、アセトニトリル、プロピオニトリルなどのニトリル類、酢酸メチル、酢酸エチルなどのエステル類あるいはこれらの適宜の混合物などが用いられる。反応温度は蛋白質結合形成反応に使用され得ることが知られている範囲から適宜選択され、通常約-20~50の範囲から適宜選択される。活性化されたアミノ酸誘導体は通常1.5~4倍過剰で用いられる。ニンヒドリン反応を用いたテストの結果、縮合が不十分な場合には保護基の脱離を行うことなく縮合反応を繰り返すことにより十分な縮合を行うことができる。反応を繰り返しても十分な縮合が得られないときには、無水酢酸またはアセチルイミダゾールを用いて未反応アミノ酸をアセチル化することができる。

10

20

#### 【0021】

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

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

30

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

40

チロシンのフェノール性水酸基の保護基としては、例えば、Bzl、Cl<sub>2</sub>-Bzl、2-ニトロベンジル、Br-Z、ターシャリーブチルなどが用いられる。

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

#### 【0022】

原料のカルボキシル基の活性化されたものとしては、例えば、対応する酸無水物、アジド、活性エステル〔アルコール(例えば、ペンタクロロフェノール、2,4,5-トリクロロフェノール、2,4-ジニトロフェノール、シアノメチルアルコール、パラニトロフェノール、HONB、N-ヒドロキシスクシミド、N-ヒドロキシフタルイミド、HOBT

50

）とのエステル）などが用いられる。原料のアミノ基の活性化されたものとしては、例えば、対応するリン酸アミドが用いられる。

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

10

### 【0023】

原料の反応に関与すべきでない官能基の保護ならびに保護基、およびその保護基の脱離、反応に関与する官能基の活性化などは公知の基または公知の手段から適宜選択しうる。蛋白質のアミド体を得る別の方法としては、例えば、まず、カルボキシ末端アミノ酸の-カルボキシル基をアミド化して保護した後、アミノ基側にペプチド（蛋白質）鎖を所望の鎖長まで延ばした後、該ペプチド鎖のN末端の-アミノ基の保護基のみを除いた蛋白質とC末端のカルボキシル基の保護基のみを除去した蛋白質とを製造し、この両蛋白質を上記したような混合溶媒中で縮合させる。縮合反応の詳細については上記と同様である。縮合により得られた保護蛋白質を精製した後、上記方法によりすべての保護基を除去し、所望の粗蛋白質を得ることができる。この粗蛋白質は既知の各種精製手段を駆使して精製し、主要画分を凍結乾燥することで所望の蛋白質のアミド体を得ることができる。蛋白質のエステル体を得るには、例えば、カルボキシ末端アミノ酸の-カルボキシル基を所望のアルコール類と縮合しアミノ酸エステルとした後、蛋白質のアミド体と同様にし、所望の蛋白質のエステル体を得ることができる。

20

### 【0024】

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

30

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

40

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

(3) 泉屋信夫他、ペプチド合成の基礎と実験、丸善(株) (1975年)

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

(5) 矢島治明監修、続医薬品の開発 第14巻 ペプチド合成 広川書店

また、反応後は通常の前製法、例えば、溶媒抽出・蒸留・カラムクロマトグラフィー・液体クロマトグラフィー・再結晶などを組み合わせて本発明の部分ペプチドを精製単離することができる。上記方法で得られる部分ペプチドが遊離体である場合は、公知の方法によって適当な塩に変換することができるし、逆に塩で得られた場合は、公知の方法によって

50



遊離体に変換することができる。

【0025】

本発明のレセプター蛋白質をコードするポリヌクレオチドとしては、上記した本発明のレセプター蛋白質をコードする塩基配列(DNAまたはRNA、好ましくはDNA)を含有するものであればいかなるものであってもよい。該ポリヌクレオチドとしては、本発明のレセプター蛋白質をコードするDNA、mRNA等のRNAであり、二本鎖であっても、一本鎖であってもよい。二本鎖の場合は、二本鎖DNA、二本鎖RNAまたはDNA:RNAのハイブリッドでもよい。一本鎖の場合は、センス鎖(すなわち、コード鎖)であっても、アンチセンス鎖(すなわち、非コード鎖)であってもよい。

本発明のレセプター蛋白質をコードするポリヌクレオチドを用いて、例えば、公知の実験医学増刊「新PCRとその応用」15(7)、1997記載の方法またはそれに準じた方法により、本発明のレセプター蛋白質のmRNAを定量することができる。

本発明のレセプター蛋白質をコードするDNAとしては、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、上記した細胞・組織由来のcDNA、上記した細胞・組織由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。ライブラリーに使用するベクターは、バクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってもよい。また、上記した細胞・組織よりtotal RNAまたはmRNA画分を調製したものをを用いて直接Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction(以下、RT-PCR法と略称する)によって増幅することもできる。

具体的には、本発明のレセプター蛋白質をコードするDNAとしては、例えば、(1)配列番号:2で表される塩基配列を含有するDNA、または配列番号:2で表される塩基配列を含有するDNAとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAを有し、配列番号:1で表されるアミノ酸配列を含有するレセプター蛋白質と実質的に同質の活性(例、リガンド結合活性、シグナル情報伝達作用など)を有するレセプター蛋白質をコードするDNA、または

(2)配列番号:8で表される塩基配列を含有するDNA、または配列番号:8で表される塩基配列を含有するDNAとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAを有し、配列番号:7で表されるアミノ酸配列を含有するレセプター蛋白質と実質的に同質の活性(例、リガンド結合活性、シグナル情報伝達作用など)を有するレセプター蛋白質をコードするDNAであれば何れのものでもよい。

配列番号:2で表される塩基配列を含有するDNAとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAとしては、例えば、配列番号:2で表される塩基配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の同一性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられ、具体例としては、配列番号:4、配列番号:5または配列番号:6で表される塩基配列を含有するDNAなどが挙げられる。

配列番号:8で表される塩基配列を含有するDNAとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAとしては、例えば、配列番号:8で表される塩基配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の同一性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられ、具体例としては、配列番号:10、配列番号:11または配列番号:12で表される塩基配列を含有するDNAなどが挙げられる。

【0026】

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

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

より具体的には、配列番号：1で表されるアミノ酸配列を含有するレセプター蛋白質をコードするDNAとしては、配列番号：2または配列番号：5で表される塩基配列を含有するDNAなどが、配列番号：3で表されるアミノ酸配列を含有するレセプター蛋白質をコードするDNAとしては、配列番号：4または配列番号：6で表される塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

配列番号：7で表されるアミノ酸配列を含有するレセプター蛋白質をコードするDNAとしては、配列番号：8または配列番号：11で表される塩基配列を含有するDNAなどが、配列番号：9で表されるアミノ酸配列を含有するレセプター蛋白質をコードするDNAとしては、配列番号：10または配列番号：12で表される塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

本発明のレセプター蛋白質をコードするDNAの塩基配列の一部、または該DNAと相補的な塩基配列の一部を含有してなるポリヌクレオチドとは、下記の本発明の部分ペプチドをコードするDNAを包含するだけでなく、RNAをも包含する意味で用いられる。

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

#### 【0027】

目的核酸と、対象領域の少なくとも一部に相補的なポリヌクレオチドとの関係は、対象物とハイブリダイズすることができるポリヌクレオチドとの関係は、「アンチセンス」であるということができる。アンチセンス・ポリヌクレオチドは、2-デオキシ-D-リボースを含有しているポリデオキシヌクレオチド、D-リボースを含有しているポリデオキシヌクレオチド、プリンまたはピリミジン塩基のN-グリコシドであるその他のタイプのポリヌクレオチド、あるいは非ヌクレオチド骨格を有するその他のポリマー(例えば、市販の蛋白質核酸および合成配列特異的な核酸ポリマー)または特殊な結合を含有するその他のポリマー(但し、該ポリマーはDNAやRNA中に見出されるような塩基のペアリングや塩基の付着を許容する配置をもつヌクレオチドを含有する)などが挙げられる。それらは、2本鎖DNA、1本鎖DNA、2本鎖RNA、1本鎖RNA、さらにDNA:RNAハイブリッドであることができ、さらには非修飾ポリヌクレオチド(または非修飾オリゴヌクレオチド)、さらには公知の修飾の付加されたもの、例えば当該分野で知られた標識のあるもの、キャップの付いたもの、メチル化されたもの、1個以上の天然のヌクレオチド

10

20

30

40

50

を類縁物で置換したもの、分子内ヌクレオチド修飾のされたもの、例えば非荷電結合（例えば、メチルホスホネート、ホスホトリエステル、ホスホルアミデート、カルバメートなど）を持つもの、電荷を有する結合または硫黄含有結合（例えば、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエートなど）を持つもの、例えば蛋白質（ヌクレアーゼ、ヌクレアーゼ・インヒビター、トキシン、抗体、シグナルペプチド、ポリ-L-リジンなど）や糖（例えば、モノサッカライドなど）などの側鎖基を有しているもの、インターカレント化合物（例えば、アクリジン、プソラレンなど）を持つもの、キレート化合物（例えば、金属、放射活性をもつ金属、ホウ素、酸化性の金属など）を含有するもの、アルキル化剤を含有するもの、修飾された結合を持つもの（例えば、アノマー型の核酸など）であってもよい。ここで「ヌクレオシド」、「ヌクレオチド」および「核酸」とは、プリンおよびピリミジン塩基を含有するのみでなく、修飾されたその他の複素環型塩基をもつようなものを含んでいて良い。こうした修飾物は、メチル化されたプリンおよびピリミジン、アシル化されたプリンおよびピリミジン、あるいはその他の複素環を含むものであってよい。修飾されたヌクレオチドおよび修飾されたヌクレオチドはまた糖部分が修飾されていてよく、例えば、1個以上の水酸基がハロゲンとか、脂肪族基などで置換されていたり、あるいはエーテル、アミンなどの官能基に変換されていてよい。

10

#### 【0028】

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

20

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

30

本発明のアンチセンス核酸は、変化せしめられたり、修飾された糖、塩基、結合を含有していて良く、リポゾーム、ミクロスフェアのような特殊な形態で供与されたり、遺伝子治療により適用されたり、付加された形態で与えられることができる。こうして付加形態で用いられるものとしては、リン酸基骨格の電荷を中和するように働くポリリジンのようなポリカチオン体、細胞膜との相互作用を高めたり、核酸の取込みを増大せしめるような脂質（例えば、ホスホリピド、コレステロールなど）といった疎水性のものが挙げられる。付加するに好ましい脂質としては、コレステロールやその誘導体（例えば、コレステリルクロロホルメート、コール酸など）が挙げられる。こうしたものは、核酸の3'端あるいは5'端に付着させることができ、塩基、糖、分子内ヌクレオシド結合を介して付着させることができる。その他の基としては、核酸の3'端あるいは5'端に特異的に配置されたキャップ用の基で、エキソヌクレアーゼ、RNaseなどのヌクレアーゼによる分解を阻止するためのものが挙げられる。こうしたキャップ用の基としては、ポリエチレングリコール、テトラエチレングリコールなどのグリコールをはじめとした当該分野で知られた水酸基の保護基が挙げられるが、それに限定されるものではない。

40

アンチセンス核酸の阻害活性は、本発明の形質転換体、本発明の生体内や生体外の遺伝子発現系、あるいはG蛋白質共役型レセプター蛋白質の生体内や生体外の翻訳系を用いて調べることができる。該核酸は公知の各種の方法で細胞に適用できる。

#### 【0029】

本発明の部分ペプチドをコードするDNAとしては、上記した本発明の部分ペプチドをコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。また、ゲノムD

50

NA、ゲノムDNAライブラリー、上記した細胞・組織由来のcDNA、上記した細胞・組織由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。ライブラリーに使用するベクターは、バクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってもよい。また、上記した細胞・組織よりmRNA画分を調製したものをを用いて直接Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction(以下、RT-PCR法と略称する)によって増幅することもできる。

具体的には、本発明の部分ペプチドをコードするDNAとしては、例えば、(1)配列番号:2で表される塩基配列を含有するDNAの部分塩基配列を有するDNA、または(2)配列番号:2で表される塩基配列を含有するDNAとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAを有し、配列番号:1で表されるアミノ酸配列を含有するレセプター蛋白質と実質的に同質の活性(例、リガンド結合活性、シグナル情報伝達作用など)を有するレセプター蛋白質をコードするDNAの部分塩基配列を有するDNAなどが用いられる。

配列番号:2で表される塩基配列を含有するDNAとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAとしては、例えば、配列番号:2で表される塩基配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられ、具体例としては、配列番号:4で表される塩基配列を含有するDNAなどが挙げられる。

#### 【0030】

本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチド(以下、本発明のレセプター蛋白質と略記する場合がある)を完全にコードするDNAのクローニングの手段としては、本発明のレセプター蛋白質をコードするDNAの塩基配列の部分塩基配列を有する合成DNAプライマーを用いてPCR法によって増幅するか、または適当なベクターに組み込んだDNAを本発明のレセプター蛋白質の一部あるいは全領域をコードするDNA断片もしくは合成DNAを用いて標識したものとハイブリダイゼーションによって選別することができる。ハイブリダイゼーションの方法は、例えば、モレキュラー・クローニング(Molecular Cloning) 2nd(J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989)に記載の方法などに従って行うことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行うことができる。

#### 【0031】

DNAの塩基配列の変換は、PCRや公知のキット、例えば、Mutant<sup>TM</sup>-super Express Km(宝酒造)、Mutant<sup>TM</sup>-K(宝酒造)等を用いて、OD A-LA PCR法やGapped duplex法やKunkel法等の公知の方法あるいはそれらに準じる方法に従って行うことができる。

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

本発明のレセプター蛋白質の発現ベクターは、例えば、(イ)本発明のレセプター蛋白質をコードするDNAから目的とするDNA断片を切り出し、(ロ)該DNA断片を適当な発現ベクター中のプロモーターの下流に連結することにより製造することができる。

#### 【0032】

ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド(例、pCR4、pCR2.1、pBR322、pBR325、pUC12、pUC13)、枯草菌由来のプラスミド(例、pUB110、pTP5、pC194)、酵母由来プラスミド(例、pSH19、pSH15)、ファージなどのバクテリオファージ、レトロウイルス、ワクシニアウイルス、バキュロウイルスなどの動物ウイルスなどの他、pA1-11、pXT1、pRc/CMV、pR

10

20

30

40

50

c / R S V、p c D N A I / N e oなどが用いられる。

本発明で用いられるプロモーターとしては、遺伝子の発現に用いる宿主に対応して適切なプロモーターであればいかなるものでもよい。例えば、動物細胞を宿主として用いる場合は、S R プロモーター、S V 4 0 プロモーター、L T R プロモーター、C M V プロモーター、H S V - T K プロモーターなどが挙げられる。

これらのうち、C M V プロモーター、S R プロモーターなどを用いるのが好ましい。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、t r p プロモーター、l a c プロモーター、r e c A プロモーター、P<sub>L</sub> プロモーター、l p p プロモーターなどが、宿主がバチルス属菌である場合は、S P O 1 プロモーター、S P O 2 プロモーター、p e n P プロモーターなど、宿主が酵母である場合は、P H O 5 プロモーター、P G K プロモーター、G A P プロモーター、A D H プロモーターなどが好ましい。宿主が昆虫細胞である場合は、ポリヘドリンプロモーター、P 1 0 プロモーターなどが好ましい。

#### 【0033】

発現ベクターには、以上の他に、所望によりエンハンサー、スプライシングシグナル、ポリA付加シグナル、選択マーカー、S V 4 0 複製オリジン（以下、S V 4 0 o r i と略称する場合がある）などを含有しているものを用いることができる。選択マーカーとしては、例えば、ジヒドロ葉酸還元酵素（以下、d h f r と略称する場合がある）遺伝子〔メソトレキセート（M T X）耐性〕、アンピシリン耐性遺伝子（以下、A m p<sup>r</sup> と略称する場合がある）、ネオマイシン耐性遺伝子（以下、N e o<sup>r</sup> と略称する場合がある、G 4 1 8 耐性）等が挙げられる。特に、C H O ( d h f r<sup>-</sup> ) 細胞を用いて d h f r 遺伝子を選択マーカーとして使用する場合、目的遺伝子をチミジンを含まない培地によっても選択できる。

また、必要に応じて、宿主に合ったシグナル配列を、本発明のレセプター蛋白質のN末端側に付加する。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、P h o A ・シグナル配列、O m p A ・シグナル配列などが、宿主がバチルス属菌である場合は、 - アミラーゼ ・シグナル配列、サブチリシン ・シグナル配列などが、宿主が酵母である場合は、M F<sup>+</sup> ・シグナル配列、S U C 2 ・シグナル配列など、宿主が動物細胞である場合には、インシュリン ・シグナル配列、 - インターフェロン ・シグナル配列、抗体分子 ・シグナル配列などがそれぞれ利用できる。

このようにして構築された本発明のレセプター蛋白質をコードするD N A を含有するベクターを用いて、形質転換体を製造することができる。

#### 【0034】

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

エシェリヒア属菌の具体例としては、エシェリヒア ・ コリ ( E s c h e r i c h i a c o l i ) K 1 2 ・ D H 1 [ プロシーディングズ ・ オブ ・ ザ ・ ナショナル ・ アカデミー ・ オブ ・ サイエンス ・ オブ ・ ザ ・ ユーエスエー ( P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A ) , 6 0 巻 , 1 6 0 ( 1 9 6 8 ) ] , J M 1 0 3 [ ヌクイレック ・ アシックス ・ リサーチ , ( N u c l e i c A c i d s R e s e a r c h ) , 9 巻 , 3 0 9 ( 1 9 8 1 ) ] , J A 2 2 1 [ ジャーナル ・ オブ ・ モレキュラー ・ バイオロジー ( J o u r n a l o f M o l e c u l a r B i o l o g y ) , 1 2 0 巻 , 5 1 7 ( 1 9 7 8 ) ] , H B 1 0 1 [ ジャーナル ・ オブ ・ モレキュラー ・ バイオロジー , 4 1 巻 , 4 5 9 ( 1 9 6 9 ) ] , C 6 0 0 [ ジェネティクス ( G e n e t i c s ) , 3 9 巻 , 4 4 0 ( 1 9 5 4 ) ] , D H 5 [ I n o u e , H . , N o j i m a , H . a n d O k a y a m a , H . , G e n e , 9 6 , 2 3 - 2 8 ( 1 9 9 0 ) ] , D H 1 0 B [ プロシーディングズ ・ オブ ・ ザ ・ ナショナル ・ アカデミー ・ オブ ・ サイエンス ・ オブ ・ ザ ・ ユーエスエー ( P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A ) , 8 7 巻 , 4 6 4 5 - 4 6 4 9 ( 1 9 9 0 ) ] などが用いられる。

バチルス属菌としては、例えば、バチルス ・ スブチルス ( B a c i l l u s s u b t i l i s ) M I 1 1 4 [ ジーン , 2 4 巻 , 2 5 5 ( 1 9 8 3 ) ] , 2 0 7 - 2 1 [ ジャーナ

10

20

30

40

50

ル・オブ・バイオケミストリー (Journal of Biochemistry), 95巻, 87(1984)]などが用いられる。

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

#### 【0035】

昆虫細胞としては、例えば、ウイルスがAcNPVの場合は、夜盗蛾の幼虫由来株化細胞 (Spodoptera frugiperda cell; Sf細胞)、Trichoplusia niの中腸由来のMG1細胞、Trichoplusia niの卵由来のHigh Five<sup>T<sup>M</sup></sup>細胞、Mamestra brassicae由来の細胞またはEstigmena acrea由来の細胞などが用いられる。ウイルスがBmNPVの場合は、蚕由来株化細胞 (Bombyx mori N; BmN細胞)などが用いられる。該Sf細胞としては、例えば、Sf9細胞 (ATCC CRL1711)、Sf21細胞 (以上、Vaughn, J.L.ら、イン・ヴィボ (In Vivo), 13, 213-217, (1977))などが用いられる。

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

動物細胞としては、例えば、サル細胞COS-7, VerO, チャイニーズハムスター細胞CHO (以下、CHO細胞と略記)、dhfr遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞CHO (以下、CHO(dhfr<sup>-</sup>)細胞と略記)、マウスL細胞, マウスAtT-20、マウスミエローマ細胞、ラットGH3、ヒトFL細胞などが用いられる。

#### 【0036】

エシェリヒア属菌を形質転換するには、例えば、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 69巻, 2110(1972)やジーン (Gene), 17巻, 107(1982)などに記載の方法に従って行うことができる。

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

酵母を形質転換するには、例えば、メツズ・イン・エンザイモロジー (Methods in Enzymology), 194巻, 182-187(1991)、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 75巻, 1929(1978)などに記載の方法に従って行うことができる。

昆虫細胞または昆虫を形質転換するには、例えば、バイオテクノロジー (Bio/Technology), 6, 47-55(1988)などに記載の方法に従って行うことができる。動物細胞を形質転換するには、例えば、細胞工学別冊8新細胞工学実験プロトコル, 263-267(1995) (秀潤社発行)、ヴィロロジー (Virology), 52巻, 456(1973)に記載の方法に従って行うことができる。

このようにして、G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAを含有する発現ベクターで形質転換された形質転換体を得られる。

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

10

20

30

40

50

長促進因子などを添加してもよい。培地のpHは約5~8が望ましい。

【0037】

エシェリヒア属菌を培養する際の培地としては、例えば、グルコース、カザミノ酸を含むM9培地〔ミラー(Miller), ジャーナル・オブ・エクスペリメンツ・イン・モレキュラー・ジェネティクス(Journal of Experiments in Molecular Genetics), 431-433, Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1972〕が好ましい。ここに必要によりプロモーターを効率よく働かせるために、例えば、3-インドリルアクリル酸のような薬剤を加えることができる。宿主がエシェリヒア属菌の場合、培養は通常約15~43で約3~24時間行ない、必要により、通気や攪拌を加えることもできる

10

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

宿主が酵母である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、バークホルダー(Burkholder)最小培地〔Bostian, K. L. ら、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー(Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 77巻, 4505(1980)〕や0.5%カザミノ酸を含有するSD培地〔Bitter, G. A. ら、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー(Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 81

20

【0038】

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

宿主が動物細胞である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、約5~20%の胎児牛血清を含むMEM培地〔サイエンス(Science), 122巻, 501(1952)〕, DMEM培地〔ウイルス学(Virology), 8巻, 396(1959)〕, RPMI 1640培地〔ジャーナル・オブ・ザ・アメリカン・メディカル・アソシエーション(The Journal of the American Medical Association) 199巻, 519(1967)〕, 199培地〔プロシーディング・オブ・ザ・ソサイエティ・フォー・ザ・バイオロジカル・メディスン(Proceeding of the Society for the Biological Medicine), 73巻, 1(1950)〕などが用いられる。pHは約6~8であるのが好ましい。培養は通常約30~40で約15~60時間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

30

40

以上のようにして、形質転換体の細胞内、細胞膜または細胞外に本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を生成せしめることができる。

【0039】

上記培養物から本発明のレセプター蛋白質を分離精製するには、例えば、下記の方法により行うことができる。

本発明のレセプター蛋白質を培養菌体あるいは細胞から抽出するに際しては、培養後、公知の方法で菌体あるいは細胞を集め、これを適当な緩衝液に懸濁し、超音波、リゾチームおよび/または凍結融解などによって菌体あるいは細胞を破壊したのち、遠心分離やろ過によりレセプター蛋白質の粗抽出液を得る方法などが適宜用いられる。緩衝液の中に尿素や塩酸グアニジンなどの蛋白質変性剤や、トリトンX-100<sup>T M</sup>などの界面活性剤が含

50

まれていてもよい。培養液中にレセプター蛋白質が分泌される場合には、培養終了後、公知の方法で菌体あるいは細胞と上清とを分離し、上清を集める。

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

10

#### 【0040】

かくして得られるレセプター蛋白質が遊離体で得られた場合には、公知の方法あるいはそれに準じる方法によって塩に変換することができ、逆に塩で得られた場合には公知の方法あるいはそれに準じる方法により、遊離体または他の塩に変換することができる。

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

かくして生成する本発明のレセプター蛋白質またはその塩の活性は、標識したりガンドとの結合実験および特異抗体を用いたエンザイムイムノアッセイなどにより測定することができる。

20

#### 【0041】

本発明のレセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体は、本発明のレセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を認識し得る抗体であれば、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体の何れであってもよい。

本発明のレセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩（以下、本発明のレセプター蛋白質等と略記する場合がある）に対する抗体は、本発明のレセプター蛋白質等を抗原として用い、公知の抗体または抗血清の製造法に従って製造することができる。

#### 【0042】

##### 〔モノクローナル抗体の作製〕

##### （a）モノクローナル抗体産生細胞の作製

本発明のレセプター蛋白質等は、哺乳動物に対して投与により抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は通常 2 ~ 6 週毎に 1 回ずつ、計 2 ~ 10 回程度行なわれる。用いられる哺乳動物としては、例えば、サル、ウサギ、イヌ、モルモット、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギが挙げられるが、マウスおよびラットが好ましく用いられる。

30

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

40

骨髄腫細胞としては、例えば、NS - 1、P3U1、SP2/0などが挙げられるが、P3U1が好ましく用いられる。用いられる抗体産生細胞（脾臓細胞）数と骨髄腫細胞数との好ましい比率は 1 : 1 ~ 20 : 1 程度であり、PEG（好ましくは、PEG1000 ~

50



PEG 6000) が 10 ~ 80 % 程度の濃度で添加され、約 20 ~ 40 、好ましくは約 30 ~ 37 で約 1 ~ 10 分間インキュベートすることにより効率よく細胞融合を実施できる。

#### 【0043】

モノクローナル抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングには種々の方法が使用できるが、例えば、レセプター蛋白質等の抗原を直接あるいは担体とともに吸着させた固相(例、マイクロプレート)にハイブリドーマ培養上清を添加し、次に放射性物質や酵素などで標識した抗免疫グロブリン抗体(細胞融合に用いられる細胞がマウスの場合、抗マウス免疫グロブリン抗体が用いられる)またはプロテイン A を加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法、抗免疫グロブリン抗体またはプロテイン A を吸着させた固相にハイブリドーマ培養上清を添加し、放射性物質や酵素などで標識したレセプター蛋白質等を加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法などが挙げられる。

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

#### 【0044】

##### (b) モノクローナル抗体の精製

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

#### 【0045】

##### 〔ポリクローナル抗体の作製〕

本発明のポリクローナル抗体は、公知あるいはそれに準じる方法にしたがって製造することができる。例えば、免疫抗原(本発明のレセプター蛋白質等の抗原)とキャリアー蛋白質との複合体をつくり、上記のモノクローナル抗体の製造法と同様に哺乳動物に免疫を行ない、該免疫動物から本発明のレセプター蛋白質等に対する抗体含有物を採取して、抗体の分離精製を行うことにより製造できる。哺乳動物を免疫するために用いられる免疫抗原とキャリアー蛋白質との複合体に関し、キャリアー蛋白質の種類およびキャリアーとハプテンとの混合比は、キャリアーに架橋させて免疫したハプテンに対して抗体が効率良くできれば、どの様なものをどの様な比率で架橋させてもよいが、例えば、ウシ血清アルブミン、ウシサイログロブリン、キーホール・リンペット・ヘモシアニン等を重量比でハプテン 1 に対し、約 0.1 ~ 20、好ましくは約 1 ~ 5 の割合でカプルさせる方法が用いられる。

