

(19)日本国特許庁(J P)

(12) 公表特許公報(A) (11)特許出願公表番号

特表2003 - 528633

(P2003 - 528633A)

(43)公表日 平成15年9月30日(2003.9.30)

(51) Int.Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マコード* (参考)
C 1 2 N 15/09	ZNA	A 6 1 K 45/00	2 G 0 4 5
A 6 1 K 38/00		A 6 1 P 1/04	4 B 0 2 4
45/00		1/12	4 B 0 6 3
A 6 1 P 1/04		1/14	4 B 0 6 4
1/12		1/16	4 B 0 6 5

審査請求 未請求 予備審査請求(全152数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001 - 571767(P2001 - 571767)

(86)(22)出願日 平成13年3月29日(2001.3.29)

(85)翻訳文提出日 平成13年11月28日(2001.11.28)

(86)国際出願番号 PCT/US01/10436

(87)国際公開番号 W001/072836

(87)国際公開日 平成13年10月4日(2001.10.4)

(31)優先権主張番号 60/193,051

(32)優先日 平成12年3月29日(2000.3.29)

(33)優先権主張国 米国(US)

(31)優先権主張番号 60/195,155

(32)優先日 平成12年4月6日(2000.4.6)

(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 インサイト・ゲノミックス・インコーポレイテッド

アメリカ合衆国カリフォルニア州94304・パロアルト・ポータードライブ 3160

(72)発明者 ポリッキー、ジェニファー・エル

アメリカ合衆国カリフォルニア州95118・サンノゼ・ジャービスコート 1511

(72)発明者 トリボレー、キャサリン・エム

アメリカ合衆国カリフォルニア州94107・サンフランシスコ・#5・テネシーストリート 1121

(74)代理人 弁理士 大島 陽一

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 Gタンパク質結合受容体

(57)【要約】

本発明は、ヒトGタンパク質結合受容体(GCREC)と、GCRECを同定しコードするポリヌクレオチドとを提供する。本発明はまた、発現ベクター、宿主細胞、抗体、アゴニスト及びアンタゴニストを提供する。更に、本発明は、GCRECの発現に関連する疾患を診断、治療または予防する方法を提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 以下の(a)乃至(d)を有する群から選択した実質上単離されたポリペプチド。

(a) 配列番号1乃至6を有する群から選択したポリペプチド

(b) 配列番号1乃至6を有する群から選択したアミノ酸配列と少なくとも90%が同一であるようなアミノ酸配列を有する天然のポリペプチド

(c) 配列番号1乃至6を有する群から選択したアミノ酸配列を有するポリペプチドの生物学的活性断片

(d) 配列番号1乃至6を有する群から選択したアミノ酸配列を有するポリペプチドの免疫抗原性断片

【請求項2】 配列番号1乃至6を有する群から選択した請求項1に記載の単離されたポリペプチド。

【請求項3】 請求項1のポリペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチド。

【請求項4】 請求項2のポリペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチド。

【請求項5】 配列番号7乃至12を有する群から選択した請求項4に記載の単離されたポリヌクレオチド。

【請求項6】 請求項3に記載のポリヌクレオチドに機能的に結合したプロモーター配列を含む組換えポリヌクレオチド。

【請求項7】 請求項6に記載の組換えポリヌクレオチドを用いて形質転換した細胞。

【請求項8】 請求項6に記載の組換えポリヌクレオチドを含む遺伝形質転換体。

【請求項9】 請求項1に記載のポリペプチドを製造する方法であって、

(a) 組換えポリヌクレオチドを用いて形質転換した細胞を前記ポリペプチドの発現に適した条件下で培養する過程と、

(b) そのように発現した前記ポリペプチドを受容する過程とからなり、

前記組換えポリヌクレオチドが、請求項1に記載の前記ポリペプチドをコード

するポリヌクレオチドに機能的に結合したプロモーター配列を有することを特徴とする方法。

【請求項10】 請求項1に記載のポリペプチドと特異結合するような単離された抗体。

【請求項11】 以下の(a)乃至(d)を有する群から選択した実質上単離されたポリヌクレオチド。

(a) 配列番号7乃至12を有する群から選択したポリヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチド

(b) 配列番号7乃至12を有する群から選択したポリヌクレオチド配列と少なくとも90%が同一であるような天然のポリヌクレオチド

(c) (a)のポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチド

(d) (b)のポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチド

(e) (a)~(d)のRNA等価物

【請求項12】 請求項11に記載のポリヌクレオチドの少なくとも60の連続したヌクレオチドを含む単離されたポリヌクレオチド。

【請求項13】 請求項11に記載のポリヌクレオチドの配列を有する標的ポリヌクレオチドをサンプル中から検出する方法であって、

(a) 前記サンプル中の前記標的ポリヌクレオチドに相補的な配列を有する少なくとも20の連続したヌクレオチドを含むプローブを用いて前記サンプルをハイブリダイズする過程と、

(b) 前記ハイブリダイゼーション複合体の存在・不存在を検出し、該複合体が存在する場合にはオプションでその量を検出する過程からなり、

前記プローブと前記標的ポリヌクレオチドの間でハイブリダイゼーション複合体が形成されるような条件下で、前記プローブが前記標的ポリヌクレオチドに特異的にハイブリダイズすることを特徴とする方法。

【請求項14】 前記プローブが少なくとも60の連続したヌクレオチドを含むことを特徴とする請求項13に記載の方法。

【請求項15】 請求項11に記載のポリヌクレオチドの配列を有する標的ポリヌクレオチドをサンプル中から検出する方法であって、

(a) ポリメラーゼ連鎖反応増幅を用いて前記標的ポリヌクレオチドまたはその断片を増幅する過程と、

(b) 前記標的ポリヌクレオチドまたはその断片の存在・不存在を検出し、該標的ポリヌクレオチドまたはその断片が存在する場合にはオプションでその量を検出する過程を含むことを特徴とする方法。

【請求項16】 有効量の請求項1のポリペプチドと、薬剤として許容できる賦形剤とを有することを特徴とする成分。

【請求項17】 前記ポリペプチドが、配列番号1乃至6を有する群から選択したアミノ酸配列を含むことを特徴とする請求項16に記載の成分。

【請求項18】 機能性GCRECの発現低下に関連する疾患又は病状を治療する方法であって、そのような治療を必要とする患者に対して請求項16に記載の成分を投与する過程を含むことを特徴とする方法。

【請求項19】 請求項1に記載のポリペプチドのアゴニストとして有効性を確認するために化合物をスクリーニングする方法であって、

(a) 請求項1に記載のポリペプチドを含むサンプルを化合物に曝す過程と、

(b) 前記サンプル中のアゴニスト活性を検出する過程とを含むことを特徴とする方法。

【請求項20】 請求項19に記載の方法によって同定したアゴニスト化合物と、薬剤として許容できる賦形剤とを含むことを特徴とする成分。

【請求項21】 機能性GCRECの発現低下に関連する疾患又は病状を治療する方法であって、そのような治療を必要とする患者に対して請求項20に記載の成分を投与する過程を含むことを特徴とする方法。

【請求項22】 請求項1に記載のポリペプチドのアンタゴニストとして有効性を確認するために化合物をスクリーニングする方法であって、

(a) 請求項1に記載のポリペプチドを含むサンプルを化合物に曝す過程と、

(b) 前記サンプル中のアンタゴニスト活性を検出する過程とを含むことを特徴とする方法。

【請求項23】 請求項22に記載の方法によって同定したアンタゴニスト化合物と、薬剤として許容できる賦形剤とを含むことを特徴とする成分。

【請求項24】 機能性GCRECの過剰発現に関連する疾患又は病状の治療方法であって、そのような治療を必要とする患者に対して請求項23に記載の成分を投与する過程を含むことを特徴とする方法。

【請求項25】 請求項1に記載のポリペプチドに特異結合する化合物をスクリーニングする方法であって、

(a) 適切な条件下で請求項1に記載のポリペプチドを少なくとも1つの試験化合物に結合させる過程と、

(b) 請求項1に記載のポリペプチドの試験化合物との結合を検出し、それによって請求項1に記載のポリペプチドに特異結合する化合物を同定する過程とを含むことを特徴とする方法。

【請求項26】 請求項1に記載のポリペプチドの活性を調節する化合物をスクリーニングする方法であって、

(a) 請求項1に記載のポリペプチドの活性が許容された条件下で、請求項1に記載のポリペプチドを少なくとも1つの試験化合物に結合させる過程と、

(b) 請求項1に記載のポリペプチドの活性を試験化合物の存在下で算定する過程と、

(c) 試験化合物の存在下での請求項1に記載のポリペプチドの活性を、試験化合物の不存在下での請求項1に記載のポリペプチドの活性と比較する過程とを含み、

試験化合物の存在下での請求項1に記載のポリペプチドの活性の変化が、請求項1に記載のポリペプチドの活性を調節する化合物を標示することを特徴とする方法。

【請求項27】 請求項5に記載の配列を有する標的ポリヌクレオチドの変異発現の有効性を確認するために化合物をスクリーニングする方法であって、

(a) 前記標的ポリヌクレオチドの発現に適した条件下で、該標的ポリヌクレオチドを含むサンプルを化合物に曝す過程と、

(b) 前記標的ポリヌクレオチドの変異発現を検出する過程と、

(c) 可変量の前記化合物の存在下と前記化合物の不存在下で、前記標的ポリヌクレオチドの発現を比較する過程とを含むことを特徴とする方法。

【請求項28】 試験化合物の毒性を算定する方法であって、

(a) 核酸を含む生物学的サンプルを前記試験化合物で処理する過程と、

(b) 請求項11に記載のポリヌクレオチドの少なくとも20の連続したヌクレオチドを含むプローブと、請求項11に記載のポリヌクレオチドまたはその断片のポリヌクレオチド配列を有する前記生物学的サンプルの標的ポリヌクレオチドとの間に、特定のハイブリタイゼーション複合体が形成されるような条件下で、前記処理されたサンプルの核酸を前記プローブでハイブリタイズする過程と、

(c) 前記ハイブリタイゼーション複合体の量を定量する過程と、

(d) 前記処理された生物学的サンプル中の前記ハイブリタイゼーション複合体の量を、処理されていない生物学的サンプル中の前記ハイブリタイゼーション複合体の量と比較する過程とを含み、

前記処理された生物学的サンプル中の前記ハイブリタイゼーション複合体の量の差が、前記試験化合物の毒性を標示することを特徴とする方法。

【請求項29】 生物学的サンプル中のGCRECの発現に関連する症状または疾患に対する診断試験法であって、

(a) 前記抗体が前記ポリペプチドに結合し、抗体とポリペプチドとの複合体が形成されるのに適した条件下で、前記生物学的サンプルを請求項10に記載の抗体と結合する過程と、

(b) 前記複合体を検出する過程とを含み、

前記複合体の存在が、前記生物学的サンプル中の前記ポリペプチドの存在と相関することを特徴とする方法。

【請求項30】 前記抗体が、

(a) キメラ抗体

(b) 単鎖抗体

(c) Fab断片

(d) F(ab')₂断片

(e) ヒト化抗体

のいずれかであることを特徴とする請求項10に記載の抗体。

【請求項31】 請求項10に記載の抗体と、許容できる賦形剤とを含む

化合物。

【請求項32】 被検者のGCRECの発現に関連する病状又は疾患の診断方法であって、請求項31に記載の化合物の有効量を前記被検者に投与する過程を含むことを特徴とする方法。

【請求項33】 前記抗体が標識されることを特徴とする請求項31に記載の化合物。

【請求項34】 被検者のGCRECの発現に関連する病状又は疾患の診断方法であって、請求項33に記載の化合物の有効量を前記被検者に投与する過程を含むことを特徴とする方法。

【請求項35】 請求項10に記載の抗体の特異性を有するポリクローナル抗体を調製する方法であって、

(a) 抗体反応を誘発する条件下で、配列番号1乃至6を有する群から選択したアミノ酸配列またはその免疫抗原性断片を含むポリペプチドを用いて動物を免疫化する過程と、

(b) 前記動物から抗体を単離する過程と、

(c) 前記単離された抗体をポリペプチドでスクリーニングし、それによって、配列番号1乃至6を有する群から選択したアミノ酸配列を有するポリペプチドに特異結合するようなポリクローナル抗体を同定する過程とを含むことを特徴とする方法。

【請求項36】 請求項35に記載の方法で産出した抗体。

【請求項37】 請求項36に記載の抗体及び適切なキャリアを含む化合物。

【請求項38】 請求項10に記載の抗体の特異性を有する抗体を用いてモノクローナル抗体を製造する方法であって、

(a) 抗体反応を誘発する条件下で、配列番号1乃至6を有する群から選択したアミノ酸配列またはその免疫抗原性断片を含むポリペプチドを用いて動物を免疫化する過程と、

(b) 前記動物から抗体産出細胞を単離する過程と、

(c) 不滅の細胞を用いて前記抗体産出細胞を融合して、モノクローナル抗体

を産出するハイブリドーマ細胞を形成する過程と、

(d) 前記ハイブリドーマ細胞を培養する過程と、

(e) 配列番号1乃至6を有する群から選択したアミノ酸配列を有するポリペプチドに特異結合するような前記培養モノクローナル抗体から単離する過程とを含むことを特徴とする方法。

【請求項39】 請求項38に記載の方法で産出したモノクローナル抗体。

【請求項40】 請求項39に記載の抗体及び適切なキャリアを含む化合物。

【請求項41】 Fab発現ライブラリのスクリーニングにより前記抗体を産出することを特徴とする請求項10に記載の抗体。

【請求項42】 組換え免疫グロブリンライブラリのスクリーニングにより前記抗体を産出することを特徴とする請求項10に記載の抗体。

【請求項43】 配列番号1乃至6を有する群から選択したアミノ酸配列を有するポリペプチドを検出する方法であって、

(a) 前記抗体と前記ポリペプチドの特異結合を許容する条件下で、サンプルを用いて請求項10に記載の抗体をインキュベートする過程と、

(b) 特異結合を検出する過程とを含み、

該特異結合が、配列番号1乃至6を有する群から選択したアミノ酸配列を有するポリペプチドがサンプル中に存在することを標示することを特徴とする方法。

【請求項44】 配列番号1乃至6を有する群から選択したアミノ酸配列を有するポリペプチドを精製する方法であって、

(a) 前記抗体と前記ポリペプチドの特異結合を許容する条件下で、サンプルを用いて請求項10に記載の抗体をインキュベートする過程と、

(b) 前記サンプルから前記抗体を分離し、配列番号1乃至6を有する群から選択したアミノ酸配列を有する精製ポリペプチドを得る過程とを含むことを特徴

【請求項45】 配列番号1のアミノ酸配列を有する請求項1に記載のポリペプチド。

【請求項46】 配列番号2のアミノ酸配列を有する請求項1に記載のポ

リペプチド。

【請求項47】 配列番号3のアミノ酸配列を有する請求項1に記載のポリペプチド。

【請求項48】 配列番号4のアミノ酸配列を有する請求項1に記載のポリペプチド。

【請求項49】 配列番号5のアミノ酸配列を有する請求項1に記載のポリペプチド。

【請求項50】 配列番号6のアミノ酸配列を有する請求項1に記載のポリペプチド。

【請求項51】 配列番号7のポリヌクレオチド配列を有する請求項11に記載のポリヌクレオチド。

【請求項52】 配列番号8のポリヌクレオチド配列を有する請求項11に記載のポリヌクレオチド。

【請求項53】 配列番号9のポリヌクレオチド配列を有する請求項11に記載のポリヌクレオチド。

【請求項54】 配列番号10のポリヌクレオチド配列を有する請求項11に記載のポリヌクレオチド。

【請求項55】 配列番号11のポリヌクレオチド配列を有する請求項11に記載のポリヌクレオチド。

【請求項56】 配列番号12のポリヌクレオチド配列を有する請求項11に記載のポリヌクレオチド。

【発明の詳細な説明】**【0001】****(技術分野)**

本発明は、Gタンパク質結合受容体の核酸配列及びアミノ酸配列に関し、細胞増殖異常、神経障害、心血管障害、胃腸障害、自己免疫/炎症疾患及び代謝障害並びにウイルス性感染症の診断、治療並びに予防におけるこれらの配列の利用と、Gタンパク質結合受容体の核酸配列及びアミノ酸配列の発現における外因性化合物の効果の算定におけるこれらの配列の利用に関する。

【0002】**(発明の背景)**

シグナル伝達は、それによって細胞が細胞外シグナルに応答するような一般的过程である。原形質膜でのシグナル伝達は、ホルモン、神経伝達物質または成長因子などのシグナル分子が細胞膜受容体することから開始する。受容体は、従って活性化されており、転写因子などの細胞内標的分子の活性化で終了する細胞内の生化学的カスケードを誘発する。シグナル伝達のこのプロセスは、細胞増殖、分化及び遺伝子転移を含む全てのタイプの細胞機能を制御する。同定された遺伝子の最大ファミリーの1つによりコードされたGタンパク質結合受容体(GPCR)は、原形質膜での細胞外シグナルの伝達において中心的役割を果たす。GPCRが治療の標的として成功であることは歴史的に証明されている。

【0003】

GPCRは、まとめて逆平行アルファ()螺旋の束を形成するような7つの疎水性膜貫通ドメインの存在により特徴付けられた完全な膜タンパク質である。GPCRのサイズは、400以下から1000以上のアミノ酸に及ぶ(Strosberg, A.D. (1991) Eur. J. Biochem. 196:1-10、Coughlin, S.R. (1994) Curr. Opin. Cell Biol. 6:191-197)。GPCRのアミノ末端は、細胞外にあり、長さが可変で、多くの場合グリコシル化される。カルボキシル末端は、細胞質であり、通常はリン酸化される。細胞外ループは、細胞内ループと交互に現れ、膜貫通ドメインを結合する。第2及び第3細胞外ループを結合するシステインジスルフィド架橋は、アゴニスト及びアンタゴニストと相互に作用し得る。GPCRの最も保存されたドメ

インは、膜貫通ドメイン及び最初の2つの細胞質ループである。膜貫通ドメインは、受容体の構造的及び機能的特徴をある程度明らかにする。殆どの場合、螺旋の束はリガンド結合ポケットを形成する。細胞外N末端セグメント即ち1若しくは数個の3細胞外ループは、リガンド結合にも関与し得る。リガンド結合は、受容体の細胞内部分で構造変化を誘導することにより受容体を活性化する。同様に、活性化された受容体の大きな第3細胞内ループは、ヘテロ三量体のグアニンヌクレオチド結合Gタンパク質複合体と相互作用し、この複合体はサイクリックAMP (cAMP)、ホスホリパーゼC及びイノシトール三リン酸などの第2メッセンジャーの活性化を含む細胞内シグナル伝達活性と、イオンチャネルタンパク質で活性化されたGPCRの相互作用とを更に仲介する (Watson, S. and S. Arkininstall (1994) *The G-Protein Linked Receptor Facts Book*, Academic Press, San Diego CA, pp. 2-6、Bolander, F.F. (1994) *Molecular Endocrinology*, Academic Press, San Diego CA, pp. 162-176、Baldwin, J.M. (1994) *Curr. Opin. Cell Biol.* 6:180-190等を参照)。

【0004】

GPCRには、知覚性シグナルメディエータ (例えば光及び嗅覚刺激性分子) の受容体、アデノシン、アミノ酪酸 (GABA)、肝細胞成長因子、メラノコルチン、ニューロペプチドY、オピオイドペプチド、オプシン、ソマトスタチン、タキキニン、血管作用性腸管ポリペプチドファミリー及びバソプレシン、生体アミン (例えばドーパミン、エピネフリン及びノルエピネフリン、ヒスタミン、グルタミン酸 (向代謝性作用)、アセチルコリン (ムスカリン様作用) 及びセロトニン)、ケモカイン、炎症の脂質メディエータ (例えばプロスタグランジン及びプロスタノイド、血小板活性化因子及びロイコトリエン) 及びペプチドホルモン (例えばボンベシン、ブラジキニン、カルシトニン、C5aアナフィラトキシン、エンドセリン、卵胞刺激ホルモン (FSH)、ゴナドトロピン放出ホルモン (GnRH)、ニューロキニン及び甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン (TRH) 及びオキシトシン) がある。同定された刺激に対する受容体として作用するGPCRは、オーファン受容体として知られている。

【0005】

GPCRファミリーの多様性は、別のスプライシングによって更に増加する。多くのGPCR遺伝子にはイントロンが含まれ、スプライシング変異体が同定されるそのような受容体は現在では30を超えている。変異の数が最も大きいのは、タンパク質C末端においてである。細胞外ループまたは膜貫通ドメインは頻度が低いものに対して、N末端及び細胞質ループ変異体もまた高頻度である。変異が発生し得るような部位を2以上有する受容体もある。スプライシング変異体は、分布、シグナル伝達、結合、制御及びリガンド結合プロフィールに観察される差異に基づき、機能的に異なる外観を呈する (Kilpatrick, G.J. ら (1999) Trends Pharmacol. Sci. 20:294-301)。

【0006】

GPCRは、3つの主要なサブファミリー即ちロドプシン様、セクレチン様及び向代謝性グルタミン酸受容体サブファミリーに分けることができる。GPCRサブファミリーのメンバーは、同様の機能及び特徴的な膜7回貫通構造を共有しているが、アミノ酸配列は互いに異なる。最大のファミリーはロドプシン様GPCRを有し、ロドプシン様GPCRはホルモン、神経伝達物質及び光を含む多様な細胞外シグナルを伝送する。ロドプシンは、動物の網膜に見られる感光性GPCRである。脊椎動物では、ロドプシン分子は光受容体(杆体)細胞に見られる膜性スタックに包埋されている。各ロドプシン分子は、原形質膜ナトリウムチャンネルの閉鎖に導くcGMPレベルの低下を誘発することにより光の光子に反応する。この方法で、可視シグナルが神経インパルスに変換される。その他のロドプシン様GPCRは、神経伝達物質への反応に直接関与する。このようなGPCRには、アドレナリンに対する受容体(アドレナリン受容体)、アセチルコリンに対する受容体(ムスカリン様受容体)、アデノシンに対する受容体、ガラニンに対する受容体及びグルタミン酸に対する受容体(N-メチル-D-アスパラギン酸/NMDA受容体)がある (Watson, S. and S. Arkininstall (1994) The G-Protein Linked Receptor Facts Book, Academic Press, San Diego CA, pp. 7-9, 19-22, 32-35, 130-131, 214-216, 221-222、Habert-Ortoli, E. ら (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:9780-9783にレビューされている)。

【0007】

ガラニン受容体は、インスリン、アセチルコリン、セロトニン及びノルアドレナリンの分泌を阻害する神経内分泌ペプチドガラニンの活性を仲介し、プロラクチン及び成長ホルモンの放出を刺激する。ガラニン受容体は、疾患、痛み、うつ病及びアルツハイマー病のフィードに関与している (Kask, K. ら (1997) *Life Sd.* 60:1523-1533)。その他の神経系ロドプシン様GPCRIは、発達及び神経病理学において役割を有するように見えるリゾホスファチジン酸その他のリゾホスファチドに対する受容体の成長ファミリーを含む (Chun, J. ら (1999) *Cell Biochem. Biophys.* 30:213-242)。

【0008】

GPCRの最大のサブファミリーである嗅覚受容体もまた、ロドプシン様GPCRファミリーのメンバーである。この受容体は、臭気物質シグナルの伝達により機能する。異なる臭気を区別するためには、複数の異なる嗅覚受容体が必要である。各嗅覚知覚ニューロンは1種類の嗅覚受容体しか発現せず、異なる受容体を発現するニューロンの異なる空間域は鼻の経路に見られる。例えば、ラット脳ライブラリから単離したRA1c受容体は、脳の非常に異なる領域及び画定された嗅覚上皮の区域への発現に限定されていることを示していた (Raining, K. ら (1998) *受容体 Channels* 6:141-151)。しかしながら、嗅覚様受容体の発現は嗅覚組織に限定されない。例えば、典型的なGPCR特性を有する嗅覚様受容体をコードする3つのラット遺伝子は、味覚及び嗅覚組織のみならず男性生殖組織においても発現パターンを示す (Thomas, M.B. ら (1996) *Gene* 178:1-5)。

【0009】

セクレチン様GPCRサブファミリーのメンバーは、セクレチン、カルシトニン、グルカゴン、成長ホルモン放出ホルモン、副甲状腺ホルモンなどのペプチドホルモン及び血管作用性小腸ペプチドをリガンドとして有する。例えば、セクレチン受容体は、膵臓及び小腸で酵素及び鉄の分泌を刺激するペプチドホルモンであるセクレチンに対応する (前出のWatson, pp. 278-283)。セクレチン受容体は、長さが約450アミノ酸であり、胃腸細胞の原形質膜に見られる。セクレチンがその受容体に結合することにより、cAMPの産出が誘発される。

【0010】

炎症及び免疫反応に結びつけられるセクレチン様GPCRの例には、EGFモジュール含有ムシク様ホルモン受容体 (Emr1) 及びCD97受容体タンパク質がある。これらのGPCRは、最近特徴付けられたEGF-TM7受容体サブファミリーのメンバーである。これら膜7回貫通ホルモン受容体は、in vivoにヘテロ二量体として存在し、3から7の潜在的カルシウム結合EGF様モチーフを含む。CD97は、主に白血球で発現し、活性化されたB及びT細胞上で顕著に上方制御される (McKnight, A.J. and S. Gordon (1998) J. Leukoc. Biol. 63:271-280)。

【0011】

第3 GPCRサブファミリーは、向代謝性グルタミン酸受容体ファミリーである。グルタミン酸は、中枢神経系の主要な興奮性神経伝達物質である。向代謝性グルタミン酸受容体は、細胞内エフェクターの活性を調節し、長期の増強作用に関与する (前出のWatson, p.130)。Ca²⁺検出受容体は、カルシウムイオンの細胞外濃度の変化を検出するものであり、カルシウム結合に関与し得る酸性アミノ酸のクラスターを含む大きな細胞外ドメインを有する。向代謝性グルタミン酸受容体ファミリーには、フェロモン受容体、GABA_B受容体及び味覚受容体もある。

【0012】

その他のGPCRのサブファミリーには、線虫及び*Caenorhabditis briggsae*に見られる化学受容体遺伝子の2つの群があり、これらは哺乳動物の嗅覚受容体遺伝子に直接関係している。細胞膜の交配因子への反応に関与している酵母フェロモン受容体STE2及びSTE3は、個々の細胞の集合を調整し、複数の発達の制御遺伝子の発現を制御すると考えられている粘菌即ち細胞性粘菌からのcAMP受容体と同様に自身の膜7回貫通サインを有する。