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

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

ポリクローナル抗体は、上記の方法で免疫された哺乳動物の血液、腹水など、好ましくは

血液から採取することができる。

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

【0046】

本発明のレセプター蛋白質またはその塩、その部分ペプチドまたはその塩、および該レセプター蛋白質またはその部分ペプチドをコードするDNAは、(1)本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンド(アゴニスト)の決定、(2)本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の機能不全に関連する疾患の予防および/または治療剤、(3)遺伝子診断剤、(4)本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの発現量を変化させる化合物のスクリーニング方法、(5)本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの発現量を変化させる化合物を含有する各種疾病の予防および/または治療剤、(6)本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドの定量法、(7)本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質とリガンドとの結合性を変化させる化合物(アゴニスト、アンタゴニストなど)のスクリーニング方法、(8)本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質とリガンドとの結合性を変化させる化合物(アゴニスト、アンタゴニスト)を含有する各種疾病の予防および/または治療剤、(9)本発明のレセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の定量、(10)細胞膜における本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの量を変化させる化合物のスクリーニング方法、(11)細胞膜における本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの量を変化させる化合物を含有する各種疾病の予防および/または治療剤、(12)本発明のレセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体による中和、(13)本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAを有する非ヒト動物の作製などに用いることができる。

特に、本発明の組換え型G蛋白質共役型レセプター蛋白質の発現系を用いたレセプター結合アッセイ系を用いることによって、哺乳動物に特異的なG蛋白質共役型レセプターに対するリガンドの結合性を変化させる化合物(例、アゴニスト、アンタゴニストなど)をスクリーニングすることができ、該アゴニストまたはアンタゴニストを各種疾病の予防・治療剤などとして使用することができる。

本発明のレセプター蛋白質もしくは部分ペプチドまたはその塩(以下、本発明のレセプター蛋白質等と略記する場合がある)、本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドをコードするDNA(以下、本発明のDNAと略記する場合がある)および本発明のレセプター蛋白質等に対する抗体(以下、本発明の抗体と略記する場合がある)の用途について、以下に具体的に説明する。

【0047】

(1)本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンド(アゴニスト)の決定  
本発明のレセプター蛋白質もしくはその塩または本発明の部分ペプチドもしくはその塩は、本発明のレセプター蛋白質またはその塩に対するリガンド(アゴニスト)を探索し、または決定するための試薬として有用である。

すなわち、本発明は、本発明のレセプター蛋白質もしくはその塩または本発明の部分ペプチドもしくはその塩と、試験化合物とを接触させることを特徴とする本発明のレセプター蛋白質に対するリガンドの決定方法を提供する。

試験化合物としては、公知のリガンド(例えば、アンギオテンシン、ボンベシン、カナビノイド、コレシストキニン、グルタミン、セロトニン、メラトニン、ニューロペプチドY、オピオイド、プリン、バソプレッシン、オキシトシン、PACAP(例、PACAP27, PACAP38)、セクレチン、グルカゴン、カルシトニン、アドレノメジュリン、ソマトスタチン、GHRH、CRF、ACTH、GRP、PTH、VIP(バソアクティブインテスティナルアンドリレイテッドポリペプチド)、ソマトスタチン、ドーパミン、モチリン、アミリン、ブラジキニン、CGRP(カルシトニンジーンリレーテッドペプチド)、ロイコトリエン、パンクレアスタチン、プロスタグランジン、トロンボ

キサン、アデノシン、アドレナリン、ケモカインスーパーファミリー（例、IL-8, GRO $\alpha$ , GRO $\beta$ , GRO $\gamma$ , NAP-2, ENA-78, GCP-2, PF4, IP-10, Mig, PBSF/SDF-1などのCXCKeモカインサブファミリー；MCAF/MCP-1, MCP-2, MCP-3, MCP-4, eotaxin, RANTES, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , HCC-1, MIP-3 $\alpha$ /LARC, MIP-3 $\beta$ /ELC, I-309, TARC, MIPF-1, MIPF-2/eotaxin-2, MDC, DC-CK1/PARC, SLCなどのCCKeモカインサブファミリー；lymphotactinなどのCKeモカインサブファミリー；fractalkineなどのCX3CKeモカインサブファミリー等）、エンドセリン、エンテロガストリン、ヒスタミン、ニューロテンシン、TRH、パンクレアティックポリペプチド、ガラニン、リゾホスファチジン酸（LPA）、スフィンゴシン1-リン酸など）の他に、例えば、哺乳動物（例えば、ヒト、マウス、ラット、ブタ、ウシ、ヒツジ、サルなど）の組織抽出物、細胞培養上清などが用いられる。例えば、該組織抽出物、細胞培養上清などを本発明のレセプター蛋白質に添加し、細胞刺激活性などを測定しながら分画し、最終的に単一のリガンドを得ることができる。

#### 【0048】

具体的には、本発明のリガンド決定方法は、本発明のレセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドもしくはその塩を用いるか、または組換え型レセプター蛋白質の発現系を構築し、該発現系を用いたレセプター結合アッセイ系を用いることによって、本発明のレセプター蛋白質に結合して細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca<sup>2+</sup>遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fos活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性）を有する化合物（例えば、ペプチド、蛋白質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物など）またはその塩を決定する方法である。本発明のリガンド決定方法においては、本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドと試験化合物とを接触させた場合の、例えば、該レセプター蛋白質または該部分ペプチドに対する試験化合物の結合量や、細胞刺激活性などを測定することを特徴とする。

#### 【0049】

より具体的には、本発明は、

1 標識した試験化合物を、本発明のレセプター蛋白質もしくはその塩または本発明の部分ペプチドもしくはその塩に接触させた場合における、標識した試験化合物の該蛋白質もしくはその塩、または該部分ペプチドもしくはその塩に対する結合量を測定することを特徴とする本発明のレセプター蛋白質またはその塩に対するリガンドの決定方法、

2 標識した試験化合物を、本発明のレセプター蛋白質を含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合における、標識した試験化合物の該細胞または該膜画分に対する結合量を測定することを特徴とする本発明のレセプター蛋白質またはその塩に対するリガンドの決定方法、

3 標識した試験化合物を、本発明のレセプター蛋白質をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現したレセプター蛋白質に接触させた場合における、標識した試験化合物の該レセプター蛋白質またはその塩に対する結合量を測定しすることを特徴とする本発明のレセプター蛋白質に対するリガンドの決定方法、

#### 【0050】

4 試験化合物を、本発明のレセプター蛋白質を含有する細胞に接触させた場合における、レセプター蛋白質を介した細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca<sup>2+</sup>遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など）を測定することを特徴とする本発明のレセプター蛋白質またはその塩に対するリガンドの決定方法、および

5 試験化合物を、本発明のレセプター蛋白質をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現したレセプター蛋白質に接触させた場合にお

る、レセプター蛋白質を介する細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内  $Ca^{2+}$  遊離、細胞内 cAMP 生成、細胞内 cGMP 生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fos の活性化、pH の低下などを促進する活性または抑制する活性など）を測定することを特徴とする本発明のレセプター蛋白質またはその塩に対するリガンドの決定方法を提供する。

特に、上記 1 ~ 3 の試験を行ない、試験化合物が本発明のレセプター蛋白質に結合することを確認した後に、上記 4 ~ 5 の試験を行うことが好ましい。

#### 【0051】

まず、リガンド決定方法に用いるレセプター蛋白質としては、上記した本発明のレセプター蛋白質または本発明の部分ペプチドを含有するものであれば何れのものであってもよいが、動物細胞を用いて大量発現させたレセプター蛋白質が適している。

本発明のレセプター蛋白質を製造するには、上記の発現方法が用いられるが、該レセプター蛋白質をコードする DNA を哺乳動物細胞や昆虫細胞で発現することにより行うことが好ましい。目的とする蛋白質部分をコードする DNA 断片には、通常、相補 DNA が用いられるが、必ずしもこれに制約されるものではない。例えば、遺伝子断片や合成 DNA を用いてもよい。本発明のレセプター蛋白質をコードする DNA 断片を宿主動物細胞に導入し、それらを効率よく発現させるためには、該 DNA 断片を昆虫を宿主とするバキュロウイルスに属する核多角体病ウイルス (nuclear polyhedrosis virus; NPV) のポリヘドリンプロモーター、SV40 由来のプロモーター、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、ヒトヒートショックプロモーター、サイトメガロウイルスプロモーター、SR プロモーターなどの下流に組み込むのが好ましい。発現したレセプターの量と質の検査は公知の方法で行うことができる。例えば、文献 [Nambi, P. ら、ザ・ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.), 267 巻, 19555 ~ 19559 頁, 1992 年] に記載の方法に従って行うことができる。

#### 【0052】

したがって、本発明のリガンド決定方法において、本発明のレセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を含有するものとしては、公知の方法に従って精製したレセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩であってもよいし、該レセプター蛋白質を含有する細胞またはその細胞膜画分を用いてもよい。

本発明のリガンド決定方法において、本発明のレセプター蛋白質を含有する細胞を用いる場合、該細胞をグルタルアルデヒド、ホルマリンなどで固定化してもよい。固定化方法は公知の方法に従って行うことができる。

本発明のレセプター蛋白質を含有する細胞としては、本発明のレセプター蛋白質を発現した宿主細胞をいうが、該宿主細胞としては、大腸菌、枯草菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞などが用いられる。

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

#### 【0053】

該レセプター蛋白質を含有する細胞やその膜画分中のレセプター蛋白質の量は、1 細胞当たり  $10^3$  ~  $10^8$  分子であるのが好ましく、 $10^5$  ~  $10^7$  分子であるのが好適である。なお、発現量が多いほど膜画分当たりのリガンド結合活性 (比活性) が高くなり、高感

10

20

30

40

50

度なスクリーニング系の構築が可能になるばかりでなく、同一ロットで大量の試料を測定できるようになる。

本発明のレセプター蛋白質またはその塩に対するリガンドを決定する上記の 1 ~ 3 の方法を実施するためには、適当なレセプター蛋白質画分と、標識した試験化合物が必要である。

レセプター蛋白質画分としては、天然型のレセプター蛋白質画分か、またはそれと同等の活性を有する組換え型レセプター画分などが望ましい。ここで、同等の活性とは、同等のリガンド結合活性、シグナル情報伝達作用などを示す。

標識した試験化合物としては、 $[^3\text{H}]$ 、 $[^{125}\text{I}]$ 、 $[^{14}\text{C}]$ 、 $[^{35}\text{S}]$ などで標識したアンギオテンシン、ボンペシン、カナビノイド、コレシストキニン、グルタミン、セロトニン、メラトニン、ニューロペプチドY、オピオイド、プリン、バソプレッシン、オキシトシン、PACAP（例、PACAP27、PACAP38）、セクレチン、グルカゴン、カルシトニン、アドレノメジュリン、ソマトスタチン、GHRH、CRF、ACTH、GRP、PTH、VIP（バソアクティブインテスティナルアンドリイテッドポリペプチド）、ソマトスタチン、ドーパミン、モチリン、アミリン、ブラジキニン、CGRP（カルシトニンジーンリレーティッドペプチド）、ロイコトリエン、パンクレアスタチン、プロスタグランジン、トロンボキサン、アデノシン、アドレナリン、ケモカインスーパーファミリー（例、IL-8、GRO $\alpha$ 、GRO $\beta$ 、GRO $\gamma$ 、NAP-2、ENA-78、GCP-2、PF4、IP-10、Mig、PBSF/SDF-1などのCXCKeモカインサブファミリー；MCAF/MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、eotaxin、RANTES、MIP-1 $\alpha$ 、MIP-1 $\beta$ 、HCC-1、MIP-3 $\alpha$ /LARC、MIP-3 $\beta$ /ELC、I-309、TARC、MIPF-1、MIPF-2/eotaxin-2、MDC、DC-CK1/PARC、SLCなどのCCKeモカインサブファミリー；lymphotactinなどのCケモカインサブファミリー；fractalkinなどのCX3CKeモカインサブファミリー等）、エンドセリン、エンテロガストリン、ヒスタミン、ニューロテンシン、TRH、パンクレアティックポリペプチド、ガラニン、リゾホスファチジン酸（LPA）、スフィンゴシン1-リン酸などが好適である。

#### 【0054】

具体的には、本発明のレセプター蛋白質またはその塩に対するリガンドの決定方法を行うには、まず本発明のレセプター蛋白質を含有する細胞または細胞の膜画分を、決定方法に適したバッファーに懸濁することによりレセプター標品を調製する。バッファーには、pH4~10（望ましくはpH6~8）のリン酸バッファー、トリス-塩酸バッファーなどのリガンドとレセプター蛋白質との結合を阻害しないバッファーであればいずれでもよい。また、非特異的結合を低減させる目的で、CHAPS、Tween-80<sup>TM</sup>（花王-アトラス社）、ジギトニン、デオキシコレートなどの界面活性剤やウシ血清アルブミンやゼラチンなどの各種蛋白質をバッファーに加えることもできる。さらに、プロテアーゼによるレセプターやリガンドの分解を抑える目的でPMSF、ロイペプチン、E-64（ペプチド研究所製）、ペプスタチンなどのプロテアーゼ阻害剤を添加することもできる。0.01ml~10mlの該レセプター溶液に、一定量（5000cpm~500000cpm）の $[^3\text{H}]$ 、 $[^{125}\text{I}]$ 、 $[^{14}\text{C}]$ 、 $[^{35}\text{S}]$ などで標識した試験化合物を共存させる。非特異的結合量（NSB）を知るために大過剰の未標識の試験化合物を加えた反応チューブも用意する。反応は約0~50分、望ましくは約4~37分で、約20分~24時間、望ましくは約30分~3時間行う。反応後、ガラス繊維濾紙等で濾過し、適量の同バッファーで洗浄した後、ガラス繊維濾紙に残存する放射活性を液体シンチレーションカウンターあるいは $\beta$ -カウンターで計測する。全結合量（B）から非特異的結合量（NSB）を引いたカウント（B-NSB）が0cpmを越える試験化合物を本発明のレセプター蛋白質またはその塩に対するリガンド（アゴニスト）として選択することができる。

#### 【0055】

本発明のレセプター蛋白質またはその塩に対するリガンドを決定する上記の 4 ~ 5 の方法を実施するためには、該レセプター蛋白質を介する細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内  $Ca^{2+}$  遊離、細胞内 cAMP 生成、細胞内 cGMP 生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fos の活性化、pH の低下などを促進する活性または抑制する活性など）を公知の方法または市販の測定用キットを用いて測定することができる。具体的には、まず、レセプター蛋白質を含有する細胞をマルチウェルプレート等に培養する。リガンド決定を行うにあたっては前もって新鮮な培地あるいは細胞に毒性を示さない適当なバッファーに交換し、試験化合物などを添加して一定時間インキュベートした後、細胞を抽出あるいは上清液を回収して、生成した産物をそれぞれの方法に従って定量する。細胞刺激活性の指標とする物質（例えば、アラキドン酸など）の生成が、細胞が含有する分解酵素によって検定困難な場合は、該分解酵素に対する阻害剤を添加してアッセイを行なってもよい。また、cAMP 産生抑制などの活性については、フォルスコリンなどで細胞の基礎的産生量を増大させておいた細胞に対する産生抑制作用として検出することができる。

#### 【0056】

本発明のレセプター蛋白質またはその塩に結合するリガンド決定用キットは、本発明のレセプター蛋白質もしくはその塩、本発明の部分ペプチドもしくはその塩、本発明のレセプター蛋白質を含有する細胞、または本発明のレセプター蛋白質を含有する細胞の膜画分などを含有するものである。

本発明のリガンド決定用キットの例としては、次のものが挙げられる。

#### 1. リガンド決定用試薬

##### 1 測定用緩衝液および洗浄用緩衝液

Hanks' Balanced Salt Solution (ギブコ社製) に、0.05% のウシ血清アルブミン (シグマ社製) を加えたもの。

孔径 0.45  $\mu$ m のフィルターで濾過滅菌し、4℃ で保存するか、あるいは用時調製しても良い。

##### 2 G蛋白質共役型レセプター蛋白質標品

本発明のレセプター蛋白質を発現させた CHO 細胞を、12穴プレートに  $5 \times 10^5$  個/穴で継代し、37℃、5%  $CO_2$ 、95% air で2日間培養したもの。

##### 3 標識試験化合物

市販の [ $^3H$ ]、[ $^{125}I$ ]、[ $^{14}C$ ]、[ $^{35}S$ ] などで標識した化合物、または適当な方法で標識化したもの

水溶液の状態のものを 4℃ あるいは -20℃ にて保存し、用時に測定用緩衝液にて 1  $\mu$ M に希釈する。水に難溶性を示す試験化合物については、ジメチルホルムアミド、DMSO、メタノール等に溶解する。

##### 4 非標識試験化合物

標識化合物と同じものを 100 ~ 1000 倍濃い濃度に調製する。

#### 【0057】

#### 2. 測定法

1 12穴組織培養用プレートにて培養した本発明のレセプター蛋白質発現 CHO 細胞を、測定用緩衝液 1 ml で2回洗浄した後、490  $\mu$ l の測定用緩衝液を各穴に加える。

2 標識試験化合物を 5  $\mu$ l 加え、室温にて1時間反応させる。非特異的結合量を知るためには非標識試験化合物を 5  $\mu$ l 加えておく。

3 反応液を除去し、1 ml の洗浄用緩衝液で3回洗浄する。細胞に結合した標識試験化合物を 0.2 N NaOH - 1% SDS で溶解し、4 ml の液体シンチレーター A (和光純薬製) と混合する。

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

#### 【0058】

本発明のレセプター蛋白質またはその塩に結合することができるリガンドとしては、例え

ば、脳、下垂体、心臓、膵臓、脂肪組織、乳腺、精巣などに特異的に存在する物質などが挙げられ、具体的には、アンギオテンシン、ボンベシン、カナビノイド、コレシストキニン、グルタミン、セロトニン、メラトニン、ニューロペプチドY、オピオイド、プリン、バソプレッシン、オキシトシン、PACAP（例、PACAP27、PACAP38）、セクレチン、グルカゴン、カルシトニン、アドレノメジュリン、ソマトスタチン、GHRH、CRF、ACTH、GRP、PTH、VIP（バソアクティブインテスティナルアンドリレイテッドポリペプチド）、ソマトスタチン、ドーパミン、モチリン、アミリン、ブラジキニン、CGRP（カルシトニンジーンリレーティッドペプチド）、ロイコトリエン、パンクレアスタチン、プロスタグランジン、トロンボキサン、アデノシン、アドレナリン、ケモカインスーパーファミリー（例、IL-8、GRO、GRO、GR、O、NAP-2、ENA-78、GCP-2、PF4、IP-10、Mig、PBSF/SDF-1などのCXCKeモカインサブファミリー；MCAF/MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、eotaxin、RANTES、MIP-1、MIP-1、HCC-1、MIP-3/LARC、MIP-3/ELC、I-309、TARC、MIPF-1、MIPF-2/eotaxin-2、MDC、DC-CK1/PARC、SLCなどのCCKeモカインサブファミリー；lymphotactinなどのCKeモカインサブファミリー；fractalkineなどのCX3CKeモカインサブファミリー等）、エンドセリン、エンテロガストリン、ヒスタミン、ニューロテンシン、TRH、パンクレアティックポリペプチド、ガラニン、リゾホスファチジン酸（LPA）、スフィンゴシン1-リン酸などが用いられる。

#### 【0059】

(2) 本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の機能不全に関連する疾患の予防および/または治療剤

上記(1)の方法において、本発明のレセプター蛋白質に対するリガンドが明らかになれば、該リガンドが有する作用に応じて、1 本発明のレセプター蛋白質または 2 該レセプター蛋白質をコードするDNAを、本発明のレセプター蛋白質の機能不全に関連する疾患の予防および/または治療剤などの医薬として使用することができる。

例えば、生体内において本発明のレセプター蛋白質が減少しているためにリガンドの生理作用が期待できない（該レセプター蛋白質の欠乏症）患者がいる場合に、1 本発明のレセプター蛋白質を該患者に投与し該レセプター蛋白質の量を補充したり、2 (イ) 本発明のレセプター蛋白質をコードするDNAを該患者に投与し発現させることによって、あるいは(ロ)対象となる細胞に本発明のレセプター蛋白質をコードするDNAを挿入し発現させた後に、該細胞を該患者に移植することなどによって、患者の体内におけるレセプター蛋白質の量を増加させ、リガンドの作用を十分に発揮させることができる。すなわち、本発明のレセプター蛋白質をコードするDNAは、安全で低毒性な本発明のレセプター蛋白質の機能不全に関連する疾患の予防および/または治療剤として有用である。

本発明のレセプター蛋白質または該レセプター蛋白質をコードするDNAは、中枢疾患（例えば、アルツハイマー病、痴呆、摂食障害など）、内分泌疾患（例えば、高血圧症、性腺機能異常、甲状腺機能異常、下垂体機能異常など）、代謝疾患（例えば、糖尿病、脂質代謝異常、高脂血症など）、炎症性疾患（例えば、アレルギー、喘息、リュウマチなど）、循環器系疾患（例えば、高血圧症、心肥大、狭心症、動脈硬化症等）、呼吸器系疾患（例えば、喘息、肺気腫、肺炎、気道閉塞性疾患、感染性肺疾患など）、消化器系疾患（例えば、大腸炎、下痢、消化器潰瘍（例、胃潰瘍、十二指腸潰瘍）、胃炎、消化器運動不全、肝硬変、膵炎、逆流性食道炎など）、免疫系疾患（例えば、自己免疫性疾患、アレルギー、リンパ腫など）、骨・軟骨疾患（例えば、リュウマチ、関節炎、骨粗鬆症）、泌尿器疾患（例えば、腎不全、膀胱炎、尿失禁、頻尿）、生殖器疾患（例えば、卵巣炎、子宮内膜症）、感染症（例えば、免疫機能不全、肺炎、インフルエンザなど）、癌（例えば、非小細胞肺癌、卵巣癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、乳癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌等）などの予防および/または治療に有用である。

本発明のレセプター蛋白質を上記予防・治療剤として使用する場合は、常套手段に従って

製剤化することができる。

一方、本発明のレセプター蛋白質をコードするDNA（以下、本発明のDNAと略記する場合がある）を上記予防・治療剤として使用する場合は、本発明のDNAを単独あるいはレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルスアソシエートウイルスベクターなどの適当なベクターに挿入した後、常套手段に従って実施することができる。本発明のDNAは、そのまま、あるいは摂取促進のための補助剤とともに、遺伝子銃やヒドロゲルカテーテルのようなカテーテルによって投与できる。

例えば、1 本発明のレセプター蛋白質または 2 該レセプター蛋白質をコードするDNAは、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、1 本発明のレセプター蛋白質または 2 該レセプター蛋白質をコードするDNAを生理学的に認められる公知の担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般に認められた製剤実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な用量が得られるようにするものである。

#### 【0060】

錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えば、ゼラチン、コーンスターチ、トラガント、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸などのような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのような香味剤などが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、上記タイプの材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などのような天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施に従って処方することができる。注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなど）などが用いられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール（例、エタノール）、ポリアルコール（例、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン性界面活性剤（例、ポリソルベート80<sup>T M</sup>、HCO-50）などと併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油などが用いられ、溶解補助剤である安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。

#### 【0061】

また、上記予防・治療剤は、例えば、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど）、保存剤（例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど）、酸化防止剤などと配合してもよい。調製された注射液は通常、適当なアンプルに充填される。

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

本発明のレセプター蛋白質の投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に例えば、癌患者（60kgとして）においては、一日につき約0.1~100mg、好ましくは約1.0~50mg、より好ましくは約1.0~20mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形では通常例えば、癌患者（60kgとして）においては、一日につき約0.01~30mg程度、好ましくは約0.1~20mg程度、より好ましくは約0.1~10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kgあたりに換算した量を投与することができる。

10

20

30

40

50



本発明のDNAの投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に例えば、癌患者（60kgとして）においては、一日につき約0.1～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形では通常例えば、癌患者（60kgとして）においては、一日につき約0.01～30mg程度、好ましくは約0.1～20mg程度、より好ましくは約0.1～10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kg当りに換算した量を投与することができる。

#### 【0062】

##### (3) 遺伝子診断剤

本発明のDNAは、プローブとして使用することにより、哺乳動物（例えば、ヒト、ラット、マウス、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）における本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドをコードするDNAまたはmRNAの異常（遺伝子異常）を検出することができるので、例えば、該DNAまたはmRNAの損傷、突然変異あるいは発現低下や、該DNAまたはmRNAの増加あるいは発現過多などの遺伝子診断剤として有用である。

本発明のDNAを用いる上記の遺伝子診断は、例えば、公知のノーザンハイブリダイゼーションやPCR-SSCP法（ゲノミクス（Genomics），第5巻，874～879頁（1989年）、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ユーエスエー（Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America），第86巻，2766～2770頁（1989年））などにより実施することができる。

#### 【0063】

##### (4) 本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの発現量を変化させる化合物のスクリーニング方法

本発明のDNAは、プローブとして用いることにより、本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの発現量を変化させる化合物のスクリーニングに用いることができる。すなわち、本発明は、例えば、(i) 非ヒト哺乳動物の 1 血液、 2 特定の臓器、 3 臓器から単離した組織もしくは細胞、または(ii) 形質転換体等に含まれる本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドのmRNA量を測定することによる、本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの発現量を変化させる化合物のスクリーニング方法を提供する。

#### 【0064】

本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドのmRNA量の測定は具体的には以下のようにして行う。

(i) 正常あるいは疾患モデル非ヒト哺乳動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど、より具体的には痴呆ラット、肥満マウス、動脈硬化ウサギ、担癌マウスなど）に対して、薬剤（例えば、抗痴呆薬、血圧低下薬、抗癌剤、抗肥満薬など）あるいは物理的ストレス（例えば、浸水ストレス、電気ショック、明暗、低温など）などを与え、一定時間経過した後に、血液、あるいは特定の臓器（例えば、脂肪組織、乳腺、精巣など）、または臓器から単離した組織、あるいは細胞を得る。得られた細胞に含まれる本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドのmRNAは、例えば、通常の方法により細胞等からmRNAを抽出し、例えば、TaqMan PCRなどの手法を用いることにより定量することができ、公知の手段によりノーザンブロットを行うことにより解析することもできる。

(ii) 本発明のレセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドを発現する形質転換体を上記の方法に従い作製し、該形質転換体に含まれる本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドのmRNAを同様にして定量、解析することができる。

#### 【0065】

10

20

30

40

50

本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの発現量を変化させる化合物のスクリーニングは、

(i) 正常あるいは疾患モデル非ヒト哺乳動物に対して、薬剤あるいは物理的ストレスなどを与える一定時間前(30分前~24時間前、好ましくは30分前~12時間前、より好ましくは1時間前~6時間前)もしくは一定時間後(30分後~3日後、好ましくは1時間後~2日後、より好ましくは1時間後~24時間後)、または薬剤あるいは物理的ストレスと同時に被検化合物を投与し、投与後一定時間経過後(30分後~3日後、好ましくは1時間後~2日後、より好ましくは1時間後~24時間後)、細胞に含まれる本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドのmRNA量を定量、解析することにより行うことができ、

10

(ii) 形質転換体を常法に従い培養する際に被検化合物を培地中に混合させ、一定時間培養後(1日後~7日後、好ましくは1日後~3日後、より好ましくは2日後~3日後)、該形質転換体に含まれる本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドのmRNA量を定量、解析することにより行うことができる。

#### 【0066】

本発明のスクリーニング方法を用いて得られる化合物またはその塩は、本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの発現量を変化させる作用を有する化合物であり、具体的には、(イ)本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの発現量を増加させることにより、G蛋白質共役型レセプターを介する細胞刺激活性(例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca<sup>2+</sup>遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など)を増強させる化合物、(ロ)本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの発現量を減少させることにより、該細胞刺激活性を減弱させる化合物である。

20

該化合物としては、ペプチド、蛋白、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物などが挙げられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

該細胞刺激活性を増強させる化合物は、本発明のレセプター蛋白質等の生理活性を増強するための安全で低毒性な医薬として有用である。

該細胞刺激活性を減弱させる化合物は、本発明のレセプター蛋白質等の生理活性を減少させるための安全で低毒性な医薬として有用である。

30

#### 【0067】

本発明のスクリーニング方法を用いて得られる化合物またはその塩を医薬組成物として使用する場合、常套手段に従って実施することができる。例えば、上記した本発明のレセプター蛋白質を含有する医薬と同様にして、錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤、無菌性溶液、懸濁液剤などとすることができる。

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

該化合物またはその塩の投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に、例えば、癌患者(60kgとして)においては、一日につき約0.1~100mg、好ましくは約1.0~50mg、より好ましくは約1.0~20mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形では通常例えば、癌患者(60kgとして)においては、一日につき約0.01~30mg程度、好ましくは約0.1~20mg程度、より好ましくは約0.1~10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kg当りに換算した量を投与することができる。

40

#### 【0068】

(5) 本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの発現量を変化させる化合物を

50

含有する各種疾病の予防および/または治療剤

本発明のレセプター蛋白質は上記のとおり、例えば、中枢機能など生体内で何らかの重要な役割を果たしていると考えられる。したがって、本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの発現量を変化させる化合物は、本発明のレセプター蛋白質の機能不全に関連する疾患の予防および/または治療剤として用いることができる。

該化合物を本発明のレセプター蛋白質の機能不全に関連する疾患の予防および/または治療剤として使用する場合は、常套手段に従って製剤化することができる。

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

#### 【0069】

錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えば、ゼラチン、コーンスターチ、トラガント、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸などのような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンのようない甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのようない香味剤などが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、上記タイプの材料にさらに油脂のようない液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用水のようないベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などのようない天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常い製剤実施に従って処方することができる。注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなど）などが用いられ、適当い溶解補助剤、例えば、アルコール（例、エタノール）、ポリアルコール（例、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン性界面活性剤（例、ポリソルベート 80<sup>T M</sup>、HCO-50）などと併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油などが用いられ、溶解補助剤である安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。

#### 【0070】

また、上記予防・治療剤は、例えば、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど）、保存剤（例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど）、酸化防止剤などと配合してもよい。調製された注射液は通常、適当いアンブルに充填される。

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

該化合物またはその塩の投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に例えば、癌患者（60kgとして）においては、一日につき約0.1~100mg、好ましくは約1.0~50mg、より好ましくは約1.0~20mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形では通常例えば、癌患者（60kgとして）においては、一日につき約0.01~30mg程度、好ましくは約0.1~20mg程度、より好ましくは約0.1~10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kgあたりに換算した量を投与することができる。

#### 【0071】

(6) 本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドの定量法

10

20

30

40

50

本発明のレセプター蛋白質等は、リガンドに対して結合性を有しているので、生体内におけるリガンド濃度を感度良く定量することができる。

本発明の定量法は、例えば、競合法と組み合わせることによって用いることができる。すなわち、被検体を本発明のレセプター蛋白質等と接触させることによって被検体中のリガンド濃度を測定することができる。具体的には、例えば、以下の 1 または 2 などに記載の方法あるいはそれに準じる方法に従って用いることができる。

1 入江寛編「ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和49年発行)

2 入江寛編「続ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和54年発行)

#### 【0072】

(7) 本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質とリガンドとの結合性を变化させる化合物(アゴニスト、アンタゴニストなど)のスクリーニング方法 10

本発明のレセプター蛋白質等を用いるか、または組換え型レセプター蛋白質等の発現系を構築し、該発現系を用いたレセプター結合アッセイ系を用いることによって、リガンドと本発明のレセプター蛋白質等との結合性を变化させる化合物(例えば、ペプチド、蛋白質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物など)またはその塩を効率よくスクリーニングすることができる。

このような化合物には、(イ)G蛋白質共役型レセプターを介して細胞刺激活性(例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca<sup>2+</sup>遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など)を有する化合物(いわゆる、本発明のレセプター蛋白質に対するアゴニスト)、(ロ)該細胞刺激活性を有しない化合物(いわゆる、本発明のレセプター蛋白質に対するアンタゴニスト)、(ハ)リガンドと本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合力を増強する化合物、あるいは(ニ)リガンドと本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合力を減少させる化合物などが含まれる(なお、上記(イ)の化合物は、上記したリガンド決定方法によってスクリーニングすることが好ましい)。

すなわち、本発明は、(i)本発明のレセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩と、リガンドとを接触させた場合と(ii)本発明のレセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩と、リガンドおよび試験化合物とを接触させた場合との比較を行うことを特徴とするリガンドと本発明のレセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩との結合性を变化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。 30

本発明のスクリーニング方法においては、(i)と(ii)の場合における、例えば、該レセプター蛋白質等に対するリガンドの結合量、細胞刺激活性などを測定して、比較することを特徴とする。

#### 【0073】

より具体的には、本発明は、

1 標識したリガンドを、本発明のレセプター蛋白質等に接触させた場合と、標識したリガンドおよび試験化合物を本発明のレセプター蛋白質等に接触させた場合における、標識したリガンドの該レセプター蛋白質等に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンドと本発明のレセプター蛋白質等との結合性を变化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、 40

2 標識したリガンドを、本発明のレセプター蛋白質等を含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合と、標識したリガンドおよび試験化合物を本発明のレセプター蛋白質等を含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合における、標識したリガンドの該細胞または該膜画分に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンドと本発明のレセプター蛋白質等との結合性を变化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

3 標識したリガンドを、本発明のDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現したレセプター蛋白質等に接触させた場合と、標識したリガンドおよび 50

試験化合物を本発明のDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現した本発明のレセプター蛋白質等に接触させた場合における、標識したリガンドの該レセプター蛋白質等に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンドと本発明のレセプター蛋白質等との結合性を变化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

#### 【0074】

4 本発明のレセプター蛋白質等を活性化する化合物（例えば、本発明のレセプター蛋白質等に対するリガンドなど）を本発明のレセプター蛋白質等を含有する細胞に接触させた場合と、本発明のレセプター蛋白質等を活性化する化合物および試験化合物を本発明のレセプター蛋白質等を含有する細胞に接触させた場合における、レセプターを介した細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 $Ca^{2+}$ 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など）を測定し、比較することを特徴とするリガンドと本発明のレセプター蛋白質等との結合性を变化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、および

10

5 本発明のレセプター蛋白質等を活性化する化合物（例えば、本発明のレセプター蛋白質等に対するリガンドなど）を本発明のDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現した本発明のレセプター蛋白質等に接触させた場合と、本発明のレセプター蛋白質等を活性化する化合物および試験化合物を本発明のDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現した本発明のレセプター蛋白質等に接触させた場合における、レセプターを介する細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 $Ca^{2+}$ 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など）を測定し、比較することを特徴とするリガンドと本発明のレセプター蛋白質等との結合性を变化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

20

#### 【0075】

本発明のレセプター蛋白質等が得られる以前は、G蛋白質共役型レセプターアゴニストまたはアンタゴニストをスクリーニングする場合、まずラットなどのG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含む細胞、組織またはその細胞膜画分を用いて候補化合物を得て（一次スクリーニング）、その後該候補化合物が実際にヒトのG蛋白質共役型レセプター蛋白質とリガンドとの結合を阻害するか否かを確認する試験（二次スクリーニング）が必要であった。細胞、組織または細胞膜画分をそのまま用いれば他のレセプター蛋白質も混在するために、目的とするレセプター蛋白質に対するアゴニストまたはアンタゴニストを実際にスクリーニングすることは困難であった。

30

しかしながら、例えば、本発明のヒト由来レセプター蛋白質を用いることによって、一次スクリーニングの必要がなくなり、リガンドとG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合を阻害する化合物を効率良くスクリーニングすることができる。さらに、スクリーニングされた化合物がアゴニストかアンタゴニストかを簡便に評価することができる。

本発明のスクリーニング方法の具体的な説明を以下にする。

40

まず、本発明のスクリーニング方法に用いる本発明のレセプター蛋白質等としては、上記した本発明のレセプター蛋白質等を含有するものであれば何れのものであってもよいが、本発明のレセプター蛋白質等を含有する哺乳動物の臓器の細胞膜画分が好適である。しかし、特にヒト由来の臓器は入手が極めて困難なことから、スクリーニングに用いられるものとしては、組換え体を用いて大量発現させたヒト由来のレセプター蛋白質等などが適している。

#### 【0076】

本発明のレセプター蛋白質等を製造するには、上記の方法が用いられるが、本発明のDNAを哺乳細胞や昆虫細胞で発現することにより行うことが好ましい。目的とする蛋白質部分をコードするDNA断片には相補DNAが用いられるが、必ずしもこれに制約されるも

50

のではない。例えば、遺伝子断片や合成DNAを用いてもよい。本発明のレセプター蛋白質をコードするDNA断片を宿主動物細胞に導入し、それらを効率よく発現させるためには、該DNA断片を昆虫を宿主とするバキュロウイルスに属する核多角体病ウイルス(nuclear polyhedrosis virus; NPV)のポリヘドリンプロモーター、SV40由来のプロモーター、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、ヒトヒートショックプロモーター、サイトメガロウイルスプロモーター、SRプロモーターなどの下流に組み込むのが好ましい。発現したレセプターの量と質の検査は公知の方法で行うことができる。例えば、文献〔Nambi, P.ら、ザ・ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー(J. Biol. Chem.), 267巻, 19555~19559頁, 1992年〕に記載の方法に従って行うことができる。

したがって、本発明のスクリーニング方法において、本発明のレセプター蛋白質等を含有するものとしては、公知の方法に従って精製したレセプター蛋白質等であってもよいし、該レセプター蛋白質等を含有する細胞を用いてもよく、また該レセプター蛋白質等を含有する細胞の膜画分を用いてもよい。

#### 【0077】

本発明のスクリーニング方法において、本発明のレセプター蛋白質等を含有する細胞を用いる場合、該細胞をグルタルアルデヒド、ホルマリンなどで固定化してもよい。固定化方法は公知の方法に従って行うことができる。

本発明のレセプター蛋白質等を含有する細胞としては、該レセプター蛋白質等を発現した宿主細胞をいうが、該宿主細胞としては、大腸菌、枯草菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞などが好ましい。

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

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

#### 【0078】

リガンドと本発明のレセプター蛋白質等との結合性を变化させる化合物をスクリーニングする上記の1~3を実施するためには、例えば、適当なレセプター蛋白質画分と、標識したリガンドが必要である。

レセプター蛋白質画分としては、天然型のレセプター蛋白質画分か、またはそれと同等の活性を有する組換え型レセプター蛋白質画分などが望ましい。ここで、同等の活性とは、同等のリガンド結合活性、シグナル情報伝達作用などを示す。

標識したリガンドとしては、標識したリガンド、標識したリガンドアナログ化合物などが用いられる。例えば〔 $^3\text{H}$ 〕、〔 $^{125}\text{I}$ 〕、〔 $^{14}\text{C}$ 〕、〔 $^{35}\text{S}$ 〕などで標識されたリガンドなどが用いられる。

具体的には、リガンドと本発明のレセプター蛋白質等との結合性を变化させる化合物のスクリーニングを行うには、まず本発明のレセプター蛋白質等を含有する細胞または細胞の膜画分を、スクリーニングに適したバッファーに懸濁することによりレセプター蛋白質標

品を調製する。バッファーには、pH 4 ~ 10 (望ましくは pH 6 ~ 8) のリン酸バッファー、トリス - 塩酸バッファーなどのリガンドとレセプター蛋白質との結合を阻害しないバッファーであればいずれでもよい。また、非特異的結合を低減させる目的で、CHAPS、Tween-80<sup>TM</sup> (花王 - アトラス社)、ジギトニン、デオキシコレートなどの界面活性剤をバッファーに加えることもできる。さらに、プロテアーゼによるレセプターやリガンドの分解を抑える目的でPMSF、ロイペプチン、E-64 (ペプチド研究所製)、ペプスタチンなどのプロテアーゼ阻害剤を添加することもできる。0.01 ml ~ 10 ml の該レセプター溶液に、一定量 (5000 cpm ~ 500000 cpm) の標識したリガンドを添加し、同時に  $10^{-4}$  M ~  $10^{-10}$  M の試験化合物を共存させる。非特異的結合量 (NSB) を知るために大過剰の未標識のリガンドを加えた反応チューブも用意する。反応は約 0 から 50、望ましくは約 4 から 37 で、約 20 分から 24 時間、望ましくは約 30 分から 3 時間行う。反応後、ガラス繊維濾紙等で濾過し、適量の同バッファーで洗浄した後、ガラス繊維濾紙に残存する放射活性を液体シンチレーションカウンターまたは  $\beta$ -カウンターで計測する。拮抗する物質がない場合のカウント ( $B_0$ ) から非特異的結合量 (NSB) を引いたカウント ( $B_0 - NSB$ ) を 100% とした時、特異的結合量 ( $B - NSB$ ) が、例えば、50% 以下になる試験化合物を拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができる。

#### 【0079】

リガンドと本発明のレセプター蛋白質等との結合性を変化させる化合物スクリーニングする上記の 4 ~ 5 の方法を実施するためには、例えば、レセプター蛋白質を介する細胞刺激活性 (例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内  $Ca^{2+}$  遊離、細胞内 cAMP 生成、細胞内 cGMP 生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fos の活性化、pH の低下などを促進する活性または抑制する活性など) を公知の方法または市販の測定用キットを用いて測定することができる。

具体的には、まず、本発明のレセプター蛋白質等を含有する細胞をマルチウェルプレート等に培養する。スクリーニングを行うにあたっては前もって新鮮な培地あるいは細胞に毒性を示さない適当なバッファーに交換し、試験化合物などを添加して一定時間インキュベートした後、細胞を抽出あるいは上清液を回収して、生成した産物をそれぞれの方法に従って定量する。細胞刺激活性の指標とする物質 (例えば、アラキドン酸など) の生成が、細胞が含有する分解酵素によって検定困難な場合は、該分解酵素に対する阻害剤を添加してアッセイを行なってもよい。また、cAMP 産生抑制などの活性については、フォルスコリンなどで細胞の基礎的産生量を増大させておいた細胞に対する産生抑制作用として検出することができる。

細胞刺激活性を測定してスクリーニングを行うには、適当なレセプター蛋白質を発現した細胞が必要である。本発明のレセプター蛋白質等を発現した細胞としては、天然型の本発明のレセプター蛋白質等を有する細胞株、上記の組換え型レセプター蛋白質等を発現した細胞株などが望ましい。

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

#### 【0080】

リガンドと本発明のレセプター蛋白質等との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング用キットは、本発明のレセプター蛋白質等、本発明のレセプター蛋白質等を含有する細胞、または本発明のレセプター蛋白質等を含有する細胞の膜画分を含有するものなどである。

本発明のスクリーニング用キットの例としては、次のものが挙げられる。

##### 1. スクリーニング用試薬

###### 1 測定用緩衝液および洗浄用緩衝液

Hanks' Balanced Salt Solution (ギブコ社製) に、0. 50

0.5%のウシ血清アルブミン(シグマ社製)を加えたもの。

孔径0.45 μmのフィルターで濾過滅菌し、4℃で保存するか、あるいは用時調製しても良い。

## 2 G蛋白質共役型レセプター標品

本発明のレセプター蛋白質を発現させたCHO細胞を、12穴プレートに $5 \times 10^5$ 個/穴で継代し、37℃、5%CO<sub>2</sub>、95%airで2日間培養したもの。

## 3 標識リガンド

市販の[<sup>3</sup>H]、[<sup>125</sup>I]、[<sup>14</sup>C]、[<sup>35</sup>S]などで標識したリガンド水溶液の状態のものを4℃あるいは-20℃にて保存し、用時に測定用緩衝液にて1 μMに希釈する。

10

## 4 リガンド標準液

リガンドを0.1%ウシ血清アルブミン(シグマ社製)を含むPBSで1 mMとなるように溶解し、-20℃で保存する。

## 【0081】

### 2. 測定法

1 12穴組織培養用プレートにて培養した本発明のレセプター蛋白質発現CHO細胞を、測定用緩衝液1 mlで2回洗浄した後、490 μlの測定用緩衝液を各穴に加える。

2  $10^{-3}$  ~  $10^{-10}$  Mの試験化合物溶液を5 μl加えた後、標識リガンドを5 μl加え、室温にて1時間反応させる。非特異的結合量を知るためには試験化合物の代わりに $10^{-3}$  Mのリガンドを5 μl加えておく。

20

3 反応液を除去し、1 mlの洗浄用緩衝液で3回洗浄する。細胞に結合した標識リガンドを0.2 N NaOH-1% SDSで溶解し、4 mlの液体シンチレーターA(和光純薬製)と混合する。

4 液体シンチレーションカウンター(ベックマン社製)を用いて放射活性を測定し、Percent Maximum Binding(PMB)を次の式で求める。

$$PMB = [(B - NSB) / (B_0 - NSB)] \times 100$$

PMB: Percent Maximum Binding

B: 検体を加えた時の値

NSB: Non-specific Binding(非特異的結合量)

B<sub>0</sub>: 最大結合量

30

## 【0082】

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩は、リガンドと本発明のレセプター蛋白質等との結合性を变化させる作用を有する化合物であり、具体的には、(イ)G蛋白質共役型レセプターを介して細胞刺激活性(例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca<sup>2+</sup>遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など)を有する化合物(いわゆる、本発明のレセプター蛋白質に対するアゴニスト)、(ロ)該細胞刺激活性を有しない化合物(いわゆる、本発明のレセプター蛋白質に対するアンタゴニスト)、(ハ)リガンドと本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合力を増強する化合物、あるいは(ニ)リガンドと本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合力を減少させる化合物である。

40

該化合物としては、ペプチド、蛋白、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物などが挙げられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

本発明のレセプター蛋白質等に対するアゴニストは、本発明のレセプター蛋白質等に対するリガンドが有する生理活性と同様の作用を有しているため、該リガンド活性に応じて安全で低毒性な医薬として有用である。

本発明のレセプター蛋白質等に対するアンタゴニストは、本発明のレセプター蛋白質等に対するリガンドが有する生理活性を抑制することができるため、該リガンド活性を抑制す

50



る安全で低毒性な医薬として有用である。

リガンドと本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合力を増強する化合物は、本発明のレセプター蛋白質等に対するリガンドが有する生理活性を増強するための安全で低毒性な医薬として有用である。

リガンドと本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合力を減少させる化合物は、本発明のレセプター蛋白質等に対するリガンドが有する生理活性を減少させるための安全で低毒性な医薬として有用である。

#### 【0083】

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩を上記の医薬組成物として使用する場合、常套手段に従って実施することができる。例えば、上記した本発明のレセプター蛋白質を含有する医薬と同様にして、錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤、無菌性溶液、懸濁液剤などとすることができる。

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

該化合物またはその塩の投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に例えば、癌患者（60kgとして）においては、一日につき約0.1～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形では通常例えば、癌患者（60kgとして）においては、一日につき約0.01～30mg程度、好ましくは約0.1～20mg程度、より好ましくは約0.1～10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kg当たり換算した量を投与することができる。

#### 【0084】

(8) 本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質とリガンドとの結合性を变化させる化合物（アゴニスト、アンタゴニスト）を含有する各種疾病の予防および/または治療剤

本発明のレセプター蛋白質は上記のとおり、例えば中枢機能、循環機能、消化機能など生体内で何らかの重要な役割を果たしていると考えられる。従って、本発明のレセプター蛋白質とリガンドとの結合性を变化させる化合物（アゴニスト、アンタゴニスト）や本発明のレセプター蛋白質に対するリガンドは、本発明のレセプター蛋白質の機能不全に関連する疾患の予防および/または治療剤として用いることができる。

該化合物やリガンドを本発明のレセプター蛋白質の機能不全に関連する疾患の予防および/または治療剤として使用する場合は、常套手段に従って製剤化することができる。

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

#### 【0085】

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

10

20

30

40

50

のような天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施に従って処方することができる。注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなど）などが用いられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール（例、エタノール）、ポリアルコール（例、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン性界面活性剤（例、ポリソルベート 80<sup>T M</sup>、HCO-50）などと併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油などが用いられ、溶解補助剤である安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。

#### 【0086】

また、上記予防・治療剤は、例えば、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど）、保存剤（例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど）、酸化防止剤などと配合してもよい。調製された注射液は通常、適当なアンプルに充填される。

さらに、上記予防・治療剤は適当な薬剤と組み合わせて例えば本発明のレセプター蛋白質が高発現している臓器や組織を特異的なターゲットとしたDDS製剤として使用することもできる。

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

該化合物またはその塩の投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に例えば、癌患者（60kgとして）においては、一日につき約0.1~100mg、好ましくは約1.0~50mg、より好ましくは約1.0~20mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形では通常例えば、癌患者（60kgとして）においては、一日につき約0.01~30mg程度、好ましくは約0.1~20mg程度、より好ましくは約0.1~10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kgあたりに換算した量を投与することができる。

#### 【0087】

(9) 本発明のレセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の定量  
本発明の抗体は、本発明のレセプター蛋白質等の特異的に認識することができるので、被検液中の本発明のレセプター蛋白質等の定量、特にサンドイッチ免疫測定法による定量などに使用することができる。すなわち、本発明は、例えば、(i) 本発明の抗体と、被検液および標識化レセプター蛋白質等とを競合的に反応させ、該抗体に結合した標識化レセプター蛋白質等の割合を測定することを特徴とする被検液中の本発明のレセプター蛋白質等の定量法、

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

上記(ii)においては、一方の抗体が本発明のレセプター蛋白質等のN端部を認識する抗体で、他方の抗体が本発明のレセプター蛋白質等のC端部に反応する抗体であることが好ましい。

#### 【0088】

本発明のレセプター蛋白質等に対するモノクローナル抗体（以下、本発明のモノクローナル抗体と称する場合がある）を用いて本発明のレセプター蛋白質等の測定を行なえるほか、組織染色等による検出を行うこともできる。これらの目的には、抗体分子そのものを用いてもよく、また、抗体分子のF(ab')<sub>2</sub>、Fab'、あるいはFab画分を用いてもよい。本発明のレセプター蛋白質等に対する抗体を用いる測定法は、特に制限されるべきものではなく、被測定液中の抗原量（例えば、レセプター蛋白質量）に対応した抗体、

10

20

30

40

50

抗原もしくは抗体 - 抗原複合体の量を化学的または物理的手段により検出し、これを既知量の抗原を含む標準液を用いて作製した標準曲線より算出する測定法であれば、いずれの測定法を用いてもよい。例えば、ネフロメトリー、競合法、イムノメトリック法およびサンドイッチ法が好適に用いられるが、感度、特異性の点で、後に記載するサンドイッチ法を用いるのが特に好ましい。

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

10

#### 【0089】

抗原あるいは抗体の不溶化に当っては、物理吸着を用いてもよく、また通常、蛋白質あるいは酵素等を不溶化、固定化するのに用いられる化学結合を用いる方法でもよい。担体としては、例えば、アガロース、デキストラン、セルロースなどの不溶性多糖類、ポリスチレン、ポリアクリルアミド、シリコン等の合成樹脂、あるいはガラス等が用いられる。サンドイッチ法においては不溶化した本発明のモノクローナル抗体に被検液を反応させ（1次反応）、さらに標識化した本発明のモノクローナル抗体を反応させ（2次反応）た後、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することにより被検液中の本発明のレセプター蛋白質量を定量することができる。1次反応と2次反応は逆の順序に行なっても、また、同時に行なってもよいし時間をずらして行なってもよい。標識化剤および不溶化の方法は上記のそれらに準じることができる。また、サンドイッチ法による免疫測定法において、固相抗体あるいは標識用抗体に用いられる抗体は必ずしも1種類である必要はなく、測定感度を向上させる等の目的で2種類以上の抗体の混合物を用いてもよい。

20

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

30

#### 【0090】

本発明のモノクローナル抗体をサンドイッチ法以外の測定システム、例えば、競合法、イムノメトリック法あるいはネフロメトリーなどに用いることができる。競合法では、被検液中の抗原と標識抗原とを抗体に対して競合的に反応させたのち、未反応の標識抗原と（F）と抗体と結合した標識抗原（B）とを分離し（B/F分離）、B、Fいずれかの標識量を測定し、被検液中の抗原量を定量する。本反応法には、抗体として可溶性抗体を用い、B/F分離をポリエチレングリコール、上記抗体に対する第2抗体などを用いる液相法、および、第1抗体として固相化抗体を用いるか、あるいは、第1抗体は可溶性のものを第2抗体として固相化抗体を用いる固相化法とが用いられる。

40

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

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

50

## 【0091】

これら個々の免疫学的測定法を本発明の測定方法に適用するにあたっては、特別の条件、操作等の設定は必要とされない。それぞれの方法における通常の条件、操作法に当業者の通常の技術的配慮を加えて本発明のレセプター蛋白質またはその塩の測定系を構築すればよい。これらの一般的な技術手段の詳細については、総説、成書などを参照することができる〔例えば、入江 寛編「ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和49年発行)、入江 寛編「続ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和54年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(医学書院、昭和53年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(第2版)(医学書院、昭和57年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(第3版)(医学書院、昭和62年発行)、「メソッズ・イン・エンジモロジー(Methods in ENZYMOLOGY)」Vol. 70 (Immunochemical Techniques (Part A))、同書Vol. 73 (Immunochemical Techniques (Part B))、同書Vol. 74 (Immunochemical Techniques (Part C))、同書Vol. 84 (Immunochemical Techniques (Part D: Selected Immunoassays))、同書Vol. 92 (Immunochemical Techniques (Part E: Monoclonal Antibodies and General Immunoassay Methods))、同書Vol. 121 (Immunochemical Techniques (Part I: Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies)) (以上、アカデミックプレス社発行)など参照〕。