【0013】

GPCR突然変異は、機能または恒常的活性化の減少を招き得るものであり、多数のヒト疾患に関係してきた (前出のCoughlin)。例えば、色素性網膜炎はロドプシン遺伝子の突然変異から発生し得る。更に、甲状腺刺激ホルモン受容体の体細胞活性化突然変異は、機能亢進甲状腺アデノーマス (adenomas) の原因となることが報告されており、恒常的活性化に感受性が高い或るGPCRが癌原遺伝子のよう
に振舞い得ることを示唆している (Parma, J. ら (1993) Nature 365:649-651

)。以下のリガンド即ち黄体形成ホルモン（思春期早発症）、バソプレシン V_2 （X連鎖の腎原発性糖尿病）、グルカゴン（糖尿病及び高血圧）、カルシウム（副甲状腺機能亢進症、低カルシウム尿症(hypocalcuria)、高カルシウム血症）、副甲状腺ホルモン（短肢小人症）、f33-アドレナリン受容体（肥満症、非インスリン依存型糖尿病）、成長ホルモン放出ホルモン（小人症）及び副腎皮質刺激ホルモン（糖質コルチコイド欠乏症）に対するGPCR受容体には、ヒトの疾患に関連する突然変異も含まれる（Wilson, S. ら（1998）Br. J. Pharmacol. 125:1387-.1392、Stadel, J.M. ら（1997）Trends Pharmacol. Sci. 18:430-437）。GPCRは、抑うつ症、分裂病、不眠症、高血圧、不安、ストレス、腎不全その他幾つかの心血管障害にも関与している（Horn, F. and G. Vriend（1998）J. Mol. Med. 76:464-468）。

【0014】

更に、GPCRの活性化及び阻害に直接作用する数百の新薬が過去20年のうちに認知されてきた。これらの薬の治療標的は、癌、骨粗鬆症、子宮内膜症のみならず心血管障害、胃腸障害、中枢神経系疾患を含めた幅広い疾病及び疾患に及ぶ（前出のWilson、同Stadel）。例えば、ドーパミンアゴニストのLドーパはパーキンソン病の治療に用いられ、ドーパミンアンタゴニストは精神分裂病及び初期段階のハンチントン病の治療に用いられる。アドレナリン受容体のアゴニスト及びアンタゴニストは、喘息、高血圧その他の心血管障害及び不安の治療に用いられてきた。ムスカリン様アゴニストは、緑内障及び頻脈の治療に用いられ、セロトニン5HT $1D$ アンタゴニストは片頭痛に対して用いられ、ヒスタミンH 1 アンタゴニストはアレルギー性及びアナフィラキシー性反応、枯草熱、痒み及び動揺病に対して用いられる（前出のHorn）。

【0015】

最近の調査では、糖尿病、肥満症及び骨粗鬆症を含む代謝障害の治療においてGPCRを将来的に使用する可能性を示唆している。例えば、腎原発性糖尿病の原因となる突然変異体 $V2$ バソプレシン受容体は、突然変異を含む領域に及ぶC末端 $V2$ 受容体ペプチドの同時発現により *in vitro* で機能的に救出され得る。これは疾病治療の新規なストラテジーを示唆する（Schoneberg, T. ら（1996）EMBO 1. 15:

1283-1291)。メラノコルチン4受容体(MC4R)における突然変異は、ヒトの体重調節及び肥満症に結びつけられる。バソプレシンV2受容体の突然変異体により、これらMC4Rの突然変異体は原形質膜への輸送中に正常値に満たないので(Ho, G. and R.G. MacKenzie (1999) J. Biol. Chem. 274:35816-35822)、従って同様のストラテジーで処理し得る。副甲状腺ホルモン(PTH)のための1型受容体は、血流中のカルシウムホメオスタシスのPTH依存型制御を仲介するGPCRである。PTH/受容体の相互作用の研究は、骨粗鬆症の治療のための新規なPTH受容体リガンドの開発を可能にし得る(Mannstadt, M. ら (1999) Am. J. Physiol. 277:F665-F675)。

【0016】

GPCRのケモカイン受容体基は、炎症及び感染症の治療に役立つ可能性を有する(レビューは、Locati, M. and P.M. Murphy (1999) Annu. Rev. Med. 50:425-440を参照のこと)。ケモカインは、白血球輸送、造血及び血管形成の制御において細胞内シグナルとして作用する小ポリペプチドである。マウスにおける種々のケモカイン受容体の標的分裂は、異常炎症において及び多発性硬化症などの自己免疫異常において役割を演じるこれらの受容体を示す。ケモカイン受容体は、ヘルペスウイルス及びヒト免疫不全症ウイルス(HIV-1)を含む感染を促進する感染媒介物にも利用される。ケモカイン受容体CCR5の短縮変種は、HIV-1によるT細胞の感染に対する補助受容体として作用するものであり、AIDSに対する抵抗力を生じさせ、CCR5のアンタゴニストがAIDSの発達予防に有用たり得ることを示唆する。

【0017】

新たなGタンパク質結合受容体及びそれをコードするポリヌクレオチドの発見は、細胞増殖異常、神経障害、心血管障害、胃腸障害、自己免疫/炎症疾患及び代謝障害並びにウイルス性感染症の診断、治療並びに予防と、Gタンパク質結合受容体の核酸配列及びアミノ酸配列の発現における外因性化合物の効果の算定において有用である新たな組成を提供することにより、当分野における要求を満たす。

【0018】

(発明の概要)

本発明は、集合的には「GCREC」、個別には「GCREC-1」、「GCREC-2」、「GCREC-3」、「GCREC-4」、「GCREC-5」及び「GCREC-6」と呼ばれるような、実質上精製されたポリペプチドであるGタンパク質結合受容体に特徴がある。或る実施態様において本発明は、(a)配列番号1乃至6を有する群から選択したポリペプチド、(b)配列番号1乃至6を有する群から選択したアミノ酸配列と少なくとも90%が同一であるアミノ酸配列を有する天然のポリペプチド、(c)配列番号1乃至6を有する群から選択したアミノ酸配列を有するポリペプチドの生物学的活性断片、または(d)配列番号1乃至6を有する群から選択したアミノ酸配列を有するポリペプチドの免疫抗原性断片を含む群から選択した実質上単離されたポリペプチドを提供する。一実施態様では、配列番号1乃至6を有する群から選択したアミノ酸配列を含む実質上単離されたポリペプチドを提供する。

【0019】

また、本発明は(a)配列番号1乃至6を有する群から選択したアミノ酸配列、(b)配列番号1乃至6を有する群から選択したアミノ酸配列と少なくとも90%の相同性を有する天然のアミノ酸配列、(c)配列番号1乃至6を有する群から選択したアミノ酸配列の生物学的活性断片、または(d)配列番号1乃至6を有する群から選択したアミノ酸配列の免疫抗原性断片を含むポリペプチドをコードするような実質上単離されたポリヌクレオチドを提供する。一実施態様では、ポリヌクレオチドは配列番号1乃至6を有する群から選択したポリペプチドをコードする。別の実施態様では、ポリヌクレオチドは配列番号7乃至12を有する群から選択される。

【0020】

本発明は更に、(a)配列番号1乃至6を有する群から選択したアミノ酸配列、(b)配列番号1乃至6を有する群から選択したアミノ酸配列と少なくとも90%の相同性を有する天然のアミノ酸配列、(c)配列番号1乃至6を有する群から選択したアミノ酸配列の生物学的活性断片、または(d)配列番号1乃至6を有する群から選択したアミノ酸配列の免疫抗原性断片を含むポリペプチドをコードするような実質上単離されたポリヌクレオチドと機能的に結合したプロモー

ター配列を有する組換えポリヌクレオチドを提供する。一実施態様では、本発明は組換えポリヌクレオチドを用いて形質転換した細胞を提供する。別の実施態様では、本発明は組換えポリヌクレオチドを含む遺伝形質転換体を提供する。

【0021】

また、本発明は（a）配列番号1乃至6を有する群から選択したアミノ酸配列、（b）配列番号1乃至6を有する群から選択したアミノ酸配列と少なくとも90%の相同性を有する天然のアミノ酸配列、（c）配列番号1乃至6を有する群から選択したアミノ酸配列の生物学的活性断片、または（d）配列番号1乃至6を有する群から選択したアミノ酸配列の免疫抗原性断片を含む実質上単離されたポリペプチドを製造する方法を提供する。製造方法は、（a）組換えポリヌクレオチドを用いて形質転換した細胞をポリペプチドの発現に適した条件下で培養する過程と、（b）そのように発現したポリペプチドを受容する過程とを有し、組換えポリヌクレオチドはポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに機能的に結合したプロモーター配列を有する。

【0022】

本発明は更に、（a）配列番号1乃至6を有する群から選択したアミノ酸配列、（b）配列番号1乃至6を有する群から選択したアミノ酸配列と少なくとも90%の相同性を有する天然のアミノ酸配列、（c）配列番号1乃至6を有する群から選択したアミノ酸配列の生物学的活性断片、または（d）配列番号1乃至6を有する群から選択したアミノ酸配列の免疫抗原性断片を含むポリペプチドに特異結合するような実質上単離された抗体を提供する。

【0023】

本発明は更に、（a）配列番号7乃至12を有する群から選択したポリヌクレオチド配列、（b）配列番号7乃至12を有する群から選択したポリヌクレオチド配列と少なくとも90%の相同性を有する天然のポリヌクレオチド配列、（c）（a）に相補的なポリヌクレオチド配列、（d）（b）に相補的なポリヌクレオチド配列、または（e）（a）～（d）のRNA等価物を含む実質上単離されたポリヌクレオチドを提供する。一実施態様では、ポリヌクレオチドは少なくとも60の連続したヌクレオチドを有する。

【0024】

本発明は更に、サンプル中の標的ポリヌクレオチドを検出する方法を提供する。ここで、標的ポリヌクレオチドは(a)配列番号7乃至12を有する群から選択したポリヌクレオチド配列、(b)配列番号7乃至12を有する群から選択したポリヌクレオチド配列と少なくとも90%の相同性を有する天然のポリヌクレオチド配列、(c)(a)に相補的なポリヌクレオチド配列、(d)(b)に相補的なポリヌクレオチド配列、または(e)(a)~(d)のRNA等価物を含む実質上単離されたポリヌクレオチドを提供する。検出方法は、(a)サンプル中の標的ポリヌクレオチドに相補的な配列からなる少なくとも20の連続したヌクレオチドを含むプローブを用いて該サンプルをハイブリダイズする過程と、(b)ハイブリダイゼーション複合体の存在・不存在を検出し、複合体が存在する場合にはオプションでその量を検出する過程からなり、プローブと標的ポリヌクレオチドの間でハイブリダイゼーション複合体が形成されるような条件下で、プローブは標的ポリヌクレオチドに特異的にハイブリダイズする。一実施態様では、プローブは少なくとも60の連続したヌクレオチドを含む。

【0025】

本発明はまた、サンプル中の標的ポリヌクレオチドを検出する方法を提供する。ここで、標的ポリヌクレオチドは(a)配列番号7乃至12を有する群から選択したポリヌクレオチド配列、(b)配列番号7乃至12を有する群から選択したポリヌクレオチド配列と少なくとも90%の相同性を有する天然のポリヌクレオチド配列、(c)(a)に相補的なポリヌクレオチド配列、(d)(b)に相補的なポリヌクレオチド配列、または(e)(a)~(d)のRNA等価物を含む実質上単離されたポリヌクレオチドを提供する。検出方法は、(a)ポリメラーゼ連鎖反応増幅を用いて標的ポリヌクレオチドまたはその断片を増幅する過程と、(b)標的ポリヌクレオチドまたはその断片の存在・不存在を検出し、該標的ポリヌクレオチドまたはその断片が存在する場合にはオプションでその量を検出する過程を含む。

【0026】

本発明は更に、有効量のポリペプチドと薬剤として許容できる賦形剤とを含む

成分を提供する。有効量のポリペプチドは、(a) 配列番号1乃至6を有する群から選択したアミノ酸配列、(b) 配列番号1乃至6を有する群から選択したアミノ酸配列と少なくとも90%の相同性を有する天然のアミノ酸配列、(c) 配列番号1乃至6を有する群から選択したアミノ酸配列の生物学的活性断片、または(d) 配列番号1乃至6を有する群から選択したアミノ酸配列の免疫抗原性断片を含む。一実施態様では、成分は配列番号1乃至6を有する群から選択したアミノ酸配列を含む。更に本発明は、機能性GCRECの発現低下に関連する疾患又は病状を治療する方法であって、そのような治療を必要とする患者に対して成分を投与する過程を有する方法を提供する。

【0027】

本発明はまた、(a) 配列番号1乃至6を有する群から選択したアミノ酸配列、(b) 配列番号1乃至6を有する群から選択したアミノ酸配列と少なくとも90%の相同性を有する天然のアミノ酸配列、(c) 配列番号1乃至6を有する群から選択したアミノ酸配列の生物学的活性断片、または(d) 配列番号1乃至6を有する群から選択したアミノ酸配列の免疫抗原性断片を含むポリペプチドのアゴニストとしての有効性を確認するために化合物をスクリーニングする方法を提供する。スクリーニング方法は、(a) ポリペプチドを有するサンプルを化合物に曝す過程と、(b) サンプル中のアゴニスト活性を検出する過程とを含む。一実施態様では、本発明は機能性GCRECの発現低下に関連する疾患又は病状を治療する方法であって、そのような治療を必要とする患者に対して成分を投与する過程を含む方法を提供する。

【0028】

本発明は更に、(a) 配列番号1乃至6を有する群から選択したアミノ酸配列、(b) 配列番号1乃至6を有する群から選択したアミノ酸配列と少なくとも90%の相同性を有する天然のアミノ酸配列、(c) 配列番号1乃至6を有する群から選択したアミノ酸配列の生物学的活性断片、または(d) 配列番号1乃至6を有する群から選択したアミノ酸配列の免疫抗原性断片を含むポリペプチドのアンタゴニストとしての有効性を確認するために化合物をスクリーニングする方法を提供する。スクリーニング方法は、(a) ポリペプチドを含むサンプルを化合

物に曝す過程と、(b) サンプル中のアゴニスト活性を検出する過程とを含む。
一実施態様で本発明は、この方法によって同定したアンタゴニスト化合物と薬剤として許容できる賦形剤とを含む成分を提供する。別の実施態様では、機能性GC RECの過剰発現に関連する疾患又は病状を治療する方法であって、そのような治療を必要とする患者に対して成分を投与する過程を含む方法を提供する。

【0029】

本発明は更に、(a) 配列番号1乃至6を有する群から選択したアミノ酸配列、(b) 配列番号1乃至6を有する群から選択したアミノ酸配列と少なくとも90%の相同性を有する天然のアミノ酸配列、(c) 配列番号1乃至6を有する群から選択したアミノ酸配列の生物学的活性断片、または(d) 配列番号1乃至6を有する群から選択したアミノ酸配列の免疫抗原性断片を含むポリペプチドに特異結合する化合物をスクリーニングする方法を提供する。スクリーニング方法は、(a) ポリペプチドを適切な条件下で少なくとも1つの試験化合物に結合させる過程と、(b) 試験化合物とのポリペプチドの結合を検出し、それによってポリペプチドに特異結合する化合物を同定する過程とを含む。

【0030】

本発明は更に、(a) 配列番号1乃至6を有する群から選択したアミノ酸配列、(b) 配列番号1乃至6を有する群から選択したアミノ酸配列と少なくとも90%の相同性を有する天然のアミノ酸配列、(c) 配列番号1乃至6を有する群から選択したアミノ酸配列の生物学的活性断片、または(d) 配列番号1乃至6を有する群から選択したアミノ酸配列の免疫抗原性断片を含むポリペプチドの活性を調節する化合物をスクリーニングする方法を提供する。スクリーニング方法は、(a) ポリペプチドの活性が許容された条件下で、ポリペプチドを少なくとも1つの試験化合物に結合させる過程と、(b) ポリペプチドの活性を試験化合物の存在下で算定する過程と、(c) 試験化合物の存在下でのポリペプチドの活性を試験化合物の不存在下でのポリペプチドの活性と比較する過程とを含み、試験化合物の存在下でのポリペプチドの活性の変化は、ポリペプチドの活性を調節する化合物を標示する。

【0031】

本発明は更に、標的ポリヌクレオチドの変異発現の有効性を確認するために化合物をスクリーニングする方法を提供する。標的ポリヌクレオチドは、配列番号7乃至12を有する群から選択した配列を含む。スクリーニング方法は、(a) 標的ポリヌクレオチドを含むサンプルを化合物に曝す過程と、(b) 標的ポリヌクレオチドの変異発現を検出する過程とを含む。

【0032】

本発明は更に、(a) 核酸を含む生物学的サンプルを試験化合物で処理する過程と、(b) (i) 配列番号7乃至12を有する群から選択したポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド、(ii) 配列番号7乃至12を有する群から選択したポリヌクレオチド配列と少なくとも90%の相同性を有するポリヌクレオチド配列を含む天然のポリヌクレオチド、(iii) (i) に相補的な配列を有するポリヌクレオチド、(iv) (ii) のポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチド、(v) (i) ~ (iv) のRNA等価物を含む群から選択したポリヌクレオチドの少なくとも20の連続したヌクレオチドから構成されるプローブを用いて、処理した生物学的サンプルの核酸をハイブリダイズする過程とを含む試験化合物の毒性の算定方法を提供する。ハイブリダイゼーションは、上記プローブと生物学的サンプル中の標的ポリヌクレオチドの間に特定のハイブリダイゼーション複合体が形成されるような条件下で発生し、上記標的ポリヌクレオチドは、(i) 配列番号7乃至12を有する群から選択したポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド、(ii) 配列番号7乃至12を有する群から選択したポリヌクレオチド配列と少なくとも90%の相同性を有するポリヌクレオチド配列を含む天然のポリヌクレオチド、(iii) (i) のポリヌクレオチドに相補的な配列を有するポリヌクレオチド、(iv) (ii) のポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチド、(v) (i) ~ (iv) のRNA等価物を含む群から選択する。或いは、標的ポリヌクレオチドは、上記(i) ~ (v) を含む群から選択したポリヌクレオチド配列の断片と、(c) ハイブリダイゼーション複合体の量を定量する過程と、(d) 処理した生物学的サンプルのハイブリダイゼーション複合体の量を、非処理の生物学的サンプルのハイブリダイゼーション複合体の量と比較する過程を含み、処理した生物学的サンプルのハイブリダイゼーション複合体の量の差は、試験化合物の毒性

を示す。

【0033】

(発明を実施するための形態)

本発明のタンパク質、ヌクレオチド配列及び方法について説明するが、その前に、説明した特定の装置、材料及び方法に本発明が限定されるものではなく、改変し得ることを理解されたい。また、ここで使用する専門用語は特定の実施例を説明する目的で用いたものに過ぎず、特許請求の範囲にのみ限定される本発明の範囲を限定することを意図したものではないことも併せて理解されたい。

【0034】

請求の範囲及び明細書中で用いている単数形の「或る」及び「その(この)」の表記は、文脈から明らかにそうでないとされる場合を除いて複数のものを指す場合もあることに注意しなければならない。従って、例えば「或る宿主細胞」と記されている場合にはそのような宿主細胞が複数あることもあり、「或る抗体」と記されている場合には単数または複数の抗体、及び、当業者に公知の抗体の等価物等についても言及しているのである。

【0035】

本明細書中で用いる全ての専門用語及び科学用語は、特に定義されている場合を除き、当業者に一般に理解されている意味と同じ意味を有する。本明細書で説明するものと類似あるいは同等の任意の装置、材料及び方法を用いて本発明の実施または試験を行うことができるが、ここでは好適な装置、材料、方法について説明する。本発明で言及する全ての刊行物は、刊行物中で報告されていて且つ本発明に関係があるであろう細胞、プロトコル、試薬及びベクターについて説明及び開示する目的で引用しているものである。本明細書のいかなる開示内容も、本発明が先行技術の効力によってこのような開示に対して先行する権利を与えられていないことを認めるものではない。

【0036】

定義

「GCREC」は、実質上精製されたGCRECのアミノ酸配列であって、任意の種、特にウシ、ヒツジ、ブタ、マウス、ウマ及びヒトを含む哺乳動物の種から得たもの

で、任意の天然物、合成物、半合成物或いは組換え物を起源とするものを指す。

【0037】

「アゴニスト」の語は、GCRECの生物学的活性を強化または擬態する分子を指す。アゴニストの例として、タンパク質、核酸、糖質、小分子その他の任意の化合物や成分を挙げることができるが、これらはGCRECと直接相互作用することによって、或いはGCRECが関与する生物学的経路の構成エレメントに作用することによって、GCRECの活性を調節する。

【0038】

「対立遺伝子変異体」は、GCRECをコードする遺伝子の別の形態である。対立遺伝子変異体は、核酸配列における少なくとも1の突然変異から作製し得る。また、変異RNAまたはポリペプチドからも作製し得る。ポリペプチドの構造または機能は、変異することもしないこともある。遺伝子は、天然の対立遺伝子変異体を全く有しないか、1若しくは数個の天然の対立遺伝子変異体を有し得る。一般に対立遺伝子変異体を生じさせる通常の突然変異性変化は、ヌクレオチドの自然欠失、付加または置換に帰するものである。これら各変化は、単独或いは他の変化と共に、所定の配列内で1若しくは数回生じ得る。

【0039】

GCRECをコードする「変異(altered)」核酸配列は、種々のヌクレオチドを欠失、挿入または置換する核酸配列を有し、GCRECと同一またはGCRECの機能的特徴を少なくとも1つ有するポリペプチドを産出する。この定義に含まれるのは、GCRECをコードするポリヌクレオチドの特定のオリゴヌクレオチドプローブを用いて容易に検出可能或いは検出困難な多型現象と、GCRECをコードするポリヌクレオチド配列のための正常な染色体遺伝子座以外の遺伝子座に占めるような、対立遺伝子変異体に対する不適切或いは不測のハイブリダイゼーションである。コードされたタンパク質も「変異」し得るものであり、サイレント変化を生ぜしめて結果的に機能的に等価なGCRECとなるようなアミノ酸残基の欠失、挿入または置換を含み得る。計画的アミノ酸置換は、GCRECの生物学的または免疫学的活性が保持される限りにおいて、残基の極性、電荷、溶解度、疎水性、親水性、及び/または両親媒性特性の類似性に基づき行い得る。例えば、負に帯電したアミノ酸に

はアスパラギン酸及びグルタミン酸があり、正に帯電したアミノ酸にはリジン及びアルギニンがある。親水性値が近似している非荷電極性側鎖を有するアミノ酸には、アスパラギンとグルタミン、セリンとスレオニンがある。親水性値が近似している非荷電側鎖を有するアミノ酸には、ロイシンとイソロイシンとバリン、グリシンとアラニン、フェニルアラニンとチロシンがある。

【0040】

「アミノ酸」または「アミノ酸配列」の語は、オリゴペプチド、ペプチド、ポリペプチド若しくはタンパク質の配列またはその断片を指し、天然または合成分子を指す。ここで、「アミノ酸配列」は天然のタンパク質分子のアミノ酸配列を指すものであり、「アミノ酸配列」及び類似の語は、アミノ酸配列を、列挙したタンパク質分子に会合する完全な本来のアミノ酸配列に限定しようとするものではない。

【0041】

「増幅」は、核酸配列の追加複製に関連する。増幅は通常、当業者によく知られたポリメラーゼ連鎖反応(PCR)技術を用いて行う。

【0042】

「アンタゴニスト」の語は、GCRECの生物学的活性を阻害或いは弱める分子を指す。アンタゴニストとしては、抗体などのタンパク質、核酸、糖質、小分子またはその他の任意の化合物や成分を挙げることができるが、これらはGCRECと直接相互作用することによって、或いはGCRECが関与する生物学的経路の構成エレメントに作用することによって、GCRECの活性を調節する。

【0043】

「抗体」の語は、無損傷免疫グロブリンやその断片、例えばFa、F(ab')₂及びFv断片を指すが、これらはエピトープの決定基と結合することができる。GCRECポリペプチドを結合する抗体は、無損傷ポリペプチドを用いるか或いは免疫抗原として感心のある小ペプチドを含む断片を用いるかして調製することができる。動物(マウス、ラット、ウサギ等)を免疫化するために用いるポリペプチドまたはオリゴペプチドは、翻訳または化学合成されたRNAに由来し得るもので、好みに応じて担体タンパク質に接合することも可能である。通常用いられる担体であっ

てペプチドと化学結合するものは、ウシ血清アルブミン、サイログロブリン及びキーホールリンペットヘモシアニン (KLH) 等がある。結合ペプチドは、動物を免疫化するために用いる。

【0044】

「抗原決定基」の語は、特定の抗体と接触している分子の領域（即ちエピトープ）を指す。タンパク質またはタンパク質断片を用いて宿主動物を免疫化する場合、タンパク質の多数の領域が、抗原決定基（タンパク質の特定の領域または3次元構造）に特異結合する抗体の産生を誘導し得る。抗原決定基は、抗体に結合するための無損傷抗原（即ち免疫応答を誘導するために用いられる免疫原）と競合し得る。

【0045】

「アンチセンス」の語は、特定の核酸配列の「センス」鎖と塩基対を形成することが可能な任意の成分を指す。アンチセンス成分には、DNAや、RNAや、ペプチド核酸 (PNA) や、ホスホロチオ酸、メチルホスホン酸またはベンジルホスホン酸等の修飾されたバックボーン連鎖を有するオリゴヌクレオチドや、2'-メトキシエチル糖または2'-メトキシエトキシ糖等の修飾された糖類を有するオリゴヌクレオチドや、或いは5-メチルシトシン、2-デオキシウラシルまたは7-デアザ-2'-デオキシグアノシン等の修飾された塩基を有するオリゴヌクレオチドがある。アンチセンス分子は、化学合成または転写を含む任意の方法で製造することができる。相補的アンチセンス分子は、ひとたび細胞に導入されたら、細胞が形成した天然の核酸配列と塩基対を形成し、転写または翻訳を妨害する二重鎖を形成する。「負」若しくは「マイナス (-)」の語がアンチセンス鎖を、「正」若しくは「プラス (+)」がセンス鎖を指すことがある。

【0046】

「生物学的に活性」の語は、天然分子の構造的機能、調節機能または生化学的機能を有するタンパク質を指す。同様に「免疫学的に活性」は、天然、組換えまたは合成のGCREC、或いはその任意のオリゴペプチドの能力であって、適切な動物または細胞において特定の免疫反応を誘導して特定の抗体と結合し得る能力を指す。

【0047】

「相補(的)」または「相補性」の語は、ポリヌクレオチドとポリヌクレオチドの、塩基対形成による自然結合を指す。例えば、配列「5'A-G-T3'」は、相補配列「3'T-C-A5'」に結合する。2つの一本鎖分子間の相補性は、幾つかの核酸が結合しているだけの「部分的」なものであるか、或いは一本鎖分子間に完全な相補性が存在するような「完全」なものであり得る。核酸鎖間の相補性の程度は、核酸鎖間のハイブリダイゼーションの効率及び強度に著しい影響を与える。このことは、核酸鎖間の結合に依存する増幅反応において、またペプチド核酸(PNA)分子の設計及び使用において特に重要である。

【0048】

「所定のポリヌクレオチド配列からなる成分」及び「所定のアミノ酸配列からなる成分」は、概して所定のポリヌクレオチド配列またはアミノ酸配列からなる任意の成分を指す。この成分には、乾燥製剤または水溶液が含まれ得る。GCRCまたはGCRC断片をコードするポリヌクレオチドからなる成分は、ハイブリダイゼーションプローブとして利用することができる。このプローブは凍結乾燥状態で保存し得るものであり、糖質等の安定化剤と会合し得る。ハイブリダイゼーションにおいては、塩(例えばNaCl)、界面活性剤(例えばドデシル硫酸ナトリウム; SDS)及びその他の構成エレメント(例えばデンハート液、脱脂粉乳、サケの精子のDNA等)を含む水溶液中にプローブを分散させることができる。

【0049】

「コンセンサス配列」は、不必要な塩基を分離するために再配列し、XL-PCRキット(Perkin-Elmer, Norwalk, CT)を用いて5'方向、3'方向のいずれか一方向或いは両方向に伸長させ、更に再配列した核酸配列を指す。或いは、断片アセンブルのコンピュータプログラムを用いて、1若しくは数個のIncyteクローンの、場合によっては1若しくは数個のパブリックドメインESTの、オーバーラップした配列から組み立てた核酸配列を指す。コンピュータプログラムの例としては、GELVIEW断片アセンブルシステム(GCG, Madison WI)が挙げられる。伸長及びアセンブルの両方を行ってコンセンサス配列を決定する配列もある。

【0050】

「保存的なアミノ酸置換」は、置換がなされた時に元のタンパク質の特性を殆ど損なわないような置換、即ちタンパク質の構造と特に機能が保存され、そのような置換による大きな変化がない置換を指す。下表は、タンパク質中で元のアミノ酸と置換され得るアミノ酸と、保存アミノ酸置換と認められるアミノ酸を示している。

元の残基	保存的な置換
Ala	Gly, Ser
Arg	His, Lys
Asn	Asp, Gln, His
Asp	Asn, Glu
Cys	Ala, Ser
Gln	Asn, Glu, His
Glu	Asp, Gln, His
Gly	Ala
His	Asn, Arg, Gln, Glu
Ile	Leu, Val
Leu	Ile, Val
Lys	Arg, Gln, Glu
Met	Leu, Ile
Phe	His, Met, Leu, Trp, Tyr
Ser	Cys, Thr
Thr	Ser, Val
Trp	Phe, Tyr
Tyr	His, Phe, Trp
Val	Ile, Leu, Thr

保存アミノ酸置換では通常、(a)置換領域におけるポリペプチドのバックボーン構造、例えば シートや 螺旋構造、(b)置換部位における分子の電荷または疎水性、及び/または(c)側鎖の大部分を保持する。

「欠失」は、結果的に1若しくは数個のアミノ酸またはヌクレオチドが失われなくなるようなアミノ酸またはヌクレオチド配列における変化を指す。

【0052】

「誘導体」の語は、ポリペプチド配列またはポリヌクレオチド配列の化学修飾を指す。例えば、アルキル基、アシル基、ヒドロキシル基またはアミノ基による水素の置換は、ポリヌクレオチド配列の化学修飾に含まれ得る。ポリヌクレオチド誘導体は、天然分子の生物学的または免疫学的機能を少なくとも1つは保持しているポリペプチドをコードする。ポリペプチド誘導体は、グリコシル化、ポリエチレングリコール化(pegylation)、或いは任意の同様なプロセスであって誘導起源のポリペプチドから少なくとも1つの生物学的若しくは免疫学的機能を保持しているプロセスによって、修飾されたポリペプチドである。

【0053】

「検出可能な標識」は、測定可能な信号を生成することができ、ポリヌクレオチドまたはポリペプチドに共有結合または非共有結合するようなレポーター分子または酵素を指す。

【0054】

「断片」は、GCRECまたはGCRECをコードするポリヌクレオチドの固有部分であって、親配列と同一配列であるが親配列よりも長さが短い配列を指す。断片は、画定された配列の全長から1ヌクレオチド/アミノ酸残基を差し引いた長さよりも短い長さを有し得る。例えば或る断片は、5~1000の連続したヌクレオチドまたはアミノ酸残基を有し得る。プローブ、プライマー、抗原、治療用分子として、或いはその他の目的のために用いられる断片は、少なくとも5、10、15、20、25、30、40、50、60、75、100、150、250若しくは500の連続したヌクレオチド或いはアミノ酸残基長さであり得る。断片は、分子の特定領域から優先的に選択し得る。例えば、ポリペプチド断片は、所定の配列に示すような最初の250または500アミノ酸(またはポリペプチドの最初の25%または50%)から選択された或る長さの連続したアミノ酸を有し得る。これらの長さは明らかに例として挙げているものであり、本発明の実施例では、配列表、表及び図面を含む明細書に裏付けされた任意の長さであってよい

。

【0055】

配列番号7乃至12の断片には、固有のポリヌクレオチド配列領域が含まれる。この領域は、配列番号7乃至12を特異的に同定するものであり、例えば同一ゲノム中の配列番号7乃至12以外の配列とは異なるものである。配列番号7乃至12の断片は、例えば、ハイブリダイゼーション及び増幅技術において、或いは関連するポリヌクレオチド配列から配列番号7乃至12を区別する類似の方法において有用である。配列番号7乃至12の断片の正確な長さ及び断片に対応する配列番号7乃至12の領域は、断片に対する意図した目的に基づき当業者が慣例的に決定することが可能である。

【0056】

配列番号1乃至6の断片は、配列番号7乃至12の断片によってコードされる。配列番号1乃至6の断片には、配列番号1乃至6を特異的に同定する固有のアミノ酸配列領域が含まれている。例えば、配列番号1乃至6の断片は、配列番号1乃至6を特異認識する抗体を産出するための免疫抗原性ペプチドとして有用である。配列番号1乃至6の断片及び断片に対応する配列番号1乃至6の領域の正確な長さは、断片に対する意図した目的に基づき当業者が慣例的に決定することが可能である。

【0057】

「完全長」ポリヌクレオチド配列とは、少なくとも1つの翻訳開始コドン（例えばメチオニン）、オープンリーディングフレーム及び翻訳終止コドンを有する配列である。「完全長」ポリヌクレオチド配列は、「完全長」ポリペプチド配列をコードする。

【0058】

「相同性」の語は、配列類似性即ち2つ以上のポリヌクレオチド配列または2つ以上のポリペプチド配列の配列間で互換可能な配列同一性である。

【0059】

ポリヌクレオチド配列に適用される「一致率」または「一致%」の語は、標準化されたアルゴリズムを用いてアラインメントされた少なくとも2つ以上のポリ

ヌクレオチド配列間で一致する残基の割合を意味する。このようなアルゴリズムは、2配列間のアラインメントを最適化するために比較する配列において、標準化された再現性のある方法でギャップを挿入するので、2つの配列をより有意に比較できる。

【0060】

ポリヌクレオチド配列間の一致率は、MEGALIGN version 3.12e配列アラインメントプログラムに組み込まれているようなCLUSTAL Vアルゴリズムのデフォルトパラメータを用いて決定できる。このプログラムはLASERGENEソフトウェアパッケージの一部であり、一式の分子生物学分析プログラム(DNASTAR, Madison WI)である。CLUSTAL Vについては、Higgins, D.G. and P.M. Sharp (1989) CABIOS 5:151-153及びHiggins, D.G. ら (1992) CABIOS 8:189-191の文献に記載されている。ポリヌクレオチド配列の対をなすアラインメントの場合、デフォルトパラメータは、Ktuple=2、gap penalty=5、window=4、「diagonals saved」=4と設定する。デフォルトとして「重みづけされた」残基の重みづけ表を選択する。CLUSTAL Vは、アラインメントされたポリヌクレオチド配列対間の「類似率」として一致率を報告する。

【0061】

或いは、一般的に用いられ且つ無料で入手可能な配列比較アルゴリズム一式が、国立バイオテクノロジー情報センター(NCBI) Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) から提供されており(Altschul, S.F. ら (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410)、これはメリーランド州ベセスダにあるNCBI及びインターネット(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)を含む幾つかの情報源から入手可能である。BLASTソフトウェア一式には様々な配列分析プログラムが含まれており、既知のポリヌクレオチド配列を種々のデータベースから得た別のポリヌクレオチド配列とアラインメントする「blastn」もその1つである。その他にも、2つのヌクレオチド配列を対で直接比較するために用いる「BLAST 2 Sequences」と称されるツールも利用可能である。「BLAST 2 Sequences」は、<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/bl2.html>にアクセスして対話形式で利用することが可能である。「BLAST 2 Sequences」ツールは、blastn と blastp (後述)の両方に用いる

ことができる。BLASTプログラムは、一般的には、ギャップ及びデフォルト設定に設定された他のパラメータと共に用いる。例えば、2つのヌクレオチド配列を比較するために、デフォルトパラメータとして設定された「BLAST 2 Sequences」ツールVersion 2.0.9(1999年5月7日)を用いてblastnを実行してもよい。デフォルトパラメータの設定例を以下に示す。

Matrix: BLOSUM62

Reward for match: 1

Penalty for mismatch: -2

Open Gap: 5 及び Extension Gap: 2 penalties

Gap x drop-off: 50

Expect: 10

Word Size: 11

Filter: on

一致率は、完全に画定された(例えば特定の配列番号で画定された)配列長さと比較して測定し得る。或いは、より短い長さ、例えばより大きな画定された配列から得られた断片(例えば少なくとも20、30、40、50、70、100または200の連続したヌクレオチドの断片)の長さと比較して一致率を測定してもよい。ここに挙げた長さは単なる例示的なものに過ぎず、表、図及び配列リストを含めた本明細書に記載された配列に裏付けられた任意の配列長さの断片を用いて、一致率を測定し得る長さを説明し得ることを理解されたい。

【0062】

高度の相同性を示さない核酸配列が、それにもかかわらず遺伝子コードの縮重が原因で類似のアミノ酸配列をコードする場合がある。この縮重を利用して核酸配列内で変化を生じさせて、全ての核酸配列が実質上同一のタンパク質をコードするような多数の核酸配列を生成し得ることを理解されたい。

【0063】

ポリペプチド配列に適用される「一致率」または「一致%」の語は、標準化されたアルゴリズムを用いてアラインメントされた少なくとも2以上のポリペプチド配列間で一致する残基の割合を意味する。ポリペプチド配列アラインメントの

方法は公知である。保存的アミノ酸置換を考慮するアラインメント方法もある。既に詳述したこのような保存的置換は通常、置換部位の酸性度及び疎水性を保存するので、ポリペプチドの構造を（従って機能も）保存する。

【0064】

ポリペプチド配列間の一致率は、MEGALIGN version 3.12e配列アラインメントプログラムに組み込まれているようなCLUSTAL Vアルゴリズムのデフォルトのパラメータを用いて決定できる（既に説明したのでそれを参照されたい）。CLUSTAL Vを用いて、ポリペプチド配列を2つ1組でアラインメントする際のデフォルトパラメータは、Ktuple=1、gap penalty=3、window=5、「diagonals saved」=5と設定する。デフォルトの残基重み付け表としてPAM250マトリクスを選択する。ポリヌクレオチドアラインメントと同様に、CLUSTAL VIは、アラインメントされたポリペプチド配列対間の「類似率」として一致率を報告する。

【0065】

或いは、NCBI BLASTソフトウェア一式を用いてもよい。例えばポリペプチド配列を2つ1組で比較をする場合、デフォルトパラメータとして設定されたblastpと共に「BLAST 2 Sequences」ツールVersion 2.0.9（1999年5月7日）を使用してもよい。デフォルトパラメータの設定例を以下に示す。

Matrix: BLOSUM62

Open Gap: 11 及び Extension Gap: 1 penalties

Gap x drop-off: 50

Expect: 10

Word Size: 3

Filter: on

一致率は、完全に画定された（例えば特定の配列番号で画定された）ポリペプチド配列の長さと比較して測定し得る。一致率は、配列或いは、より短い長さ、例えばより大きな画定されたポリペプチド配列から得られた断片（例えば少なくとも15、20、30、40、50、70または150の連続した残基の断片）の長さと比較して一致率を測定してもよい。ここに挙げた長さは単なる例示的なものに過ぎず、表、図及び配列リストを含めた本明細書に記載された配列に裏付

けられた任意の配列長さの断片を用いて、或る長さであってその長さに対して一効率を測定し得る長さを説明し得ることを理解されたい。

【0066】

「ヒト人工染色体」(HAC)は直鎖状の小染色体であり、6 kb ~ 10 MbのサイズのDNA配列を含み、安定した有糸分裂染色体の分離及び維持に必要な全てのエレメントが含まれている。

【0067】

「ヒト化抗体」の語は、非抗体結合領域におけるアミノ酸配列はヒト抗体により近づくように変異させた抗体分子であって、本来の結合能力はそのまま保持しているような抗体分子を指す。

【0068】

「ハイブリダイゼーション」は、所定のハイブリダイゼーション条件下で塩基対を形成することによって、一本鎖ポリヌクレオチドが相補的鎖とアニーリングするプロセスを指す。特異的ハイブリダイゼーションは、2つの核酸配列が高い相同性を共有することを示すものである。特異的ハイブリダイゼーション複合体は許容されるアニーリング条件下で形成され、「洗浄」ステップ後もハイブリダイズされたままである。洗浄ステップは、ハイブリダイゼーションプロセスのストリンジェンシーを決定する際に特に重要であり、更にストリンジェントな条件では、非特異結合(即ち完全には一致しない核酸鎖間の対の結合)が減少する。核酸配列のアニーリングに対する許容条件は、本技術分野における当業者が慣例的に決定する。許容条件はハイブリダイゼーション実験の間は一定でよいが、洗浄条件は所望のストリンジェンシーを得るように、従ってハイブリダイゼーション特異性も得るように実験中に変更することができる。アニーリング許容条件は、例えば約6 × SSC、約1% (w/v)のSDS及び約100 µg/mlの変性サケ精子DNAの存在下で温度68 において成立する。

【0069】

一般に、ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーは或る程度、洗浄ステップを実行する温度を基準にして表すことができる。このような洗浄温度は通常、所定のイオン強度及びpHにおける特異配列の融点(T_m)より約5 ~ 20 低く

なるように選択する。この T_m は、所定のイオン強度及びpHの下で、完全に一致するプローブに標的配列の50%がハイブリダイズする温度である。 T_m を計算する式及び核酸のハイブリダイゼーション条件はよく知られており、Sambrookら(1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第2版, 1-3巻, Cold Spring Harbor Press, Plainview NYに記載されており、特に2巻の9章を参照されたい。

【0070】

本発明の、ポリヌクレオチドとポリヌクレオチドのハイブリダイゼーションに対する高ストリンジェンシー条件には、約 $0.2 \times \text{SSC}$ 及び約1%のSDS存在下で約68において1時間の洗浄条件が含まれる。或いは、65、60、55または42の温度で行ってもよい。SSC濃度は、約0.1%のSDS存在下で、約 $0.1 \sim 2 \times \text{SSC}$ の範囲で変化し得る。通常は、遮断剤を用いて非特異ハイブリダイゼーションを阻止する。このような遮断剤には、例えば、約100~200 $\mu\text{g/ml}$ の変性サケ精子DNAがある。特定条件下で、例えばRNAとDNAのハイブリダイゼーションに有機溶剤、例えば約35~50%v/vの濃度のホルムアミドを用いることもできる。洗浄条件の有用なバリエーションは、当業者には自明であろう。ハイブリダイゼーションは、特に高ストリンジェント条件下では、ヌクレオチド間の進化的な類似性を示唆し得る。このような類似性は、ヌクレオチド及びヌクレオチドにコードされるポリペプチドに対する類似の役割を強く示唆している。

【0071】

「ハイブリダイゼーション複合体」の語は、相補的塩基対間の水素結合の形成力によって2つの核酸配列間に形成された複合体を指す。ハイブリダイゼーション複合体は、溶解状態で形成し得る(C_0t または R_0t 解析等)。或いは、一方の核酸配列が溶解状態で存在し、もう一方の核酸配列が固体支持体(例えば紙、膜、フィルタ、チップ、ピンまたはガラススライド、或いは他の適切な基質であって細胞若しくはその核酸が固定される基質)に固定されているような2つの核酸配列間に形成され得る。

【0072】

「挿入」及び「付加」の語は、1若しくは数個のアミノ酸残基またはヌクレオ

チド配列を各々付加するようなアミノ酸またはヌクレオチド配列における変化を指す。

【0073】

「免疫応答」は、炎症、外傷、免疫異常症、伝染性疾患または遺伝性疾患に関連する症状を指し得る。これらの症状は、細胞及び全身の防御系に作用し得る種々の因子、例えばサイトカイン、ケモカイン、その他のシグナル伝達分子の発現によって特徴づけることができる。

【0074】

「免疫抗原性断片」とは、哺乳動物等の生命体に導入されると免疫応答を誘発し得るようなGCRECのポリペプチドまたはオリゴペプチド断片である。「免疫抗原性断片」の語には、本明細書中で開示したような或いは当分野で既知であるような任意の抗体産出方法において有用なGCRECの任意のポリペプチドまたはオリゴペプチド断片も含まれる。

【0075】

「マイクロアレイ」の語は、基質上の複数のポリヌクレオチド、ポリペプチドまたはその他の化合物の構成を指す。

【0076】

「エレメント」または「アレイエレメント」の語は、マイクロアレイの環境において、基質の表面上に配置されたハイブリダイズ可能なポリヌクレオチドを指す。

【0077】

「調節(する)」の語は、GCRECの活性の変化を指す。調節することによって例えば、GCRECのタンパク質活性、結合特性その他の生物学的、機能的または免疫学的特性が増大または低下し得る。

【0078】

「核酸」及び「核酸配列」の語は、ヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチドまたはこれらの断片を指す。「核酸」及び「核酸配列」の語は、ゲノム起源または合成起源のDNAまたはRNAであって一本鎖または二本鎖であるか或いはセンス鎖またはアンチセンス鎖を表し得るようなDNAまたはRNAや、ペプチド

核酸 (PNA) や、任意のDNA様またはRNA様物質を指すこともある。

【0079】

「機能的に結合した」は、第1核酸配列が第2核酸配列と機能的な関係があるように配置された状態を指す。例えば、プロモーターがコード配列の転写または発現に影響を及ぼす場合には、そのプロモーターはそのコード配列に機能的に結合している。同一のリーディングフレーム内で2つのタンパク質コード領域を結合する必要がある場合、一般に、機能的に結合したDNA配列は非常に近接するか、或いは連続し得る。

【0080】

「ペプチド核酸」(PNA)は、アンチセンス分子または抗遺伝子物質であって、リジンを末端とするアミノ酸残基のペプチドバックボーンに結合した、少なくとも約5ヌクレオチドの長さのオリゴヌクレオチドからなるものを指す。末端のリジンは、成分に溶解性を与える。PNAは、相補的一本鎖DNAまたはRNAに優先的に結合して転写の拡張を停止するものであり、ポリエチレングリコール化して細胞におけるPNAの寿命を延長し得る。

【0081】

GCRECの「翻訳後修飾」は、脂質化、グリコシル化、リン酸化、アセチル化、ラセミ化、タンパク分解性開裂及びその他の当分野で既知の修飾を含み得る。これらのプロセスは、合成的または生化学的に発生し得る。生化学的修飾は、GCRECの酵素環境に依存し、細胞タイプによって変化し得る。

【0082】

「プローブ」は、GCREC、GCRECの相補配列またはこれらの断片をコードする核酸配列を指し、同一核酸配列、対立遺伝子核酸配列または関連する核酸配列の検出に用いられる。プローブは、単離されたオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドであって、検出可能な標識またはレポーター分子に結合したものである。典型的な標識には、放射性アイソトープ、リガンド、化学発光試薬及び酵素がある。

【0083】

「プライマー」は、短い核酸、通常はDNAオリゴヌクレオチドであり、相補的

塩基対を形成することで標的ポリヌクレオチドにアニーリングされ得る。プライマーは次に、DNAポリメラーゼ酵素によって標的DNA鎖に延在し得る。プライマー対は、例えばポリメラーゼ連鎖反応(PCR)による核酸配列の増幅(及び同定)に用い得る。

【0084】

本発明に用いるようなプローブ及びプライマーは通常、既知の配列の少なくとも15の連続したヌクレオチドを含んでいる。特異性を高めるために長めのプローブ及びプライマー、例えば開示した核酸配列の少なくとも20、25、30、40、50、60、70、80、90、100または150の連続したヌクレオチドからなるようなプローブ及びプライマーを用いてもよい。これよりもかなり長いプローブ及びプライマーもある。表、図面及び配列リストを含む本明細書に裏付けされた任意の長さのヌクレオチドを用いることができるものと理解されたい。

【0085】

プローブ及びプライマーの調製及び使用方法については、Sambrook, J. ら (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第2版, 1-3巻, Cold Spring Harbor Press, Plainview NY、Ausubel, F.M. ら, (1987) Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publi. Assoc. & Wiley-Intersciences, New York NY、Innisら (1990) PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications Academic Press, San Diego CA等を参照されたい。PCRプライマー対は、その目的のためのコンピュータプログラム、例えばPrimer (Version 0.5, 1991, Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge MA)を用いるなどして既知の配列から得ることができる。

【0086】

プライマーとして用いるオリゴヌクレオチドの選択は、そのような目的のために本技術分野でよく知られているソフトウェアを用いて行う。例えばOLIGO 4.06ソフトウェアは、各100ヌクレオチドまでのPCRプライマー対の選択に有用であり、オリゴヌクレオチド及び最大5,000までの大きめのポリヌクレオチドであって32キロベースまでのインプットポリヌクレオチド配列から得たものを

分析するのにも有用である。類似のプライマー選択プログラムには、拡張能力のための追加機能が組込まれている。例えば、PrimOUプライマー選択プログラム（テキサス州ダラスにあるテキサス大学南西部医療センターのゲノムセンターから一般向けに入手可能）は、メガベース配列から特定のプライマーを選択することが可能であり、従ってゲノム全体の範囲でプライマーを設計するのに有用である。Primer3プライマー選択プログラム（マサチューセッツ州ケンブリッジのWhitehead Institute / MITゲノム研究センターから一般向けに入手可能）ではユーザーが「ミスプライミング・ライブラリ」をインプットすることができ、ここでプライマー結合部位として避けたい配列はユーザーが指定する。Primer3は特に、マイクロアレイのためのオリゴヌクレオチドの選択に有用である。（後二者のプライマー選択プログラムのソースコードは、各自のソースから得てユーザー固有のニーズを満たすように変更してもよい。）PrimerGenプログラム（英国ケンブリッジ市の英国ヒトゲノムマッピングプロジェクト-リソースセンターから一般向けに入手可能）は、多数の配列アラインメントに基づいてプライマーを設計し、それによって、アラインメントされた核酸配列の最大保存領域または最小保存領域の何れかとハイブリダイズするようなプライマーの選択を可能にする。従って、このプログラムは、固有であって保存されたオリゴヌクレオチド及びポリヌクレオチドの断片の同定に有用である。上記選択方法のいずれかによって同定したオリゴヌクレオチド及びポリヌクレオチドの断片は、ハイブリダイゼーション技術において、例えばPCRまたはシーケンシングプライマーとして、マイクロアレイエレメントとして、或いは核酸のサンプルにおいて完全または部分的相補的ポリヌクレオチドを同定する特異プローブとして有用である。オリゴヌクレオチドの選択方法は、上記の方法に限定されるものではない。

【0087】

「組換え核酸」は天然配列ではない配列であるか或いは人為的に組み合わせなければ離隔しているような配列の2以上のセグメントを人為的に組み合わせで産出した配列を有する配列である。この人為的組合せはしばしば化学合成によって達成するが、より一般的には核酸の単離セグメントの人為的操作によって、例えばのSambrookらの文献（前出）に記載されているような遺伝子工学的手法によ

て達成する。組換え核酸の語は、単に核酸の一部を付加、置換または欠失した変異核酸も含む。しばしば組換え核酸には、プロモーター配列に機能的に結合した核酸配列が含まれる。このような組換え核酸は、ベクターの不可欠なエレメントであって例えばある細胞を形質転換するために用いられるようなものであり得る。

【0088】

或いはこのような組換え核酸は、ウイルスベクターの不可欠なエレメントであって例えばワクシニアウイルスに基づくものであり得る。ワクシニアウイルスは組換え核酸が発現する哺乳動物のワクチン接種に用いるもので、哺乳動物の防御免疫応答を誘導する。

【0089】

「調節エレメント」は、通常は遺伝子の未翻訳領域に由来する核酸配列であり、エンハンサー、プロモーター、イントロン及び5'及び3'の未翻訳領域(UTR)を含む。調節エレメントは、転写、翻訳またはRNA安定性を調節する宿主またはウイルスタンパク質と相互作用する。

【0090】

「レポーター分子」とは、核酸、アミノ酸または抗体を標識するのに用いられる化学的または生化学的成分である。レポーター分子には、放射性核種、酵素、蛍光剤、化学発光剤、発色剤、基質、補助因子、阻害因子、磁気粒子及びその他の当分野で既知の成分がある。

【0091】

DNA配列に関する「RNA等価物」は、発生した窒素塩基チミンが全てウラシルに置換されていることと、糖のバックボーンがデオキシリボースではなくリボースから構成されていることを除いて、参照DNA配列と同一のヌクレオチド線形配列から構成されている。

【0092】

「サンプル」の語は、その最も広い意味で用いられる。GCRECをコードする核酸若しくはその断片、またはGCREC自体を含む疑いのあるサンプルは、体液や、細胞から単離された細胞、染色体、細胞小器官または膜からの抽出物や、細胞や

、溶解しているか基質に結合しているゲノムDNA、RNAまたはcDNAや、組織や、組織プリント等から構成され得る。

【0093】

「特異結合」または「特異的に結合する」の語は、タンパク質またはペプチドと、アゴニスト、抗体、アンタゴニスト、小分子、任意の天然成分または合成結合成分との間の相互作用を指す。この相互作用は、タンパク質の特定の構造（例えば抗原決定基即ちエピトープ）であって結合分子が認識するものが存在するか否かに依存していることを意味している。例えば、抗体がエピトープ「A」に対して特異的である場合、標識された遊離したA及びその抗体を含む反応において、エピトープA（つまり遊離し、標識されていないA）を含むポリヌクレオチドの存在が、抗体に結合している標識されたAの量を低減させる。