10

20

30

40

50

以上のように、本発明の抗体を用いることによって、本発明のレセプター蛋白質またはその塩を感度良く定量することができる。

さらに、本発明の抗体を用いて、生体内での本発明のレセプター蛋白質またはその塩を定量することによって、本発明のレセプター蛋白質の機能不全に関連する各種疾患の診断をすることができる。

また、本発明の抗体は、体液や組織などの被検体中に存在する本発明のレセプター蛋白質等を特異的に検出するために使用することができる。また、本発明のレセプター蛋白質等を精製するために使用する抗体カラムの作製、精製時の各分画中の本発明のレセプター蛋白質等の検出、被検細胞内における本発明のレセプター蛋白質の挙動の分析などのために使用することができる。

30

40

50

## 【0092】

(10) 細胞膜における本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの量を変化させる化合物のスクリーニング方法

本発明の抗体は、本発明のレセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を特異的に認識することができるので、細胞膜における本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの量を変化させる化合物のスクリーニングに用いることができる。

すなわち本発明は、例えば、

- (i) 非ヒト哺乳動物の 1 血液、 2 特定の臓器、 3 臓器から単離した組織もしくは細胞等を破壊した後、細胞膜画分を単離し、細胞膜画分に含まれる本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドを定量することによる、細胞膜における本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの量を変化させる化合物のスクリーニング方法、
  - (ii) 本発明のレセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドを発現する形質転換体等を破壊した後、細胞膜画分を単離し、細胞膜画分に含まれる本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドを定量することによる、細胞膜における本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの量を変化させる化合物のスクリーニング方法、
  - (iii) 非ヒト哺乳動物の 1 血液、 2 特定の臓器、 3 臓器から単離した組織もしくは細胞等を切片とした後、免疫染色法を用いることにより、細胞表層での該受容体蛋白質の染色度合いを定量化することにより、細胞膜上の該蛋白質を確認することによる、細胞膜における本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの量を変化させる
- 40
- 50

化合物のスクリーニング方法を提供する。

(iv) 本発明のレセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドを発現する形質転換体等を切片とした後、免疫染色法を用いることにより、細胞表層での該受容体蛋白質の染色度合いを定量化することにより、細胞膜上の該蛋白質を確認することによる、細胞膜における本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの量を変化させる化合物のスクリーニング方法を提供する。

【0093】

細胞膜画分に含まれる本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの定量は具体的には以下のようにして行う。

(i) 正常あるいは疾患モデル非ヒト哺乳動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど、より具体的には痴呆ラット、肥満マウス、動脈硬化ウサギ、担癌マウスなど）に対して、薬剤（例えば、抗痴呆薬、血圧低下薬、抗癌剤、抗肥満薬など）あるいは物理的ストレス（例えば、浸水ストレス、電気ショック、明暗、低温など）などを与え、一定時間経過した後に、血液、あるいは特定の臓器（例えば、脂肪組織、乳腺、精巣など）、または臓器から単離した組織、あるいは細胞を得る。得られた臓器、組織または細胞等を、例えば、適当な緩衝液（例えば、トリス塩酸緩衝液、リン酸緩衝液、ヘペス緩衝液など）等に懸濁し、臓器、組織あるいは細胞を破壊し、界面活性剤（例えば、トリトン X-100<sup>TM</sup>、ツイーン 20<sup>TM</sup> など）などを用い、さらに遠心分離や濾過、カラム分画などの手法を用いて細胞膜画分を得る。

10

【0094】

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

20

30

【0095】

細胞膜画分に含まれる本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドは、例えば、本発明の抗体を用いたサンドイッチ免疫測定法、ウエスタンブロット解析などにより定量することができる。

かかるサンドイッチ免疫測定法は上記の方法と同様にして行うことができ、ウエスタンブロットは公知の手段により行うことができる。

【0096】

(ii) 本発明のレセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドを発現する形質転換体を上記の方法に従い作製し、細胞膜画分に含まれる本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドを定量することができる。

40

【0097】

細胞膜における本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの量を変化させる化合物のスクリーニングは、

(i) 正常あるいは疾患モデル非ヒト哺乳動物に対して、薬剤あるいは物理的ストレスなどを与える一定時間前（30分前～24時間前、好ましくは30分前～12時間前、より好ましくは1時間前～6時間前）もしくは一定時間後（30分後～3日後、好ましくは1時間後～2日後、より好ましくは1時間後～24時間後）、または薬剤あるいは物理的ストレスと同時に被検化合物を投与し、投与後一定時間経過後（30分後～3日後、好ましくは1時間後～2日後、より好ましくは1時間後～24時間後）、細胞膜における本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの量を定量することにより行うことができ、

50

( i i ) 形質転換体を常法に従い培養する際に被検化合物を培地中に混合させ、一定時間培養後( 1 日後 ~ 7 日後、好ましくは 1 日後 ~ 3 日後、より好ましくは 2 日後 ~ 3 日後)、細胞膜における本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの量を定量することにより行うことができる。

【 0 0 9 8 】

細胞膜画分に含まれる本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの確認は具体的には以下のようにして行う。

( i i i ) 正常あるいは疾患モデル非ヒト哺乳動物( 例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど、より具体的には痴呆ラット、肥満マウス、動脈硬化ウサギ、担癌マウスなど) に対して、薬剤( 例えば、抗痴呆薬、血圧低下薬、抗癌剤、抗肥満薬など) あるいは物理的ストレス( 例えば、浸水ストレス、電気ショック、明暗、低温など) などを与え、一定時間経過した後に、血液、あるいは特定の臓器( 例えば、脂肪組織、乳腺、精巣など)、または臓器から単離した組織、あるいは細胞を得る。得られた臓器、組織または細胞等を、常法に従い組織切片とし、本発明の抗体を用いて免疫染色を行う。細胞表面での該受容体蛋白質の染色度合いを定量化することにより、細胞膜上の該蛋白質を確認することにより、定量的または定性的に、細胞膜における本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの量を確認することができる。

( i v ) 本発明のレセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドを発現する形質転換体等を用いて同様の手段をとることにより確認することもできる。

【 0 0 9 9 】

本発明のスクリーニング方法を用いて得られる化合物またはその塩は、細胞膜における本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの量を変化させる作用を有する化合物であり、具体的には、( イ ) 細胞膜における本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの量を増加させることにより、G 蛋白質共役型レセプターを介する細胞刺激活性( 例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内  $Ca^{2+}$  遊離、細胞内 c A M P 生成、細胞内 c G M P 生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c - f o s の活性化、p H の低下などを促進する活性または抑制する活性など) を増強させる化合物、( ロ ) 細胞膜における本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの量を減少させることにより、該細胞刺激活性を減弱させる化合物である。

該化合物としては、ペプチド、蛋白、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物などが挙げられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

該細胞刺激活性を増強させる化合物は、本発明のレセプター蛋白質等の生理活性を増強するための安全で低毒性な医薬として有用である。

該細胞刺激活性を減弱させる化合物は、本発明のレセプター蛋白質等の生理活性を減少させるための安全で低毒性な医薬として有用である。

【 0 1 0 0 】

本発明のスクリーニング方法を用いて得られる化合物またはその塩を医薬組成物として使用する場合、常套手段に従って実施することができる。例えば、上記した本発明のレセプター蛋白質を含有する医薬と同様にして、錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤、無菌性溶液、懸濁液剤などとすることができる。

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

該化合物またはその塩の投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に例えば、癌患者( 6 0 k g として) においては、一日につき約 0 . 1 ~ 1 0 0 m g 、好ましくは約 1 . 0 ~ 5 0 m g 、より好ましくは約 1 . 0 ~ 2 0 m g である。非経口的に投与する場合は、その 1 回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形では通常例えば、癌患者( 6 0 k g として) においては、一日につき約 0 . 0 1 ~ 3 0 m g 程度、好ましくは約 0

10

20

30

40

50

． 1 ~ 20 mg 程度、より好ましくは約 0 . 1 ~ 10 mg 程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60 kg 当りに換算した量を投与することができる。

#### 【0101】

(11) 細胞膜における本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの量を変化させる化合物を含有する各種疾病の予防および/または治療剤

本発明のレセプター蛋白質は上記のとおり、例えば、中枢機能など生体内で何らかの重要な役割を果たしていると考えられる。したがって、細胞膜における本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの量を変化させる化合物は、本発明のレセプター蛋白質の機能不全に関連する疾患の予防および/または治療剤として用いることができる。

10

該化合物を本発明のレセプター蛋白質の機能不全に関連する疾患の予防および/または治療剤として使用する場合は、常套手段に従って製剤化することができる。

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

#### 【0102】

20

錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えば、ゼラチン、コーンスターチ、トラガント、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのよう賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸などのような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのような香味剤などが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、上記タイプの材料にさらに油脂のよう液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用水のようベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などのよう天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常製剤実施に従って処方することができる。注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなど）などが用いられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール（例、エタノール）、ポリアルコール（例、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン性界面活性剤（例、ポリソルベート 80<sup>T M</sup>、HCO-50）などと併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油などが用いられ、溶解補助剤である安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。

30

#### 【0103】

また、上記予防・治療剤は、例えば、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど）、保存剤（例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど）、酸化防止剤などと配合してもよい。調製された注射液は通常、適当なアンプルに充填される。

40

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

該化合物またはその塩の投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に例えば、癌患者（60 kg として）においては、一日につき約 0 . 1 ~ 100 mg、好ましくは約 1 . 0 ~ 50 mg、より好ましくは約 1 . 0 ~ 20 mg である。非経口的に投与する場合は、その 1 回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形では通常例えば、癌患者（60 kg として）においては、一日につき約 0 . 01 ~ 30 mg 程度、好ましくは約 0

50

． 1 ~ 20 mg 程度、より好ましくは約 0 . 1 ~ 10 mg 程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60 kg 当りに換算した量を投与することができる。

#### 【0104】

(12) 本発明のレセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはそれらの塩に対する抗体による中和

本発明のレセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体の、それらレセプター蛋白質などに対する中和活性とは、すなわち、該レセプター蛋白質の関与するシグナル伝達機能を不活性化する活性を意味する。従って、該抗体が中和活性を有する場合は、該レセプター蛋白質の関与するシグナル伝達、例えば、該レセプター蛋白質を介する細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内  $Ca^{2+}$  遊離、細胞内 cAMP 生成、細胞内 cGMP 生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fos の活性化、pH の低下などを促進する活性または抑制する活性など）を不活性化することができる。したがって、該レセプター蛋白質の過剰発現などに起因する疾患の予防および/または治療に用いることができる。

10

#### 【0105】

(13) 本発明の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードする DNA を有する動物の作製

本発明の DNA を用いて、本発明のレセプター蛋白質等を発現するトランスジェニック動物を作製することができる。動物としては、哺乳動物（例えば、ラット、マウス、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）など（以下、動物と略記する場合があります）が挙げられるが、特に、マウス、ウサギなどが好適である。

20

本発明の DNA を対象動物に転移させるにあたっては、該 DNA を動物細胞で発現させうるプロモーターの下流に結合した遺伝子コンストラクトとして用いるのが一般に有利である。例えば、ウサギ由来の本発明の DNA を転移させる場合、これと相同性が高い動物由来の本発明の DNA を動物細胞で発現させうる各種プロモーターの下流に結合した遺伝子コンストラクトを、例えば、ウサギ受精卵へマイクロインジェクションすることによって本発明のレセプター蛋白質等を高産生する DNA 転移動物を作出できる。このプロモーターとしては、例えば、ウイルス由来プロモーター、メタロチオネイン等のユビキアスな発現プロモーターも使用しうるが、好ましくは脳で特異的に発現する NGF 遺伝子プロモーターやエノラーゼ遺伝子プロモーターなどが用いられる。

30

#### 【0106】

受精卵細胞段階における本発明の DNA の転移は、対象動物の胚芽細胞および体細胞の全てに存在するように確保される。DNA 転移後の作出動物の胚芽細胞において本発明のレセプター蛋白質等が存在することは、作出動物の子孫が全てその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明のレセプター蛋白質等を有することを意味する。遺伝子を受け継いだこの種の動物の子孫はその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明のレセプター蛋白質等を有する。

本発明の DNA 転移動物は、交配により遺伝子を安定に保持することを確認して、該 DNA 保有動物として通常の飼育環境で飼育継代を行うことができる。さらに、目的 DNA を保有する雌雄の動物を交配することにより、導入遺伝子を相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得し、この雌雄の動物を交配することによりすべての子孫が該 DNA を有するように繁殖継代することができる。本発明の DNA が転移された動物は、本発明のレセプター蛋白質等が高発現させられているので、本発明のレセプター蛋白質等に対するアゴニストまたはアンタゴニストのスクリーニング用の動物などとして有用である。

40

本発明の DNA 転移動物を、組織培養のための細胞源として使用することもできる。例えば、本発明の DNA 転移マウスの組織中の DNA もしくは RNA を直接分析するか、あるいは遺伝子により発現された本発明のレセプター蛋白質が存在する組織を分析することにより、本発明のレセプター蛋白質等について分析することができる。本発明のレセプター蛋白質等を有する組織の細胞を標準組織培養技術により培養し、これらを使用して、例え

50



ば、脳や末梢組織由来のような一般に培養困難な組織からの細胞の機能を研究することができる。また、その細胞を用いることにより、例えば、各種組織の機能を高めるような医薬の選択も可能である。また、高発現細胞株があれば、そこから、本発明のレセプター蛋白質等を単離精製することも可能である。

## 【0107】

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

10

DNA	: デオキシリボ核酸
cdNA	: 相補的デオキシリボ核酸
A	: アデニン
T	: チミン
G	: グアニン
C	: シトシン
RNA	: リボ核酸
mRNA	: メッセンジャーリボ核酸
dATP	: デオキシアデノシン三リン酸
dTTP	: デオキシチミジン三リン酸
dGTP	: デオキシグアノシン三リン酸
dCTP	: デオキシシチジン三リン酸
ATP	: アデノシン三リン酸
EDTA	: エチレンジアミン四酢酸
SDS	: ドデシル硫酸ナトリウム

20

## 【0108】

Gly	: グリシン
Ala	: アラニン
Val	: バリン
Leu	: ロイシン
Ile	: イソロイシン
Ser	: セリン
Thr	: スレオニン
Cys	: システイン
Met	: メチオニン
Glu	: グルタミン酸
Asp	: アスパラギン酸
Lys	: リジン
Arg	: アルギニン
His	: ヒスチジン
Phe	: フェニルアラニン
Tyr	: チロシン
Trp	: トリプトファン
Pro	: プロリン
Asn	: アスパラギン
Gln	: グルタミン
pGlu	: ピログルタミン酸
Me	: メチル基
Et	: エチル基
Bu	: ブチル基

30

40

50

Ph : フェニル基  
 TC : チアゾリジン - 4 ( R ) - カルボキサミド基

## 【 0 1 0 9 】

また、本明細書中で繁用される置換基、保護基および試薬を下記の記号で表記する。

To s : p - トルエン sulfonil  
 CH O : ホルミル  
 B z l : ベンジル  
 Cl<sub>2</sub> B z l : 2 , 6 - ジクロロベンジル  
 B o m : ベンジルオキシメチル  
 Z : ベンジルオキシカルボニル 10  
 Cl - Z : 2 - クロロベンジルオキシカルボニル  
 Br - Z : 2 - ブロモベンジルオキシカルボニル  
 B o c : t - ブトキシカルボニル  
 D N P : ジニトロフェノール  
 T r t : トリチル  
 B u m : t - ブトキシメチル  
 F m o c : N - 9 - フルオレニルメトキシカルボニル  
 H O B t : 1 - ヒドロキシベンズトリアゾール  
 H O O B t : 3 , 4 - ジヒドロ - 3 - ヒドロキシ - 4 - オキソ - 1 , 2 , 3 - ベン  
 ゴトリアジン 20  
 H O N B : 1 - ヒドロキシ - 5 - ノルボルネン - 2 , 3 - ジカルボキシイミド  
 D C C : N , N ' - ジシクロヘキシルカルボジイミド

## 【 0 1 1 0 】

本明細書の配列表の配列番号は、以下の配列を示す。

配列番号 : 1

本発明のヒト脾臓由来の新規 G 蛋白質共役型レセプター蛋白質 T G R 4 1 A のアミノ酸配列を示す。

配列番号 : 2

本発明のヒト脾臓由来の新規 G 蛋白質共役型レセプター蛋白質 T G R 4 1 A をコードする c D N A の塩基配列を示す。 30

配列番号 : 3

本発明のヒト脾臓由来の新規 G 蛋白質共役型レセプター蛋白質 T G R 4 1 V のアミノ酸配列を示す。

配列番号 : 4

本発明のヒト脾臓由来の新規 G 蛋白質共役型レセプター蛋白質 T G R 4 1 V をコードする c D N A の塩基配列を示す。

配列番号 : 5

本発明のヒト脾臓由来の新規 G 蛋白質共役型レセプター蛋白質 T G R 4 1 A をコードする S N P s を含んだ c D N A の塩基配列を示す。

配列番号 : 6 40

本発明のヒト脾臓由来の新規 G 蛋白質共役型レセプター蛋白質 T G R 4 1 V をコードする S N P s を含んだ c D N A の塩基配列を示す。

配列番号 : 7

本発明のヒト脾臓由来の新規 G 蛋白質共役型レセプター蛋白質 T G R 4 1 A 2 のアミノ酸配列を示す。

配列番号 : 8

本発明のヒト脾臓由来の新規 G 蛋白質共役型レセプター蛋白質 T G R 4 1 A 2 をコードする c D N A の塩基配列を示す。

配列番号 : 9

本発明のヒト脾臓由来の新規 G 蛋白質共役型レセプター蛋白質 T G R 4 1 V 2 のアミノ酸 50

配列を示す。

配列番号：10

本発明のヒト脾臓由来の新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質TGR41V2をコードするcDNAの塩基配列を示す。

配列番号：11

本発明のヒト脾臓由来の新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質TGR41A2をコードするSNPsを含んだcDNAの塩基配列を示す。

配列番号：12

本発明のヒト脾臓由来の新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質TGR41V2をコードするSNPsを含んだcDNAの塩基配列を示す。

10

配列番号：13

以下の実施例1におけるPCR反応で使用したプライマー1の塩基配列を示す。

配列番号：14

以下の実施例1におけるPCR反応で使用したプライマー2の塩基配列を示す。

配列番号：15

以下の実施例2におけるPCR反応で使用したプライマー3の塩基配列を示す。

配列番号：16

以下の実施例2におけるPCR反応で使用したプライマー4の塩基配列を示す。

配列番号：17

以下の実施例3におけるTaqMan PCR反応で使用したプライマー5の塩基配列を示す。

20

配列番号：18

以下の実施例3におけるTaqMan PCR反応で使用したプライマー6の塩基配列を示す。

配列番号：19

以下の実施例3におけるTaqMan PCR反応で使用したプローブ7の塩基配列を示す。

配列番号：20

GenBank AB049405に登録されている公知の塩基配列を示す。

配列番号：21

BAB39854に登録されている公知のアミノ酸配列を示す。

30

【0111】

以下の実施例1で得られた形質転換体エシェリヒア コリ (*Escherichia coli*) DH5 / pCR2.1-hTGR41Aは、2002年(平成14年)4月8日から茨城県つくば市東1丁目1番1号(郵便番号305-8566)の独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに寄託番号FERM BP-8006として、2002年(平成14年)3月14日から大阪府大阪市淀川区十三本町2-17-85(郵便番号532-8686)の財団法人・発酵研究所(IFO)に寄託番号IFO 16774として寄託されている。

以下の実施例1で得られた形質転換体エシェリヒア コリ (*Escherichia coli*) DH5 / pCR2.1-hTGR41Vは、2002年(平成14年)4月8日から茨城県つくば市東1丁目1番1号(郵便番号305-8566)の独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに寄託番号FERM BP-8007として、2002年(平成14年)3月14日から大阪府大阪市淀川区十三本町2-17-85(郵便番号532-8686)の財団法人・発酵研究所(IFO)に寄託番号IFO 16775として寄託されている。

40

以下の実施例2で得られた形質転換体エシェリヒア コリ (*Escherichia coli*) DH5 / pCR2.1-hTGR41A2は、2002年(平成14年)4月8日から茨城県つくば市東1丁目1番1号(郵便番号305-8566)の独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに寄託番号FERM BP-8008として

50

、2002年(平成14年)3月14日から大阪府大阪市淀川区十三本町2-17-85(郵便番号532-8686)の財団法人・発酵研究所(IFO)に寄託番号IFO 16776として寄託されている。

以下の実施例2で得られた形質転換体*Escherichia coli* DH5 / pCR2.1-hTGR41V2は、2002年(平成14年)4月8日から茨城県つくば市東1丁目1番1号(郵便番号305-8566)の独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに寄託番号FERM BP-8009として、2002年(平成14年)3月14日から大阪府大阪市淀川区十三本町2-17-85(郵便番号532-8686)の財団法人・発酵研究所(IFO)に寄託番号IFO 16777として寄託されている。

10

【0112】

【実施例】

以下に実施例を示して、本発明をより詳細に説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。なお、大腸菌を用いての遺伝子は、モレキュラー・クローニング(Molecular cloning)に記載されている方法に従った。

【0113】

実施例1

配列番号: 13で表されるオリゴDNAをセンス鎖プライマー1として、配列番号: 14で表されるオリゴDNAをアンチセンス鎖プライマー2として、各々0.2 μM、Pyrobest DNA Polymerase (TaKaRa社製) 0.25 μl、10x Buffer 5 μl、GC-Melt 10 μl、dNTP (TaKaRa社製) 0.2 mM、鋳型DNAとしてMarathon-Ready Human cDNA library (CLONTECH社製)の脾臓cDNA溶液3 μl、滅菌水24 μlからなる混合液50 μlを調製し、サーマルサイクラー(GeneAmp PCR system model 9700 (Applied Biosystems社製))を用いて、最初に94 で10秒間置いた後、94 で10秒、68 で3分30秒を1サイクルとして3サイクル、続いて94 で10秒、66.5 で30秒、68 で3分を1サイクルとして3サイクル、続いて94 で10秒、65 で30秒、68 で3分を1サイクルとして35サイクル、最後に68 で7分伸長反応させるタッチダウンPCRのプログラムでPCR反応を行った。次に反応液にTaKaRa Ex Taq (TaKaRa社製) 1 μlを添加し、サーマルサイクラー(GeneAmp PCR system model 9700 (Applied Biosystems社製))を用いて72 で10分間反応させた後、反応終了液の一部をエチジウムブロマイドを含む1.5%アガロースゲルを用いて電気泳動後、UV照射のもと分子量マーカー換算で3 kb付近の位置にPCR反応で増幅されたDNAに対応するバンドを確認した。次に塩基配列を決定する為にpCR2.1-TOPO (Invitrogen社製)を用いてTAクローニングし、該プラスミドを大腸菌DH5 株のコンピテントセルに導入した。アンピシリン含有LB寒天培地上で出現するアンピシリン耐性形質転換株のコロニーの中から外来DNA断片が挿入されていたプラスミドを保持していたクローンをColony PCRにより選択し、挿入DNAの塩基配列を決定するためにABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (Applied Biosystems社製)を用いたシーケンス反応を添付資料の条件にしたがって、サーマルサイクラー(GeneAmp PCR system model 9700 (Applied Biosystems社製))で行った後、該反応試料をDNAシーケンサーABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems社製)で分析した。その結果、PCR産物から公知のタンパク質には存在しない、配列番号: 2で表される2901塩基の塩基配列からなり、配列番号: 1で表される新規の967個のアミノ酸からなる構造遺伝子配列を決定できた。また、配列番号: 4で表される塩基配列も得られたが、これは配列番号: 2の第1775番目の塩基CがTに置換したものであり、

20

30

40

50

配列番号：3で表される通り、アミノ酸配列は592番目のAla(GCC)がVal(GTC)に置換したものであった。その他にはSNPsと予想されるが、配列番号：5および配列番号：6で表される通り、1245番目の塩基TがC(Pro Pro)に、2106番目の塩基AがG(Ala Ala)に、2382番目の塩基CがT(Phe Phe)に置換したクローンが得られたが何れもサイレント変異である。アミノ酸配列(配列番号：1)を含有する新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質をTGR41Aと、アミノ酸配列(配列番号：3)を含有する新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質をTGR41Vとそれぞれ命名した。

配列番号：2で表わされる塩基配列を含有するcDNAを含むプラスミドpCR2.1-hTGR41Aで大腸菌(菌株DH5)を形質転換し、大腸菌(*Escherichia coli*) DH5 / pCR2.1-hTGR41Aを得た。同様に、配列番号：4で表わされる塩基配列を含有するcDNAを含むプラスミドpCR2.1-hTGR41Vで大腸菌(菌株DH5)を形質転換し、大腸菌(*Escherichia coli*) DH5 / pCR2.1-hTGR41Vを得た。

TGR41Aの疎水性プロット図を図1に示す。

#### 【0114】

#### 実施例2

配列番号：15で表されるオリゴDNAをセンス鎖プライマー3として、配列番号：16で表されるオリゴDNAをアンチセンス鎖プライマー4として、各々0.2 μM、Pyrobest DNA Polymerase (Takara社製) 0.25 μl、10x Buffer 5 μl、GC-Melt 10 μl、dNTP (Takara社製) 0.2 mM、鋳型DNAとしてMarathon-Ready Human cDNA library (CLONTECH社製)の脾臓cDNA溶液3 μl、滅菌水24 μlからなる混合液50 μlを調製し、サーマルサイクラー(GeneAmp PCR system model 9700 (Applied Biosystems社製))を用いて、最初に94で10秒間置いた後、94で10秒、68で3分30秒を1サイクルとして3サイクル、続いて94で10秒、66.5で30秒、68で3分を1サイクルとして3サイクル、続いて94で10秒、65で30秒、68で3分を1サイクルとして35サイクル、最後に68で7分伸長反応させるタッチダウンPCRのプログラムでPCR反応を行った。次に反応液にTakara Ex Taq (Takara社製) 1 μlを添加し、サーマルサイクラー(GeneAmp PCR system model 9700 (Applied Biosystems社製))を用いて72で10分間反応させた後、反応終了液の一部をエチジウムブロマイドを含む1.5%アガロースゲルを用いて電気泳動後、UV照射のもと分子量マーカー換算で3 kb付近の位置にPCR反応で増幅されたDNAに対応するバンドを確認した。次に塩基配列を決定する為にpCR2.1-TOPO (Invitrogen社製)を用いてTAクローニングし、該プラスミドを大腸菌DH5株のコンピテントセルに導入した。アンピシリン含有LB寒天培地上で出現するアンピシリン耐性形質転換株のコロニーの中から外来DNA断片が挿入されていたプラスミドを保持していたクローンをColony PCRにより選択し、挿入DNAの塩基配列を決定するためにABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (Applied Biosystems社製)を用いたシーケンス反応を添付資料の条件にしたがって、サーマルサイクラー(GeneAmp PCR system model 9700 (Applied Biosystems社製))で行った後、該反応試料をDNAシーケンサーABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems社製)で分析した。その結果、PCR産物から公知のタンパク質には存在しない、配列番号：8で表される3042塩基の塩基配列からなり、配列番号：7で表される新規の1014個のアミノ酸からなる構造遺伝子配列を決定できた。また、配列番号：10で表される塩基配列も得られたが、これは配列番号：8の第1916番目の塩基CがTに置換したものであ