【0094】

「実質上精製された」の語は、自然環境から取り除かれ、或いは単離または分離された核酸またはアミノ酸配列であって、自然に会合するその他の構成エレメントの少なくとも約60%、好ましくは少なくとも約75%、最も好ましいのは少なくとも約90%が遊離しているものを指す。

【0095】

「置換」は、1若しくは数個のアミノ酸またはヌクレオチドを各々別のアミノ酸またはヌクレオチドに置換することを意味する。

【0096】

「基質」は、任意の好適な固体または半固体の支持体を指すものであって、膜、フィルタ、チップ、スライド、ウエハ、ファイバー、磁性非磁性ビーズ、ゲル、管、プレート、ポリマー、微細粒子、毛管が含まれる。基質は、壁、溝、ピン、チャンネル、孔等、様々な表面形態を有することができ、基質表面にはポリヌクレオチドやポリペプチドが結合する。

【0097】

「転写イメージ」は、所与の時間、条件での固有の細胞タイプまたは組織による遺伝子発現の集合的パターンを指す。

【0098】

「形質転換」は、外来性のDNAが宿主細胞に入り込み、宿主細胞を変化させるプロセスを表す。形質転換は、本技術分野で知られている種々の方法に従って自然条件または人工条件下で生じ得るものであり、外来性の核酸配列を原核または真核宿主細胞に挿入する任意の既知の方法を基にし得る。形質転換の方法は、形質転換する宿主細胞の種類によって選択する。限定するものではないが形質転換方法には、ウイルス感染、電気穿孔法（エレクトロポレーション）、熱ショック、リポフェクション及び微粒子銃を用いる方法がある。「形質転換された」細胞の語には、限られた時間内に挿入されたDNAやRNAを発現するような一時的に形質転換された細胞のみならず、安定的に形質転換された細胞であってその中に挿入されたDNAが自律的に複製するプラスミドとして或いは宿主の染色体の一部として複製可能であるものも含まれる。

【0099】

ここで用いる「遺伝形質転換体」とは任意の有機体であり、限定するものではないが動植物を含み、有機体の1若しくは数個の細胞が、ヒトの関与によって、例えば本技術分野でよく知られている形質転換技術によって導入された異種核酸を有する。核酸の細胞への導入は、直接または間接的に、細胞の前駆物質に導入することによって、計画的な遺伝子操作によって、例えば微量注射法によって或いは組換えウイルスの導入によって行う。遺伝子操作の語は、古典的な交雑育種或いは*in vitro*受精を指すものではなく、組換えDNA分子の導入を指すものである。本発明に基づいて予期される遺伝形質転換体には、バクテリア、シアノバクテリア、真菌及び動植物がある。本発明の単離されたDNAは、本技術分野で知られている方法、例えば感染、形質移入、形質転換またはトランス接合によって宿主に導入することができる。本発明のDNAをこのような有機体に移入する技術はよく知られており、前出のSambrookら（1989）等の参考文献に与えられている。

【0100】

特定の核酸配列の「変異体」は、核酸配列1本全部の長さに対して特定の核酸配列と少なくとも40%の相同性を有する核酸配列であると定義する。その際、デフォルトパラメータに設定した「BLAST 2 Sequences」ツールVersion 2.0.9（

1999年5月7日)を用いてblastnを実行する。このような核酸対は、所定の長さに対して、例えば少なくとも50%、60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれ以上の相同性を示し得る。或る変異体は、例えば「対立遺伝子」変異体(前述)、「スプライス」変異体、「種」変異体または「多形性」変異体として説明し得る。スプライス変異体は参照分子とかなりの相同性を有し得るが、mRNAプロセッシング中のエキソンの交互スプライシングによって通常多数の或いは僅かな数のポリヌクレオチドを有することになる。対応するポリペプチドは、追加機能ドメインを有するか或いは参照分子に存在するドメインが欠落していることがある。種変異体は、種相互に異なるポリヌクレオチド配列である。結果的に生じるポリペプチドは通常、相互にかなりのアミノ酸相同性を有する。多形性変異体は、与えられた種の個体間で特定の遺伝子のポリヌクレオチド配列が異なる。また、多形性変異体は、1つのヌクレオチド塩基によってポリヌクレオチド配列が変化する「単一ヌクレオチド多形性」(SNP)を含み得る。SNPの存在は、例えば特定の個体群、病状または病状性向を示し得る。

【0101】

特定のポリペプチド配列の「変異体」は、ポリペプチド配列の1本の長さ全体で特定のポリペプチド配列に対して少なくとも40%の相同性を有するポリペプチド配列として画定される。ここで、デフォルトパラメータに設定した「BLAST 2 Sequences」ツールVersion 2.0.9(1999年5月7日)を用いてblastpを実行する。このようなポリペプチド対は、所定の長さに対して、例えば少なくとも50%、60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれ以上の相同性を示し得る。

【0102】

発明

本発明は、新規なヒトGタンパク質(GCREC)と、GCRECをコードするポリヌクレオチドと、細胞増殖異常、神経障害、心血管障害、胃腸障害、自己免疫/炎症疾患及び代謝障害並びにウイルス性感染症の診断、治療並びに予防にこれらの配

列を利用する方法の発見に基づくものである。

【0103】

表1は、本発明の完全長ポリヌクレオチド配列及びポリペプチド配列の命名の概略である。各ポリヌクレオチド及び対応するポリペプチドは、1つのIncyteプロジェクト識別番号(IncyteプロジェクトID)と関連している。各ポリペプチド配列は、ポリペプチド配列識別番号(ポリペプチドSEQ ID NO)とIncyteポリペプチド配列番号(IncyteポリペプチドID)の両方により表示した。各ポリヌクレオチド配列は、ポリヌクレオチド配列識別番号(ポリヌクレオチドSEQ ID NO)とIncyteポリヌクレオチドコンセンサス配列番号(IncyteポリヌクレオチドID)の両方により表示した。

【0104】

表2は、GenBankタンパク質(genpept)データベースに対するBLAST分析によって同定されたような、本発明のポリペプチドとの相同性を有する配列を示している。列1及び列2は本発明のポリペプチドに対するポリペプチド配列識別番号(ポリペプチドSEQ ID NO)及び対応するIncyteポリペプチド配列番号(IncyteポリペプチドID)を、列3は最も近いGenBank相同体のGenBank識別認識番号(Genbank ID NO)を、列4は各ポリペプチドとそのGenBank相同体が一致する確率スコアを、列5はGenBank相同体の注釈と可能であればそれに関連する引用と共に示している。これらは全て特に引用することを以って本明細書の一部となす。

【0105】

表3は、本発明のポリペプチドの様々な構造的特徴を示している。列1及び列2は本発明の各ポリペプチドに対するポリペプチド配列識別番号(SEQ ID NO)及び対応するIncyteポリペプチド配列番号(IncyteポリペプチドID)を、列3は各ポリペプチドのアミノ酸残基の数を、列4はリン酸化部位を、列5はGCG配列分析ソフトウェアパッケージ(Genetics Computer Group, Madison WI)のMOTIFSプログラムにより決定したような潜在化グリコシル化部位を、列6はサイン配列、ドメイン及びモチーフからなるアミノ酸残基を、列7はタンパク質構造/機能分析及び場合によっては分析手法が適用される検索可能なデータベースを示している。

【0106】

合わせて、表2及び表3は本発明のポリペプチドの特性を概略的に示している。これらの特性は、特許請求の範囲に記載されたポリペプチドがGタンパク質結合受容体であることを証明する。例えば配列番号3は、Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)により決定されるように、メダカ (GenBank ID g992582) から得たGタンパク質結合膜7回貫通受容体に残基E2から残基E421までと41%が同一である(表2を参照)。BLAST確率スコアは $6.10E-82$ であり、これは保存されたポリペプチド配列アラインメントが偶然に得られる確率を示している。配列番号3はまた、保存されたタンパク質ファミリドメインの隠れマルコフモデル(HMM)ベースPFAMデータベースにおいて統計学的に有意な一致を検索することによりけっさいされるようなロドプシンファミリー膜7回貫通受容体ドメインを有する(表3を参照)。BLIMPS、MOTIFS及びPROFILESCAN分析から得たデータは、配列番号3がGタンパク質結合受容体であることを裏づける証拠を更に提供する。GCREC-3(配列番号3)は、ヒト5-HT₆セロトニン受容体(GenBank ID g1162924、Kohen, R. ら(1996) J. Neurochem. 66:47-56)、マウスセロトニン6受容体(GenBank ID g5669868)及びラット5HT₆セロトニン受容体(GenBank ID g310071)との相同性を有し、Gタンパク質結合受容体がセロトニン、別の神経伝達物質分子または別の生体アミンに対する受容体として作用することを示している。配列番号1、配列番号2、配列番号4、配列番号5及び配列番号6については、同様の方法で分析し、注釈を付けた。配列番号1乃至6の分析のためのアルゴリズム及びパラメータは、表7で説明している。

【0107】

表4に示すように、本発明の完全長ポリヌクレオチド配列は、cDNA配列またはゲノムDNA由来のコード(エキソン)配列を用いて、或いはこれら2種類の配列を任意に組み合わせてアセンブルした。列1及び列2は本発明の各ポリヌクレオチドに対するポリヌクレオチド配列識別番号(ポリヌクレオチドSEQ ID NO)及び対応するIncyteポリヌクレオチドコンセンサス配列番号(IncyteポリヌクレオチドID)を、列3は塩基対の各ポリヌクレオチド配列の長さを示している。列4は、配列番号7乃至12を同定するか或いは配列番号7乃至12と関連するポリ

ヌクレオチド配列を区別するような例えばハイブリダイゼーションまたは増幅技術において有用であるようなポリヌクレオチド配列の断片を収載している。列5はcDNA配列、ゲノムDNAから予想されたコード配列(エキソン)及び/またはcDNA及びゲノムDNAを共に有する配列集合に対応する識別番号を示している。これらの配列は、本発明の完全長ポリヌクレオチド配列をアセンブルするのに用いた。表4の列6及び列7は、それぞれの完全長配列に関連する列5のcDNA及びゲノムDNAのヌクレオチド開始位置(5')及び終止位置(3')を示している。

【0108】

表4の列5の識別番号は、特に例えばIncyte cDNAとそれに対応するcDNAライブラリに照会し得る。例えば、5628963H1はIncyte cDNA配列の識別番号であり、PLACFER01は由来のcDNAライブラリである。cDNAライブラリが示されていないIncyte cDNAは、プールcDNAライブラリ(例えば71125928V1)に由来する。或いは列5の識別番号は、完全長ポリヌクレオチド配列のアセンブリに寄与するGenBank cDNAまたはESTに照会し得る。或いは列5の識別番号は、ゲノムDNAのGenscan分析により予想されるコード領域に照会し得る。例えば、GNN.g6524217_026.3p.editは、Genscan予想コード配列の識別番号であり、g6524217はGenscanが行われる配列のGenBank識別番号である。Genscan予想コード配列は、アセンブリに先立ち編集することができる(実施例4を参照)。または列5の識別番号は、「エキソンスティッチング(stitching)」アルゴリズムにより結び合わせたcDNA及びGenscan予想エキソンの両方の集合に照会し得る。例えば、FL324227_00001 .editはアルゴリズムが適用される配列のクラスターの識別番号が324227であり、アルゴリズムにより生成される予測の番号が00001であるような「縫合された」配列である(実施例5を参照)。或いは列5の識別番号は、「エキソンスティッチング」アルゴリズムにより結び合わせたcDNA及びGenscan予想エキソンの両方の集合に照会し得る(実施例5を参照)。場合によっては、最終コンセンサスポリヌクレオチド配列を確認するための列5に示すような配列の適用範囲と重複するIncyte cDNAの適用範囲が得られたが、関連するIncyte cDNA識別番号は示さなかった。

【0109】

表5は、Incyte cDNA配列を用いてアセンブルされた完全長ポリヌクレオチド配列のための代表的なcDNAライブラリを示している。代表的なcDNAライブラリは、上記のポリヌクレオチド配列をアセンブル及び確認するために用いられるIncyte cDNA配列によって最も頻繁に表されるIncyte cDNAライブラリである。cDNAライブラリを作製するために用いた組織及びベクターを表5に示し、表6で説明している。

【0110】

本発明には、GCRECの変異体も含まれる。好適なGCRECの変異体のアミノ酸配列は、GCRECアミノ酸配列と少なくとも約80%、または少なくとも約90%、或いは少なくとも約95%もの一致率を有し、GCRECの機能的若しくは構造的特徴を少なくとも1つ有するような変異体である。

【0111】

本発明には、GCRECをコードするポリヌクレオチドも含まれる。或る例では、GCRECをコードする配列番号7乃至12からなる群から選択された配列を有するポリヌクレオチド配列が本発明に含まれている。配列番号7乃至12のポリヌクレオチド配列は、配列表に示されているように等価RNA配列と同等の価値を有しているが、窒素塩基チミンの出現はウラシルに置換され、糖のバックボーンはデオキシリボースではなくシリボースから構成されている。

【0112】

本発明には、GCRECをコードするポリヌクレオチド配列の変異配列も含まれる。具体的には、そのようなポリヌクレオチド配列の変異配列は、GCRECをコードするポリヌクレオチド配列と少なくとも約70%、或いは少なくとも約85%、または少なくとも約95%もの一致率を有する。本発明の或る実施態様では、配列番号7乃至12からなる群から選択されたアミノ酸配列と少なくとも約70%、或いは少なくとも約85%、または少なくとも約95%もの一致率を有するような配列番号7乃至12からなる群から選択された配列を有するポリヌクレオチド配列の変異配列を含む。上記の任意のポリヌクレオチドの変異体は、GCRECの機能的若しくは構造的特徴を少なくとも1つ有するアミノ酸配列をコードし得る。

。

【0113】

当業者であれば、遺伝暗号の縮重の結果、GCRECをコードする多数のポリヌクレオチド配列（既知の遺伝子または天然の遺伝子のポリヌクレオチド配列と最低限の類似性しか有しないポリヌクレオチド配列もある）を産出し得ることは理解できよう。したがって本発明には、可能コドン選択に基づく組合せの選択によって産出し得るようなありとあらゆる可能性のあるポリヌクレオチド配列変異体を網羅し得る。これらの組合せは、天然のGCRECのポリヌクレオチド配列に適用されるような標準トリプレット遺伝暗号を基に作られるものであり、このような変異は全て明確に開示されているものと考えられる。

【0114】

GCREC及びその変異体をコードするヌクレオチド配列は通常、好適に選択されたストリンジェントな条件下で天然のGCRECのヌクレオチド配列とハイブリダイズ可能であるが、GCRECまたはその誘導体であって実質上異なるコドンの使用方法があるもの、例えば天然に存在しないコドンの封入があるものをコードするヌクレオチド配列を作り出すことは有益であろう。宿主が特定のコドンを利用する頻度に基づいて、特定の真核又は原核宿主に発生するペプチドの発現率を高めるようにコドンを選択することが可能である。コードされたアミノ酸配列を変えることなくGCREC及びその誘導体をコードするヌクレオチド配列を実質上変更する別の理由には、天然の配列から作製される転写物より好ましい、例えば半減期が長いなどの特性を有するRNA転写物の作製がある。

【0115】

本発明には、GCREC、GCREC誘導体及びこれらの断片をコードするDNA配列又はそれらの断片を完全に合成化学によって作製することも含まれる。作製後、当分野でよく知られている試薬を用いて、この合成配列を任意の様々な入手可能な発現ベクター及び細胞系中に挿入し得る。更に、合成化学を用いてGCRECまたはその任意の断片をコードする配列に突然変異を誘導し得る。

【0116】

更に本発明には、種々のストリンジェントな条件下で、請求項に記載のポリヌクレオチド配列、特に配列番号7乃至12で示される配列及びそれらの断片に八

イブリダイズ可能なポリヌクレオチド配列も含まれる (Wahl, G.M. and S.L. Berger (1987) *Methods Enzymol.* 152:399-407、Kimmel, A.R. (1987) *Methods Enzymol.* 152:507-511.等を参照)。

【0117】

DNAシーケンシングの方法は当分野では公知であり、本発明のいずれの実施例もDNAシーケンシング方法を用いて実施可能である。DNAシーケンシング方法には酵素を用いることができ、例えばDNAポリメラーゼIのクレノウ断片、SEQUENASE (US Biochemical, Cleveland OH)、Taqポリメラーゼ (Applied Biosystems)、熱安定性T7ポリメラーゼ (Amersham, Pharmacia Biotech, Piscataway NJ) を用いることができる。或いは、例えばELONGASE増幅システム (Life Technologies, Gaithersburg MD) において見られるように、ポリメラーゼと校正エキソヌクレアーゼを併用することができる。好適には、MICROLAB2200液体転移システム (Hamilton, Reno, NV)、PTC200サーマルサイクラー (MJ Research, Watertown MA) 及びABI CATALYST 800サーマルサイクラー (Applied Biosystems) 等の装置を用いて配列の準備を自動化する。次に、ABI 373 或いは 377 DNAシーケンシングシステム (Applied Biosystems)、MEGABACE 1000 DNAシーケンシングシステム (Molecular Dynamics, Sunnyvale CA) または当分野でよく知られている他の方法を用いてシーケンシングを行う。結果として得られた配列を当分野でよく知られている種々のアルゴリズムを用いて分析する。(Ausubel, F.M. (1997) *Short Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York NY, unit 7.7、Meyers, R.A. (1995) *Molecular Biology and Biotechnology*, Wiley VCH, New York NY, pp. 856-853.等を参照)。

【0118】

GCRECをコードする核酸配列を、部分的ヌクレオチド配列を利用し且つ当分野でよく知られているPCR法をベースにした種々の方法を用いて伸長させ、プロモーター及び調節要素等の上流配列を検出することができる。例えば、使用し得る方法の1つである制限部位PCR法は、ユニバーサルプライマー及びネステッドプライマーを用いてクローニングベクター内のゲノムDNAから未知の配列を増幅する方法である (Sarkar, G. (1993) *PCR Methods Applic* 2:318-322等を参照)。

別の方法に逆PCR法があり、これは広範な方向に伸長させたプライマーを用いて環状化した鋳型から未知の配列を増幅する方法である。鋳型は、既知のゲノム遺伝子座及びその周辺の配列からなる制限断片から得る (Triglia, T.ら (1988) *Nucleic Acids Res* 16:8186等を参照)。第3の方法としてキャプチャPCR法があり、これはヒト及び酵母菌人工染色体DNAの既知の配列に隣接するDNA断片をPCR増幅する方法に關与している (Lagerstrom, M.ら (1991) *PCR Methods Applic* 1:111-119等を参照)。この方法では、PCRを行う前に多重制限酵素の消化及び連結反応を用いて未知の配列領域内に組換え二本鎖配列を挿入することが可能である。また、未知の配列を検索するために用い得る別の方法については当分野で知られている (Parker, J.D.ら (1991) *Nucleic Acids Res.* 19:3055-3060等を参照)。更に、PCR、ネステッドプライマー及びPromoterFinder (商標) イブラリ (Clontech, Palo Alto CA) を用いてゲノムDNAをウォーキングすることができる。この手順は、ライブラリをスクリーニングする必要がなく、イントロン/エキソン接合部を見付けるのに有用である。全てのPCRベースの方法に対して、市販されているソフトウェア、例えばOLIGO 4.06プライマー分析ソフトウェア (National Biosciences, Plymouth MN) 或いは別の好適なプログラムを用いて、長さが約22~30ヌクレオチド、GC含有率が約50%以上、温度約68~72で鋳型に対してアニーリングするようにプライマーを設計し得る。

【0119】

完全長cDNAをスクリーニングする際は、より大きなcDNAを含むようにサイズ選択されたライブラリを用いるのが好ましい。更に、ランダムに初回抗原刺激を受けたライブラリは、しばしば遺伝子の5'領域を有する配列を含み、オリゴd(T)ライブラリが完全長cDNAを作製できない状況に対して好適である。ゲノムライブラリは、5'非転写調節領域への配列の伸長に有用であろう。

【0120】

市販のキャピラリー電気泳動システムを用いて、シーケンシングまたはPCR産物のサイズを分析し、またはそのヌクレオチド配列を確認することができる。具体的には、キャピラリーシーケンシングは、電気泳動による分離のための流動性ポリマーと、4つの異なるヌクレオチドに特異的であるような、レーザで活

性化される蛍光色素と、放出された波長の検出に利用するCCDカメラとを有し得る。出力/光の強度は、適切なソフトウェア (Applied Biosystems社のGENOTYPE R、SEQUENCE NAVIGATOR等) を用いて電気信号に変換し得る。サンプルのロードからコンピュータ分析及び電子データ表示までの全プロセスがコンピュータ制御可能である。キャピラリー電気泳動法は、特定のサンプルに少量しか存在しないようなDNA小断片のシーケンシングに特に適している。

【0121】

本発明の別の実施例では、GCRECをコードするポリヌクレオチド配列またはその断片を、適切な宿主細胞内でGCREC、GCRECの断片またはその機能的等価物を発現させるような組換えDNA分子内でクローニングし得る。遺伝暗号固有の宿重に起因して、実質的同一或いは機能的等価のアミノ酸配列をコードするような別のDNA配列を作製してGCRECの発現に利用し得る。

【0122】

種々の目的でGCRECがコードする配列を変えるために、本発明のヌクレオチド配列を当分野で通常知られている方法を用いて組み換えることができる。ここで目的には、限定するものではないが遺伝子産物のクローニング、プロセッシング、発現の調節がある。遺伝子断片及び合成オリゴヌクレオチドのランダムなフラグメンテーション及びPCR再アセンブリによるDNAシャッフリングを用い、ヌクレオチド配列を組み換えることが可能である。例えば、オリゴヌクレオチド仲介定方向突然変異誘導を利用して、新規な制限部位の生成、グリコシル化パターンの変更、コドン優先の変更、スプライス変異体の生成等を行う突然変異を導入し得る。

【0123】

本発明のヌクレオチドは、MolecularBreeding™ (Maxygen Inc., Santa Clara CA. 米国特許第5,837,458号、Chang, C.-C.ら (1999) Nat. Biotechnol. 17:793-797、Christians, F.C.ら (1999) Nat. Biotechnol. 17:259-264、Cramer, A.ら (1996) Nat. Biotechnol. 14:315-319に記載) 等のDNAシャッフリング技術の対象となり、GCRECの生物学的特性、例えば生物活性、酵素力、或いは他の分子や化合物との結合力等を変更または向上させ得る。DNAシャッフリングは、遺

伝子断片のPCR仲介再組換えを用いて遺伝子変異体のライブラリを生成するプロセスである。ライブラリはその後、その遺伝子変異体を所望の特性に同定するような選択またはスクリーニングにかける。次にこれらの好適な変異体をプールし、更に反復してDNAシャッフリング及び選択/スクリーニングを行ってもよい。このように、遺伝の多様性は「人為的」品種改良及び急速な分子の進化を経て創生される。例えば、ランダムポイント突然変異を有する単一の遺伝子の断片を再結合し、スクリーニングし、その後所望の特性が最適化されるまでシャッフリングすることができる。或いは、所定の遺伝子を同種または異種のいずれかから得た同一遺伝子ファミリーの相同遺伝子と再結合し、それによって天然に存在する複数の遺伝子の遺伝多様性を、指図された制御可能な方法で最大化させることができる。

【0124】

別の実施例によれば、当分野でよく知られている化学的方法を用いて、GCRECをコードする配列の全部或いは一部を合成し得る (Caruthers, M.H.ら (1980) *Nucleic. Acids Symp. Ser 7:215-223*, Horn, T.ら (1980) *Nucleic. Acids Symp. Ser. 7:225-232*等を参照)。或いは、化学的方法を用いてGCRECそれ自体またはその断片を合成し得る。例えば、種々の液相または固相技術を用いてペプチド合成を行うことができる (Creighton, T. (1984) *Proteins, Structures and Molecular Properties*, WH Freeman, New York NY, pp. 55-60, Roberge, J.Y. ら (1995) *Science 269:202-204*等を参照)。自動合成はABI 431Aペプチドシンセサイザ (Perkin Elmer) を用いて達成し得る。更にGCRECのアミノ酸配列またはその任意の一部は、直接合成する間、または他のタンパク質から得た配列またはその任意の一部と結合する間、或いはその両方を行っている間に変更し、変異型ポリペプチドを生成することが可能である。

【0125】

ペプチドは、分離用高速液体クロマトグラフィーを用いて実質上精製可能である (Chiez, R.M.and F.Z. Regnier (1990) *Methods Enzymol. 182:392-421*等を参照)。合成ペプチドの組成は、アミノ酸分析またはシーケンシングによって確認することができる (前出のCreighton, pp.28-53等を参照)。

【0126】

生物学的に活性なGCRECを発現させるために、GCRECをコードするヌクレオチド配列またはその誘導体を好適な発現ベクターに挿入することができる。好適な発現ベクターとは即ち好適な宿主内で挿入されたコーディング配列の転写及び翻訳の調節に必要な要素を含むベクターである。必要な要素には、ベクター及びGCRECをコードするポリヌクレオチド配列におけるエンハンサー、構成型及び発現誘導型プロモーター、5'及び3'の非翻訳領域などの調節配列がある。このような要素は、長さ及び特異性が様々である。固有開始シグナルを用いて、GCRECをコードする配列をより効果的に翻訳することが可能もある。このようなシグナルには、ATG開始コドンと、コザック配列などの近傍の配列が含まれる。GCRECをコードする配列及びその開始コドン、上流の調節配列が好適な発現ベクターに挿入された場合は、更なる転写調節シグナルや翻訳調節シグナルは必要なくなるであろう。しかしながら、コーディング配列或いはその断片のみが挿入された場合は、インフレームのATG開始コドンを含む外来性の翻訳調節シグナルが発現ベクターに含まれるようにすべきである。外来性の翻訳要素及び開始コドンは、様々な天然物及び合成物を起源とし得る。発現の効率は、用いられる特定の宿主細胞系に好適なエンハンサーを包含することによって高めることができる (Scharf, D. ら (1994) Results Probl. Cell Differ. 20:125-162.等を参照)。

【0127】

当業者によく知られている方法を用いて、GCRECをコードする配列と、好適な転写及び翻訳調節要素とを含む発現ベクターを構築することが可能である。この方法には、in vitro組換えDNA技術、合成技術及びin vivo遺伝子組換え技術がある (Sambrook, J. ら (1989) Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Plainview NYの4, 8, 16-17章、Ausubel, F.M. ら. (1995) Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York NYの9, 13, 16章等を参照)。