10

20

30

40

50

り、配列番号：9で表される通り、アミノ酸配列は639番目のAla(GCC)がVal(GTC)に置換したものであった。その他にはSNPsと予想されるが、配列番号：11および配列番号：12で表される通り、1386番目の塩基TがC(ProPro)に、2247番目の塩基AがG(AlaAla)に、2523番目の塩基CがT(PhePhe)に置換したクローンが得られたが何れもサイレント変異である。アミノ酸配列(配列番号：7)を含有する新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質をTGR41A2と、アミノ酸配列(配列番号：9)を含有する新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質をTGR41V2とそれぞれ命名した。

配列番号：8で表わされる塩基配列を含有するcDNAを含むプラスミドpCR2.1-hTGR41A2で大腸菌(菌株DH5)を形質転換し、大腸菌(Escherichia coli)DH5 / pCR2.1-hTGR41A2を得た。同様に、配列番号：10で表わされる塩基配列を含有するcDNAを含むプラスミドpCR2.1-hTGR41V2で大腸菌(菌株DH5)を形質転換し、大腸菌(Escherichia coli)DH5 / pCR2.1-hTGR41V2を得た。

TGR41A2の疎水性プロット図を図2に示す。

【0115】

### 実施例3

TGR41(TGR41A、TGR41V、TGR41A2、TGR41V2)のヒト組織における発現分布解析はTaqMan PCR法を用いることにより調べた。鑄型としては、各臓器のHuman Poly A+ RNA(クロンテック社)をSMART PCR cDNA Synthesis Kit(クロンテック社)で調製したcDNAライブラリーを用いた。TGR41の発現分布を解析するためには、PCR用プライマーとしてフォワードプライマーTGR41NtTqF(配列番号：17)及びリバースプライマーTGR41NtTqR(gtccagggtcc cccggaac;配列番号：18)を、またプローブはTGR41NtTqP(FAM-ccgactgctc tga gctcggg ct-TAMRA;配列番号：19)を使用してTaqMan PCRを行った。該反応における反応液組成は、TaqMan Universal PCR Master Mix(アプライドバイオシステムズジャパン)を10μl、5μMのプライマー1とプライマー2およびプローブの混合液を3μl、鑄型を4μl、蒸留水を3μlの合計20μlであり、PCR反応は、50・2分、95・10分保持した後、95・30秒、60・1分のサイクルを40回繰り返した。得られた結果より標準化に用いた -アクチン $1 \times 10^7$ 当たりのコピー数として算出した値を図3に示す。これより得られた結果を臓器別にみるとTGR41は脾臓、心臓、肺、肝臓、膵臓の順に発現量が高かった。

【0116】

### 【発明の効果】

本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩、該レセプター蛋白質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチド(例えば、DNA、RNAおよびそれらの誘導体)は、1 リガンドの決定、2 抗体および抗血清の入手、3 組換え型レセプター蛋白質の発現系の構築、4 同発現系を用いたレセプター結合アッセイ系の開発と医薬品候補化合物(アゴニスト、アンタゴニストなど)のスクリーニング、5 構造的に類似したリガンド・レセプターとの比較にもとづいたドラッグデザインの実施、6 遺伝子診断におけるプローブやPCRプライマーの作成のための試薬、7 トランスジェニック動物の作製または8 遺伝子予防・治療剤等の医薬等として用いることができる。

【0117】

### 【配列表】

## SEQUENCE LISTING

<110> Takeda Chemical Industries, Ltd.

<120> Novel G Protein-Coupled Receptor Protein and its DNA

<130> B02361

<150> JP2001-340189

<151> 2001-11-06

<150> JP2002-159448

<151> 2002-05-31

<160> 21

<210> 1

<211> 967

<212> PRT

<213> Human

<400> 1

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

5

10

15

Cys Ala Ser Arg Arg Ala Gly Gly Ala Pro Gln Pro Gly Pro Gly Pro

20

25

30

Thr Ala Cys Pro Ala Pro Cys His Cys Gln Glu Asp Gly Ile Met Leu

35

40

45

Ser Ala Asp Cys Ser Glu Leu Gly Leu Ser Ala Val Pro Gly Asp Leu

50

55

60

Asp Pro Leu Thr Ala Tyr Leu Asp Leu Ser Met Asn Asn Leu Thr Glu

65

70

75

80

Leu Gln Pro Gly Leu Phe His His Leu Arg Phe Leu Glu Glu Leu Arg

85

90

95

Leu Ser Gly Asn His Leu Ser His Ile Pro Gly Gln Ala Phe Ser Gly

100

105

110

Leu Tyr Ser Leu Lys Ile Leu Met Leu Gln Asn Asn Gln Leu Gly Gly

10

20

30

40

115	120	125	
Ile Pro Ala Glu Ala Leu Trp Glu Leu Pro Ser Leu Gln Ser Leu Arg			
130	135	140	
Leu Asp Ala Asn Leu Ile Ser Leu Val Pro Glu Arg Ser Phe Glu Gly			
145	150	155	160
Leu Ser Ser Leu Arg His Leu Trp Leu Asp Asp Asn Ala Leu Thr Glu			
	165	170	175
Ile Pro Val Arg Ala Leu Asn Asn Leu Pro Ala Leu Gln Ala Met Thr			10
	180	185	190
Leu Ala Leu Asn Arg Ile Ser His Ile Pro Asp Tyr Ala Phe Gln Asn			
	195	200	205
Leu Thr Ser Leu Val Val Leu His Leu His Asn Asn Arg Ile Gln His			
	210	215	220
Leu Gly Thr His Ser Phe Glu Gly Leu His Asn Leu Glu Thr Leu Asp			20
225	230	235	240
Leu Asn Tyr Asn Lys Leu Gln Glu Phe Pro Val Ala Ile Arg Thr Leu			
	245	250	255
Gly Arg Leu Gln Glu Leu Gly Phe His Asn Asn Asn Ile Lys Ala Ile			
	260	265	270
Pro Glu Lys Ala Phe Met Gly Asn Pro Leu Leu Gln Thr Ile His Phe			
	275	280	285
Tyr Asp Asn Pro Ile Gln Phe Val Gly Arg Ser Ala Phe Gln Tyr Leu			
	290	295	300
Pro Lys Leu His Thr Leu Ser Leu Asn Gly Ala Met Asp Ile Gln Glu			
305	310	315	320
Phe Pro Asp Leu Lys Gly Thr Thr Ser Leu Glu Ile Leu Thr Leu Thr			
	325	330	335
Arg Ala Gly Ile Arg Leu Leu Pro Ser Gly Met Cys Gln Gln Leu Pro			40
	340	345	350



Arg Leu Arg Val Leu Glu Leu Ser His Asn Gln Ile Glu Glu Leu Pro	
355	360 365
Ser Leu His Arg Cys Gln Lys Leu Glu Glu Ile Gly Leu Gln His Asn	
370	375 380
Arg Ile Trp Glu Ile Gly Ala Asp Thr Phe Ser Gln Leu Ser Ser Leu	
385	390 395 400
Gln Ala Leu Asp Leu Ser Trp Asn Ala Ile Arg Ser Ile His Pro Glu	10
405	410 415
Ala Phe Ser Thr Leu His Ser Leu Val Lys Leu Asp Leu Thr Asp Asn	
420	425 430
Gln Leu Thr Thr Leu Pro Leu Ala Gly Leu Gly Gly Leu Met His Leu	
435	440 445
Lys Leu Lys Gly Asn Leu Ala Leu Ser Gln Ala Phe Ser Lys Asp Ser	
450	455 460
Phe Pro Lys Leu Arg Ile Leu Glu Val Pro Tyr Ala Tyr Gln Cys Cys	
465	470 475 480
Pro Tyr Gly Met Cys Ala Ser Phe Phe Lys Ala Ser Gly Gln Trp Glu	
485	490 495
Ala Glu Asp Leu His Leu Asp Asp Glu Glu Ser Ser Lys Arg Pro Leu	
500	505 510
Gly Leu Leu Ala Arg Gln Ala Glu Asn His Tyr Asp Gln Asp Leu Asp	30
515	520 525
Glu Leu Gln Leu Glu Met Glu Asp Ser Lys Pro His Pro Ser Val Gln	
530	535 540
Cys Ser Pro Thr Pro Gly Pro Phe Lys Pro Cys Glu Tyr Leu Phe Glu	
545	550 555 560
Ser Trp Gly Ile Arg Leu Ala Val Trp Ala Ile Val Leu Leu Ser Val	
565	570 575
Leu Cys Asn Gly Leu Val Leu Leu Thr Val Phe Ala Gly Gly Pro Ala	40

	580		585		590												
Pro	Leu	Pro	Pro	Val	Lys	Phe	Val	Val	Gly	Ala	Ile	Ala	Gly	Ala	Asn		
	595						600					605					
Thr	Leu	Thr	Gly	Ile	Ser	Cys	Gly	Leu	Leu	Ala	Ser	Val	Asp	Ala	Leu		
	610					615					620						
Thr	Phe	Gly	Gln	Phe	Ser	Glu	Tyr	Gly	Ala	Arg	Trp	Glu	Thr	Gly	Leu		
625					630				635					640			10
Gly	Cys	Arg	Ala	Thr	Gly	Phe	Leu	Ala	Val	Leu	Gly	Ser	Glu	Ala	Ser		
				645				650						655			
Val	Leu	Leu	Leu	Thr	Leu	Ala	Ala	Val	Gln	Cys	Ser	Val	Ser	Val	Ser		
			660					665						670			
Cys	Val	Arg	Ala	Tyr	Gly	Lys	Ser	Pro	Ser	Leu	Gly	Ser	Val	Arg	Ala		
	675						680						685				
Gly	Val	Leu	Gly	Cys	Leu	Ala	Leu	Ala	Gly	Leu	Ala	Ala	Ala	Leu	Pro		20
	690				695				700								
Leu	Ala	Ser	Val	Gly	Glu	Tyr	Gly	Ala	Ser	Pro	Leu	Cys	Leu	Pro	Tyr		
705					710				715					720			
Ala	Pro	Pro	Glu	Gly	Gln	Pro	Ala	Ala	Leu	Gly	Phe	Thr	Val	Ala	Leu		
			725					730						735			
Val	Met	Met	Asn	Ser	Phe	Cys	Phe	Leu	Val	Val	Ala	Gly	Ala	Tyr	Ile		
			740					745						750			30
Lys	Leu	Tyr	Cys	Asp	Leu	Pro	Arg	Gly	Asp	Phe	Glu	Ala	Val	Trp	Asp		
	755						760							765			
Cys	Ala	Met	Val	Arg	His	Val	Ala	Trp	Leu	Ile	Phe	Ala	Asp	Gly	Leu		
	770					775								780			
Leu	Tyr	Cys	Pro	Val	Ala	Phe	Leu	Ser	Phe	Ala	Ser	Met	Leu	Gly	Leu		
785					790					795				800			
Phe	Pro	Val	Thr	Pro	Glu	Ala	Val	Lys	Ser	Val	Leu	Leu	Val	Val	Leu		40
				805						810					815		

Pro Leu Pro Ala Cys Leu Asn Pro Leu Leu Tyr Leu Leu Phe Asn Pro  
820 825 830  
His Phe Arg Asp Asp Leu Arg Arg Leu Arg Pro Arg Ala Gly Asp Ser  
835 840 845  
Gly Pro Leu Ala Tyr Ala Ala Ala Gly Glu Leu Glu Lys Ser Ser Cys  
850 855 860  
Asp Ser Thr Gln Ala Leu Val Ala Phe Ser Asp Val Asp Leu Ile Leu  
865 870 875 880  
Glu Ala Ser Glu Ala Gly Arg Pro Pro Gly Leu Glu Thr Tyr Gly Phe  
885 890 895  
Pro Ser Val Thr Leu Ile Ser Cys Gln Gln Pro Gly Ala Pro Arg Leu  
900 905 910  
Glu Gly Ser His Cys Val Glu Pro Glu Gly Asn His Phe Gly Asn Pro  
915 920 925  
Gln Pro Ser Met Asp Gly Glu Leu Leu Leu Arg Ala Glu Gly Ser Thr  
930 935 940  
Pro Ala Gly Gly Gly Leu Ser Gly Gly Gly Gly Phe Gln Pro Ser Gly  
945 950 955 960  
Leu Ala Phe Ala Ser His Val  
965

10

20

30

40

<210> 2

<211> 2901

<212> DNA

<213> Human

<400> 2

atgcccagcc cgccgggct ccggcgcta tggctttgcg ccgcgctgtg cgcttcccgg 60  
aggccggcg gcgccccca gcccgcccg gggcccaccg cctgcccggc cccctgccac 120  
tgccaggagg acggcatcat gctgtctgcc gactgtcttg agctcgggct gtccgccgtt 180  
ccggggacc tggacccct gacggcttac ctggacctca gcatgaacaa cctcacagag 240

cttcagccctg	gccctctcca	ccacctgcgc	ttcttggagg	agctgcgtct	ctctgggaac	300	
catctctcac	acatcccagg	acaagcattc	tctggctctt	acagcctgaa	aatcctgatg	360	
ctgcagaaca	atcagctggg	aggaatcccc	gcagaggcgc	tgtgggagct	gccgagccctg	420	
cagtcgcctc	gectagatgc	caacctcatt	tccctggctc	cggagaggag	ctttgagggg	480	
ctgtccctcc	tcgcccacct	ctggctggac	gacaatgcac	tcacggagat	ccctgtcagg	540	
gccctcaaca	acctccctgc	cttgcaggcc	atgaccttgg	ccctcaaccg	catcagccac	600	
atccccgact	acgcgttcca	gaatctcacc	agccttgtgg	tgctgcattt	gcataacaac	660	10
cgcctccagc	atctggggac	ccacagcttc	gaggggctgc	acaatctgga	gacactagac	720	
ctgaattata	acaagctgca	ggagttccct	gtggccatcc	ggaccttggg	cagactgcag	780	
gaactggggg	tccataacaa	caacatcaag	gccatcccag	aaaaggcctt	catggggaac	840	
ccctgtctac	agacgataca	cttttatgat	aaccaatcc	agtttgtggg	aagatcggca	900	
ttccagtacc	tgctaaact	ccacacacta	tctctgaatg	gtgccatgga	catccaggag	960	
ttccagatc	tcaaaggcac	caccagcctg	gagatcctga	ccctgaccgg	cgcaggcattc	1020	
cggctgtctc	catcggggat	gtgccaacag	ctgcccagge	tccgagtcct	ggaactgtct	1080	20
cacaatcaaa	ttagaggagct	gccagcctg	cacagggtgc	agaaattgga	ggaaatcggc	1140	
ctccaacaca	accgcatctg	ggaaattgga	gctgacacct	tcagccagct	gagctccctg	1200	
caagcccctg	atcttagctg	gaacgccatc	cggctccatc	accctgaggg	cttctccacc	1260	
ctgcactccc	tggctcaagct	ggacctgaca	gacaaccagc	tgaccacact	gcccctggct	1320	
ggacttgggg	gctttagtca	tctgaagctc	aaaggggaacc	tgtctctctc	ccaggccttc	1380	
tccaaggaca	gtttcccaaa	actgaggatc	ctggagggtgc	cttatgccta	ccagtgtctgt	1440	
ccctatggga	tgtgtgccag	cttcttcaag	gcctctgggc	agtgggaggc	tgaagacctt	1500	30
caccttgatg	atgaggagtc	ttcaaaaagg	ccccggggcc	tccttgccag	acaagcagag	1560	
aaccactatg	accaggacct	ggatgagctc	cagctggaga	tggaggactc	aaagccacac	1620	
cccagtgtcc	agtgtagccc	tactccagge	cccttcaagc	ccctgtgagta	ccctctttgaa	1680	
agctggggca	tcgcccctggc	cgtgtggggc	atcgtgttgc	tctccgtgct	ctgcaatgga	1740	
ctggctgtct	tgaccgtgtt	cgttggcggg	ccctgcccc	tgcccccggt	caagtttgtg	1800	
gtaggctcga	tgcaggcgc	caacaccttg	actggcattt	ccctgtggcct	tctagcctca	1860	
gtcgatgccc	tgacctttgg	tcagttctct	gagtacggag	cccgtctggga	gacggggcta	1920	40
ggctgcccgg	ccactggctt	ccctggcagta	cttgggtcgg	aggcatcggg	gctgtctgctc	1980	

actctggccg cagtcagtg cagcgtctcc gtctccigtg tccgggccta tgggaagtcc 2040  
 cccctcccgg gcagcgttcg agcaggggtc ctaggcctgcc tggcactggc agggctggcc 2100  
 gccgcacigc ccciggcctc agtgggagaa tacggggcct ccccactctg cctgccctac 2160  
 gcgccacctg agggteagcc agcagcccig ggcttcaccg tggccctggg gatgatgaac 2220  
 tcctctgtt tccigtctgt ggcccgtgcc tacatcaaac tgiactgtga cctgccgcgg 2280  
 ggcgactttg aggccgtgtg ggactgcgcc atgggtaggg acgtggcctg gctcatcttc 2340  
 gcagacgggc tctctactg tcccgtggcc ttctcagct tcgctccat gctgggcctc 2400 10  
 ttcccgtgca cggccgagggc cgtcaagtct gtctctctgg tgggtctgcc cctgccctgcc 2460  
 igcctcaacc cacigtctga cctgctcttc aacccccact tccgggatga ccttcggcgg 2520  
 cttcggcccc gcgcagggga ctacagggccc ctagccctatg ctgcggccgg ggagctggag 2580  
 aagagctcct gtgattctac ccaggcccctg gttagcctct ctgatgtgga tctcattctg 2640  
 gaagctctct aagctgggcg gccccctggg ctggagacct atggcttccc ctcagtgacc 2700  
 ctcatctcct gtcagcagcc aggggcccc aggctggagg gcagccattg tgtagagcca 2760  
 gagggaacc actttgggaa cccccaaacc tccatggatg gagaactgct gctgagggca 2820 20  
 gagggatcta cgccagcagg tggaggcttg tcaggggggtg gcggctttca gccctctggc 2880  
 ttggcctttg cttcacacgt g 2901

<210> 3

<211> 967

<212> PRT

<213> Human

<400> 3 30

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

5

10

15

Cys Ala Ser Arg Arg Ala Gly Gly Ala Pro Gln Pro Gly Pro Gly Pro

20

25

30

Thr Ala Cys Pro Ala Pro Cys His Cys Gln Glu Asp Gly Ile Met Leu

35

40

45

Ser Ala Asp Cys Ser Glu Leu Gly Leu Ser Ala Val Pro Gly Asp Leu 40

50

55

60

Asp Pro Leu Thr Ala Tyr Leu Asp Leu Ser Met Asn Asn Leu Thr Glu	
65	70
Leu Gln Pro Gly Leu Phe His His Leu Arg Phe Leu Glu Glu Leu Arg	
	85
Leu Ser Gly Asn His Leu Ser His Ile Pro Gly Gln Ala Phe Ser Gly	
	100
Leu Tyr Ser Leu Lys Ile Leu Met Leu Gln Asn Asn Gln Leu Gly Gly	
	115
	120
	125
Ile Pro Ala Glu Ala Leu Trp Glu Leu Pro Ser Leu Gln Ser Leu Arg	
130	135
	140
Leu Asp Ala Asn Leu Ile Ser Leu Val Pro Glu Arg Ser Phe Glu Gly	
145	150
	155
	160
Leu Ser Ser Leu Arg His Leu Trp Leu Asp Asp Asn Ala Leu Thr Glu	
	165
	170
	175
Ile Pro Val Arg Ala Leu Asn Asn Leu Pro Ala Leu Gln Ala Met Thr	
	180
	185
	190
Leu Ala Leu Asn Arg Ile Ser His Ile Pro Asp Tyr Ala Phe Gln Asn	
	195
	200
	205
Leu Thr Ser Leu Val Val Leu His Leu His Asn Asn Arg Ile Gln His	
210	215
	220
Leu Gly Thr His Ser Phe Glu Gly Leu His Asn Leu Glu Thr Leu Asp	
225	230
	235
	240
Leu Asn Tyr Asn Lys Leu Gln Glu Phe Pro Val Ala Ile Arg Thr Leu	
	245
	250
	255
Gly Arg Leu Gln Glu Leu Gly Phe His Asn Asn Asn Ile Lys Ala Ile	
	260
	265
	270
Pro Glu Lys Ala Phe Met Gly Asn Pro Leu Leu Gln Thr Ile His Phe	
	275
	280
	285
Tyr Asp Asn Pro Ile Gln Phe Val Gly Arg Ser Ala Phe Gln Tyr Leu	

290	295	300	
Pro Lys Leu His Thr Leu Ser Leu Asn Gly Ala Met Asp Ile Gln Glu			
305	310	315	320
Phe Pro Asp Leu Lys Gly Thr Thr Ser Leu Glu Ile Leu Thr Leu Thr			
	325	330	335
Arg Ala Gly Ile Arg Leu Leu Pro Ser Gly Met Cys Gln Gln Leu Pro			
	340	345	350
Arg Leu Arg Val Leu Glu Leu Ser His Asn Gln Ile Glu Glu Leu Pro			10
	355	360	365
Ser Leu His Arg Cys Gln Lys Leu Glu Glu Ile Gly Leu Gln His Asn			
	370	375	380
Arg Ile Trp Glu Ile Gly Ala Asp Thr Phe Ser Gln Leu Ser Ser Leu			
385	390	395	400
Gln Ala Leu Asp Leu Ser Trp Asn Ala Ile Arg Ser Ile His Pro Glu			20
	405	410	415
Ala Phe Ser Thr Leu His Ser Leu Val Lys Leu Asp Leu Thr Asp Asn			
	420	425	430
Gln Leu Thr Thr Leu Pro Leu Ala Gly Leu Gly Gly Leu Met His Leu			
	435	440	445
Lys Leu Lys Gly Asn Leu Ala Leu Ser Gln Ala Phe Ser Lys Asp Ser			
	450	455	460
Phe Pro Lys Leu Arg Ile Leu Glu Val Pro Tyr Ala Tyr Gln Cys Cys			30
465	470	475	480
Pro Tyr Gly Met Cys Ala Ser Phe Phe Lys Ala Ser Gly Gln Trp Glu			
	485	490	495
Ala Glu Asp Leu His Leu Asp Asp Glu Glu Ser Ser Lys Arg Pro Leu			
	500	505	510
Gly Leu Leu Ala Arg Gln Ala Glu Asn His Tyr Asp Gln Asp Leu Asp			40
	515	520	525

Glu	Leu	Gln	Leu	Glu	Met	Glu	Asp	Ser	Lys	Pro	His	Pro	Ser	Val	Gln	
530						535					540					
Cys	Ser	Pro	Thr	Pro	Gly	Pro	Phe	Lys	Pro	Cys	Glu	Tyr	Leu	Phe	Glu	
545					550					555					560	
Ser	Trp	Gly	Ile	Arg	Leu	Ala	Val	Trp	Ala	Ile	Val	Leu	Leu	Ser	Val	
				565						570					575	
Leu	Cys	Asn	Gly	Leu	Val	Leu	Leu	Thr	Val	Phe	Ala	Gly	Gly	Pro	Val	10
			580							585					590	
Pro	Leu	Pro	Pro	Val	Lys	Phe	Val	Val	Gly	Ala	Ile	Ala	Gly	Ala	Asn	
						600									605	
Thr	Leu	Thr	Gly	Ile	Ser	Cys	Gly	Leu	Leu	Ala	Ser	Val	Asp	Ala	Leu	
						615									620	
Thr	Phe	Gly	Gln	Phe	Ser	Glu	Tyr	Gly	Ala	Arg	Trp	Glu	Thr	Gly	Leu	
625					630										640	20
Gly	Cys	Arg	Ala	Thr	Gly	Phe	Leu	Ala	Val	Leu	Gly	Ser	Glu	Ala	Ser	
					645										655	
Val	Leu	Leu	Leu	Thr	Leu	Ala	Ala	Val	Gln	Cys	Ser	Val	Ser	Val	Ser	
					660										670	
Cys	Val	Arg	Ala	Tyr	Gly	Lys	Ser	Pro	Ser	Leu	Gly	Ser	Val	Arg	Ala	
										680					685	
Gly	Val	Leu	Gly	Cys	Leu	Ala	Leu	Ala	Gly	Leu	Ala	Ala	Ala	Leu	Pro	30
										695					700	
Leu	Ala	Ser	Val	Gly	Glu	Tyr	Gly	Ala	Ser	Pro	Leu	Cys	Leu	Pro	Tyr	
705						710									720	
Ala	Pro	Pro	Glu	Gly	Gln	Pro	Ala	Ala	Leu	Gly	Phe	Thr	Val	Ala	Leu	
						725									735	
Val	Met	Met	Asn	Ser	Phe	Cys	Phe	Leu	Val	Val	Ala	Gly	Ala	Tyr	Ile	
															740	40
															750	
Lys	Leu	Tyr	Cys	Asp	Leu	Pro	Arg	Gly	Asp	Phe	Glu	Ala	Val	Trp	Asp	



755	760	765	
Cys Ala Met Val Arg His Val Ala Trp Leu Ile Phe Ala Asp Gly Leu			
770	775	780	
Leu Tyr Cys Pro Val Ala Phe Leu Ser Phe Ala Ser Met Leu Gly Leu			
785	790	795	800
Phe Pro Val Thr Pro Glu Ala Val Lys Ser Val Leu Leu Val Val Leu			
	805	810	815
Pro Leu Pro Ala Cys Leu Asn Pro Leu Leu Tyr Leu Leu Phe Asn Pro			10
	820	825	830
His Phe Arg Asp Asp Leu Arg Arg Leu Arg Pro Arg Ala Gly Asp Ser			
	835	840	845
Gly Pro Leu Ala Tyr Ala Ala Ala Gly Glu Leu Glu Lys Ser Ser Cys			
	850	855	860
Asp Ser Thr Gln Ala Leu Val Ala Phe Ser Asp Val Asp Leu Ile Leu			20
865	870	875	880
Glu Ala Ser Glu Ala Gly Arg Pro Pro Gly Leu Glu Thr Tyr Gly Phe			
	885	890	895
Pro Ser Val Thr Leu Ile Ser Cys Gln Gln Pro Gly Ala Pro Arg Leu			
	900	905	910
Glu Gly Ser His Cys Val Glu Pro Glu Gly Asn His Phe Gly Asn Pro			30
	915	920	925
Gln Pro Ser Met Asp Gly Glu Leu Leu Leu Arg Ala Glu Gly Ser Thr			
	930	935	940
Pro Ala Gly Gly Gly Leu Ser Gly Gly Gly Gly Phe Gln Pro Ser Gly			
945	950	955	960
Leu Ala Phe Ala Ser His Val			
	965		
<210> 4			40
<211> 2901			

<212> DNA

<213> Human

<400> 4

atgcccagcc cggcgggct ccgggcgcta tggctttgcg ccgcgctgtg cgttccccgg	60	
agggccggcg gcgccccca gcccggcccc gggcccaccg ctgcccggc cccctgccac	120	
tgccaggagg acggcatcat gctgtctgcc gactgtcttg agctcgggct gtccgccgtt	180	
ccgggggacc tggacccct gacggcttac ctggacctca gcatgaacaa cctcacagag	240	10
cttcagcctg gctcttcca ccacctgcgc ttcttggagg agctgcgtct ctctgggaac	300	
catctctac acatcccagg acaagcattc tctggctctt acagcctgaa aatcctgatg	360	
ctgcagaaca atcagctggg aggaatcccc gcagaggcgc tgtgggagct gccgagcctg	420	
cagtcgcigc gcctagatgc caacctcatt tccctggctc cggagaggag cttttagggg	480	
ctgtcctccc tccgccacct ctggctggac gacaatgcac tcacggagat cccctgtcagg	540	
gcccacaaca acctccctgc cctgcaggcc atgacctgg cctcaaccg catcagccac	600	
atccccgact acgcgttcca gaatctcacc agccttgtgg tgcctgattt gcataacaac	660	20
cgcatccagc atctggggac ccacagcttc gaggggctgc acaatctgga gacactagac	720	
ctgaattata acaagctgca ggagtccct gtggccatcc ggacctggg cagactgcag	780	
gaactggggt tccataaca caacatcaag gccatcccag aaaaggcctt catggggaac	840	
ccctctctac agacgataca cttttatgat aacccaatcc agtttgtggg aagatcggca	900	
ttccagtacc tgcctaaact ccacacacta tctctgaatg gtgccatgga catccaggag	960	
ttccagatc tcaaaggcac caccagcctg gagatcctga ccttgacctg cgcaggcctc	1020	
cggctgtccc catcggggat gtgccaacag ctgcccaggc tccgagtcct ggaactgtct	1080	30
cacaatcaaa ttgaggagct gccagcctg cacagggtgc agaaattgga ggaaatcggc	1140	
ctccaacaca accgcatctg ggaaattgga gctgacacct tcagccagct gagctccctg	1200	
caagcccctg atcttagctg gaacgccatc cggtcctatc accccgaggc cttctccacc	1260	
ctgcactccc tggtaagct ggacctgaca gacaaccagc tgaccacact gcccctggct	1320	
ggacttgggg gcttgaatgca tctgaagctc aaaggggaacc ttgctctctc ccaggccttc	1380	
tccaaggaca gtttccaaa actgaggatc ctggagggtc cttatgccta ccagtgtgt	1440	
ccctatggga tgtgtgccag cttcttcaag gcctctgggc agtgggaggc tgaagacctt	1500	40
cacctgatg atgaggagtc ttcaaaaagg cccctgggcc tccctgccag acaagcagag	1560	

aaccactatg accaggacct ggatgagctc cagctggaga tggaggactc aaagccacac	1620	
cccagtgtec agtgtagccc tactccagge ccttcaage cctgtgagta cctctttgaa	1680	
agctggggca tccgccctggc cgtgtggggc atcgtgttgc tctccgtgct ctgcaatgga	1740	
ctgggtctgc tgaccgtgtt cgttggcggg cctgtccccc tgcccccggt caagtttgtg	1800	
gtaggtgcga ttgcaggcgc caacaccttg actggcattt cctgtggcct tctagcctca	1860	
gtcgaatccc tgaccittgg tcagttctct gactacggag cccgctggga gacggggcta	1920	
ggctgccggg ccactggcct cctggcagta ctgggtcgg aggcacgggt gctgctgctc	1980	10
actctggccc cagtgcaatg cagcgtctcc gtctccctgtg tccgggccta tgggaagtec	2040	
cccctccctgg gcagcgttcg agcaggggtc ctaggctgcc tggcactggc agggctggcc	2100	
gccgcctctc ccttggcctc agtgggagaa tacggggcct ccccactctg cctgcccctac	2160	
gcgccaccig agggctagcc agcagccctg ggcttcaccg tggccctggt gatgatgaac	2220	
tcttctgttt tcttggctgt ggcccgtgcc tacatcaaac tgtactgtga cctgccgcgg	2280	
ggcgactttg aggccgtgtg ggactgcgcc atgggtaggc acgtggcctg gctcatcttc	2340	
gcagacgggc tctctactg tcccgtggcc tctctcagct ttgcctccat gctgggcctc	2400	20
ttcccgtgca cgcccagggc cgtcaagtct gtctctctgg tgggtctgcc cctgcccgcc	2460	
tgcccaacc cactgctgta cctgctcttc aacccccact tccgggatga ccttcggcgg	2520	
cttcggcccc gcgcagggga ctcagggccc ctagcciatg ctgcggccgg ggagctggag	2580	
aagagctcct gtgattctac ccaggcccctg gttagcctct ctgatgtgga tctcattctg	2640	
gaagctctcg aagctgggcg gccccctggg ctggagacct atggcttccc ctcagtgacc	2700	
ctcatctcct gtcagcagcc aggggcccc aggctggagg gcagccattg tgtagagcca	2760	
gaggggaacc actttgggaa cccccaacc tccatggatg gagaactgct gctgagggca	2820	30
gagggatcta cgccagcagg tggaggcttg tcaggggggt gcggctttca gccctctggc	2880	
tggcctttg ctccacacgt g	2901	
<210> 5		
<211> 2901		
<212> DNA		
<213> Human		
<400> 5		40
atgccagcc cgccggggct ccgggcgcta tggctttgcg ccgcgctgtg cgcttcccgg	60	

agggccggcg	gcgccccca	gcccggcccc	gggcccaccg	ctgcccggc	ccccigccac	120	
igccaggagg	acggcateat	gctgtctgcc	gactgtcttg	agctcgggct	gtccgccgtt	180	
ccgggggacc	iggaccccc	gacggcttac	ctggacctca	gcatgaacaa	cttcacagag	240	
cttcagcctg	gcctcttcca	ccacctgcgc	ttcttggagg	agctgcgtct	ctctgggaac	300	
catctctac	acatcccagg	acaagcattc	tctggctctt	acagcctgaa	aatcctgatg	360	
ctgcagaaca	atcagctggg	aggaatcccc	gcagaggcgc	tgtgggagct	gccgagcctg	420	
cagtcgctgc	gcctagatgc	caacctcatt	tcccgtgtcc	cggagaggag	ctttgagggg	480	10
ctgtcctccc	tccgccacct	ctggctggac	gacaatgcac	tcacggagat	ccctgtcagg	540	
gcccicaaca	acctccctgc	ctgcaggcc	atgacctgg	ccctcaaccg	catcagccac	600	
atccccgact	acgcgttcca	gaatctcacc	agccttgtgg	tgtctcattt	gcataacaac	660	
cgcatccagc	atciggggac	ccacagcttc	gaggggctgc	acaatctgga	gacactagac	720	
ctgaattata	acaagctgca	ggagtccct	gtggccatcc	ggaccttggg	cagactgcag	780	
gaaciggggi	tccataacaa	caacatcaag	gccatcccag	aaaaggcctt	catggggaac	840	
ccctctctac	agacgataca	cttttatgat	aacccaatcc	agtttgtggg	aagatcggca	900	20
ttccagtacc	tgccataaact	ccacacacta	tctctgaatg	gtgccatgga	catccaggag	960	
ttccagatc	tcaaaggcac	caccagcctg	gagatcctga	ccctgacctg	cgcaggcate	1020	
cggctgtccc	catcggggat	gtgccaacag	ctgcccaggc	tccgagtcct	ggaactgtct	1080	
cacaatcaaa	ttgaggagct	gcccagcctg	cacagggtgc	agaaattgga	ggaaatcggc	1140	
ctccaacaca	accgcatctg	ggaaattgga	gctgacacct	tcagccagct	gagctccctg	1200	
caagcccctgg	atcttagctg	gaacgccatc	cggctccatc	accccagggc	cttctccacc	1260	
ctgcactccc	tggtcaagct	ggacctgaca	gacaaccagc	tgaccacact	gccccctggct	1320	30
ggacttgggg	gcttgatgca	tctgaagctc	aaaggggaacc	ttgctctctc	ccaggccttc	1380	
tccaaggaca	gtttcccaaa	actgaggatc	ctggagggtgc	cttaigccta	ccagtgtctgt	1440	
ccctatggga	tgtgtgccag	cttcttcaag	gcctctgggc	agtgggaggc	tgaagacctt	1500	
cacctgatg	atgaggagtc	ttcaaaaagg	ccccctgggc	tccttgccag	acaagcagag	1560	
aaccactatg	accaggacct	ggatgagctc	cagctggaga	tggaggactc	aaagccacac	1620	
cccaggtccc	agtgtagccc	tactccaggc	cccttcaagc	ccctgtgagta	ctcttttgaa	1680	
agctggggca	tccgccctggc	cgtgtgggccc	atcgtgttgc	tctccgtgct	ctgcaatgga	1740	40
ctggctgtgc	tgacctgttt	cgtgtggcggg	cttgccccc	tgcccccggt	caagtttgtg	1800	

gtaggtgca ttgcaggcgc caacacctg actggcattt cctgtggcct tctagcctca 1860  
 gtcgatccc tgaccttgg teagttctct gactacggag cccgctggga gacggggcta 1920  
 ggctgccggg ccactggcct cctggcagta ctgggtcgg aggcacggg gctgctgctc 1980  
 actctggccc cagtgcagt cagcgtctcc gtctccctg tccgggcta tgggaagfcc 2040  
 ccccccgg gcagcgttc agcaggggtc ctaggctgcc tggcactggc agggctggcc 2100  
 gccgcctgc ccttggcctc agtgggagaa tacggggcct ccccactctg cctgcccctac 2160  
 gcgccacctg agggctagcc agcagcccct ggcttcaccg tggccctggg gatgatgaac 2220  
 tcctctgtt tcttggctgt ggccggctgc tacatcaaac tgtactgtga cctgccgcgg 2280  
 ggcgacttg aggccgtgt ggactgcgcc atggtagggc acgtggcctg gctcatcttc 2340  
 gcagacgggc tctctactg tcccgtggcc tctctcagct ttgcctccat gctgggcctc 2400  
 tccccgca cgcggaggc cgtcaagtct gtctgctgg tggctgctgcc cctgcccctgc 2460  
 tgcctcaacc cactgctgta cctgctcttc aacccccact tccgggatga ccttcggcgg 2520  
 ctccggccc gcgcagggga ctcagggccc ctagcctatg ctgcggccgg ggagctggag 2580  
 aagagctcct gtgattctac ccagggcctg gttagcctct ctgatgtgga tctcattctg 2640  
 gaagctctg aagctgggcg gccccctggg ctggagacct atggctccc ctcagtgacc 2700  
 ctcatctcct gtcagcagcc aggggcccc aggcctggagg gcagccattg tgtagagcca 2760  
 gagggaacc acttgggaa ccccaacc tccatggatg gagaactgct gctgagggca 2820  
 gaggatcta cgcagcagg tggaggcttg tcagggggtg gcggcttca gccctctggc 2880  
 tggccttg cttcacacgt g 2901

<210> 6

<211> 2901

<212> DNA

<213> Human

<400> 6

atgcccagcc cgcggggct ccgggcgcta tggcttggc ccgcgctgt cgcttcccgg 60  
 agggccggcg gcgccccca gcccgcccc gggcccaccg cctgcccggc cccctgccac 120  
 tggcaggagg acggcatcat gctgtctgcc gactgctctg agctcgggct gtccgccgtt 180  
 ccggggacc tggacccct gacggcttac ctggacctca gcatgaacaa cctcacagag 240  
 cttagcctg gcccttcca ccacctgcgc ttcttggagg agctgcgtct ctctgggaac 300

10

20

30

40

catctctac	acatcccagg	acaagcattc	tctggctctt	acagcctgaa	aatcctgatg	360	
ctgcagaaca	atcagctggg	aggaateccc	gcagaggcgc	tgtgggagct	gccgagcctg	420	
cagtcgctgc	gcctagatgc	caacctcatt	tccctggctc	cggagaggag	ctttgagggg	480	
ctgtcctccc	tcgcccacct	ctggctggac	gacaatgcac	tcacggagat	ccctgtcagg	540	
gcccicaaca	acctccctgc	cctgcaggcc	atgacctggg	ccctcaaccg	catcagccac	600	
atccccgact	acgcgttcca	gaatctcacc	agccttgtgg	tgtctcattt	gcataacaac	660	
cgcatccagc	atctggggac	ccacagcttc	gaggggctgc	acaatctgga	gacactagac	720	10
ctgaattata	acaagctgca	ggagttccct	gtggccatcc	ggaccttggg	cagactgcag	780	
gaactggggg	tccataacaa	caacatcaag	gccatcccag	aaaaggcctt	catggggaac	840	
cctctgctac	agacgataca	cttttatgat	aacccaatcc	agtttgtggg	aagatcggca	900	
ttccagtacc	tgccataaact	ccacacacta	tctctgaatg	gtgccatgga	catccaggag	960	
ttccagatc	tcaaaggcac	caccagcctg	gagatcctga	ccctgacctg	cgcaggcctc	1020	
cggctgctcc	catcggggat	gtgccaacag	ctgcccaggc	tccgagtcct	ggaactgtct	1080	
cacaatcaaa	ttgaggagct	gcccagcctg	cacagggtgc	agaaattgga	ggaaatcggc	1140	20
ctccaacaca	accgcatctg	ggaaattgga	gctgacacct	tcagccagct	gagctccctg	1200	
caagcccctgg	atcttagctg	gaacgccatc	cggctccatcc	accccgaggc	cttctccacc	1260	
ctgcaactcc	tggtcaagct	ggacctgaca	gacaaccagc	tgaccacact	gccccctggct	1320	
ggacttgggg	gcttgaatgca	tctgaagctc	aaaggggaacc	ttgctctctc	ccaggccttc	1380	
tccaaggaca	gtttcccaaa	actgaggatc	ctggagggtgc	cttaigccta	ccagtgtctgt	1440	
ccctatggga	tgtgtgccag	cttcttcaag	gcctctgggc	agtgggaggc	tgaagacctt	1500	
cacctgatg	atgaggagtc	ttcaaaaagg	ccccctgggc	tcttggccag	acaagcagag	1560	30
aaccactatg	accaggacct	ggatgagctc	cagctggaga	tggaggactc	aaagccacac	1620	
cccaggtccc	agtgtagccc	tactccaggc	cccttcaagc	ccgtgtgagta	ctcttttgaa	1680	
agctggggca	tcgcccctggc	cgtgtgggccc	atcgtgttgc	tctccgtgct	ctgcaatgga	1740	
ctggctctgc	tgaccgtgtt	cgtgtggcggg	ccgttcccc	tgcccccggt	caagtttgtg	1800	
gtaggtgcga	ttgcaggcgc	caacaccttg	actggcattt	ccgttggcct	tctagcctca	1860	
gtcgaatccc	tgacctttgg	tcagttctct	gagtacggag	cccgttggga	gacggggcta	1920	
ggctgccggg	ccactggcct	cctggcagta	cttgggtcgg	aggcatcggg	gctgtctgctc	1980	40
actctggccc	cagtgcaatg	cagcgtctcc	gtctccctgtg	tccgggccta	tgggaagtcc	2040	

ccc1ccc1gg gcagcgttcg agcaggggtc ctaggctgcc tggcactggc agggctggcc 2100  
 gccgcgc1gc ccc1ggcctc agtgggagaa tacggggcct ccccactctg cctgccc1ac 2160  
 gcgccacc1g aggg1cagcc agcagccc1g ggct1caccg tggccc1ggt gatgatgaac 2220  
 tccttctgtt tcctgg1cgt ggcccgtgcc tacatcaaac tgfactgtga cctgcccgcgg 2280  
 ggcgact11g aggccgtgtg ggactgcgcc atgg1gaggc acgtggcctg gctcatcttc 2340  
 gcagacgggc tcctctactg tcccgtggcc ttcctcagct ttgctccat gctgggcctc 2400  
 t1ccc1g1ca cggccgaggc cgtcaagtct gtcc1gctgg tgg1gctgcc cctgccc1gc 2460  
 tgcc1caacc cactgctgta cctgctcttc aacccccact tccgggatga ccttccggcgg 2520  
 ct1ccggccc gcgcagggga ctcagggccc ctagcc1atg ctgcggcccgg ggagctggag 2580  
 aagagctcct gtgattctac ccaggccc1g gtagcc1tct ctgatgtgga tctcattctg 2640  
 gaagct1ctg aagctgggcg gcccct1ggg ctggagacct atggct1ccc ctcagtgacc 2700  
 ctcatctcct gtcagcagcc aggggcccc aggc1ggagg gcagccattg tgtagagcca 2760  
 gagggaacc act11gggaa ccccaacc tccatggatg gagaactgct gctgagggca 2820  
 gagggatcta cggcagcagg tggaggct1g tcaggggg1g gcggct1tca gccctctggc 2880  
 t1ggcct11g ct1cacacgt g 2901

10  
20

<210> 7  
 <211> 1014  
 <212> PRT  
 <213> Human  
 <400> 7

Met Pro Ser Pro Pro Gly Leu Arg Ala Leu Trp Leu Cys Ala Ala Leu  
                   5                  10                  15  
 Cys Ala Ser Arg Arg Ala Gly Gly Ala Pro Gln Pro Gly Pro Gly Pro  
                   20                  25                  30  
 Thr Ala Cys Pro Ala Pro Cys His Cys Gln Glu Asp Gly Ile Met Leu  
                   35                  40                  45  
 Ser Ala Asp Cys Ser Glu Leu Gly Leu Ser Ala Val Pro Gly Asp Leu  
                   50                  55                  60  
 Asp Pro Leu Thr Ala Tyr Leu Asp Leu Ser Met Asn Asn Leu Thr Glu

30  
40

65		70		75		80									
Leu	Gln	Pro	Gly	Leu	Phe	His	His	Leu	Arg	Phe	Leu	Glu	Glu	Leu	Arg
				85				90						95	
Leu	Ser	Gly	Asn	His	Leu	Ser	His	Ile	Pro	Gly	Gln	Ala	Phe	Ser	Gly
			100					105						110	
Leu	Tyr	Ser	Leu	Lys	Ile	Leu	Met	Leu	Gln	Asn	Asn	Gln	Leu	Gly	Gly
			115					120						125	
Ile	Pro	Ala	Glu	Ala	Leu	Trp	Glu	Leu	Pro	Ser	Leu	Gln	Ser	Leu	Arg
			130					135						140	
Leu	Asp	Ala	Asn	Leu	Ile	Ser	Leu	Val	Pro	Glu	Arg	Ser	Phe	Glu	Gly
145				150						155					160
Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	His	Leu	Trp	Leu	Asp	Asp	Asn	Ala	Leu	Thr	Glu
				165						170					175
Ile	Pro	Val	Arg	Ala	Leu	Asn	Asn	Leu	Pro	Ala	Leu	Gln	Ala	Met	Thr
				180						185					190
Leu	Ala	Leu	Asn	Arg	Ile	Ser	His	Ile	Pro	Asp	Tyr	Ala	Phe	Gln	Asn
				195						200					205
Leu	Thr	Ser	Leu	Val	Val	Leu	His	Leu	His	Asn	Asn	Arg	Ile	Gln	His
				210						215					220
Leu	Gly	Thr	His	Ser	Phe	Glu	Gly	Leu	His	Asn	Leu	Glu	Thr	Leu	Asp
225					230					235					240
Leu	Asn	Tyr	Asn	Lys	Leu	Gln	Glu	Phe	Pro	Val	Ala	Ile	Arg	Thr	Leu
				245						250					255
Gly	Arg	Leu	Gln	Glu	Leu	Arg	Ser	Leu	Thr	Leu	Ser	Pro	Cys	Trp	Ser
				260						265					270
Ala	Val	Ala	Arg	Ser	Arg	Leu	Thr	Ala	Thr	Ser	Thr	Ser	Gln	Val	Gln
				275						280					285
Ala	Ile	Leu	Leu	Pro	Gln	Pro	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Leu	Gln	Ala	Arg
				290											300

10

20

30

40



Thr Thr Met Pro Arg Gly Phe His Asn Asn Asn Ile Lys Ala Ile Pro	
305	310 315 320
Glu Lys Ala Phe Met Gly Asn Pro Leu Leu Gln Thr Ile His Phe Tyr	
	325 330 335
Asp Asn Pro Ile Gln Phe Val Gly Arg Ser Ala Phe Gln Tyr Leu Pro	
	340 345 350
Lys Leu His Thr Leu Ser Leu Asn Gly Ala Met Asp Ile Gln Glu Phe	10
	355 360 365
Pro Asp Leu Lys Gly Thr Thr Ser Leu Glu Ile Leu Thr Leu Thr Arg	
	370 375 380
Ala Gly Ile Arg Leu Leu Pro Ser Gly Met Cys Gln Gln Leu Pro Arg	
385	390 395 400
Leu Arg Val Leu Glu Leu Ser His Asn Gln Ile Glu Glu Leu Pro Ser	
	405 410 415
Leu His Arg Cys Gln Lys Leu Glu Glu Ile Gly Leu Gln His Asn Arg	20
	420 425 430
Ile Trp Glu Ile Gly Ala Asp Thr Phe Ser Gln Leu Ser Ser Leu Gln	
	435 440 445
Ala Leu Asp Leu Ser Trp Asn Ala Ile Arg Ser Ile His Pro Glu Ala	
	450 455 460
Phe Ser Thr Leu His Ser Leu Val Lys Leu Asp Leu Thr Asp Asn Gln	30
465	470 475 480
Leu Thr Thr Leu Pro Leu Ala Gly Leu Gly Gly Leu Met His Leu Lys	
	485 490 495
Leu Lys Gly Asn Leu Ala Leu Ser Gln Ala Phe Ser Lys Asp Ser Phe	
	500 505 510
Pro Lys Leu Arg Ile Leu Glu Val Pro Tyr Ala Tyr Gln Cys Cys Pro	
	515 520 525
Tyr Gly Met Cys Ala Ser Phe Phe Lys Ala Ser Gly Gln Trp Glu Ala	40

530	535	540		
Glu Asp Leu His Leu Asp Asp Glu Glu Ser Ser Lys Arg Pro Leu Gly				
545	550	555	560	
Leu Leu Ala Arg Gln Ala Glu Asn His Tyr Asp Gln Asp Leu Asp Glu				
	565	570	575	
Leu Gln Leu Glu Met Glu Asp Ser Lys Pro His Pro Ser Val Gln Cys				
	580	585	590	10
Ser Pro Thr Pro Gly Pro Phe Lys Pro Cys Glu Tyr Leu Phe Glu Ser				
	595	600	605	
Trp Gly Ile Arg Leu Ala Val Trp Ala Ile Val Leu Leu Ser Val Leu				
610	615	620		
Cys Asn Gly Leu Val Leu Leu Thr Val Phe Ala Gly Gly Pro Ala Pro				
625	630	635	640	
Leu Pro Pro Val Lys Phe Val Val Gly Ala Ile Ala Gly Ala Asn Thr				20
	645	650	655	
Leu Thr Gly Ile Ser Cys Gly Leu Leu Ala Ser Val Asp Ala Leu Thr				
	660	665	670	
Phe Gly Gln Phe Ser Glu Tyr Gly Ala Arg Trp Glu Thr Gly Leu Gly				
	675	680	685	
Cys Arg Ala Thr Gly Phe Leu Ala Val Leu Gly Ser Glu Ala Ser Val				
690	695	700		30
Leu Leu Leu Thr Leu Ala Ala Val Gln Cys Ser Val Ser Val Ser Cys				
705	710	715	720	
Val Arg Ala Tyr Gly Lys Ser Pro Ser Leu Gly Ser Val Arg Ala Gly				
	725	730	735	
Val Leu Gly Cys Leu Ala Leu Ala Gly Leu Ala Ala Ala Leu Pro Leu				
	740	745	750	
Ala Ser Val Gly Glu Tyr Gly Ala Ser Pro Leu Cys Leu Pro Tyr Ala				40
	755	760	765	

Pro	Pro	Glu	Gly	Gln	Pro	Ala	Ala	Leu	Gly	Phe	Thr	Val	Ala	Leu	Val	
770						775					780					
Met	Met	Asn	Ser	Phe	Cys	Phe	Leu	Val	Val	Ala	Gly	Ala	Tyr	Ile	Lys	
785					790					795					800	
Leu	Tyr	Cys	Asp	Leu	Pro	Arg	Gly	Asp	Phe	Glu	Ala	Val	Trp	Asp	Cys	
				805					810						815	
Ala	Met	Val	Arg	His	Val	Ala	Trp	Leu	Ile	Phe	Ala	Asp	Gly	Leu	Leu	10
			820					825					830			
Tyr	Cys	Pro	Val	Ala	Phe	Leu	Ser	Phe	Ala	Ser	Met	Leu	Gly	Leu	Phe	
			835					840							845	
Pro	Val	Thr	Pro	Glu	Ala	Val	Lys	Ser	Val	Leu	Leu	Val	Val	Leu	Pro	
							855								860	
Leu	Pro	Ala	Cys	Leu	Asn	Pro	Leu	Leu	Tyr	Leu	Leu	Phe	Asn	Pro	His	
865					870					875					880	20
Phe	Arg	Asp	Asp	Leu	Arg	Arg	Leu	Arg	Pro	Arg	Ala	Gly	Asp	Ser	Gly	
				885						890					895	
Pro	Leu	Ala	Tyr	Ala	Ala	Ala	Gly	Glu	Leu	Glu	Lys	Ser	Ser	Cys	Asp	
				900						905					910	
Ser	Thr	Gln	Ala	Leu	Val	Ala	Phe	Ser	Asp	Val	Asp	Leu	Ile	Leu	Glu	
				915						920					925	
Ala	Ser	Glu	Ala	Gly	Arg	Pro	Pro	Gly	Leu	Glu	Thr	Tyr	Gly	Phe	Pro	30
930							935								940	
Ser	Val	Thr	Leu	Ile	Ser	Cys	Gln	Gln	Pro	Gly	Ala	Pro	Arg	Leu	Glu	
945							950								960	
Gly	Ser	His	Cys	Val	Glu	Pro	Glu	Gly	Asn	His	Phe	Gly	Asn	Pro	Gln	
				965						970					975	
Pro	Ser	Met	Asp	Gly	Glu	Leu	Leu	Leu	Arg	Ala	Glu	Gly	Ser	Thr	Pro	
				980						985					990	40
Ala	Gly	Gly	Gly	Leu	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Phe	Gln	Pro	Ser	Gly	Leu	