【0128】

種々の発現ベクター/宿主系を利用して、GCRECをコードする配列を保持及び発現し得る。限定するものではないがこのような発現ベクター/宿主系には、組

換えバクテリオファージ、プラスミドまたはコスミドDNA発現ベクターで形質転換させた細菌や、酵母菌発現ベクターで形質転換させた酵母菌や、ウイルス発現ベクター（例えばバキュロウイルス）に感染した昆虫細胞系や、ウイルス発現ベクター（例えばカリフラワーモザイクウイルスCaMVまたはタバコモザイクウイルスTMV）または細菌発現ベクター（例えばTiまたはpBR322プラスミド）で形質転換させた植物細胞系、動物細胞系などの微生物等がある（前出のSambrook、前出のAusubel、Van Heeke, G. and S.M. Schuster (1989) *J. Biol. Chem.* 264:5503-5509、Bitter, G.A.ら (1987) *Methods Enzymol.* 153:516-544; Scorer, C.A.ら (1994) *Bio/Technology* 12:18 1-184; Engelhard, E.K.ら (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:3224-3227、Sandig, V.ら (1996) *Hum. Gene Ther.* 7:1937-1945、タカマツ, N. (1987) *EMBOJ.* 6:307-311、Coruzzi, G.ら (1984) *EMBOJ.* 3:1671-1680、Broglie, R.ら (1984) *Science* 224:838-843、Winter, J.ら (1991) *Results Probl. Cell Differ.* 17:85-105、『マグローヒル科学技術年鑑』(The McGraw Hill Yearbook of Science and Technology) (1992) McGraw Hill New York NY, pp.191-196、Logan, J. and T. Shenk (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:3655-3659、Harrington, J.J.ら (1997) *Nat. Genet.* 15:345-355等を参照)。レトロウイルス、アデノウイルス、ヘルペスウイルスまたはワクシニアウイルス由来の発現ベクターまたは種々の細菌性プラスミド由来の発現ベクターを用いて、ポリヌクレオチド配列を標的器官、組織または細胞集団へ輸送することができる (Di Nicola, M.ら (1998) *Cancer Gen. Ther.* 5(6):350-356、Yu, M.ら (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90(13):6340-6344、Buller, R.M.ら (1985) *Nature* 317(6040):813-815; McGregor, D.P.ら (1994) *Mol. Immunol.* 31(3):219-226、Verma, I.M. and N. Somia (1997) *Nature* 389:239-242等を参照)。本発明は、使用する宿主細胞によって限定されるものではない。

【0129】

細菌系では、GCRECをコードするポリヌクレオチド配列の使用目的に応じて多数のクローニングベクター及び発現ベクターを選択し得る。例えば、GCRECをコードするポリヌクレオチド配列の日常的なクローニング、サブクローニング及び

増殖には、PBLUESCRIPT (Stratagene, La Jolla CA) またはPSPORT 1 プラスミド (Life Technologies) などの多機能大腸菌ベクターを用いることができる。GCRECをコードする配列の、ベクターの多数のクローニング部位への連結反応によって、lacZ 遺伝子が破壊され、組換え分子を含む形質転換された細菌を同定するための比色スクリーニング法が可能となる。更にこれらのベクターは、クローニングされた配列における *in vitro* 転写、ジデオキシのシーケンシング、ヘルパーファージによる一本鎖の救出、入れ子状態の欠失の生成にも有用であろう (Van Heeke, G. and S.M. Schuster (1989) J. Biol. Chem. 264:5503-5509. 等を参照)。多量のGCRECが必要な場合、例えば抗体を生成する場合などには、GCRECの発現をハイレベルで誘導するベクターが使用できる。例えば、強力な誘導T5バクテリオファージプロモーターまたは誘導T7バクテリオファージプロモーターを含むベクターが使用できる。

【0130】

酵母の発現系を使用してGCRECを生成し得る。因子、アルコールオキシダーゼ、PGHプロモーター等の構成型或いは誘導型のプロモーターを含む多数のベクターが、酵母菌サッカロミセス - セレビジエまたは *Pichia pastoris* に使用可能である。更に、このようなベクターは、発現したタンパク質を分泌或いは細胞内への保持のいずれかに誘導し、安定した増殖のために外来配列の宿主ゲノムへの組込みを可能にする (前出のAusubel (1995)、前出のBitter、前出のScorer等を参照)。

【0131】

植物系を使用してGCRECを発現することも可能である。GCRECをコードする配列の転写は、ウイルスプロモーター、例えば単独或いはTMV (タカマツ, N. (1987) EMBO J 6:307-311) 由来のオメガリーダー配列と組み合わせて用いられるようなCaMV由来の35S及び19Sプロモーターによって促進される。或いは、RUBISCOの小サブユニット等の植物プロモーターまたは熱ショックプロモーターを用いてもよい (前出のCoruzzi、前出のBroglie、前出のWinter等を参照)。これらの構成物は、直接DNA形質転換または病原体を媒介とする形質移入によって、植物細胞内に導入可能である。(『マグローヒル科学技術年鑑』(The McGraw Hill Yearb

ook of Science and Technology) (1992) McGraw Hill New York NY, pp.191-196等を参照。)

哺乳動物細胞においては、多数のウイルスベースの発現系を利用し得る。発現ベクターとしてアデノウイルスを用いる場合、GCRECをコードする配列は、後発プロモーター及び3連リーダー配列からなるアデノウイルス転写/翻訳複合体に連結反応され得る。可欠E1またはE3領域へウイルスのゲノムを挿入し、宿主細胞でGCRECを発現する感染ウイルスを得ることが可能である (Logan, J. and T. Shenk (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. 81:3655-3659等を参照)。更に、ラウス肉腫ウイルス (RSV) エンハンサー等の転写エンハンサーを用いて、哺乳動物宿主細胞における発現を増大させ得る。SV40またはEBVをベースにしたベクターを用いてタンパク質を高レベルで発現させることもできる。

【0132】

ヒト人工染色体 (HAC) を用いて、プラスミドに含まれ且つプラスミドから発現するものより大きなDNAの断片を輸送することもできる。治療目的のために約6 kb ~ 10 MbのHACを作製し、従来の輸送方法 (リポソーム、ポリカチオンアミノポリマー、またはベシクル) で供給する (Harrington, J.J. ら (1997) Nat Genet. 15:345-355.等を参照)。

【0133】

長期にわたり哺乳動物系内で組換えタンパク質を生成するためには、細胞株内のGCRECの安定発現が望ましい。例えば、発現ベクターであって複製発現因子、内在性発現因子、或いはその両者のウイルス起源を含むものと、同一或いは別のベクター上の選択可能マーカー遺伝子とを用いて、GCRECをコードする配列を細胞株に形質転換することが可能である。ベクターの導入後、選択培地に移す前に強化培地で約1 ~ 2日間細胞を増殖させることができる。選択可能マーカーの目的は選択培地への抵抗性を与えることであり、選択可能マーカーが存在することにより、導入された配列をうまく発現するような細胞の成長及び回収が可能となる。安定的に形質転換された細胞の耐性クローンは、その細胞型に適した組織培養技術を用いて増殖可能である。

【0134】

任意の数の選択系を用いて、形質転換細胞株を回収できる。限定するものではないがこのような選択系には、*tk⁻* 単純細胞のために用いられるヘルペスウイルスチミジンキナーゼ遺伝子と、*apr^r* 細胞のために用いられるアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ遺伝子がある (Wigler, M. ら (1977) *Cell* 11:223-232、Lowy, I. ら (1980) *Cell* 22:817-823等を参照)。また、選択の基礎として代謝拮抗物質、抗生物質或いは除草剤への耐性を用いることができる。例えば*dhfr*はメトトレキセートに対する耐性を与え、*neo*はアミノグリコシッドネオマイシン及びG-418に対する耐性を与え、*als*はクロルスルフロンに対する耐性を、*pat*はホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼに対する耐性を各々与える (Wigler, M. ら (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:3567-3570、Colbere-Garapin, F. ら (1981) *J. Mol. Biol.* 150:1-14 等を参照)。この他の選択可能遺伝子、例えば、代謝のための細胞要求を変える*trpB*及び*hisD*は、文献に記載されている (Hartman, S.C. and R.C. Mulligan (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:8047-8051等を参照)。可視マーカー、例えばアノトシアニン、緑色蛍光タンパク質 (GFP; Clontech)、グルクロニダーゼ及びその基質 グルクロニド、またはルシフェラーゼ及びその基質ルシフェリン等を用いてもよい。これらのマーカーを用いて、トランスフォーマントを特定するだけでなく、特定のベクター系に起因する一過性或いは安定したタンパク質発現を定量することが可能である (Rhodes, C.A. (1995) *Methods Mol. Biol.* 55:121-131等を参照)。

【0135】

マーカー遺伝子発現の存在 / 不存在によって目的の遺伝子の存在が示唆されても、その遺伝子の存在及び発現の確認が必要な場合もある。例えば、GCRECをコードする配列がマーカー遺伝子配列内に挿入された場合、GCRECをコードする配列を含む形質転換細胞は、マーカー遺伝子機能の欠落により同定することが可能である。または単一プロモーター制御下で、GCRECをコードする配列とタンデムにマーカー遺伝子を配置することも可能である。誘導または選択に応答したマーカー遺伝子の発現は通常、タンデム遺伝子の発現も示す。

【0136】

一般に、GCRECをコードする核酸配列を含み且つGCRECを発現する宿主細胞は、

当業者によく知られている種々の方法を用いて同定することが可能である。限定するものではないが当業者によく知られている方法には、DNA-DNA或いはDNA-RNAハイブリダイゼーション、PCR法、核酸或いはタンパク質の検出、定量、或いはその両方を行うための膜系、溶液ベース或いはチップベースの技術を含むタンパク質バイオアッセイまたはイムノアッセイ技術がある。

【0137】

特異的ポリクローナル抗体または特異的モノクローナル抗体を用いてGCRECの発現の検出及び計測を行うための免疫学的方法は、当分野で公知である。このような技術の例としては、酵素に結合したイムノソルベントアッセイ (ELISA)、ラジオイムノアッセイ (RIA)、蛍光活性化細胞選別 (FACS) などが挙げられる。GCREC上の2つの非干渉エピトープに反応するモノクローナル抗体を用いた、2部位モノクローナルベースのイムノアッセイ (two-site, monoclonal-based immunoassay) が好ましいが、競合結合アッセイも用いることもできる。これらのアッセイ及びこれ以外のアッセイは、当分野で公知である (Hampton, R. ら (1990) *Serological Methods, a Laboratory Manual*. APS Press. St Paul. MN, Sect. IV、Coligan, J. E. ら (1997) *Current Protocols in Immunology*, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience, New York NY、Pound, J.D. (1998) *Immunochemical Protocols*, Humana Press, Totowa NJ等を参照)。

【0138】

多岐にわたる標識方法及び結合方法が、当業者に知られており、様々な核酸アッセイおよびアミノ酸アッセイにこれらの方法を用い得る。GCRECをコードするポリヌクレオチドに関連する配列を検出するための、標識されたハイブリダイゼーションプローブ或いはPCRプローブを産出する方法には、オリゴ標識化、ニックトランスレーション、末端標識化、または標識されたヌクレオチドを用いるPCR法がある。或いは、GCRECをコードする配列またはその任意の断片を、mRNAプローブを産出するためのベクターにクローニングすることも可能である。このようなベクターは、当分野において知られており、市販もされており、T7、T3またはSP6等の好適なRNAポリメラーゼ及び標識されたヌクレオチドを加えて、in vitroでRNAプローブの合成に用いることができる。このような方法は、例えばAmersha

m Pharmacia Biotech、Promega (Madison WI)、U.S. Biochemical等から市販されている種々のキットを用いて実行することができる。検出を容易にするために用い得る好適なレポーター分子或いは標識には、基質、補助因子、インヒビター、磁気粒子のほか、放射性核種、酵素、蛍光剤、化学発光剤、発色剤等がある。

【0139】

GCRECをコードするヌクレオチド配列を用いて形質転換した宿主細胞は、細胞培地からのタンパク質の回収及び発現に適した条件下で培養し得る。形質転換細胞から製造されたタンパク質が分泌されるか細胞内に留まるかは、使用される配列、ベクター、或いはその両者に依存する。当業者であれば理解し得るように、GCRECをコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターを、原核細胞膜または真核細胞膜を透過するGCRECの直接分泌を誘導するシグナル配列を含むように設計し得る。

【0140】

更に、宿主細胞株の選択は、挿入した配列の発現を調節する能力または発現したタンパク質を所望の形に処理する能力によって行い得る。限定するものではないがこのようなポリペプチドの修飾には、アセチル化、カルボキシル化、グリコシル化、リン酸化、脂質化及びアシル化がある。タンパク質の「プレプロ」または「プロ」形を切断するような翻訳後処理を利用して、タンパク質のターゲティング、折りたたみ及び/または活性を特定することも可能である。翻訳後の活性のための固有の細胞装置及び特徴のある機構を有する種々の宿主細胞（例えばCHO、HeLa、MDCK、MEK293、WI38等）は、American Type Culture Collection (ATCC, Bethesda, VA) から入手可能であり、外来タンパク質の正しい修飾及び処理を確実にするように選択し得る。

【0141】

本発明の別の実施例では、GCRECをコードする天然の核酸配列、修飾核酸配列または組換え核酸配列を、上記任意の宿主系において融合タンパク質の翻訳をもたらす異種配列に連結反応させることができる。例えば、市販されている抗体を用いて認識可能な異種部分を含むキメラGCRECタンパク質は、GCREC活性阻害剤に対するペプチドライブラリのスクリーニングを促進し得る。また、異種タンパク

質部分及び異種ペプチド部分も、市販されている親和性基質を用いて融合タンパク質の精製を促進し得る。限定されるものではないがこのような部分には、グルタチオンSトランスフェラーゼ (GST)、マルトース結合タンパク質 (MBP)、チオレドキシン (Trx)、カルモジュリン結合ペプチド (CBP)、6-His、FLAG、c-myc、赤血球凝集素 (HA) がある。GSTは固定化グルタチオン上で、MBPはマルトース上で、Trxはフェニルアルシンオキシド上で、CBPはカルモジュリン上で、そして6-Hisは金属キレート樹脂上で、同族の融合タンパク質の精製を可能にする。FLAG、c-myc及び赤血球凝集素 (HA) は、これらのエピトープ標識を特異的に認識する市販されているモノクローナル抗体及びポリクローナル抗体を用いて、融合タンパク質の免疫親和性精製を可能にする。また、融合タンパク質を遺伝子操作し、GCRECが精製後に異種部分から切断され得るように、GCRECコード配列と異種タンパク質配列の間にタンパク質分解性開裂部位を含めることもできる。融合タンパク質の発現及び精製方法は、前出のAusubel (1995) 10章に記載されている。市販されている種々のキットを用いて融合タンパク質の発現及び精製を促進することもできる。

【0142】

本発明の更に別の実施例では、TNTウサギ網状赤血球可溶化液またはコムギ胚芽抽出系 (Promega) を用いて、放射能標識したGCRECの合成が *in vitro* で可能である。これらの系は、T7、T3またはSP6プロモーターと機能的に結合したタンパク質コード配列の転写及び翻訳を結合する。翻訳は、例えば³⁵Sメチオニンのような放射能標識したアミノ酸前駆体の存在下で起こる。

【0143】

治療

化学的及び構造的類似性、例えば配列及びモチーフとの関連における類似性が、GCRECの領域と細胞骨格関連タンパク質間に存在する。更にGCRECの発現は、細胞増殖、癌及び炎症に密接に関連している。従ってGCRECは、細胞増殖異常、神経障害、心血管障害、胃腸障害、自己免疫/炎症疾患及び代謝障害並びにウイルス性感染症において或る役割を果たすものと考えられる。GCRECの発現または活性の増大に関連する疾患の治療においては、GCRECの発現または活性を低下させ

ることが望ましい。また、GCRECの発現または活性の低下に関連する疾患の治療においては、GCRECの発現または活性を増大させることが望ましい。

【0144】

従って、或る実施例において、GCRECの発現または活性の低下に関連した疾患の治療または予防のために、患者にGCRECまたはその断片や誘導体を投与することが可能である。限定するものではないがこのような疾患の例として細胞増殖異常が含まれ、その中には日光性角化症、動脈硬化症、アテローム性動脈硬化症、滑液包炎、硬変、肝炎、混合型結合組織病（MCTD）、骨髄線維症、発作性夜間ヘモグロビン尿症、真性多血症、乾癬、原発性血小板血症と、腺癌、白血病、リンパ腫、黒色腫、骨髄腫、肉腫、奇形癌を含む癌、具体的には副腎、膀胱、骨、骨髄、脳、乳房、頸部、胆嚢、神経節、消化管、心臓、腎臓、肝臓、肺、筋肉、卵巣、膵臓、副甲状腺、陰茎、前立腺、唾液腺、皮膚、脾臓、精巣、胸腺、甲状腺、子宮の癌等が含まれ、神経障害が含まれ、その中には癲癇、虚血性脳血管障害、脳卒中、大脳新生物、アルツハイマー病、ピック病、ハンチントン病、痴呆、パーキンソン病その他の錐体外路障害、筋萎縮性側索硬化その他の運動ニューロン障害、進行性神経性筋萎縮症、色素性網膜炎、遺伝性運動失調、多発性硬化症その他の脱髄疾患、細菌性及びウイルス性髄膜炎、脳膿瘍、硬膜下蓄膿症、硬膜外膿瘍、化膿性頭蓋内血栓性静脈炎、脊髄炎及び神経根炎、ウイルス性中枢神経系疾患と、クールー、クロイツフェルト ヤコブ病及びガストマン ストラウスラー シャインカー症候群を含むプリオン病と、致死性家族性不眠症、神経系の栄養病及び代謝病、神経線維腫症、結節硬化症、小脳網膜性血管芽腫症（cerebellar retinal hemangioblastomatosis）、脳3叉神経血管症候群、精神薄弱その他の中枢神経系発達障害、脳性麻痺、神経骨格異常、自律神経系障害、脳神経障害、脊髄病、筋ジストロフィーその他の神経筋疾患、末梢神経疾患、皮膚筋炎及び多発性筋炎と、遺伝性、代謝性、内分泌性及び中毒性ミオパシーと、重症筋無力症、周期性四肢麻痺と、気分障害、不安障害及び精神分裂病を含む精神障害と、季節型感情障害（SAD）と、静座不能、健忘症、緊張病、糖尿病性ニューロパシー、錐体外路性終末欠陥症候群、ジストニー、分裂病性精神障害、帯状疱疹後神経痛、トゥーレット病、進行性核上麻痺、皮質基底核変性症（corticobasal degen

eration)、家族性前頭側頭骨痴呆が含まれ、また心血管障害も含まれ、その中には動静脈瘻、アテローム性動脈硬化症、高血圧、脈管炎、レイノー病、静脈奇形、動脈解離、静脈瘤、血栓静脈炎及び静脈血栓、血管の腫瘍、血栓崩壊の合併症、バルーン血管形成術(balloon angioplasty)、血管置換術、大動脈冠動脈バイパス術移植手術(coronary artery bypass graft surgery)などの血管疾患と、うっ血性心不全、虚血性心疾患、狭心症、心筋梗塞、高血圧性心疾患、変性弁膜性心疾患、石灰化大動脈弁狭窄症、先天性2尖大動脈弁、僧帽弁輪状石灰化(mitral annular calcification)、僧帽弁脱出、リウマチ熱、リウマチ性心疾患、感染性心内膜炎、非細菌性血栓性心内膜炎、全身性紅斑性狼瘡の心内膜炎、カルチノイド心疾患、心筋症、心筋炎、心膜炎、腫瘍性心疾患、先天性心臓疾患、心臓移植の合併症などの心疾患が含まれ、また胃腸障害も含まれ、その中には嚥下障害、消化性食道炎、食道痙攣、食道狭窄、食道癌、消化不良、消化障害、胃炎、胃癌、食欲不振、悪心、嘔吐、胃不全麻痺、洞または幽門の浮腫、腹部アングナ、胸焼け、胃腸炎、イレウス、腸管感染、消化性潰瘍、胆石症、胆嚢炎、胆汁うっ滞、膵臓炎、膵臓癌、胆道疾患、肝炎、高ビリルビン血症、硬変症、肝臓の受動性うっ血、ヘパトーム、感染性大腸炎、潰瘍性大腸炎、潰瘍性直腸炎、クローン病、ホイップル病、マロリー ヴァイス症候群、結腸癌、結腸閉塞、過敏性腸症候群、短小腸症候群、下痢、便秘、胃腸出血、後天性免疫不全症候群(AIDS)腸症、黄疸、肝性脳症、肝腎症候群、肝炎、血色素症、ウィルソン病、アンチトリプシン欠損症、ライ症候群、原発性硬化性胆管炎、肝梗塞、門脈循環閉塞及び血栓、小葉中心壊死、肝臓紫斑病、肝静脈血栓、肝静脈閉塞症、子癇前症、子癇、妊娠性急性肝脂肪、妊娠性肝臓内胆汁うっ滞と、結節性再生及び腺腫、癌腫を含む肝癌が含まれ、また自己免疫/炎症疾患も含まれ、その中には後天性免疫不全症候群(AIDS)、アジソン病、成人呼吸窮迫症候群、アレルギー、強直性脊椎炎、アミロイド症、貧血、喘息、アテローム性動脈硬化症、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性甲状腺炎、自己免疫多発性内分泌腺障害症(APECED)、気管支炎、胆嚢炎、接触皮膚炎、クローン病、アトピー性皮膚炎、皮膚筋炎、糖尿病、肺気腫、リンパ球毒素性一時性リンパ球減少症、赤芽球症、結節性紅斑、萎縮性胃炎、糸球体腎炎、グッドパスチャー症候群、痛風、グレーブス病、橋

本甲状腺炎、過好酸球増加症、過敏性大腸症候群、多発性硬化症、重症筋無力症、心筋または心膜の炎症、骨関節炎、骨粗しょう症、膵炎、多発性筋炎、乾癬、ライター症候群、リウマチ様関節炎、強皮症、シェーグレン症候群、全身性アナフィラキシー、全身性紅斑性狼瘡、全身性硬化症、血小板減少症、潰瘍性大腸炎、ブドウ膜炎、ウェルナー症候群、癌の合併症、血液透析、体外循環、ウイルス性感染症、細菌性感染症、真菌性感染症、寄生虫感染症、原虫感染症、蠕虫の感染症及び外傷が含まれ、また代謝障害も含まれ、その中には糖尿病、肥満症及び骨粗鬆症が含まれ、またアデノウイルス、アレナウイルス、ブニヤウイルス、カリチウイルス、コロナウイルス、フィロウイルス、ヘパドナウイルス、ヘルペスウイルス、フラビウイルス、オルソミクソウイルス、パルボウイルス、パポバウイルス、パラミクソウイルス、ピコルナウイルス、ポックスウイルス、レオウイルス、レトロウイルス、ラブドウイルス及びトンガウイルス (tongavirus) として分類されるウイルス性病原体による感染症も含まれる。

【0145】

別の実施例では、GCRECまたはその断片や誘導体を発現し得るベクターを患者に投与して、限定するものではないが上記した疾患を含むGCRECの発現または活性の低下に関連した疾患を治療または予防することも可能である。

【0146】

更に別の実施例では、実質的に精製されたGCRECを含む成分を好適な医薬用担体と共に患者に投与して、限定するものではないが上記した疾患を含むGCRECの発現または活性の低下に関連した疾患を治療または予防することも可能である。

【0147】

更に別の実施例では、GCRECの活性を調節するアゴニストを患者に投与して、限定するものではないが上記した疾患を含むGCRECの発現または活性の低下に関連した疾患を治療または予防することも可能である。

【0148】

更に別の実施例では、患者にGCRECのアンタゴニストを投与して、GCRECの発現または活性の増大に関連した疾患を治療または予防することが可能である。限定するものではないがこのような疾患の例には、上記した細胞増殖異常、神経障害

、心血管障害、胃腸障害、自己免疫/炎症疾患及び代謝障害並びにウイルス性感染症がある。一実施態様においては、アンタゴニストとして直接的に、或いはGCRECを発現する細胞または組織に薬剤を輸送するターゲティングまたは輸送機構として間接的にGCRECと特異結合する抗体を用いることができる。

【0149】

別の実施例では、GCRECをコードするポリヌクレオチドの相補体を発現するベクターを患者に投与して、限定するものではないが上記した疾患を含むGCRECの発現または活性の増大に関連した疾患を治療または予防することも可能である。

【0150】

別の実施例では、本発明の任意のタンパク質、アンタゴニスト、抗体、アゴニスト、相補配列、またはベクターを、別の好適な治療薬と組み合わせて投与することもできる。併用療法で用いる好適な治療薬は、当業者が従来 of 医薬原理に従ってを選択し得る。治療薬と組み合わせることにより、上記した種々の疾患の治療または予防に相乗効果をもたらし得る。この方法を用いることにより少量の各薬剤で医薬効果をあげることが可能となり、それによって副作用の可能性を低減し得る。

【0151】

GCRECのアンタゴニストは、本技術分野で一般的に知られている方法を用いて製造し得る。具体的には、精製されたGCRECを用いて抗体を作るか、治療薬のライブラリをスクリーニングして、GCRECと特異結合するものを同定することが可能である。GCRECの抗体も、本技術分野で一般的に知られている方法を用いて製造することが可能である。限定するものではないがこのような抗体には、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、一本鎖抗体、Fab断片及びFab発現ライブラリによって作られた断片が含まれ得る。中和抗体（即ち二量体の形成を阻害する抗体）は通常、治療用に好適である。

【0152】

抗体の産生のためには、ヤギ、ウサギ、ラット、マウス、ヒト、その他を含む種々の宿主は、GCREC、またはGCRECの任意の断片またはオリゴペプチドであって免疫抗原性の特性を有するものを注入することによって免疫化することができる

。宿主の種に応じて、種々のアジュバントを用いて免疫応答を高めることもできる。限定するものではないがこのようなアジュバントには、フロイントアジュバントと、水酸化アルミニウム等のミネラルゲルアジュバントと、リゾレシチン、プルロニックポリオール、ポリアニオン、ペプチド、油性乳剤、キーホールリンペットヘモシニアン、ジニトロフェノール等の界面活性剤とがある。ヒトに用いられるアジュバントの中では、BCG（カルメット ゲラン杆菌）及びコリネバクテリウム パルヴムが特に好ましい。

【0153】

GCRECに対する抗体を誘導するために用いるオリゴペプチド、ペプチドまたは断片は、少なくとも約5のアミノ酸からなり、一般的には少なくとも約10のアミノ酸からなるアミノ酸配列を有するものが好ましい。これらのオリゴペプチド、ペプチドまたは断片は、天然のタンパク質のアミノ酸配列の一部と同一であり且つ小さな天然の分子の全アミノ酸配列を含むことが望ましい。GCRECアミノ酸の短い伸長部は、別のタンパク質、例えばキーホールリンペットヘモシニアンの配列と融合し、キメラ分子に対する抗体が産生され得る。

【0154】

GCRECに対するモノクローナル抗体は、抗体分子を産生する任意の技術を用いて、培地内の連続した細胞株によって作製し得る。限定するものではないがこのような技術には、ハイブリドーマ技術、ヒトB細胞ハイブリドーマ技術及びEBV-ハイブリドーマ技術がある（Kohler, G. ら. (1975) *Nature* 256:495-497、Kozbor, D. ら (1985) *J. Immunol. Methods* 81:31-42、Cote, R.J. ら (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:2026-2030、Cole, S.P. ら (1984) *Mol. Cell Biol.* 62:109-120等を参照）。

【0155】

更に、「キメラ抗体」を作製するために開発した技術、例えば好適な抗原特異性及び生物学的活性を有する分子を得るためのマウス抗体遺伝子のヒト抗体遺伝子へのスプライシングを用いることが可能である（Morrison, S.L. ら. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6851-6855、Neuberger, M.S. ら (1984) *Nature* 312:604-608、タケダ, S. ら (1985) *Nature* 314:452-454等を参照）。或いは、

一本鎖抗体を産生するために説明された技術を適用し、本技術分野で知られている方法を用いて、GCREC特異性一本鎖抗体を産生し得る。関連特異性を有するがイディオタイプ組成が異なるような抗体を、ランダムな組合せの免疫グロブリンライブラリからチェーンシャッフリングによって産生することもできる (Burton D.R. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:10134-10137等を参照)。

【0156】

抗体の産生は、リンパ球集団における *in vivo* 産生の誘導によって、或いは免疫グロブリンライブラリのスクリーニングまたは文献に開示されているような高特異結合試薬のパネルのスクリーニングによっても行い得る (Orlandi, R. ら (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 3833-3837、Winter, G. ら (1991) Nature 349:293-299等を参照)。

【0157】

GCRECのための特異結合部位を有する抗体を産生することもできる。例えば、限定するものではないがこのような断片には、抗体分子のペプシン消化によって作製される $F(ab')_2$ 断片と、 $F(ab')_2$ 断片のジスルフィド架橋を減らすことによって作製される Fab断片とがある。或いは、Fab発現ライブラリを作製することによって、モノクローナル Fab断片を所望の特異性と迅速且つ容易に同定することが可能となる (Huse, W.D. ら (1989) Science 256:1275-1281等を参照)。

【0158】

種々のイムノアッセイを用いてスクリーニングし、所望の特異性を有する抗体を同定することができる。確立された特異性を有するポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体の何れかを用いる免疫放射線アッセイまたは競合結合アッセイに対する数々のプロトコルは、本技術分野において公知である。このようなイムノアッセイは通常、GCRECとその特異性抗体間の複合体形成の計測に關与している。2つの非干渉性GCRECエピトープに反応するモノクローナル抗体を用いるような、2部位モノクローナルベースのイムノアッセイが一般に利用されるが、競合結合アッセイを利用してもよい (前出のPoundの文献)。

【0159】

ラジオイムノアッセイ技術と共に様々な方法、例えばスキッチャード分析を

用いて、GCRECに対する抗体の親和性を評価する。親和性は結合定数 K_a で表す。 K_a は、平衡状態においてGCREC抗体複合体のモル濃度を遊離抗体と遊離抗原のモル濃度で除した値であると定義する。ポリクローナル抗体は多様なGCRECエピトープに対する親和性が不均一であり、ポリクローナル抗体試薬のために決定した K_a は、GCREC抗体の平均親和性または結合活性を表す。モノクローナル抗体は特定のGCRECエピトープに対して単一特異的であり、モノクローナル抗体試薬のために決定した K_a は、親和性の真の測定値を表す。 K_a 値が約 $10^9 \sim 10^{12}$ L/molの範囲にあるような高親和性抗体試薬は、GCREC抗体複合体が激しい操作に耐えなければならないイムノアッセイに用いるのが好ましい。 K_a 値が約 $10^6 \sim 10^7$ L/molの範囲にあるような低親和性抗体試薬は、GCRECが抗体から最終的に活性化状態で解離する必要がある免疫精製及び類似の処理に用いるのが好ましい (Catty, D. (1988) Antibodies, Volume I: A Practical Approach, IRL Press, Washington, DC、Liddell, J. E. and Cryer, A. (1991) A Practical Guide to Monoclonal Antibodies, John Wiley & Sons, New York NY)。

【0160】

ポリクローナル抗体試薬の抗体価及び結合活性を更に評価して、或る下流の適用例に対するこのような試薬の品質及び適性を決定することができる。例えば、少なくとも $1 \sim 2$ mg/ml、好ましくは $5 \sim 10$ mg/mlの特異抗体を含むポリクローナル抗体試薬は、GCREC抗体複合体を沈殿させる必要がある処理において通常用いられる。抗体の特異性、抗体価、結合活性、様々な適用例における抗体の品質や使用に対する指針については、一般に入手可能である。(前出のCattyの文献、同Coliganらの文献等を参照)。

【0161】

本発明の別の実施例では、GCRECをコードするポリヌクレオチド、GCRECの任意の断片または相補配列を治療目的で使用することができる。ある実施形態では、GCRECをコードするポリヌクレオチドの相補配列がmRNAの転写を阻止するのに好適である場合にこれを使用し得る。具体的には、GCRECをコードするポリヌクレオチドに相補的な配列で細胞を形質転換し得る。従って、相補的分子または断片は、GCREC活性を調節するため、または遺伝子機能を調節するために使用し得る

。このような技術は既に本技術分野ではよく知られており、センスまたはアンチセンスオリゴヌクレオチドまたは大きな断片を、GCRECをコードする配列のコード領域または制御領域に延在する様々な位置から設計することが可能である (Agrawal, S., ed. (1996) *Antisense Therapeutics*, Humana Press Inc., Totawa NJ等を参照)。

【0162】

治療に用いる場合、アンチセンス配列を好適な標的細胞に導入するのに好適な任意の遺伝子送達系を用いることができる。アンチセンス配列は、転写時に標的タンパク質をコードする細胞配列の少なくとも一部に相補的な配列を発現する発現プラスミドの形で細胞内に輸送することが可能である (Slater, J.E. ら (1998) *J. Allergy Clin. Immunol.* 102(3):469-475 及び Scanlon, K.J. ら (1995) 9(13):1288-1296.等を参照)。アンチセンス配列はまた、例えばレトロウイルスやアデノ関連ウイルスベクター等のウイルスベクターを用いて細胞内に導入することもできる (Miller, A.D. (1990) *Blood* 76:271、前出のAusubel、Uckert, W. and W. Walther (1994) *Pharmacol. Ther.* 63(3):323-347等を参照)。その他の遺伝輸送機構には、リポソーム系、人工的なウイルスエンベロープ及び当分野で公知のその他の系が含まれる (Rossi, J.J. (1995) *Br. Med. Bull.* 51(1):217-225; Boado, R.J.ら (1998) *J. Pharm. Sci.* 87(11):1308-1315、Morris, M.C. ら (1997) *Nucleic Acids Res.* 25(14):2730-2736. 等を参照)。

【0163】

本発明の別の実施例では、GCRECをコードするポリヌクレオチドを、体細胞若しくは生殖細胞遺伝子治療に用いることが可能である。遺伝子治療を行うことにより、(i) 遺伝子欠損症 (例えばX染色体鎖遺伝 (Cavazzana-Calvo, M. ら (2000) *Science* 288:669-672) により特徴付けられる重度の複合型免疫欠損(SCID)-X1の場合)、先天性アデノシンデアミナーゼ (ADA) 欠損症に関連する重度の複合型免疫欠損 (Blaese, R.M. ら (1995) *Science* 270:475-480、Bordignon, C. ら (1995) *Science* 270:470-475)、嚢胞性繊維症 (Zabner, J. ら (1993) *Cell* 75:207-216; Crystal, R.G. ら (1995) *Hum. Gene Therapy* 6:643-666、Crystal, R.G. ら. (1995) *Hum. Gene Therapy* 6:667-703)、サラセミア (thalassam

ia)、家族性高コレステロール血症、第VIII因子若しくは第IX因子欠損に起因する血友病 (Crystal, 35 R.G. (1995) Science 270:404-410、Verma, I.M. and Somia. N. (1997) Nature 389:239-242) を治療し、(ii) 条件的致死性遺伝子産物を発現させ (例えば制御不能な細胞増殖に起因する癌の場合)、(iii) 細胞内の寄生虫 (例えばヒト免疫不全ウイルス(HIV) (Baltimore, D. (1988) Nature 335:395-396、Poeschla, E. ら (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 93:11395-11399)、B型若しくはC型肝炎ウイルス (HBV、HCV)、Candida albicans及びParacoccidioides brasiliensis等の真菌寄生虫、並びにPlasmodium falciparum及びTrypanosoma cruzi等の原虫寄生体に対する防御機能を有するタンパク質を発現させることができる。GCRECの発現若しくは調節に必要な遺伝子の欠損が疾患を発生させる場合、形質導入した細胞の好適な集団からGCRECを発現することにより、遺伝子欠損に起因する症状の発現を緩和し得る。

【0164】

本発明の更なる実施例では、GCRECをコードする哺乳動物発現ベクターを作製し、これらのベクターを機械的手段によってGCREC欠損細胞に導入することによって、GCRECの欠損による疾患や異常症を治療する。in vivo或いはex vitroの細胞に用いる機械的導入技術には、(i) 個々の細胞内への直接的なDNA微量注射法、(ii) 弾道的金粒子の打ち込み (ballistic gold particle delivery)、(iii) リポソーム仲介形質移入、(iv) 受容体仲介遺伝子導入、及び(v) DNAトランスポソンの使用 (Morgan, R.A. and W.F. Anderson (1993) Annu. Rev. Biochem. 62:191-217、Ivics, Z. (1997) Cell 91:501-510; Boulay, J-L. and H. Recipon (1998) Curr. Opin. Biotechnol. 9:445-450) がある。

【0165】

限定するものではないがGCRECの発現に影響を及ぼし得る発現ベクターには、PCDNA 3.1、EPITAG、PRCCMV2、PREP、PVAXベクター (Invitrogen, Carlsbad CA)、PCMV-SCRIPT、PCMV-TAG、PEGSH/PERV (Stratagene, La Jolla CA) 及びPTET-OFF、PTET-ON、PTRE2、PTRE2-LUC、PTK-HYG (Clontech, Palo Alto CA) がある。GCRECは、(i) 恒常的に活性なプロモーター (例えばサイトメガロウイルス (CMV)、ラウス肉腫ウイルス (RSV)、SV40ウイルス、チミジンキナーゼ (TK) また

は アクチン遺伝子)、(ii)誘導性プロモーター(例えばテトラサイクリン調節性プロモーター(Gossen, M. and H. Bujard (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89:5547-5551、Gossen, M. ら (1995) Science 268:1766-1769、Rossi, F.M.V. and H.M. Blau (1998) Curr. Opin. Biotechnol. 9:451-456)、市販のInvitrogen社のT-REXプラスミドに含まれる)、エクジソン誘導性プロモーター(Invitrogen社のプラスミドPVGRXR及びPINDから得られる)、FK506/ラパマイシン誘導性プロモーターまたはRU486/ミフェプリストーン誘導性プロモーター(前出のRossi, F.M.V. and H.M. Blau)、または(iii)正常個体由来の、GCRECをコードする内在性遺伝子の天然のプロモーター若しくは組織特異的プロモーターを用いて、発現させることができる。

【0166】

市販のリポソーム形質転換キット(例えばInvitrogen社のPerFect Lipid Transfection Kit)を用いれば、当業者は経験にそれほど頼らないでもポリヌクレオチドを培養中の標的細胞に導入することが可能になる。別法では、リン酸カルシウム法(Graham, F.L. and A.J. Eb (1973) Virology 52:456-467)若しくは電気穿孔法(Neumann, B. ら (1982) EMBO J. 1:841-845)を用いて形質転換を行う。初代細胞にDNAを導入するためには、標準化された哺乳動物の形質移入プロトコルの修飾が必要である。

【0167】

本発明の別の実施例では、GCRECの発現に関連する遺伝子欠損によって起こる疾患や異常症は、(i)レトロウイルス末端反復配列(LTR)プロモーターまたは独立プロモーターの制御下でGCRECをコードするポリヌクレオチドと、(ii)好適なRNAパッケージングシグナルと、(iii)追加レトロウイルス・シス作用性RNA配列及び効率的なベクターの増殖に必要なコード配列を伴うRev応答性エレメント(RRE)とからなるレトロウイルスベクターを作製して治療することができる。レトロウイルスベクター(例えばPFB及びPFBNE0)はStratagene社から市販されており、刊行データ(Riviere, I. ら. (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 92:6733-6737)に基づいている。上記データを引用することをもって本明細書の一部とする。ベクターは、好適なベクター産生細胞系(VPCL)において増殖

され、VPCLは、標的細胞上の受容体に対する向性を有するエンベロープ遺伝子またはVSVg等の乱交雑エンベロープタンパク質を発現する (Armentano, D. ら (1987) J. Virol. 61:1647-1650、Bender, M.A. ら (1987) J. Virol. 61:1639-1646、Adam, M.A. and A.D. Miller (1988) J. Virol. 62:3802-3806、Dull, T. ら (1998) J. Virol. 72:8463-8471、Zufferey, R. ら (1998) J. Virol. 72:9873-9880)。Riggに付与された米国特許第5,910,434号 ("Method for obtaining retrovirus packaging cell lines producing high transducing efficiency retroviral supernatant") は、レトロウイルスパッケージング細胞系を得るための方法について開示しており、これを引用することをもって本明細書の一部とする。レトロウイルスベクターの増殖、細胞集団 (例えばCD4⁺ T細胞) の形質導入、及び形質導入した細胞の患者への戻しは、遺伝子治療の分野では当業者に公知の方法であり、多数の文献に記載されている (Ranga, U. ら (1997) J. Virol. 71:7020-7029、Bauer, G. ら (1997) Blood 89:2259-2267、Bonyhadi, M.L. (1997) J. Virol. 71:4707-4716、Ranga, U. ら (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 95:1201-1206、Su, L. (1997) Blood 89:2283-2290)。

【0168】

別法では、アデノウイルス系遺伝子治療の輸送系を用いて、GCRECの発現に関連する1若しくは複数の遺伝子異常を有するような細胞にGCRECをコードするポリヌクレオチドを輸送する。アデノウイルス系ベクターの作製及びパッケージングについては、当業者に公知である。複製欠損型アデノウイルスベクターは、免疫調節タンパク質をコードする遺伝子を脾臓の無損傷の脾島内に導入するために可変性であることが証明された (Csete, M.E. ら (1995) Transplantation 27:263-268)。使用できる可能性のあるアデノウイルスベクターは、Armentanoに付与された米国特許第5,707,618号 ("Adenovirus vectors for gene therapy") に記載されており、引用することをもって本明細書の一部とする。アデノウイルスベクターについては、Antinozzi, P.A. ら (1999) Annu. Rev. Nutr. 19:511-544 及び Verma, I.M. and N. Somia (1997) Nature 18:389:239-242も参照されたい。両文献は、引用することをもって本明細書の一部とする。

【0169】

別法では、ヘルペス系遺伝子治療の輸送系を用いて、GCRECの発現に関連する1若しくは複数の遺伝子異常を有する標的細胞にGCRECをコードするポリヌクレオチドを輸送する。HSVが向性を有するような中枢神経系の細胞にGCRECを導入する際には、単純ヘルペスウイルス(HSV)系のベクターの使用は特に役立つ。ヘルペス系ベクターの作製及びパッケージングは、当業者に公知である。複製適格性単純ヘルペスウイルス(HSV)I型系のベクターは、レポーター遺伝子を霊長類の眼に輸送するために用いられてきた(Liu, X. ら (1999) *Exp. Eye Res.* 169:385-395)。HSV-1ウイルスベクターの作製についても、DeLucaに付与された米国特許第5,804,413号("Herpes simplex virus swains for gene transfer")に開示されており、該特許の引用をもって本明細書の一部とする。米国特許第5,804,413号には、ヒト遺伝子治療を含む目的のために好適なプロモーターの制御下において細胞に導入される少なくとも1つの内在性遺伝子を有するゲノムを含む組換えHSV d92についての記載がある。上記特許はまた、ICP4、ICP27及びICP22のために除去される組換えHSV系統の作製及び使用について開示している。HSVベクターについては、Goins, W.F. ら (1999) *J. Virol.* 73:519-532 及び Xu, H. ら (1994) *Dev. Biol.* 163:152-161も参照されたい。両文献は、引用をもって本明細書の一部とする。クローン化ヘルペスウイルス配列の操作、巨大ヘルペスウイルスのゲノムの異なった部分を含む多数のプラスミドを形質移入した後の組換えウイルスの継代、ヘルペスウイルスの成長及び増殖、並びにヘルペスウイルスの細胞への感染は、当業者に公知の技術である。

【0170】

別法では、ウイルス(正の一本鎖RNAウイルス)ベクターを用いてGCRECをコードするポリヌクレオチドを標的細胞に輸送する。プロトタイプのウイルスであるセムリキ森林熱ウイルス(Semliki Forest Virus, SFV)の生物学的研究が広範に行われており、遺伝子導入ベクターがSFVゲノムに基づいていることが分かった(Garoff, H. and K.-J. Li (1998) *Cun. Opin. Biotech.* 9:464-469)。

ウイルスRNAの複製中に、通常はウイルスカプシドタンパク質をコードするサブゲノムRNAが作り出される。このサブゲノムRNAは、完全長のゲノムRNAより高いレベルに複製されるため、酵素活性(例えばプロテアーゼ及びポリメラーゼ)

を有するウイルスタンパク質に比べてカプシドタンパク質が過剰産生される。同様に、GCRECに対するコード配列をカプシドコード領域の ウイルスゲノムに導入することにより、ベクター導入細胞において多数のGCRECコードRNAが産生され、高レベルのGCRECが合成される。通常は ウイルスの感染が数日以内での細胞溶解に関係する一方で、シンドビスウイルス (SIN) の変異体を有するハムスター正常腎臓細胞 (BHK-21) の持続的な感染を確立する能力は、 ウイルスの溶解複製を遺伝子治療に適用できるように好適に変更可能であることを示唆している (Dryga, S.A. ら. (1997) *Virology* 228 :74-83)。 ウイルスの宿主の範囲が広いことにより、様々な細胞タイプへのGCRECの導入が可能になる。或る集団におけるサブセットの細胞の特定形質導入は、形質導入前に細胞の選別を必要とし得る。 ウイルスの感染性cDNAクローンの処置方法、 ウイルスのcDNA及びRNAの形質移入方法及び ウイルスの感染方法は、当業者に公知である。

【0171】

転写開始部位由来のオリゴヌクレオチドを用いて遺伝子発現を阻害することも可能である。転写開始部位とは例えば開始部位から数えて約 - 10 と約 + 10 の間である。同様に、三重らせん塩基対の形成方法を用いて阻害が可能となる。三重らせん塩基対形成は、ポリメラーゼ、転写因子または調節分子の結合のために十分に開くような二重らせんの能力を阻害するので、三重らせん塩基対形成は有用である。三重らせんDNAを用いる最近の治療の進歩については文献に記載がある (Gee, J.E. ら (1994) in: Huber, B.E. and B.I. Carr, *Molecular and Immunologic Approaches*, Futura Publishing Co., Mt. Kisco, NY, pp.163-177等を参照)。相補配列またはアンチセンス分子もまた、転写物がリボソームに結合するのを阻止することによってmRNAの翻訳を阻止するべく設計することができる。

【0172】

リボザイムは酵素性RNA分子であり、RNAの特異的切断を触媒するためにリボザイムを用いることもできる。リボザイム作用のメカニズムは、ヌクレオチド鎖切断に先立つ相補的標的RNAへのリボザイム分子の配列特異性ハイブリダイゼーションに関与している。例えば、組換え型のハンマーヘッド型リボザイム分子は、GCRECをコードする配列のヌクレオチド鎖切断を特異的且つ効果的に触媒する。

【0173】

任意の潜在的RNA標的内の特異的リボザイム切断部位は、GUA、GUU、GUC配列を含めたりボザイム切断部位に対する標的分子をスキャンすることによって先ず同定される。一度同定されると、オリゴヌクレオチドを機能不全にするような2次構造の特徴に対して切断部位を含む標的遺伝子の領域に対応する15~20リボヌクレオチドの短いRNA配列を、評価することが可能になる。候補標的の適合性の評価も、リボヌクレアーゼ保護アッセイを用いて相補的オリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーションの実施容易性をテストすることによって行うことができる。

【0174】

本発明の相補リボ核酸分子及びリボザイムは、核酸分子合成のために当分野でよく知られている任意の方法を用いて作製し得る。任意の方法には、固相ホスホラミダイト化合物等のオリゴヌクレオチドを化学的に合成する方法がある。或いは、HRIPをコードするDNA配列のin vitro及びin vivo転写によってRNA分子を産出し得る。このようなDNA配列は、T7やSP6等の好適なRNAポリメラーゼプロモーターを用いて多様なベクター内に取り込むことが可能である。或いは、相補的RNAを構成的或いは誘導的に合成するようなこれらcDNA産物を、細胞系、細胞または組織内に導入することができる。

【0175】

細胞内の安定性を高め、半減期を長くするためにRNA分子を修飾することができる。限定するものではないが可能な修飾には、分子の5'末端、3'末端、あるいはその両方においてフランキング配列を追加したり、分子の主鎖内においてホスホジエステラーゼ結合ではなくホスホロチオネートまたは2' Oメチルを使用したりすることが含まれる。この概念は、PNAの産出に固有のものであり、これら全ての分子に拡大することができる。それには、内在性エンドヌクレアーゼによって容易には認識されないアデニン、シチジン、グアニン、チミン、及びウリジンにアセチル -、メチル -、チオ - 及び同様の修飾をしたものに加えて、非従来型塩基、例えばイノシン、クエオシン (queosine)、ワイプトシン (wybutosine) 等を包含することによる。

【0176】

本発明の追加実施例は、GCRECをコードするポリヌクレオチドの変異発現に有効な化合物をスクリーニングする方法を含む。限定するものではないが特異ポリヌクレオチドの変異発現に有効な化合物には、オリゴヌクレオチド、アンチセンスオリゴヌクレオチド、三重らせん形成オリゴヌクレオチド、転写因子その他のポリペプチド転写制御因子、及び特異ポリヌクレオチド配列と相互作用し得る非高分子化学的実体がある。有効な化合物は、ポリヌクレオチド発現のインヒビターまたはエンハンサーのいずれかとして作用することによりポリヌクレオチド発現を変異し得る。従って、GCRECの発現または活性の増加に関連する疾病の治療においては、GCRECをコードするポリヌクレオチドの発現を特異的に阻害する化合物が治療上有益であり、GCRECの発現または活性の低下に関連する疾病の治療においては、GCRECをコードするポリヌクレオチドの発現を特異的に促進する化合物が治療上有益であり得る。

【0177】

特異ポリヌクレオチドの変異発現における有効性に対して、少なくとも1個から複数個の試験化合物をスクリーニングし得る。試験化合物は、当分野で通常知られている任意の方法により得られる。このような方法には、ポリヌクレオチドの発現を変異させる場合と、既存の、市販のまたは専売の、天然または非天然の化合物ライブラリから選択する場合と、標的ポリヌクレオチドの化学的及び/または構造的特性に基づく化合物を合理的にデザインする場合と、組合せ的にまたは無作為に生成した化合物のライブラリから選択する場合に有効であることが知られているような化合物の化学修飾がある。GCRECをコードするポリヌクレオチドを含むサンプルは、少なくとも1つの試験化合物に曝され、このように得られる。サンプルには例えば、無傷細胞、透過化処理した細胞、細胞遊離系または再構成生化学系があり得る。GCRECをコードするポリヌクレオチドの発現における変化は、当分野で通常知られている任意の方法でアッセイする。通常、GCRECをコードするポリヌクレオチドの配列に相補的なヌクレオチド配列を有するプローブを用いたハイブリダイゼーションにより、特異ヌクレオチドの発現を検出する。ハイブリダイゼーション量を定量し、それによって1若しくは複数の試験化合

物に曝露される及び曝露されないポリヌクレオチドの発現の比較に対する基礎を形成し得る。試験化合物に曝露されるポリヌクレオチドの発現における変化の検出は、ポリヌクレオチドの発現を変異する際に試験化合物が有効であることを示している。特異ポリヌクレオチドの変異発現に有効な化合物に対して、例えば *Sc hizosaccharomyces pombe* 遺伝子発現系 (Atkins, D. ら (1999) 米国特許第5,932,435号、Arndt, G.M. ら (2000) *Nucleic Acids Res.* 28:E15) または HeLa 細胞等のヒト細胞系 (Clarke, M.L. ら (2000) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 268:8-13) を用いてスクリーニングを実行する。本発明の特定の実施例は、特異的ポリヌクレオチド配列に対するアンチセンス活性のためのオリゴヌクレオチド (デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド、ペプチド核酸、修飾オリゴヌクレオチド) の組み合わせライブラリをスクリーニングすることに関与している (Bruice, T.W. ら (1997) 米国特許第5,686,242号、Bruice, T.W. ら (2000) 米国特許第6,022,691号)。

【0178】

ベクターを細胞または組織に導入する多数の方法が利用可能であり、*in vivo*、*in vitro* 及び *ex vivo* の使用に対して同程度に適している。*ex vivo* 治療の場合、ベクターを患者から採取した肝細胞内に導入し、クローニング増殖して同一患者に自家移植で戻すことができる。トランスフェクション、リボソーム注入またはポリカチオンアミノポリマーによる輸送は、当分野でよく知られている方法を用いて実行することができる (Goldman, C.K. ら (1997) *Nat. Biotechnol.* 15:462-466. 等を参照)。

【0179】

上記の治療方法はいずれも、例えば、ヒト、イヌ、ネコ、ウシ、ウマ、ウサギ、サル等の哺乳動物を含めて治療が必要な全ての対象に適用できる。

【0180】

本発明の追加実施例は、通常薬剤として許容できる賦形剤で処方される活性成分を有する成分の投与に関連する。賦形剤には例えば、セルロース、ゴム及びタンパク質がある。様々な処方が通常知られており、詳細は *Remington's Pharmaceutical Sciences* (Maack Publishing, Easton PA) の最新版に記載されている。