995	1000	1005					
Ala Phe Ala Ser His Val							
1010							
<210> 8							
<211> 3042							
<212> DNA							
<213> Human							
<400> 8							
atgcccagcc	cgccggggct	ccgggcgcta	tggtttgcg	ccgcgctgtg	cgcttcccgg	60	
agggccggcg	gcgcccccca	gcccggcccc	gggcccaccg	ctgcccggc	ccccgtccac	120	
tgccaggagg	acggcatcat	gctgtctgcc	gactgtcttg	agctcgggct	gtccgccgtt	180	
ccgggggacc	tggaccccc	gacggcttac	ctggacctca	gcatgaacaa	cttcacagag	240	
cttcagccig	gctcttcca	ccacctgcgc	ttcttggagg	agctgcgtct	ctctgggaac	300	
catctctcac	acatcccagg	acaagcattc	tctggctctt	acagcctgaa	aatcctgatg	360	10
ctgcagaaca	atcagctggg	aggaatcccc	gcagaggcgc	tgtgggagct	gccgagccig	420	
cagtcgctgc	gcctagatgc	caacctcatt	tccctggtec	cggagaggag	ctttgagggg	480	
ctgtctctcc	tccgccacct	ctggctggac	gacaatgcac	tcacggagat	ccctgtcagg	540	
gcccccaaca	acctcccctgc	cttgcaggcc	atgaccttgg	ccctcaaccg	catcagccac	600	
atccccgact	acgcgttcca	gaatctcacc	agccttgtgg	tgtctcattt	gcataacaac	660	
cgcatccagc	atctggggac	ccacagcttc	gaggggctgc	acaatctgga	gacactagac	720	
ctgaattata	acaagctgca	ggagttccct	gtggccatcc	ggaccttggg	cagactgcag	780	30
gaactacgga	gtctcactct	gtcgccatgc	tggagtgcag	tggcacgata	tcggctcact	840	
gcaacctcca	cttcacaggt	tcaagcgatt	ctcttgcctc	agcctcccga	gttgcctggga	900	
ctacaggcac	gcaccacct	gcccaggggg	ttccataaca	acaacatcaa	ggccatccca	960	
gaaaaggcct	tcatggggaa	ccctctgcta	cagacgatac	acttttatga	taaccaatc	1020	
cagtttgtgg	gaagatcggc	attccagtac	ctgcctaac	tccacacact	atctctgaat	1080	
ggtgccatgg	acatccagga	gittccagat	ctcaaaggca	ccaccagcct	ggagatcctg	1140	
acctgacc	gcgcaggcat	ccggctgctc	ccatcgggga	tgtgccaa	gctgcccagg	1200	40
ctccgagtc	tggaactgtc	tcacaatcaa	attgaggagc	tgccagcct	gcacaggtgt	1260	

cagaaattgg	aggaaatcgg	cctccaacac	aaccgcatct	gggaaattgg	agctgacacc	1320	
ttcagccagc	tgagctccct	gcaagccctg	gatcttagct	ggaacgccat	ccggctccate	1380	
cacccigagg	ctttctccac	cctgcactcc	ctggtaagc	tggacctgac	agacaaccag	1440	
ctgaccacac	tgccccggc	tggacttggg	ggcttgaatc	atctgaagct	caaagggaac	1500	
cttgctctct	cccaggcctt	ctccaaggac	agtttcccaa	aactgaggat	cctggagggtg	1560	
ccttatgcect	accagtgcct	tccttatggg	atgtgtgcca	gctttctcaa	ggcctctggg	1620	
cagtgggagg	ctgaagacct	tcacctgat	gatgaggagt	cttcaaaaag	gccccggggc	1680	10
ctccttgcca	gacaagcaga	gaaccactat	gaccaggacc	tggatgagct	ccagctggag	1740	
atggaggact	caaagccaca	ccccagtgc	cagtgtagcc	ctactccagg	ccccctcaag	1800	
ccctgtgagt	acctcttga	aagctggggc	atccgctgg	ccgtgtgggc	catcgtgttg	1860	
ctctccgigc	ctgcaatgg	actgggtctg	ctgacctgt	tcgctggcgg	gcttgcctcc	1920	
ctgccccggg	tcaagttgt	ggtaggtgcg	attgcaggcg	ccaacacctt	gactggcatt	1980	
tcctgiggcc	ttctagcctc	agtcgatgcc	ctgaccttg	gtcagttctc	tgagtacgga	2040	
gccccctggg	agacggggct	aggctgccgg	gccactggct	tcctggcagt	acttgggtcg	2100	20
gaggcatcgg	tgctgctgct	cactctggcc	gcagtgcagt	gcagcgtctc	cgctctctgt	2160	
gtccgggctt	atgggaagtc	ccccctctg	ggcagcgttc	gagcaggggt	cctaggctgc	2220	
ctggcacatg	cagggtctggc	cgccgcactg	ccccggcct	cagtgggaga	atacggggcc	2280	
tccccactct	gcttgcctca	cgcgccacct	gagggtcagc	cagcagccct	gggcttcacc	2340	
gtggccccgg	tgatgatgaa	ctcctctgt	tccctggctg	tggccgggtg	ctacatcaaa	2400	
ctgtactgtg	acctgccgcg	gggcgacttt	gaggccgtgt	gggactgcgc	catggtgagg	2460	
cacgtggcct	ggctcatctt	cgcagacggg	ctctctact	gtcccgtggc	cttctcagc	2520	30
ttcgctcca	tgctgggctt	cttccctgtc	acgcccagg	ccgtcaagtc	tgtcctgctg	2580	
gtgggtgctg	ccctgcctgc	ctgctcaac	ccactgctgt	acctgctctt	caacccccac	2640	
ttccgggatg	accttcggcg	gcttcggccc	cgcgcagggg	actcagggcc	cctagcctat	2700	
gctgcccggg	gggagctgga	gaagagctcc	tgtgattcta	cccaggccct	ggtagccttc	2760	
ctgatgtgg	atctcattct	ggaagcttct	gaagctgggc	ggccccctgg	gctggagacc	2820	
tatggcttcc	ctcagtgc	ctctatctcc	tgtcagcagc	caggggcccc	caggctggag	2880	
ggcagccatt	gtgtagagcc	agaggggaac	cactttggga	accccccaacc	ctccatggat	2940	40
ggagaactgc	tgctgagggc	agagggatct	acgccagcag	gtggaggctt	gtcagggggt	3000	

ggcggcttcc agccctctgg ctggcccttt gcttcacacg tg

3042

<210> 9

<211> 1014

<212> PRT

<213> Human

<400> 9

Met Pro Ser Pro Pro Gly Leu Arg Ala Leu Trp Leu Cys Ala Ala Leu	10
5                                  10                                  15	
Cys Ala Ser Arg Arg Ala Gly Gly Ala Pro Gln Pro Gly Pro Gly Pro	
20                                  25                                  30	
Thr Ala Cys Pro Ala Pro Cys His Cys Gln Glu Asp Gly Ile Met Leu	
35                                  40                                  45	
Ser Ala Asp Cys Ser Glu Leu Gly Leu Ser Ala Val Pro Gly Asp Leu	20
50                                  55                                  60	
Asp Pro Leu Thr Ala Tyr Leu Asp Leu Ser Met Asn Asn Leu Thr Glu	
65                                  70                                  75                                  80	
Leu Gln Pro Gly Leu Phe His His Leu Arg Phe Leu Glu Glu Leu Arg	
85                                  90                                  95	
Leu Ser Gly Asn His Leu Ser His Ile Pro Gly Gln Ala Phe Ser Gly	
100                                  105                                  110	
Leu Tyr Ser Leu Lys Ile Leu Met Leu Gln Asn Asn Gln Leu Gly Gly	30
115                                  120                                  125	
Ile Pro Ala Glu Ala Leu Trp Glu Leu Pro Ser Leu Gln Ser Leu Arg	
130                                  135                                  140	
Leu Asp Ala Asn Leu Ile Ser Leu Val Pro Glu Arg Ser Phe Glu Gly	
145                                  150                                  155                                  160	
Leu Ser Ser Leu Arg His Leu Trp Leu Asp Asp Asn Ala Leu Thr Glu	40
165                                  170                                  175	
Ile Pro Val Arg Ala Leu Asn Asn Leu Pro Ala Leu Gln Ala Met Thr	



Leu His Arg Cys Gln Lys Leu Glu Glu Ile Gly Leu Gln His Asn Arg	
420	425 430
Ile Trp Glu Ile Gly Ala Asp Thr Phe Ser Gln Leu Ser Ser Leu Gln	
435	440 445
Ala Leu Asp Leu Ser Trp Asn Ala Ile Arg Ser Ile His Pro Glu Ala	
450	455 460
Phe Ser Thr Leu His Ser Leu Val Lys Leu Asp Leu Thr Asp Asn Gln	10
465	470 475 480
Leu Thr Thr Leu Pro Leu Ala Gly Leu Gly Gly Leu Met His Leu Lys	
485	490 495
Leu Lys Gly Asn Leu Ala Leu Ser Gln Ala Phe Ser Lys Asp Ser Phe	
500	505 510
Pro Lys Leu Arg Ile Leu Glu Val Pro Tyr Ala Tyr Gln Cys Cys Pro	
515	520 525
Tyr Gly Met Cys Ala Ser Phe Phe Lys Ala Ser Gly Gln Trp Glu Ala	
530	535 540
Glu Asp Leu His Leu Asp Asp Glu Glu Ser Ser Lys Arg Pro Leu Gly	
545	550 555 560
Leu Leu Ala Arg Gln Ala Glu Asn His Tyr Asp Gln Asp Leu Asp Glu	
565	570 575
Leu Gln Leu Glu Met Glu Asp Ser Lys Pro His Pro Ser Val Gln Cys	30
580	585 590
Ser Pro Thr Pro Gly Pro Phe Lys Pro Cys Glu Tyr Leu Phe Glu Ser	
595	600 605
Trp Gly Ile Arg Leu Ala Val Trp Ala Ile Val Leu Leu Ser Val Leu	
610	615 620
Cys Asn Gly Leu Val Leu Leu Thr Val Phe Ala Gly Gly Pro Val Pro	
625	630 635 640
Leu Pro Pro Val Lys Phe Val Val Gly Ala Ile Ala Gly Ala Asn Thr	40



	645		650		655	
Leu Thr Gly Ile Ser Cys Gly Leu Leu Ala Ser Val Asp Ala Leu Thr						
	660		665		670	
Phe Gly Gln Phe Ser Glu Tyr Gly Ala Arg Trp Glu Thr Gly Leu Gly						
	675		680		685	
Cys Arg Ala Thr Gly Phe Leu Ala Val Leu Gly Ser Glu Ala Ser Val						
	690		695		700	10
Leu Leu Leu Thr Leu Ala Ala Val Gln Cys Ser Val Ser Val Ser Cys						
705		710		715		720
Val Arg Ala Tyr Gly Lys Ser Pro Ser Leu Gly Ser Val Arg Ala Gly						
	725		730		735	
Val Leu Gly Cys Leu Ala Leu Ala Gly Leu Ala Ala Ala Leu Pro Leu						
	740		745		750	
Ala Ser Val Gly Glu Tyr Gly Ala Ser Pro Leu Cys Leu Pro Tyr Ala						
	755		760		765	20
Pro Pro Glu Gly Gln Pro Ala Ala Leu Gly Phe Thr Val Ala Leu Val						
	770		775		780	
Met Met Asn Ser Phe Cys Phe Leu Val Val Ala Gly Ala Tyr Ile Lys						
785		790		795		800
Leu Tyr Cys Asp Leu Pro Arg Gly Asp Phe Glu Ala Val Trp Asp Cys						
	805		810		815	30
Ala Met Val Arg His Val Ala Trp Leu Ile Phe Ala Asp Gly Leu Leu						
	820		825		830	
Tyr Cys Pro Val Ala Phe Leu Ser Phe Ala Ser Met Leu Gly Leu Phe						
	835		840		845	
Pro Val Thr Pro Glu Ala Val Lys Ser Val Leu Leu Val Val Leu Pro						
	850		855		860	
Leu Pro Ala Cys Leu Asn Pro Leu Leu Tyr Leu Leu Phe Asn Pro His						
865		870		875		40
						880

Phe Arg Asp Asp Leu Arg Arg Leu Arg Pro Arg Ala Gly Asp Ser Gly  
885 890 895

Pro Leu Ala Tyr Ala Ala Ala Gly Glu Leu Glu Lys Ser Ser Cys Asp  
900 905 910

Ser Thr Gln Ala Leu Val Ala Phe Ser Asp Val Asp Leu Ile Leu Glu  
915 920 925

Ala Ser Glu Ala Gly Arg Pro Pro Gly Leu Glu Thr Tyr Gly Phe Pro  
930 935 940

Ser Val Thr Leu Ile Ser Cys Gln Gln Pro Gly Ala Pro Arg Leu Glu  
945 950 955 960

Gly Ser His Cys Val Glu Pro Glu Gly Asn His Phe Gly Asn Pro Gln  
965 970 975

Pro Ser Met Asp Gly Glu Leu Leu Leu Arg Ala Glu Gly Ser Thr Pro  
980 985 990

Ala Gly Gly Gly Leu Ser Gly Gly Gly Gly Phe Gln Pro Ser Gly Leu  
995 1000 1005

Ala Phe Ala Ser His Val

10

20

1010

<210> 10

<211> 3042

<212> DNA

<213> Human

<400> 10

atgcccagcc cgcggggct cggggcgcta tggctttgcg ccgcgctgtg cgcttcccgg 60

aggccggcg gcgccccca gccggcccc gggcccaccg ctgcccggc cccctgccac 120

tgccaggagg acggcatcat gctgtctgcc gactgctctg agctcgggct gtccgccgtt 180

ccggggacc tggacccct gacggcttac ctggacctca gcatgaacaa ctcacagag 240

cttcagcctg gcctcttcca ccacctgcgc ttcttggagg agctgcgtct ctctgggaac 300

catctctcac acatcccagg acaagcattc tctggtctct acagcctgaa aatcctgatg 360

30

40

ctgcagaaca atcagctggg aggaatcccc gcagaggcgc tgtgggagct gccgagcctg	420	
cagtcgctgc gcctagatgc caacctcacc tccctggtec cggagaggag ctttgagggg	480	
ctgtccctcc tccgccacct ctggctggac gacaatgcac tcacggagat cctgtcagg	540	
gccctcaaca acctccctgc cctgcaggcc atgacctgg cctcaaccg catcagccac	600	
atccccgact acgcgttcca gaatctcacc agccttgtgg tgcctgattt gcataacaac	660	
cgcateccagc atctggggac ccacagcttc gaggggctgc acaatctgga gacactagac	720	
ctgaattata acaagctgca ggagttccct gtggccatcc ggacctggg cagactgcag	780	10
gaactacgga gtctcactct gtcgccatgc tggagtgcag tggcacgata tgggtcact	840	
gcaacctcca cctcacaggt tcaagcgatt ctctgcctc agcctcccga gttgctggga	900	
ctacaggcac gcaccacct gcccaggggg ttccataaca acaacatcaa ggccatecca	960	
gaaaaggcct tcaiggggaa cctctgcta cagacgatac acttttatga taaccaate	1020	
cagtttgtgg gaagatcggc attccagtac ctgcctaac tccacacact atctctgaat	1080	
ggigccaagg acatccagga gttccagat ctcaaaggca ccaccagcct ggagatcctg	1140	
acctgacce gcgcaggcat ccggctgctc ccctcgggga tgtgccaaca gctgcccagg	1200	20
ctccgagtc tggaaactgc tcacaatcaa attgaggagc tgcccagcct gcacagggtg	1260	
cagaaattgg aggaaatcgg cctccaacac aaccgcactt gggaaattgg agctgacacc	1320	
ttcagccagc tgagctccct gcaagccctg gatcttagct ggaacgcat ccggtccatc	1380	
cacctgagg cctctccac cctgcactcc ctggctcaagc tggacctgac agacaaccag	1440	
ctgaccacac tggccctggc tggacttggg ggcttgatgc atctgaagct caaagggaac	1500	
cttgcctct cccaggcctt ctccaaggac agtttccaa aactgaggat cctggagggtg	1560	
ccttatgctt accagtgctg tccctatggg atgtgtgcca gcttcttcaa ggctctggg	1620	30
cagtgggagg ctgaagacct tcacctgat gatgaggagt ctcaaaaag gcccttgggc	1680	
ctccttgcca gacaagcaga gaaccactat gaccaggacc tggatgagct ccagctggag	1740	
atggaggact caaagccaca ccccagtgtc cagtgtagcc ctactccagg ccccttcaag	1800	
cccgtgagt acctcttga aagctggggc atccgcctgg ccgtgtgggc catcgtgttg	1860	
ctctccgtgc tctgcaatgg actgggtgctg ctgacctgtt tcgctggcgg gccctgtccc	1920	
ctgccccgg tcaagttgt ggtagggtgcg attgcaggcg ccaacacctt gactggcatt	1980	
tcctgtggcc ttctagcctc agtcgatgcc ctgaccttg gtcagttctc tgagtacgga	2040	40
gcccgttggg agacggggct aggctgccgg gccactggct tcctggcagt acttgggtcg	2100	

gaggcacggtg tgcigctgct cactctggcc gcagtgagc gcagcgtctc cgtctccigt 2160  
 gtccgggctt atgggaagtc cccctcccig ggcagcgttc gagcaggggt cctaggctgc 2220  
 ctggcacagg cagggctggc cgcgcactg cccctggcct cagtgggaga atacggggcc 2280  
 tccccactct gccigcccta cgcgccacct gagggtcagc cagcagccct gggttcacc 2340  
 gggcccctgg tgaigatgaa ctctctctgt ttccctggctg tggccggctg ctacatcaaa 2400  
 ctgtactgtg acctgccgcg gggcgacttt gagccctgtt gggactgcgc catggtgagg 2460  
 cacgiggcct ggctcatctt cgcagacggg ctctctact gtcccgtggc ctctctcagc 2520  
 ttgcctcca tgcigggcct ctctctctg acgcccaggg ccgtcaagtc tgcctctctg 2580  
 ggggtctgct cctggcctgc ctgctcaac ccactgctgt acctgctctt caacccccac 2640  
 ttccgggatg accttcggcg gcttcggccc cgcgcagggg actcagggcc cctagcctat 2700  
 gcigccggcc gggagctgga gaagagctcc tgtgattcta cccaggccct ggtagccttc 2760  
 tctgatgtgg atctcattct ggaagcttct gaagctgggc ggccccctgg gctggagacc 2820  
 taaggcttc cctcagtgac cctcattctc tgtcagcagc caggggcccc caggctggag 2880  
 ggcagccatt gtgtagagcc agaggggaac cactttggga acccccaacc ctccatggat 2940  
 ggagaactgc tgcigagggc agagggatct acgccagcag gtggaggctt gtcaggggtt 3000  
 ggcggcttcc agcccctgg ctggccttt gcttcacacg tg 3042

10

20

<210> 11

<211> 3042

<212> DNA

<213> Human

<400> 11

atgcccagcc cgcggggct cggggcgcta tggctttgc cgcgctgtg cgcttcccgg 60  
 agggccggcg gcgccccca gccgggccc gggcccacc cctgcccggc cccctgccac 120  
 tggcaggagg acggcatcat gctgtctgcc gactgctctg agctcgggct gtccgccgtt 180  
 ccgggggacc tggacccct gacggcttac ctggacctca gcatgaacaa cctcacagag 240  
 ctccagcctg gcccttcca ccacctgcgc ttcttggagg agctgcgtct ctctgggaac 300  
 catctctcac acatcccagg acaagcattc tctggtctct acagcctgaa aatcctgatg 360  
 ctgcagaaca atcagctggg aggaatccc gcagaggcgc tgtgggagct gccgagcctg 420  
 cagtgcctgc gccatgatgc caacctcatt tccctggctc cggagaggag ctttggggg 480

30

40

ctgtcctccc	tccgccacct	ctggctggac	gacaatgcac	tcacggagat	ccctgtcagg	540	
gccctcaaca	acctcectgc	ectgcaggcc	atgacctgg	ccctcaaccg	catcagccac	600	
atccccgact	acgcgttcca	gaatctcacc	agccttgtgg	tgctgcattt	gcataacaac	660	
cgcatccagc	atctggggac	ccacagcttc	gaggggctgc	acaatctgga	gacactagac	720	
ctgaattata	acaagctgca	ggagttccct	gtggccatcc	ggaccttggg	cagactgcag	780	
gaactacgga	gtctcactct	gtcgccatgc	tggagtgcag	tggcacgata	tcggctcact	840	
gcaacctcca	cttcacaggt	tcaagcgatt	ctcttgcctc	agcctcccga	gttgcctggga	900	10
ctacaggcac	gcaccacct	gcccaggggg	tccataaca	acaacatcaa	ggccatccca	960	
gaaaaggcct	tcatggggaa	ccctctgcta	cagacgatac	acttttatga	taaccaatc	1020	
cagtttgtgg	gaagatcggc	attccagtac	ctgcctaac	tccacacact	atctctgaat	1080	
ggigccaigg	acatccagga	gittccagat	ctcaaaggca	ccaccagcct	ggagatcctg	1140	
accttgacce	gcgcaggcat	ccggctgctc	ccatcgggga	tgtgccaaca	gctgcccagg	1200	
ctccgagtc	tggaactgtc	tcacaatcaa	attgaggagc	tgccagcct	gcacagggtg	1260	
cagaaattgg	aggaaatcgg	ctccaacac	aaccgcactc	gggaaattgg	agctgacacc	1320	20
ttcagccagc	tgagctccct	gcaagccctg	gatcttagct	ggaacgcat	ccggctccatc	1380	
caccccgagg	ctttctccac	cttgcactcc	ctggctcaagc	tggacctgac	agacaaccag	1440	
ctgaccacac	tgccccggc	tggacttggg	ggcttgatgc	atctgaagct	caaagggaac	1500	
cttgcctctc	cccaggcctt	ctccaaggac	agtttcccaa	aactgaggat	cctggagggtg	1560	
cettaigcct	accagtgctg	tccctatggg	atgtgtgcc	gctttctcaa	ggcctctggg	1620	
cagtgggagg	ctgaagacct	tcaccttgat	gatgaggagt	cttcaaaaag	gccccctgggc	1680	
ctccttgcca	gacaagcaga	gaaccactat	gaccaggacc	tggatgagct	ccagctggag	1740	30
atggaggact	caaagccaca	ccccagtgtc	cagtgtagcc	ctactccagg	ccccctcaag	1800	
cccctgtgagt	acctctttga	aagctggggc	atccgcctgg	ccgtgtgggc	catcgtgttg	1860	
ctctccgtgc	tctgcaatgg	actgggtgctg	ctgaccgtgt	tcgctggcgg	gcctgcccc	1920	
ctgccccgg	tcaagittgt	ggtagggtcg	attgcaggcg	ccaacacctt	gactggcatt	1980	
tctgtggcc	ttctagcctc	agtcgatgcc	ctgacctttg	gtcagttctc	tgagtacgga	2040	
gcccgtggg	agacggggct	aggctgccgg	gccactggct	tcttggcagt	acttgggtcg	2100	
gaggcatcgg	tgctgctgct	cactctggcc	gcagtgcagt	gcagcgtctc	cgctctctgt	2160	40
gtccgggct	atgggaagtc	ccccctctg	ggcagcgttc	gagcaggggt	cctaggctgc	2220	

ctggcacitgg cagggctggc cgccgcgctg cccctggcct cagtgggaga atacggggcc	2280	
tccccactct gcttgccta cgcgccacct gagggtcage cagcagccct gggcttcacc	2340	
gtggcccitgg tgaigtgaa ctcttctgt ttcttggctg tggccggtgc ctacatcaaa	2400	
ctgtactgtg acctgccgcg gggcgacttt gagggcgtgt gggactgcgc catggtgagg	2460	
cacgtggcct ggctcatctt cgcagacggg ctctctact gtcccgtggc ctctctcage	2520	
tttgcctcca tgcitgggct ctctctgtc acgcccaggg ccgtcaagtc tctctgtctg	2580	
gtgggtctgc ccttgcctgc ctgctcaac ccactgctgt acctgctctt caacccccac	2640	10
ttccgggatg accttcggcg gcttcggccc cgcgcagggg actcagggcc cctagcctat	2700	
gcigcggccg gggagctgga gaagagctcc tgtgattcta cccaggccct ggtagccttc	2760	
tctgatgtgg atctcattct ggaagcttct gaagctgggc ggccccctgg gctggagacc	2820	
taiggcttcc cctcagtgac cctcatctcc tgtcagcagc caggggcccc caggctggag	2880	
ggcagccatt gtgtagagcc agaggggaac cactttggga acccccaacc ctccatggat	2940	
ggagaacigc tgcitgaggc agagggatct acgccagcag gtggaggctt gtcagggggt	3000	
ggcggcttcc agcccctgg ctitggccttt gcttcacag tg	3042	20