このような成分は、GCREC、GCRECに対する抗体、擬態、アゴニスト、アンタゴニスト、またはGCRECインヒビターから構成し得る。

【0181】

本発明に用いられる成分は、任意の数の経路によって投与することができ、限定するものではないが経路には、経口、静脈内、筋肉内、動脈内、骨髄内、クモ膜下腔内、心室内、肺、経皮、皮下、腹腔内、鼻腔内、腸内、局所、舌下または直腸がある。

【0182】

肺から投与する成分は、液状または乾燥粉末状で調製し得る。このような成分は通常、患者が吸入する直前にエアロゾル化する。小分子（例えば伝統的な低分子重量有機薬）の場合には、速効製剤のエアロゾル輸送は当分野で公知である。高分子（例えばより大きなペプチド及びタンパク質）の場合には、当該分野において肺の肺泡領域を介しての肺輸送が最近向上したことにより、インスリン等の薬剤を実質的に血液循環へ輸送することを可能にした（Patton, J.S. ら, 米国特許第5,997,848号等を参照）。肺輸送は、針注射なしに投与する点で優れており、潜在的に有毒な浸透エンハンサーの必要性をなくす。

【0183】

本発明での使用に適した成分には、所定の目的を達成するために必要なだけの量の活性成分を含有する成分が含まれる。有効投与量の決定は、当業者の能力の範囲内で行う。

【0184】

特殊形状の成分は、GCRECまたはその断片を含む高分子を直接細胞内輸送するために調製される。例えば、細胞不透過性高分子を含むリポソーム製剤は、細胞融合及び高分子の細胞内輸送を促進し得る。或いは、GCRECまたはその断片をHIV Tat-1タンパク質から陽イオンN末端部に結合することもできる。このようにして生成された融合タンパク質は、マウスモデル系の脳を含む全ての組織の細胞に形質導入することがわかっている（Schwarze, S.R. ら (1999) Science 285:1569-1572）。

【0185】

任意の化合物に対して、細胞培養アッセイ、例えば新生物性細胞の細胞培養アッセイにおいて、或いは、動物モデル、例えばマウス、ウサギ、イヌまたはブタ等において、先ず治療の有効投与量を推定することができる。動物モデルはまた、好適な濃度範囲及び投与経路を決定するためにも用い得る。このような情報を用いて、次にヒトに対する有益な投与量及び投与経路を決定することができる。

【0186】

治療上の有効投与量は、症状や容態を回復させるような活性成分量を参考にする。そのような活性成分の例としては、GCRECまたはその断片、GCRECの抗体、GCRECのアゴニスト、アンタゴニストまたはインヒビターがある。薬用有効度及び毒性は、細胞培養または動物実験における標準的な薬剤手法によって、例えばED₅₀（集団の50%の医薬的有効量）またはLD₅₀（集団の50%の致死量）を測定するなどして決定することができる。毒性効果の治療効果に対する投与量の比は、治療指数であり、LD₅₀/ED₅₀比として表すことができる。高い治療指数を示すような成分が望ましい。細胞培養アッセイ及び動物実験から得られたデータは、ヒトに用いるための投与量の範囲を調剤するのに用いられる。このような組成物が含まれる投与量は、毒性を殆ど或いは全く含まず、ED₅₀を含むような血中濃度の範囲にあることが好ましい。用いられる投与形態、患者の感受性及び投与の経路によって、投与量はこの範囲内で様々に変わる。

【0187】

正確な投与量は、治療が必要な被験者に関する要素を考慮して、現場の医者が決定することになる。効果的なレベルの活性成分を与え、或いは所望の効果を維持するべく、投与量及び投与を調節する。被験者に関する要素としては、疾患の重症度、患者の通常健康状態、患者の年齢、体重及び性別、投与の時間及び頻度、薬剤の配合、反応感受性及び治療に対する応答等を考慮する。作用期間が長い成分は、特定の製剤の半減期及びクリアランス率によって3～4日毎に1度、1週間に1度、或いは2週間に1度の間隔で投与し得る。

【0188】

通常の投与量は、投与の経路にもよるが約0.1～100,000 µgであり、合計で約1gまでとする。特定の投与量及び輸送方法に関するガイダンスは文献

に記載されており、現場の医者は通常それを利用することができる。当業者は、タンパク質またはインヒビターに対する処方とは異なる、ヌクレオチドに対する処方を利用することになる。同様に、ポリヌクレオチドまたはポリペプチドの輸送は、特定の細胞、状態、位置等に特異的なものとなる。

【0189】

診断

別の実施例では、GCRECの発現によって特徴付けられる疾患の診断のために、或いはGCRECやGCRECのアゴニスト、アンタゴニストまたは阻害剤で治療を受けている患者をモニターするためのアッセイにおいて、GCRECを特異的に結合する抗体が用いられることがある。診断目的に有用な抗体は、上記の治療の箇所で記載した方法と同じ方法で調合される。GCRECの診断アッセイには、抗体及び標識を利用してヒトの体液において或いは細胞や組織のエキスにおいてGCRECを検出する方法が含まれる。抗体は、修飾して或いは修飾しないで使用し、レポーター分子の共有結合性或いは非共有結合性の接着によって標識化し得る。多様なレポーター分子が本技術分野で知られており、それらを用いることができる。幾つかのレポーター分子については上記した。

【0190】

GCRECを測定するための様々なプロトコル、例えばELISA、RIA、FACS等が本技術分野において知られており、GCREC発現の修正レベル或いは異常レベルを診断する基準を提供する。複合体の形成に適した条件下でヒト対象等の正常な哺乳動物対象から採取した体液または細胞とGCRECに対する抗体とを結合させることにより、GCREC発現の正常値または標準値が決定される。標準複合体形成量は、種々の方法、例えば測光法で定量できる。対象内で発現したGCRECの量、制御、検体からの病変サンプルを標準値と比較する。標準値と対象との偏差が疾患を診断するパラメータとなる。

【0191】

別の実施例によれば、GCRECをコードするポリヌクレオチドを診断目的に用いることもできる。用いられることができるポリヌクレオチドには、オリゴヌクレオチド配列、相補的RNA及びDNA分子、そしてPNAが含まれる。ポリヌクレオチド

は、検体におけるGCRECの発現が疾患と相関し得るような該検体における遺伝子発現の検出及び定量に用いることができる。診断アッセイは、GCRECの不在、存在及び過剰発現を測定するために、そして治療インターベンション中にGCRECレベルの調製をモニターするために用いることができる。

【0192】

ある実施形態では、GCRECをコードする核酸配列を同定するために、GCRECまたは近縁の分子をコードする、ゲノム配列を含むポリヌクレオチド配列を検出可能なPCRプローブとのハイブリダイゼーションを用いることができる。プローブが同定するのはGCREC、突然変異体または関連配列をコードするような、天然に存在する配列のみであるか否かは、プローブの特異性及びハイブリダイゼーション或いは増幅のストリンジェンシーによって決定されることになる。ここで、プローブの特異性とは、プローブが高特異領域（例えば5'調節領域）からなるのか、低特異領域（例えば保存されたモチーフ）からなるのかということである。

【0193】

プローブはまた、関連する配列の検出にも用いることができ、その配列はGCRECをコードする任意の配列と少なくとも50%の相同性を有し得る。本発明のハイブリダイゼーションプローブはDNAまたはRNAとすることができ、配列番号56乃至110の配列、或いはGCREC遺伝子のプロモーター、エンハンサー、イントロンを含むゲノム配列に由来し得る。

【0194】

GCRECをコードするDNAに対する特異的ハイブリダイゼーションプローブを作製する方法には、GCRECまたはGCREC誘導体をコードするポリヌクレオチド配列を、mRNAプローブを作製するためのベクターにクローニングする方法が含まれる。mRNAプローブ作製のためのベクターは、当業者に知られており、市販されており、好適なRNAポリメラーゼ及び好適な標識されたヌクレオチドを加えることによって、*in vitro*でRNAプローブを合成するために用いられ得る。ハイブリダイゼーションプローブは、種々のレポーターの集団によって標識され得る。レポーター集団の例としては、³²Pまたは³⁵S等の放射性核種、或いはアビジン/ビオチン結合系を介してプローブに結合されたアルカリホスファターゼ等の酵素標識などが

挙げられる。

【0195】

GCRECをコードするポリヌクレオチド配列は、GCRECの発現に係る疾患の診断の為に用い得る。限定するものではないがこのような疾患の例として細胞増殖異常が含まれ、その中には日光性角化症、動脈硬化症、アテローム性動脈硬化症、滑液包炎、硬変、肝炎、混合型結合組織病(MCTD)、骨髄線維症、発作性夜間へモグロビン尿症、真性多血症、乾癬、原発性血小板血症と、腺癌、白血病、リンパ腫、黒色腫、骨髄腫、肉腫、奇形癌を含む癌、具体的には副腎、膀胱、骨、骨髄、脳、乳房、頸部、胆嚢、神経節、消化管、心臓、腎臓、肝臓、肺、筋肉、卵巣、膵臓、副甲状腺、陰茎、前立腺、唾液腺、皮膚、脾臓、精巣、胸腺、甲状腺、子宮の癌等が含まれ、神経障害が含まれ、その中には癲癇、虚血性脳血管障害、脳卒中、大脳新生物、アルツハイマー病、ピック病、ハンチントン病、痴呆、パーキンソン病その他の錐体外路障害、筋萎縮性側索硬化その他の運動ニューロン障害、進行性神経性筋萎縮症、色素性網膜炎、遺伝性運動失調、多発性硬化症その他の脱髄疾患、細菌性及びウイルス性髄膜炎、脳膿瘍、硬膜下蓄膿症、硬膜外膿瘍、化膿性頭蓋内血栓性静脈炎、脊髄炎及び神経根炎、ウイルス性中枢神経系疾患と、クールー、クロイツフェルト ヤコブ病及びガストマン ストラウスラー シャインカー症候群を含むプリオン病と、致死性家族性不眠症、神経系の栄養病及び代謝病、神経線維腫症、結節硬化症、小脳網膜性血管芽腫症(cerebelloretinal hemangioblastomatosis)、脳3叉神経血管症候群、精神薄弱その他の中枢神経系発達障害、脳性麻痺、神経骨格異常、自律神経系障害、脳神経障害、脊髄病、筋ジストロフィーその他の神経筋疾患、末梢神経疾患、皮膚筋炎及び多発性筋炎と、遺伝性、代謝性、内分泌性及び中毒性ミオパシーと、重症筋無力症、周期性四肢麻痺と、気分障害、不安障害及び精神分裂病を含む精神障害と、季節型感情障害(SAD)と、静座不能、健忘症、緊張病、糖尿病性ニューロパシー、錐体外路性終末欠陥症候群、ジストニー、分裂病性精神障害、帯状疱疹後神経痛、トゥレット病、進行性核上麻痺、皮質基底核変性症(corticobasal degeneration)、家族性前頭側頭骨痴呆が含まれ、また心血管障害も含まれ、その中には動静脈瘤、アテローム性動脈硬化症、高血圧、脈管炎、レイノー病、静脈

奇形、動脈解離、静脈瘤、血栓静脈炎及び静脈血栓、血管の腫瘍、血栓崩壊の合併症、バルーン血管形成術 (balloon angioplasty)、血管置換術、大動脈冠動脈バイパス術移植手術 (coronary artery bypass graft surgery) などの血管疾患と、うっ血性心不全、虚血性心疾患、狭心症、心筋梗塞、高血圧性心疾患、変性弁膜性心疾患、石灰化大動脈弁狭窄症、先天性2尖大動脈弁、僧帽弁輪状石灰化 (mitral annular calcification)、僧帽弁脱出、リウマチ熱、リウマチ性心疾患、感染性心内膜炎、非細菌性血栓性心内膜炎、全身性紅斑性狼瘡の心内膜炎、カルチノイド心疾患、心筋症、心筋炎、心膜炎、腫瘍性心疾患、先天性心臓疾患、心臓移植の合併症などの心疾患が含まれ、また胃腸障害も含まれ、その中には嚥下障害、消化性食道炎、食道痙攣、食道狭窄、食道癌、消化不良、消化障害、胃炎、胃癌、食欲不振、悪心、嘔吐、胃不全麻痺、洞または幽門の浮腫、腹部アングナ、胸焼け、胃腸炎、イレウス、腸管感染、消化性潰瘍、胆石症、胆嚢炎、胆汁うっ滞、膵臓炎、膵臓癌、胆道疾患、肝炎、高ビリルビン血症、硬変症、肝臓の受動性うっ血、ヘパトーム、感染性大腸炎、潰瘍性大腸炎、潰瘍性直腸炎、クローン病、ホイップル病、マロリー ヴァイス症候群、結腸癌、結腸閉塞、過敏性腸症候群、短小腸症候群、下痢、便秘、胃腸出血、後天性免疫不全症候群 (AIDS) 腸症、黄疸、肝性脳症、肝腎症候群、肝炎、血色素症、ウィルソン病、アンチトリプシン欠損症、ライ症候群、原発性硬化性胆管炎、肝梗塞、門脈循環閉塞及び血栓、小葉中心壊死、肝臓紫斑病、肝静脈血栓、肝静脈閉塞症、子癇前症、子癇、妊娠性急性肝脂肪、妊娠性肝臓内胆汁うっ滞と、結節性再生及び腺腫、癌腫を含む肝癌が含まれ、また自己免疫 / 炎症疾患も含まれ、その中には後天性免疫不全症候群 (AIDS)、アジソン病、成人呼吸窮迫症候群、アレルギー、強直性脊椎炎、アミロイド症、貧血、喘息、アテローム性動脈硬化症、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性甲状腺炎、自己免疫多発性内分泌腺障害症 (APECED)、気管支炎、胆嚢炎、接触皮膚炎、クローン病、アトピー性皮膚炎、皮膚筋炎、糖尿病、肺気腫、リンパ球毒素性一時性リンパ球減少症、赤芽球症、結節性紅斑、萎縮性胃炎、糸球体腎炎、グッドパスチャー症候群、痛風、グレーブス病、橋本甲状腺炎、過好酸球増加症、過敏性大腸症候群、多発性硬化症、重症筋無力症、心筋または心膜の炎症、骨関節炎、骨粗しょう症、膵炎、多発性筋炎、乾癬

、ライター症候群、リウマチ様関節炎、強皮症、シェーグレン症候群、全身性ア
ナフィラキシー、全身性紅斑性狼瘡、全身性硬化症、血小板減少症、潰瘍性大腸
炎、ブドウ膜炎、ウェルナー症候群、癌の合併症、血液透析、体外循環、ウイル
ス性感染症、細菌性感染症、真菌性感染症、寄生虫感染症、原虫感染症、蠕虫の
感染症及び外傷が含まれ、また代謝障害も含まれ、その中には糖尿病、肥満症及
び骨粗鬆症が含まれ、またアデノウイルス、アレナウイルス、ブニヤウイルス、
カリチウイルス、コロナウイルス、フィロウイルス、ヘパドナウイルス、ヘルペ
スウイルス、フラビウイルス、オルソミクソウイルス、パルボウイルス、パポバ
ウイルス、パラミクソウイルス、ピコルナウイルス、ポックスウイルス、レオウ
イルス、レトロウイルス、ラウドウイルス及びトンガウイルス (tongavirus) と
して分類されるウイルス性病原体による感染症も含まれる。GCRECをコードする
ポリヌクレオチド配列は、サザン法、ノーザン法、ドットプロット法やその他の
膜ベースの技術と、PCR法と、ディップスティック (dipstick) 法、ピン及びマ
ルチフォーマットELISA様アッセイと、変異GCRECの発現を検出するために患者か
ら採取した体液または組織を利用するマイクロアレイとにおいて使用し得る。こ
のような定性方法または定量方法は、当分野で公知である。

【0196】

或る形態では、関連する疾患、特に上記した疾患を検出するアッセイにおいて
、GCRECをコードするヌクレオチド配列が有用であり得る。GCRECをコードするヌ
クレオチド配列は標準法で標識化され、ハイブリダイゼーション複合体の形成に
好適な条件下で、患者から採取した体液または組織のサンプルに添加することが
できる。好適なインキュベーション期間が経過したらサンプルを洗浄し、シグナ
ルを定量して標準値と比較する。患者サンプルのシグナル量が制御サンプルと比
べて著しく変化している場合は、サンプル内のGCRECをコードするヌクレオチド
配列の変異レベルは関連する疾患の存在を示している。このようなアッセイは、
動物実験、臨床試験における特定の治療効果を推定するため、或いは個々の患者
の治療をモニターするために用いることもできる。

【0197】

GCRECの発現に関連する疾患の診断基準を提供するために、発現のための正常

あるいは標準概要を確立する。これは、ハイブリダイゼーション或いは増幅に好適な条件下で、動物或いはヒトの正常な対象から抽出した体液或いは細胞を、GC RECをコードする配列またはその断片と結合させることにより達成され得る。実質的に精製されたポリヌクレオチドを既知量用いて行った実験から得た値を正常な対象から得た値と比較することにより、標準ハイブリダイゼーションを定量することができる。このようにして得た標準値は、疾患の徴候を示す患者から得たサンプルから得た値と比較することができる。標準値からの偏差を用いて疾患の存在を確定する。

【0198】

疾患の存在が確定されて治療プロトコルが開始されると、患者の発現レベルが正常な被検者に観察されるレベルに近づき始めたかどうかを測定するため、ハイブリダイゼーションアッセイを通常ベースで繰り返し得る。連続アッセイから得られた結果を用いて、数日から数ヶ月の期間にわたる治療の効果を示し得る。

【0199】

癌に関しては、個体からの生体組織における異常な量の転写物（過少発現または過剰発現）の存在は、疾患の発生素質を示したり、実際に臨床的症状が現れる前に疾患を検出する方法を提供したりし得る。この種のより明確な診断により、医療の専門家が予防方法または積極的な治療法を早くから利用し、それによって癌の発生または更なる進行を防止することが可能となる。

【0200】

GCRECをコードする配列から設計されたオリゴヌクレオチドを追加的に診断上利用することは、PCRの利用に關与し得る。これらのオリゴマーは、化学的に合成するか、酵素により生産するか、或いは*in vitro*で産出し得る。オリゴマーは、好ましくはGCRECをコードするポリヌクレオチドの断片、或いはGCRECをコードするポリヌクレオチドと相補的ポリヌクレオチドの断片を含み、最適条件下で特定の遺伝子や条件を識別するべく利用される。また、オリゴマーは、やや緩いストリンジェント条件下で、近縁のDNA或いはRNA配列の検出、定量、或いはその両方のため用いることが可能である。

【0201】

或る態様において、GCRECをコードするポリヌクレオチド配列由来のオリゴヌクレオチドプライマーを用いて単一ヌクレオチド多形性 (SNP) を検出し得る。SNPは、多くの場合にヒトの先天性または後天性遺伝病の原因となるような置換、挿入及び欠失である。限定するものではないがSNPの検出方法には、制限酵素切断法 (SSCP) 及び蛍光SSCP (fSSCP) がある。SSCPでは、GCRECをコードするポリヌクレオチド配列由来のオリゴヌクレオチドプライマーを用いて、ポリメラーゼ連鎖反応法 (PCR) を用いたDNAの増幅を行う。DNAは例えば、病変組織または正常組織、生検サンプル、体液その他に由来し得る。DNA内のSNPは、一本鎖形状のPCR生成物の2次及び3次構造に差異を生じさせる。差異は非変性ゲル中でのゲル電気泳動法を用いて検出可能である。fSSCPでは、オリゴヌクレオチドプライマーを蛍光性に標識する。それによってDNAシーケンシング機などのハイスループット機器でアンプリマー (amplicon) の検出が可能になる。更に、インシリコSNP (in silico SNP, isSNP) と呼ばれる配列データベース分析法は、一般的なコンセンサス配列に配列されるような個々の重畳するDNA断片の配列を比較することにより、多形性を同定し得る。これらのコンピュータベースの方法は、DNAの実験室での調整及び統計モデル及びDNA配列クロマトグラムの自動分析を用いたシーケンシングのエラーに起因する配列の変異をフィルタリングして除去する。別の態様では、例えばハイスループットMASSARRAYシステム (Sequenom, Inc., San Diego CA) を用いた質量分析によりSNPを検出し、特徴付ける。

【0202】

GCRECの発現を定量するために用い得る方法には、ヌクレオチドの放射標識またはビオチン標識、調節核酸の相互増幅 (coamplification) 及び標準曲線から得た結果の補間もある (Melby, P.C.ら (1993) J. Immunol. Methods, 159:235-244、Duplaa, C.ら (1993) Anal. Biochem. 212:229-236等を参照)。目的のオリゴマーが種々の希釈液中に存在し、分光光度法または非色応答によって定量が迅速になるようなハイスループットフォーマットのアッセイを行うことによって、複数のサンプルの定量速度を加速することができる。

【0203】

更に別の実施例では、本明細書に記載した任意のポリヌクレオチド配列由来の

オリゴヌクレオチドまたはより長い断片を、マイクロアレイにおける標的として用いることができる。多数の遺伝子の関連発現レベルを同時にモニターする転写イメージング技術にマイクロアレイを用いることが可能である。これについては、以下に記載する。マイクロアレイはまた、遺伝変異体、突然変異及び多形性の同定に用いることができる。この情報を用いることで、遺伝子機能を決定し、疾患の遺伝的根拠を理解し、疾患を診断し、遺伝子発現の機能としての疾病の進行/後退をモニターし、疾病治療における薬剤の活性を開発及びモニターすることができる。特に、患者にとって最もふさわしく、有効的な治療法を選択するために、この情報を用いて患者の薬理ゲノムプロファイルを開発することができる。例えば、患者の薬理ゲノムプロファイルに基づき、患者に対して高度に有効的で副作用を殆ど示さない治療薬を選択することができる。

【0204】

別の実施例では、GCRECに特異的な抗体、GCRECまたはその断片をマイクロアレイ上で要素として用いることができる。マイクロアレイを用いて、上記のようなタンパク質 - タンパク質相互作用、薬剤 - 標的相互作用及び遺伝子発現プロファイルをモニターまたは測定することが可能である。

【0205】

或る実施例は、或る組織または細胞タイプの転写イメージを生成するような本発明のポリヌクレオチドの使用に関連する。転写イメージは、特定の組織または細胞タイプにより遺伝子発現の包括的パターンを表す。包括的遺伝子発現パターンは、所与の条件下で所与の時間に発現した遺伝子の数及び相対存在量を定量することにより分析し得る (Seilliamer らの米国特許第5,840,484号 "Comparative Gene Transcript Analysis" を参照。該特許は特に引用することを以って本明細書の一部となす)。従って、特定の組織または細胞タイプの転写または逆転写全体に本発明のポリヌクレオチドまたはその補体をハイブリダイズすることにより、転写イメージを生成し得る。或る実施例では、本発明のポリヌクレオチドまたはその補体がマイクロアレイ上の要素のサブセットを複数含むような高処理フォーマットでハイブリダイゼーションを発生させる。結果として得られる転写イメージは、遺伝子活性のプロファイルを提供し得る。

【0206】

転写イメージは、組織、株化細胞、生検またはその生物学的サンプルから単離した転写物を用いて生成し得る。転写イメージは従って、組織または生検サンプルの場合にはin vivo、または株化細胞の場合にはin vitroでの遺伝子発現を反映する。

【0207】

本発明のポリヌクレオチドの発現のプロフィールを作製する転写イメージはまた、工業的または天然の環境化合物の毒性試験のみならず、in vitroモデル系及び薬剤の前臨床評価に関連して使用し得る。全ての化合物は、作用及び毒性のメカニズムを示す、しばしば分子指紋または毒性サインと称されるような特徴的な遺伝子発現パターンを惹起する (Nuwaysir, E.F. ら. (1999) Mol. Carcinog. 24:153-159、Steiner, S. and N.L. Anderson (2000) Toxicol. Lett. 112-113:467-471、該文献は特に引用することを以って本明細書の一部となす)。試験化合物が、既知の毒性を有する化合物のサインと同一のサインを有する場合には、毒性特性を共有している可能性がある。指紋またはサインは、多数の遺伝子及び遺伝子ファミリーからの発現情報を含んでいる場合には、最も有用且つ正確である。理想的には、発現のゲノム全域にわたる測定が最高品質のサインを提供する。自己の発現が任意の試験された化合物により変化しない遺伝子が同様に重要であっても、このような遺伝子の発現レベルを用いて残りの発現データを規準化する。規準化手順は、異なる化合物で処理した後の発現データの比較に有用である。毒性サインの要素への遺伝子機能を割り当てるのが毒性メカニズムの阻止に役立つが、毒性の予測につながるサインの統計的に一致させるのに遺伝子機能の知識は必要とされない (例えば2000年2月29日にNational Institute of Environmental Health Sciencesより発行されたPress Release 00-02を参照されたい。これについては<http://www.niehs.nih.gov/oc/news/toxchip.htm>で入手可能である)。従って、中毒学的スクリーニングの際に毒性サインを用いて、全ての発現した遺伝子配列を含めることは重要且つ望ましいことである。

【0208】

或る実施例では、核酸を含有する生物学的サンプルを試験化合物で処理するこ

とにより試験化合物の毒性を算定する。処理した生物学的サンプル中で発現した核酸は、本発明のポリヌクレオチドに特異的な1若しくは複数のプローブでハイブリダイズし、それによって本発明のポリヌクレオチドに対応する転写レベルを定量し得る。処理した生物学的サンプル中の転写レベルを、非処理生物学的サンプル中のレベルと比較する。両サンプルの転写レベルの差は、処理されたサンプル中で試験化合物が引き起こす毒性反応を示す。

【0209】

別の実施例は、本発明のポリペプチド配列を用いて組織または細胞タイプのプロテオームを分析することに関連する。プロテオームの語は、特定の組織または細胞タイプでのタンパク質発現の包括的パターンを指す。プロテオームの各タンパク質成分は、個々に更に分析の対象とすることができる。プロテオーム発現パターン即ちプロフィールは、所与の条件下で所与の時間に発現したタンパク質の数及び相対存在量を定量することにより分析し得る。従って細胞のプロテオームのプロフィールは、特定の組織または細胞タイプのポリペプチドを分離及び分析することにより作成し得る。或る実施例では、1次元等電点電気泳動によりサンプルからタンパク質を分離し、2次元ドデシル硫酸ナトリウムスラブゲル電気泳動により分子量に応じて分離するような2次元ゲル電気泳動により分離が達成される(前出のSteiner and Anderson)。タンパク質は、通常クーマシーブルーまたはシルバーまたは蛍光染色などの物質を用いてゲルで染色することにより、分散した、独特な位置にある点としてゲル中で可視化される。各タンパク質スポットの光学密度は、通常サンプル中のタンパク質レベルに比例する。異なるサンプル、例えば試験化合物または治療薬で処理または非処理のいずれかの生物学的サンプルから得られるタンパク質スポットの光学密度を比較し、処理に関連するタンパク質スポット密度の変化を同定する。スポット内のタンパク質は、例えば化学的または酵素的切断とそれに続く質量分析を用いる標準的な方法を用いて部分的にシーケンシングする。スポット内のタンパク質の同一性は、その部分配列を、好適には少なくとも5の連続するアミノ酸残基を、本発明のポリペプチド配列と比較することにより決定し得る。場合によっては、決定的なタンパク質同定のための更なる配列が得られる。