<210> 12

<211> 3042

<212> DNA

<213> Human

<400> 12

atccccagcc cgccggggct ccgggcgcta tggctttgcg ccgcgctgtg cgcttcccgg	60	
agggccggcg gcgcccccca gccgggcccg gggcccaccg ctgcccggc cccctgccac	120	30
tgccaggagg acggcatcat gctgtctgcc gactgctctg agctcgggct gtccgccgtt	180	
ccgggggacc tggacccctt gacggcttac ctggacctca gcatgaacaa cctcacagag	240	
cttcagcctg gctcttcca ccacctgcgc ttcttggagg agctgcgtct ctctgggaac	300	
catctctcac acatcccagg acaagcattc tctggtctct acagcctgaa aatcctgatg	360	
ctgcagaaca atcagctggg aggaatcccc gcagaggcgc tgtgggagct gccgagcctg	420	
cagtcgctgc gcttagatgc caacctcatt tccctggctc cggagaggag ctttgagggg	480	
ctgtcctccc tccgccacct ctggctggac gacaatgcac tcacggagat cccctgtcagg	540	40
gccctcaaca acctccctgc cctgcaggcc atgacctgg cctcaaccg catcagccac	600	

atccccgact	acgcgittca	gaatctcacc	agccttgtgg	tgctgcattt	gcataacaac	660	
cgcateccagc	atctggggac	ccacagcttc	gagggctgc	acaatctgga	gacactagac	720	
ctgaattata	acaagctgca	ggagttccct	gtggccatcc	ggaccctggg	cagactgcag	780	
gaactacgga	gtctcactct	gtcgccatgc	tggagtgcag	tggcacgata	tcggctcact	840	
gcaacctcca	cttcacaggt	tcaagcgatt	ctcctgcctc	agcctcccga	gttgctggga	900	
ctacaggcac	gcaccaccat	gcccaggggg	tcccataaca	acaacatcaa	ggccatccca	960	
gaaaaggcct	tcaiggggaa	ccctctgcta	cagacgatac	acttttatga	taaccaate	1020	10
cagtttgtgg	gaagatcggc	attccagtac	ctgcctaac	tccacacact	atctctgaat	1080	
ggigccaigg	acatccagga	gittccagat	ctcaaaggca	ccaccagcct	ggagatcctg	1140	
acctgacce	gcgaggcat	ccggctgctc	ccatcgggga	tgtgccaaca	gctgcccagg	1200	
ctccgagtc	tggaactgtc	tcacaatcaa	attgaggagc	tgcccagcct	gcacagggtg	1260	
cagaaattgg	aggaaatcgg	ctccaacac	aaccgcactc	gggaaattgg	agctgacacc	1320	
ttcagccagc	tgagctccct	gcaagccctg	gatcttagct	ggaacgcat	ccggtccatc	1380	
caccccgagg	ctttctccac	cttgcactcc	ctggtaagc	tggacctgac	agacaaccag	1440	20
ctgaccacac	tgccccggc	tggacttggg	ggcttgatgc	atctgaagct	caaagggaac	1500	
cttgcctctc	cccaggcctt	ctccaaggac	agtttcccaa	aactgaggat	cctggagggtg	1560	
cettaigcct	accagtgctg	tcctatggg	atgtgtgcca	gctttctcaa	ggcctctggg	1620	
cagtgggagg	ctgaagacct	tcaccttgat	gatgaggagt	cttcaaaaag	gccccctgggc	1680	
ctccttgcca	gacaagcaga	gaaccactat	gaccaggacc	tggatgagct	ccagctggag	1740	
atggaggact	caaagccaca	ccccagtgtc	cagtgtagcc	ctactccagg	ccccctcaag	1800	
cccigtgagt	acctcttga	aagctggggc	atccgcctgg	ccgtgtgggc	catcgtgttg	1860	30
ctctccgtgc	tctgcaatgg	actgggtgctg	ctgaccgtgt	tcgctggcgg	gcctgtcccc	1920	
ctgccccgg	tcaagtttgt	ggtaggtgcg	attgcaggcg	ccaacacctt	gactggcatt	1980	
tcctgtggcc	ttctagcctc	agtcgatgcc	ctgacctttg	gtcagttctc	tgagtacgga	2040	
gcccgcctgg	agacggggct	aggctgccgg	gccactggct	tcctggcagt	acttgggtcg	2100	
gaggcatcgg	tgctgctgct	cactctggcc	gcagtgcagt	gcagcgtctc	cgtctcctgt	2160	
gtccgggct	atgggaagtc	ccccctccctg	ggcagcgttc	gagcaggggt	cctaggctgc	2220	
ctggcactgg	cagggctggc	cgcgcgcctg	ccccggcct	cagtgggaga	atacggggcc	2280	40
tccccactct	gcttgcctta	cgcgccacct	gaggtcagc	cagcagccct	gggcttcacc	2340	

gggccctgg tgaigatgaa ctcttctgt ttcttggtcg tggccggtgc ctacatcaaa 2400  
 ctgtaetgtg acctgccgcg gggcgacttt gaggccgtgt gggactgcgc catggtgagg 2460  
 cacgiggcct ggctcatctt cgcagacggg ctctctact gtcccgtagc ctctctcagc 2520  
 ttgceetcea tgcigggeet ctteectgtc acgcccaggg ccgtcaagtc tgccttgcctg 2580  
 ggggtgcctc ccttgccctg ctgcctcaac ccactgctgt acctgctctt caacccccac 2640  
 ttccgggatg accttcggcg gcttcggccc cgcgcagggg actcagggcc cctagcctat 2700  
 gcigccggccg gggagctgga gaagagctcc tgtgattcta cccaggccct ggtagccttc 2760  
 tctgatgtgg atctcattct ggaagcttct gaagctgggc ggccccctgg gctggagacc 2820  
 taiggcttcc cctcagtgac cctcatctcc tgtcagcagc caggggcccc caggctggag 2880  
 ggcagccatt gtgtagagcc agaggggaac cactttggga accccaacc ctccatggat 2940  
 ggagaacigc tgcigagggc agagggatct acgccagcag gtggaggctt gtcagggggt 3000  
 ggcggcttcc agccctctgg ctggccttt gcttcacacg tg 3042

<210> 13

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify DNA encoding TGR41

<400> 13

aaagtcgaca gtagcccgac cgccgagatg ccca 34

<210> 14

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify DNA encoding TGR41

<400> 14

aaaactagtt tacacgtgtg aagcaaaggc caagc 35

<210> 15

10

20

30

40



<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify DNA encoding TGR41

<400> 15

aaagtcgaca gtagcccgac cgccgagatg ccca 34

10

<210> 16

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify DNA encoding TGR41

<400> 16

20

aaaactagtt tacacgtgtg aagcaaaggc caagc 35

<210> 17

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify DNA encoding TGR41

30

<400> 17

aggacggcat catgctgtct 20

<210> 18

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

40

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify DNA encoding TGR41

<400> 18		
gtccaggtec cccggaac		18
<210> 19		
<211> 22		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		10
<223>		
<400> Designed oligonucleotide primer to amplify DNA encoding TGR41		
ccgactgctc tgagctcggg ct		22
<210> 20		
<211> 2786		
<212> DNA		
<213> Human		20
<400> 20		
gccactgcca ggaggacggc atcatgctgt ctgccactg ctctgagctc gggctgtccg	60	
ccgttccggg ggacctggac cccctgacgg ctacctgga cctcagcatg aacaacctca	120	
cagagcttca gccctggctc ttccaccacc tgcgcttctt ggaggagctg cgtctctctg	180	
ggaacctct ctacacatc ccaggacaag cattctctgg tctctacagc ctgaaaatcc	240	
tgatgctgca gaacaatcag ctgggaggaa tccccgcaga ggcgctgtgg gagctgccga	300	
gccctgcagtc gctgcgcta gatgccaacc tcctctccct ggtcccggag aggagctttg	360	30
agggctgtc ctccctccgc cacctctggc tggacgaaa tgcactcacg gagatccctg	420	
tcagggccct caacaacctc cctgcccctg aggccatgac cctggccctc aaccgcatca	480	
gccacatccc cgactacgcg ttccagaatc tcaccagcct tgtgggtgctg catttgcata	540	
acaaccgcat ccagcatctg gggaccaca gcctcgaggg gctgcacaat ctggagacac	600	
tagacctgaa ttataacaag ctgcaggagt tcccgtggc catccggacc ctgggcagac	660	
igcaggaact ggggttccat aacaacaaca tcaaggccat cccagaaaag gccctcatgg	720	
ggaacctct gctacagacg atacacttt atgataacc aatccagttt gtgggaagat	780	40
cggcattcca gtacctgctt aaactccaca cactatctct gaatggtgcc atggacatcc	840	

aggagtttcc agatctcaaa ggcaccacca gcctggagat cctgacctg acccgcgag	900	
gcacccggtc gctcccacg gggatgtgcc aacagctgcc caggctccga gtccctggaac	960	
igtctacaaa tcaaatgag gagctgcca gcctgcacag gtgtcagaaa ttggaggaaa	1020	
tggcctcca acacaaccgc atctgggaaa ttggagctga caccctcagc cagctgagct	1080	
cccigcaagc cctggatctt agctggaacg ccatccggtc catccacct gaggcctct	1140	
ccacctgca ctcccctggc aagctggacc tgacagacaa ccagctgacc acactgcccc	1200	
tggctggact tggggcttg atgcatctga agctcaaagg gaaccttgct ctctcccagg	1260	10
ctctctccaa ggacagtctt ccaaaactga ggatcctgga ggtgccttat gcctaccagt	1320	
gcgtcccta tgggatgtgt gccagcttct tcaaggcctc tgggcagtgg gaggctgaag	1380	
acctcacct tgaatgatgag gactcttcaa aaaggcccc gggcctcctt gccagacaag	1440	
cagagaacca ctatgaccag gacctggatg agctccagct ggagatggag gactcaaagc	1500	
cacaccccag tctccagtgt agccctactc caggccccct caagccccgt gactacctct	1560	
tigaaagctg gggcatccgc ctggccgtgt gggccatctg gtgtctctcc gtgtctgca	1620	
atggactggt gctgtgacc gtgttcctg gcgggctgc cccccgccc ccggtcaagt	1680	20
tigigttagg tgcgattgca ggcgccaaca cctgactgg catttctgt ggcttctag	1740	
ctcagctga tgcctgacc ttigtctagt tctctgagta cggagccccg tgggagacgg	1800	
ggctaggctg ccgggccact ggcttcttg cagtacttg gtcggaggca tccgtgtgc	1860	
tgtcactct ggccgcagtg cagtgcagcg tctccgtctc ctgtgtccgg gcctatggga	1920	
agccccctc cctgggcagc gttcgagcag ggttcttag ctgctggca ctggcagggc	1980	
tggcccccgc actgccccg gccctcagtgg gagaatacgg ggctccccca ctctgctgc	2040	
cttacgcgc acctgaggt cagccagcag cctgggctt caccgtggcc ctggtgatga	2100	30
tgaactctt ctgttctctg gtcgtggccg gtgctacat caaactgtac tgtacctgc	2160	
cgccggcga cttgagggc gtgtggact gcgcaatgt gaggcacgtg gcctggctca	2220	
tcttcgcaga cggctctct tactgtccc tggccttct cagctttgcc tccatgttg	2280	
gcctctccc tgtcagccc gaggccgta agtctgtct gctgggtgtg ctgccccgc	2340	
ctgctgctt caacccactg ctgtacctg tctcaacc ccacttccgg gatgacctc	2400	
ggcggcttcg gccccgcga ggggactcag ggccccagc ctatgtctcg gccggggagc	2460	
tggagaagag ctctgtgat tctaccagg ccttggtagc ctctctgat gtggatctca	2520	40
tctggaagc tctgaagct gggcggcccc ctgggctgga gacctatggc tccccctcag	2580	

igaccctcat ctccgtcag cagccagggg ccccaggct ggagggcagc cattgtgtag 2640  
 agccagaggg gaaccattt gggaacccc aacctccat ggatggagaa ctgctgctga 2700  
 gggcagaggg atctaccca gcaggtggag gcttgtcagg ggggtggcggc tttcagccct 2760  
 ctggcttggc ctttgettca cacgtg 2786

<210> 21

<211> 928

<212> PRT

<213> Human

<400> 21

His Cys Gln Glu Asp Gly Ile Met Leu Ser Ala Asp Cys Ser Glu Leu  
 5 10 15

Gly Leu Ser Ala Val Pro Gly Asp Leu Asp Pro Leu Thr Ala Tyr Leu  
 20 25 30

Asp Leu Ser Met Asn Asn Leu Thr Glu Leu Gln Pro Gly Leu Phe His  
 35 40 45

His Leu Arg Phe Leu Glu Glu Leu Arg Leu Ser Gly Asn His Leu Ser  
 50 55 60

His Ile Pro Gly Gln Ala Phe Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Lys Ile Leu  
 65 70 75 80

Met Leu Gln Asn Asn Gln Leu Gly Gly Ile Pro Ala Glu Ala Leu Trp  
 85 90 95

Glu Leu Pro Ser Leu Gln Ser Leu Arg Leu Asp Ala Asn Leu Ile Ser  
 100 105 110

Leu Val Pro Glu Arg Ser Phe Glu Gly Leu Ser Ser Leu Arg His Leu  
 115 120 125

Trp Leu Asp Asp Asn Ala Leu Thr Glu Ile Pro Val Arg Ala Leu Asn  
 130 135 140

Asn Leu Pro Ala Leu Gln Ala Met Thr Leu Ala Leu Asn Arg Ile Ser  
 145 150 155 160

10

20

30

40

His Ile Pro Asp Tyr Ala Phe Gln Asn Leu Thr Ser Leu Val Val Leu	
165	170
His Leu His Asn Asn Arg Ile Gln His Leu Gly Thr His Ser Phe Glu	
180	185
Gly Leu His Asn Leu Glu Thr Leu Asp Leu Asn Tyr Asn Lys Leu Gln	
195	200
Glu Phe Pro Val Ala Ile Arg Thr Leu Gly Arg Leu Gln Glu Leu Gly	10
210	215
Phe His Asn Asn Asn Ile Lys Ala Ile Pro Glu Lys Ala Phe Met Gly	
225	230
Asn Pro Leu Leu Gln Thr Ile His Phe Tyr Asp Asn Pro Ile Gln Phe	
245	250
Val Gly Arg Ser Ala Phe Gln Tyr Leu Pro Lys Leu His Thr Leu Ser	
260	265
Leu Asn Gly Ala Met Asp Ile Gln Glu Phe Pro Asp Leu Lys Gly Thr	
275	280
Thr Ser Leu Glu Ile Leu Thr Leu Thr Arg Ala Gly Ile Arg Leu Leu	
290	295
Pro Ser Gly Met Cys Gln Gln Leu Pro Arg Leu Arg Val Leu Glu Leu	
305	310
Ser His Asn Gln Ile Glu Glu Leu Pro Ser Leu His Arg Cys Gln Lys	30
325	330
Leu Glu Glu Ile Gly Leu Gln His Asn Arg Ile Trp Glu Ile Gly Ala	
340	345
Asp Thr Phe Ser Gln Leu Ser Ser Leu Gln Ala Leu Asp Leu Ser Trp	
355	360
Asn Ala Ile Arg Ser Ile His Pro Glu Ala Phe Ser Thr Leu His Ser	
370	375
Leu Val Lys Leu Asp Leu Thr Asp Asn Gln Leu Thr Thr Leu Pro Leu	40

385		390		395		400	
Ala Gly Leu Gly Gly Leu Met His Leu Lys Leu Lys Gly Asn Leu Ala							
		405		410		415	
Leu Ser Gln Ala Phe Ser Lys Asp Ser Phe Pro Lys Leu Arg Ile Leu							
		420		425		430	
Glu Val Pro Tyr Ala Tyr Gln Cys Cys Pro Tyr Gly Met Cys Ala Ser							
		435		440		445	10
Phe Phe Lys Ala Ser Gly Gln Trp Glu Ala Glu Asp Leu His Leu Asp							
		450		455		460	
Asp Glu Glu Ser Ser Lys Arg Pro Leu Gly Leu Leu Ala Arg Gln Ala							
		465		470		475	
Glu Asn His Tyr Asp Gln Asp Leu Asp Glu Leu Gln Leu Glu Met Glu							
		485		490		495	
Asp Ser Lys Pro His Pro Ser Val Gln Cys Ser Pro Thr Pro Gly Pro							20
		500		505		510	
Phe Lys Pro Cys Glu Tyr Leu Phe Glu Ser Trp Gly Ile Arg Leu Ala							
		515		520		525	
Val Trp Ala Ile Val Leu Leu Ser Val Leu Cys Asn Gly Leu Val Leu							
		530		535		540	
Leu Thr Val Phe Ala Gly Gly Pro Ala Pro Leu Pro Pro Val Lys Phe							
		545		550		555	30
Val Val Gly Ala Ile Ala Gly Ala Asn Thr Leu Thr Gly Ile Ser Cys							
		565		570		575	
Gly Leu Leu Ala Ser Val Asp Ala Leu Thr Phe Gly Gln Phe Ser Glu							
		580		585		590	
Tyr Gly Ala Arg Trp Glu Thr Gly Leu Gly Cys Arg Ala Thr Gly Phe							
		595		600		605	
Leu Ala Val Leu Gly Ser Glu Ala Ser Val Leu Leu Leu Thr Leu Ala							40
		610		615		620	

Ala Val Gln Cys Ser Val Ser Val Ser Cys Val Arg Ala Tyr Gly Lys			
625	630	635	640
Ser Pro Ser Leu Gly Ser Val Arg Ala Gly Val Leu Gly Cys Leu Ala			
	645	650	655
Leu Ala Gly Leu Ala Ala Ala Leu Pro Leu Ala Ser Val Gly Glu Tyr			
	660	665	670
Gly Ala Ser Pro Leu Cys Leu Pro Tyr Ala Pro Pro Glu Gly Gln Pro			
	675	680	685
Ala Ala Leu Gly Phe Thr Val Ala Leu Val Met Met Asn Ser Phe Cys			
	690	695	700
Phe Leu Val Val Ala Gly Ala Tyr Ile Lys Leu Tyr Cys Asp Leu Pro			
705	710	715	720
Arg Gly Asp Phe Glu Ala Val Trp Asp Cys Ala Met Val Arg His Val			
	725	730	735
Ala Trp Leu Ile Phe Ala Asp Gly Leu Leu Tyr Cys Pro Val Ala Phe			
	740	745	750
Leu Ser Phe Ala Ser Met Leu Gly Leu Phe Pro Val Thr Pro Glu Ala			
	755	760	765
Val Lys Ser Val Leu Leu Val Val Leu Pro Leu Pro Ala Cys Leu Asn			
	770	775	780
Pro Leu Leu Tyr Leu Leu Phe Asn Pro His Phe Arg Asp Asp Leu Arg			
785	790	795	800
Arg Leu Arg Pro Arg Ala Gly Asp Ser Gly Pro Leu Ala Tyr Ala Ala			
	805	810	815
Ala Gly Glu Leu Glu Lys Ser Ser Cys Asp Ser Thr Gln Ala Leu Val			
	820	825	830
Ala Phe Ser Asp Val Asp Leu Ile Leu Glu Ala Ser Glu Ala Gly Arg			
	835	840	845
Pro Pro Gly Leu Glu Thr Tyr Gly Phe Pro Ser Val Thr Leu Ile Ser			

10

20

30

40

850                      855                      860  
 Cys Gln Gln Pro Gly Ala Pro Arg Leu Glu Gly Ser His Cys Val Glu  
 865                      870                      875                      880  
 Pro Glu Gly Asn His Phe Gly Asn Pro Gln Pro Ser Met Asp Gly Glu  
                           885                      890                      895  
 Leu Leu Leu Arg Ala Glu Gly Ser Thr Pro Ala Gly Gly Gly Leu Ser  
                           900                      905                      910  
 Gly Gly Gly Gly Phe Gln Pro Ser Gly Leu Ala Phe Ala Ser His Val  
                           915                      920                      925

10

20

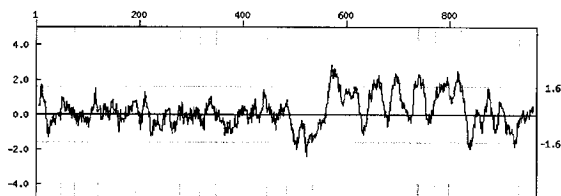
【図面の簡単な説明】

【図1】 TGR41Aの疎水性プロット図である。

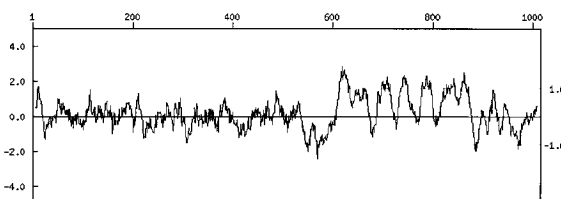
【図2】 TGR41A2の疎水性プロット図である。

【図3】 TGR41の臓器別発現分布である。横軸のHeartは心臓、Lungは肺、Spleenは脾臓、Liverは肝臓、Pancreasは膵臓、Leukocyteは白血球、Testisは精巣を示す。縦軸のcopy/beta-actin×10,000,000はアクトチンの発現量でTGR41の発現量の割算を行い、TGR41の発現量を補正した値を10<sup>7</sup>倍した値を示す。

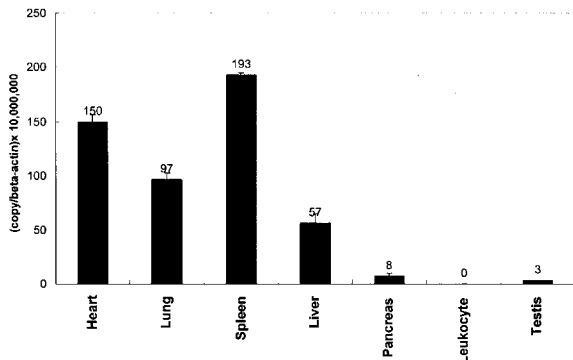
【図1】



【図2】



【図3】





## フロントページの続き

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 9/00	A 6 1 P 9/00	4 C 0 8 4
A 6 1 P 11/00	A 6 1 P 11/00	4 H 0 4 5
A 6 1 P 13/00	A 6 1 P 13/00	
A 6 1 P 15/00	A 6 1 P 15/00	
A 6 1 P 19/00	A 6 1 P 19/00	
A 6 1 P 25/00	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 29/00	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 31/00	A 6 1 P 31/00	
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 37/00	A 6 1 P 37/00	
C 0 7 K 14/705	C 0 7 K 14/705	
C 0 7 K 16/28	C 0 7 K 16/28	
C 1 2 N 1/15	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10	C 1 2 P 21/02	C
C 1 2 P 21/02	C 1 2 Q 1/68	A
C 1 2 Q 1/68	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/53	M
G 0 1 N 33/566	G 0 1 N 33/566	
	C 1 2 N 5/00	A

(72)発明者 伊藤 隆司

兵庫県神戸市東灘区住吉宮町6丁目2番7号 武田御影ハイム403号

(72)発明者 大瀧 徹也

茨城県つくば市春日1丁目7番地9 武田春日ハイツ802号

Fターム(参考) 2G045 AA34 AA35 AA40 BA11 BB50 DA12 DA13 DA14 DA36 FB02  
 FB03  
 4B024 AA01 AA11 BA63 CA04 CA05 CA06 CA09 CA12 DA02 DA06  
 EA04 GA11 GA18 GA19 HA03 HA08 HA12 HA14  
 4B063 QA01 QA18 QQ20 QQ53 QR08 QR14 QR32 QR38 QR41 QR42  
 QR55 QR62 QR82 QS12 QS25 QS34 QS39 QX01 QX07  
 4B064 AG20 CA02 CA19 CC24 DA01 DA13  
 4B065 AA26X AA93Y AB01 AC14 BA01 CA24 CA44 CA46  
 4C084 AA17 NA14 ZA022 ZA362 ZA592 ZA662 ZA812 ZA962 ZB012 ZB112  
 ZB262 ZB312 ZC022 ZC212  
 4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 CA40 DA50 DA75 DA86 EA21  
 EA22 EA23 EA25 EA26 EA28 EA50 FA72 FA74

专利名称(译)	新型G蛋白偶联受体蛋白及其DNA		
公开(公告)号	<a href="#">JP2004049213A</a>	公开(公告)日	2004-02-19
申请号	JP2002321021	申请日	2002-11-05
申请(专利权)人(译)	武田化学工业有限公司		
[标]发明人	池田夏樹 三輪真敬 伊藤隆司 大瀧徹也		
发明人	池田 夏樹 三輪 真敬 伊藤 隆司 大瀧 徹也		
IPC分类号	G01N33/50 A61K45/00 A61P1/00 A61P3/00 A61P5/00 A61P9/00 A61P11/00 A61P13/00 A61P15/00 A61P19/00 A61P25/00 A61P29/00 A61P31/00 A61P35/00 A61P37/00 C07K14/705 C07K16/28 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12P21/02 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/566		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K45/00 A61P1/00 A61P3/00 A61P5/00 A61P9/00 A61P11/00 A61P13/00 A61P15/00 A61P19/00 A61P25/00 A61P29/00 A61P31/00 A61P35/00 A61P37/00 C07K14/705 C07K16/28 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02.C C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566 C12N5/00.A C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A C12N5/00.101 C12N5/10		
F-TERM分类号	2G045/AA34 2G045/AA35 2G045/AA40 2G045/BA11 2G045/BB50 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/FB02 2G045/FB03 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA63 4B024/CA04 4B024/CA05 4B024/CA06 4B024/CA09 4B024/CA12 4B024/DA02 4B024/DA06 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/GA18 4B024/GA19 4B024/HA03 4B024/HA08 4B024/HA12 4B024/HA14 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QQ20 4B063/QQ53 4B063/QR08 4B063/QR14 4B063/QR32 4B063/QR38 4B063/QR41 4B063/QR42 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QR82 4B063/QS12 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QS39 4B063/QX01 4B063/QX07 4B064/AG20 4B064/CA02 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA26X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA01 4B065/CA24 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA17 4C084/NA14 4C084/ZA022 4C084/ZA362 4C084/ZA592 4C084/ZA662 4C084/ZA812 4C084/ZA962 4C084/ZB012 4C084/ZB112 4C084/ZB262 4C084/ZB312 4C084/ZC022 4C084/ZC212 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA50 4H045/DA75 4H045/DA86 4H045/EA21 4H045/EA22 4H045/EA23 4H045/EA25 4H045/EA26 4H045/EA28 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/FA74		
代理人(译)	高桥修一 叻关口		
优先权	2001340189 2001-11-06 JP 2002159448 2002-05-31 JP		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

要解决的问题：提供可用于筛选激动剂/拮抗剂等的新蛋白质。 解决方案：本发明涉及衍生自人或或其盐的蛋白质，编码该蛋白质的DNA，测定该蛋白质配体的方法，改变配体和蛋白质之间结合特性的化合物的筛选方法/筛选试剂盒，所得化合物或其盐。[效果]本发明的人源蛋白质或编码其的DNA可以通过（1）确定本发明蛋白质的配体，（2）预防和/或治疗与本发明蛋白质功能障碍相关的疾病而获得。试剂，（3）用于改变本发明蛋白质与配体之间的结合性质的化合物等。【选择图】无

(5) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テ-マコード (参考)
<b>C 1 2 N 15/00</b>	C 1 2 N 15/00	Z N A A 2 G O 4 5
<b>A 6 1 K 45/00</b>	A 6 1 K 45/00	4 B O 2 4
<b>A 6 1 P 1/00</b>	A 6 1 P 1/00	4 B O 6 3
<b>A 6 1 P 3/00</b>	A 6 1 P 3/00	4 B O 6 4
<b>A 6 1 P 5/00</b>	A 6 1 P 5/00	4 B O 6 5
審査請求 未請求 請求項の数 36 O L (全 97 頁) 最終頁		

(21) 出願番号	特願2002-321021 (P2002-321021)	(71) 出願人	000002934 武田薬品工業株式会社
(22) 出願日	平成14年11月5日 (2002. 11. 5)		大阪府大阪市中央区道修町四丁目1-
(31) 優先権主張番号	特願2001-340189 (P2001-340189)	(74) 代理人	100114041 弁理士 高橋 秀一
(32) 優先日	平成13年11月6日 (2001. 11. 6)	(74) 代理人	100106323 弁理士 関口 陽
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)	(72) 発明者	池田 夏樹 茨城県つくば市松代3丁目12番地 田松代レジデンス414号
(31) 優先権主張番号	特願2002-159448 (P2002-159448)	(72) 発明者	三輪 真敬 茨城県つくば市松代3丁目12番地 田松代レジデンス513号
(32) 優先日	平成14年5月31日 (2002. 5. 31)		
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		