【0210】

タンパク質の (proteomic) プロフィールは、GCRECに特異的な抗体を用いてGCREC発現レベルを定量することによっても作成し得る。或る実施例では、マイクロアレイ上で要素として抗体を用い、マイクロアレイをサンプルに曝して各アレイ要素へのタンパク質結合レベルを検出することによりタンパク質発現レベルを定量する (Lueking, A. ら. (1999) Anal. Biochem. 270:103-111、Mendoze, L. G. ら. (1999) Biotechniques 27:778-788)。検出は当分野で既知の様々な方法で行うことができ、例えば、チオールまたはアミノ反応性蛍光化合物を用いてサンプル中のタンパク質を反応させ、各アレイ要素における蛍光結合の量を検出し得る。

【0211】

プロテオームレベルでの毒性サインも中毒学的スクリーニングに有用であり、転写レベルでの毒性サインと並行に分析するべきである。或る組織の或るタンパク質に対しては、転写とタンパク質の存在量の相関が乏しいこともあるので (Anderson, N.L. and J. Seilhamer (1997) Electrophoresis 18:533-537)、転写イメージにはそれ程影響しないがタンパク質のプロフィールを変化させるような化合物の分析においてプロテオーム毒性サインは有用たり得る。更に、体液中での転写の分析はmRNA急速な分解により困難であるので、タンパク質のプロフィール作成はこのような場合により信頼でき、情報価値がある。

【0212】

別の実施例では、タンパク質を含有する生物学的サンプルを試験化合物で処理することにより試験化合物の毒性を算定する。処理された生物学的サンプル中で発現したタンパク質は、各タンパク質の量を定量し得るように分離する。各タンパク質の量を、非処理生物学的サンプル中の対応するタンパク質の量と比較する。両サンプルのタンパク質量の差は、処理されたサンプル中での試験化合物への毒性反応を示す。個々のタンパク質は、個々のタンパク質のアミノ酸残基をシーケンシングし、これら部分配列を本発明のポリペプチドと比較することにより同定する。

【0213】

別の実施例では、タンパク質を含有する生物学的サンプルを試験化合物で処理することにより試験化合物の毒性を算定する。生物学的サンプルから得たタンパク質は、本発明のポリペプチドに特異的な抗体を用いてインキュベートする。抗体により認識されたタンパク質の量を定量する。処理された生物学的サンプル中のタンパク質の量を、非処理生物学的サンプル中のタンパク質の量と比較する。両サンプルのタンパク質量の差は、処理サンプル中の試験化合物に対する反応を示す。

【0214】

マイクロアレイは、本技術分野でよく知られている方法を用いて調製し、使用し、そして分析する (Brennan, T.M. ら (1995) の米国特許第5,474,796号、Schena, M. ら (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:10614-10619、Baldeschweier らの (1995) PCT出願第W095/251116号、Shalon, D. らの (1995) PCT出願第W095/35505号、Heller, R.A. ら (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:2150-2155、Heller, M.J. らの (1997) 米国特許第5,605,662号等を参照)。様々なタイプのマイクロアレイが公知であり、詳細については、DNA Microarrays: A Practical Approach, M. Schena, ed. (1999) Oxford University Press, Londonに記載されている。該文献は、特に引用することを以って本明細書の一部となす。

【0215】

本発明の別の実施例では、天然のゲノム配列をマッピングする際に有効なハイブリダイゼーションプローブを産出するため、GCRECをコードする核酸配列を用いることが可能である。コード配列または非コード配列のいずれかを用いることができ、或る例では、コード配列全体で非コード配列が好ましい。例えば、多重遺伝子ファミリーのメンバー内でのコード配列の保存により、染色体マッピング中に望ましくないクロスハイブリダイゼーションが生じる可能性がある。核酸配列は、特定の染色体、染色体の特定領域または人工形成の染色体、例えば、ヒト人工染色体 (HAC)、酵母人工染色体 (YAC)、細菌人工染色体 (BAC)、細菌P1産物、或いは単一染色体cDNAライブラリに対してマッピングされる (Harrington, J.J. ら (1997) Nat Genet. 15:345-355、Price, C.M. (1993) Blood Rev. 7:127-134、Trask, B.J. (1991) Trends Genet. 7:149-154等を参照)。一度マッ

ピングすると、本発明の核酸配列を用いて例えば病状の遺伝を特定の染色体領域の遺伝または制限断片長多型 (RFLP) と関連させるような遺伝子連鎖地図を発生させ得る。

【0216】

蛍光原位置ハイブリッド形成法 (FISH) は、他の物理的及び遺伝地図データと関連し得る (前出のHeinz-Ulrich, ら (1995) in Meyers, pp. 965-968.等を参照)。遺伝地図データの例は、種々の科学雑誌あるいはOnline Mendelian Inheritance in Man (OMIM) のウェブサイトに見ることができる。物理的染色体地図上のGCRECをコードする遺伝子の位置と特定の疾患との相関性或いは特定の疾患に対する素因は、その疾患に関係するDNAの領域を画定するのに役立つものであり、従って更に位置クローニングする試みとなり得る。

【0217】

確定した染色体マーカーを用いた結合分析等の物理的マッピング技術及び染色体標本原位置ハイブリッド形成法を用いて、遺伝地図を拡張することができる。例えばマウスなど別の哺乳動物の染色体上に遺伝子を配置することにより、特定のヒト染色体の数或いはアームが分かっていない場合でも関連するマーカーを明らかにし得る。この情報は、位置クローニングその他の遺伝子発見技術を用いて遺伝的疾患を調査する研究者にとって価値がある。疾患または症候群が、血管拡張性失調症の11q22-23領域等、特定の遺伝子領域への遺伝的結合によって大まかに位置決めがなされると、該領域に対する任意のマッピングにより更なる調査のための関連遺伝子或いは調節遺伝子を表すことができる (Gatti, R.A. ら (1988) Nature 336:577-580等を参照)。転座、反転等に起因する、健常者、保有者、感染者の三者間における染色体位置の相違を発見するために本発明のヌクレオチド配列を用いてもよい。

【0218】

本発明の別の実施例では、種々の薬剤スクリーニング技術を以って化合物のライブラリをスクリーニングするために、GCREC、GCRECの触媒作用断片、免疫原断片、またはそのオリゴペプチドを用いることができる。薬剤スクリーニングに用いる断片は、溶液中に遊離しているか、固体支持物に固定されるか、細胞表面上

に保持されるか、細胞内に位置することになる。GCRECとテストされる薬剤との結合複合の形成は計測できる。

【0219】

別の薬剤スクリーニング方法は、目的のタンパク質に対して好適な結合親和性を有する化合物を高い処理能力でスクリーニングするために用いられる（Geysen,らの（1984）PCT出願番号 W084/03564等を参照）。この方法においては、多数の異なる小さな試験用化合物を固体基質上で合成する。試験用化合物は、GCREC 或いはその断片と反応させ、洗浄する。次に、本技術分野でよく知られている方法で、結合したGCRECを検出する。精製したGCRECはまた、上記した薬剤のスクリーニング技術において用いるプレート上で直接コーティングすることもできる。別法では、非中和抗体を用いてペプチドを捕捉し、ペプチドを固体支持物に固定することもできる。

【0220】

別の実施例では、競合薬スクリーニングアッセイを用いることができる。このアッセイでは、GCRECを結合することができる中和抗体が、GCRECを結合するための試験化合物と特異的に競合する。この方法では、抗体が、1若しくは数個の抗原決定因子をGCRECと共有するペプチドの存在を検出する。

【0221】

別の実施例では、新規技術が現在知られているヌクレオチド配列の特性（限定するものではないがトリプレット遺伝暗号及び特異的塩基対の相互作用等を含む）に依存するのであれば、依然として発展すべきいかなる分子生物学技術においても、GCRECをコードするヌクレオチド配列を用いることができる。

【0222】

更に詳細説明をしなくとも、当業者であれば以上の説明を以って本発明を最大限に利用できるであろう。従って、これ以下に記載する実施例は単なる例示目的にすぎず、いかようにも本発明を限定するものではない。

【0223】

本明細書において開示した全ての特許、特許出願及び刊行物、特に米国特許第60/199,084号、第60/202,278号、第60/193,051号、第60/195,155号及び第60/200

,551号は、言及することをもって本明細書の一部となす。

【0224】

(実施例)

1 cDNAライブラリの作製

Incyte cDNAは、LIFESEQ GOLDデータベース (Incyte Genomics, Palo Alto CA) に記載されたcDNAライブラリに由来するものであり、表4の列5に列記した。ホモジナイズしてグアニジニウムイソチオシアネート溶液に溶解した組織もあり、また、ホモジナイズしてフェノールまたは好適な変性剤の混合液に溶解した組織もある。変性剤の混合液は、例えばフェノールとグアニジニウムイソチオシアネートの単相溶液であるTRIZOL (Life Technologies) 等である。結果として得られた溶解物は、塩化セシウムにおいて遠心分離するかクロロホルムで抽出した。イソプロパノールか、酢酸ナトリウムとエタノールか、いずれか一方、或いは別の方法を用いて、溶解物からRNAを沈殿させた。

【0225】

RNAの純度を高めるため、RNAのフェノールによる抽出及び沈殿を必要な回数繰り返した。場合によっては、DNアーゼでRNAを処理した。殆どのライブラリでは、オリゴd(T)連結常磁性粒子 (Promega)、OLIGOTEXラテックス粒子 (QIAGEN, Valencia CA) またはOLIGOTEX mRNA精製キット (QIAGEN) を用いて、ポリ(A+) RNAを単離した。別法では、別のRNA単離キット、例えばPOLY(A)PURE mRNA精製キット (Ambion, Austin TX) を用いて組織溶解物からRNAを直接単離した。

【0226】

場合によってはStratagene社へのRNA提供を行い、対応するcDNAライブラリをStratagene社が作製することもあった。そうでない場合は、本技術分野で公知の推奨方法または類似の方法を用いて、UNIZAPベクターシステム (Stratagene) またはSUPERSRIPTプラスミドシステム (Life Technologies) を用いてcDNAを合成し、cDNAライブラリを作製した (前出のAusubel, 1997, unit 5.1-6.6等を参照)。逆転写は、オリゴd(T)またはランダムプライマーを用いて開始した。合成オリゴヌクレオチドアダプターを二本鎖cDNAに連結反応させ、好適な制限酵素でcDNAを消化した。殆どのライブラリに対して、cDNAのサイズ (300 ~ 1000 bp

) 選択は、SEPHACRYL S1000、SEPHAROSE CL2BまたはSEPHAROSE CL4Bカラムクロマトグラフィー (Amersham Pharmacia Biotech)、或いは調製用アガロースゲル電気泳動法を用いて行った。cDNAは、好適なプラスミドのポリリンカーの適合性制限酵素部位に連結反応させた。好適なプラスミドは、例えばPBLUESCRIPTプラスミド (Stratagene)、pSPORT1プラスミド (Life Technologies) またはpINCY (Incyte Pharmaceuticals, Palo Alto CA) 等である。組換えプラスミドは、Stratagene社のXL1-Blue、XL1-BlueMRFまたはSOLR、或いはLife Technologies社のDH5、DH10BまたはELECTROMAX DH10Bを含むコンピテント大腸菌細胞に形質転換した。

【0227】

2 cDNAクローンの単離

UNIZAPベクターシステム (Stratagene) を用いた *in vivo* 切除によって、或いは細胞溶解によって、プラスミドを宿主細胞から回収した。MagicまたはWIZARD Minipreps DNA精製システム (Promega)、AGTC Miniprep精製キット (Edge Biosystems, Gaithersburg MD)、QIAGEN社のQIAWELL 8 Plasmid、QIAWELL 8 Plus Plasmid及びQIAWELL 8 Ultra Plasmid 精製システム、R.E.A.L. Prep 96プラスミドキットの中から少なくとも1つを用いて、プラスミドを精製した。沈殿させた後、0.1 mlの蒸留水に再懸濁して、凍結乾燥して或いは凍結乾燥せずに、4で保管した。

【0228】

別法では、ハイスルーットフォーマットにおいて直接結合PCR法を用いて宿主細胞溶解物からプラスミドDNAを増幅した (Rao, V.B. (1994) Anal. Biochem. 216:1-14)。宿主細胞の溶解及び熱サイクリング過程は、単一反応混合液中で行った。サンプルを処理し、それを384穴プレート内で保管し、増幅したプラスミドDNAの濃度をPICOGREEN色素 (Molecular Probes, Eugene OR) 及びFluoroskan II蛍光スキャナ (Labsystems Oy, Helsinki, Finland) を用いて蛍光分析的に定量した。

【0229】

3 シークエンシング及び分析

cDNAのシークエンス反応は、標準的方法或いはハイスループット装置、例えばABI CATALYST 800 サーマルサイクラー (Applied Biosystems) またはPTC-200 サーマルサイクラー (MJ Research) をHYDRAマイクロディスペンサー (Robbins Scientific) またはMICROLAB 2200 (Hamilton) 液体転移システムと併用して処理した。cDNAのシークエンス反応は、Amersham Pharmacia Biotech社が提供する試薬またはABIシークエンシングキット、例えばABI PRISM BIGDYE Terminator cycle sequencing ready reaction kit (Applied Biosystems) に与えられた試薬を用いて準備した。cDNAのシークエンス反応の電気泳動的分離及び標識したポリヌクレオチドの検出には、MEGABACE 1000 DNAシークエンシングシステム (Molecular Dynamics) か、標準ABIプロトコル及び塩基対呼び出しソフトウェアを用いるABI PRISM 373または377シークエンシングシステム (Applied Biosystems) か、或いはその他の本技術分野でよく知られている配列解析システムを用いた。cDNA配列内のリーディングフレームは、標準的方法 (前出のAusubel, 1997, unit 7.7に概説) を用いて決定した。cDNA配列の幾つかを選択して、実施例8に記載した方法で配列を伸長させた。

【0230】

cDNA配列に由来するポリヌクレオチド配列は、ベクター、リンカー及びポリ(A)配列の除去し、あいまいな塩基対をマスクすることによって有効性を確認した。その際、BLAST、動的プログラミング及び隣接ジヌクレオチド頻度分析に基づくアルゴリズム及びプログラムを用いた。次に、BLAST、FASTA及びBLIMPSに基づくプログラムを用いて、プログラム中の注釈を得るべく、公共のデータベース、例えばGenBankの霊長類及びげっ歯類、哺乳動物、脊椎動物、真核生物のデータベースと、BLOCKS、PRINTS、DOMO、PRODOM及びPFAM等のHidden Markov Model (HMM) ベースのタンパク質ファミリーデータベース (HMMは、遺伝子ファミリーのコンセンサス1次構造を分析する確率的アプローチである。Eddy, S.R. (1996) Cuff. Opin. Struct. Biol. 6:361-365等を参照) の選択に対するIncyte cDNA配列またはその翻訳を問い合わせた。問合せは、BLAST、FASTA、BLIMPS及びHMMERに基づくプログラムを用いて行った。Incyte cDNA配列は、完全長のポリヌクレオチド配列を産出するようにアSEMBルした。或いは、GenBank cDNA、GenBank

EST、stitched配列、伸展ed配列またはGenscan予測コード配列（実施例4及び5を参照）を用いてIncyte cDNAの集団を完全長まで伸長させた。Phred、Phrap及びConsedに基づくプログラムを用いてアセンブリを実行し、GenMark、BLAST及びFASTAに基づくプログラムを用いてcDNAの集団をオープンリーディングフレームに対してスクリーニングした。対応する完全長ポリペプチド配列を誘導するべく完全長ポリヌクレオチド配列を翻訳した。或いは、本発明のポリペプチドは完全長翻訳ポリペプチドの任意のメチオニン残基で開始し得る。引き続き、GenBankタンパク質データベース（genpept）、SwissProt、BLOCKS、PRINTS、DOMO、PRODOM及びProsite等のデータベース、PFAM等のHidden Markov Model（HMM）ベースのタンパク質ファミリーデータベースに対する問合せによって完全長ポリペプチド配列を分析した。完全長ポリヌクレオチド配列はまた、MACDNASIS PROソフトウェア（日立ソフトウェアエンジニアリング，South San Francisco CA）及びLASERGENEソフトウェア（DNASTAR）を用いて分析した。ポリヌクレオチド及びポリペプチド配列アラインメントは、アラインメントした配列と配列の一致率も計算するMEGALIGNマルチシーケンスアラインメントプログラム（DNASTAR）に組み込まれているようなCLUSTALアルゴリズムによって特定されるデフォルトパラメータを用いて生成する。

【0231】

Incyte cDNA及び完全長配列の分析及びアセンブリに利用したツール、プログラム及びアルゴリズムの概略と、適用可能な説明、引用文献、閾値パラメータを表7に示す。用いたツール、プログラム及びアルゴリズムを表5の列1に、それらの簡単な説明を列2に示す。列3は好適な引用文献であり、全ての文献はそっくりそのまま引用を以って本明細書の一部となす。適用可能な場合には、列4は2つの配列が一致する強さを評価するために用いたスコア、確率値その他のパラメータを示す（スコアが高ければ高いほど2配列間の相同性が高くなる）。

【0232】

完全長ポリヌクレオチド及びポリペプチド配列の構築及び分析に用いる上記のプログラムは、配列番号7乃至12からのポリヌクレオチド配列の断片を同定するためにも使用できる。ハイブリダイゼーション及び増幅技術に有用な約20～

約4000のヌクレオチドの断片は、表4の列4に記載した。

【0233】

4 ゲノムDNAからのコード配列の同定及び編集

Genscan遺伝子同定プログラムを公衆のゲノム配列データベース（例えばgbpri及びgbhtg）に対して実行することにより、推定上のGタンパク質結合受容体を先ず同定する。Genscanは、様々な生物からゲノムDNA配列を分析する汎用遺伝子同定プログラムである（Burge, C. and S. Karlin (1997) J. Mol. Biol. 268:78-94 及びBurge, C. 及び S. Karlin (1998) Curr. Opin. Struct. Biol. 8:346-354参照）。プログラムは予測エキソンを連結し、メチオニンから終止コドンに及ぶアセンブルされたcDNA配列を形成する。Genscanの出力は、ポリヌクレオチド及びポリペプチド配列のFASTAデータベースである。Genscanが一度に分析する配列の最大範囲は、30 kbに設定した。いずれのGenscan予測cDNA配列がGタンパク質結合受容体をコードするかを決定するために、コードされたポリペプチドをGタンパク質結合受容体のためのPFAMモデムに対して問い合わせることにより分析した。Incyte cDNA配列の相同体をGタンパク質結合受容体として注釈を付けてきたことにより、潜在的Gタンパク質結合受容体も同定した。こうして選択されたGenscan予測配列は、次にBLAST分析により公衆データベースgbpri及びgbhtgと比較した。必要であれば、genpeptからヒットしたトップのBLASTと比較することによりGenscan予測配列を編集し、余分なまたは取り除かれたエキソンなどのGenscanにより予測された配列のエラーを修正する。BLAST分析はまた、任意のIncyte cDNAまたはGenscan予測配列の公衆cDNA適用範囲の発見に用いられるので、転写の証拠を提供する。Incyte cDNA適用範囲が利用できる場合には、この情報を用いてGenscan予測配列を修正または確認した。完全長ポリヌクレオチド配列は、実施例3に記載されたアセンブリプロセスを用いて、Incyte cDNA配列及び/または公衆のcDNA配列でGenscan予測コード配列をアセンブルすることにより得た。或いは、完全長ポリヌクレオチド配列は編集または非編集のGenscan予測コード配列に完全に由来する。

【0234】

5 ゲノム配列データのcDNA配列データへのアセンブリ

「縫合」配列

部分cDNA配列は、実施例4に記載のGenscan遺伝子同定プログラムにより予測されたエクソンを用いて伸長させた。実施例3に記載されたようにアセンブルされた部分cDNAは、ゲノムDNAにマッピングし、関連するcDNA及び1若しくは複数のゲノム配列から予測されたGenscanエクソンを含むクラスタに分解した。cDNA及びゲノム情報を統合するべくグラフ理論及び動的プログラミングに基づくアルゴリズムを用いて各クラスタを分析し、引き続いて確認、編集または伸長して完全長配列を産出するような潜在的スプライス変異体を生成した。間隔全体の長さがクラスタ中の2以上の配列に存在するような配列を同定し、そのように同定された間隔は推移により等しいと考えられた。例えば、1つのcDNA及び2つのゲノム配列に間隔が存在する場合、3つの間隔は全て等しいと考えられる。このプロセスは、無関係であるが連続したゲノム配列をcDNA配列により結び合わせて架橋し得る。このように同定された間隔は、親配列に沿って出現した順番にスティッチングアルゴリズムにより「縫合」され、配列変異体と同様に可能な限り長い配列が生成される。1種類の親配列に沿って発生した間隔と間隔との連鎖(cDNA - cDNAまたはゲノム配列 - ゲノム配列)は、親の種類を変える連鎖(cDNA - ゲノム配列)に優先した。結果として得られる縫合配列は、BLAST分析により公衆データベースgenpept及びgbpriに翻訳されて比較された。Genscanにより予測された不正確なエクソンは、genpeptからヒットしたトップのBLASTと比較することにより修正した。必要な場合には、追加cDNA配列を用いるかゲノムDNAの検査により配列を更に伸長させた。

【0235】

「伸展」配列

部分DNA配列は、BLAST分析に基づくアルゴリズムにより完全長まで伸長された。まず、GenBankの霊長類、げっ歯類、哺乳動物、脊椎動物及び真核生物のデータベースなどの公衆データベースにBLASTプログラムを用いて、実施例3に記載されたようにアセンブルされた部分cDNAを問い合わせた。次に、最も近いGenBankタンパク質相同体をBLAST分析によりIncyte cDNA配列または実施例4に記載のGenscanエクソン予測配列のいずれかと比較した。結果として得られる高スコアリ

ングセグメント対 (HSP) を用いてキメラタンパク質を産出し、翻訳した配列をGenBankタンパク質相同体上にマッピングした。元のGenBankタンパク質相同体に関連して、キメラタンパク質内で挿入または削除が起こり得る。GenBankタンパク質相同体、キメラタンパク質またはその両方をプローブとして用い、公衆のヒトゲノムデータベースから相同ゲノム配列を検索した。このようにして、相同ゲノム配列を追加することにより部分DNA配列を「伸展」または伸長させた。結果として得られる伸展配列を検査し、完全遺伝子を含んでいるか否かを決定した。

【0236】

6 ポリヌクレオチドをコードするGCRECの染色体マッピング

配列番号7乃至12を配列するために用いたcDNA配列は、BLAST及びその他のスミス ウォーターマンアルゴリズムのインプリメンテーションを用いて、Incyte LIFESEQのデータベース及びパブリックドメインのデータベースから得た配列と比較した。配列番号7乃至12に適合するデータベースから得た配列は、Phrap (表7) 等のアセンブリアルゴリズムを用いて隣接する配列及びオーバーラップする配列のクラスタに配列した。スタンフォード・ヒトゲノムセンター (SHGC)、ホワイトヘッド・ゲノム研究所 (WIGR)、Genethon等の公的な情報源から入手可能な放射線ハイブリッド及び遺伝地図データを用いて、クラスタ化された配列が前もってマッピングされたかを測定した。マッピングされた配列がクラスタに含まれている結果、個々の配列番号を含めてそのクラスタの全配列が地図上の位置に割り当てられた。

【0237】

地図上の位置は、ヒト染色体の範囲または間隔として表される。センチモルガン間隔の地図上の位置は、染色体のpアームの末端に関連して測定する。(センチモルガン (cM) は、染色体マーカー間の組換え頻度に基づく計測単位である。平均して、1 cMは、ヒト中のDNAの1メガベース (Mb) にほぼ等しい。尤も、この値は、組換えのホットスポット及びコールドスポットに起因して広範囲に変化する。) cM距離は、配列が各クラスタ内に含まれるような放射線ハイブリッドマーカーに対して境界を提供するようなGenethonによってマッピングされた遺伝マーカーに基づく。ヒトゲノム地図及びその他の公衆に利用可能な資源、例えばNC

BIの「GeneMap'99」ウェブサイト (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genemap/>) を用いて、以前に同定した病変遺伝地図が上記の間隔内またはその近傍にあるかどうかを決定することができる。

【0238】

7 ポリヌクレオチド発現の分析

ノーザン分析は、転写された遺伝情報の存在を検出するために用いられる実験技術であり、標識されたヌクレオチド配列の、特定の細胞種または組織からのRNAが結合される膜へのハイブリダイゼーションに参与している。(前出のSambrook, 7章、同Ausubel, F.M. ら, 4章及び16章等を参照。)

BLASTに適用する類似のコンピュータ技術を用いて、GenBankやLifeSeq (Incyte Pharmaceuticals) 等のヌクレオチドデータベースにおいて同一または関連分子を検索する。ノーザン分析は、多数の膜系ハイブリダイゼーションよりも断然速い。更に、特定の同一を厳密な或いは相動的なものとして分類するか否かを決定するため、コンピュータ検索の感度を変更することができる。検索の基準はプロダクトスコアであり、次式で定義される。

【0239】

【数1】

$$\frac{(\text{最大 BLAST スコア} \times \text{配列一致率})}{5 \times \text{最小 (長さ(配列1), 長さ(配列2))}}$$

【0240】

プロダクトスコアは、2つの配列間の類似度及び配列が一致する長さの両方を考慮している。プロダクトスコアは、0～100の規準化された値であり、次のようにして求める。BLASTスコアにヌクレオチドの配列一致率を乗じ、その積を2つの配列の短い方の長さの5倍で除する。高スコアリングセグメント対(HSP)に一致する各塩基に+5のスコアを割り当て、各不適性塩基対に-4を割り当てることにより、BLASTスコアを計算する。2つの配列は、2以上のHSPを共有し得る(ギャップにより離隔され得る)。2以上のHSPがある場合には、最高BLASTスコアの塩基対を用いてプロダクトスコアを計算する。プロダクトスコアは、断片

的重畳とBLASTアラインメントの質とのバランスを表す。例えばプロダクトスコア100は、比較した2つの配列の短い方の長さ全体にわたって100%一致する場合のみ得られる。プロダクトスコア70は、一端が100%一致し、70%重畳しているか、他端が88%一致し、100%重畳しているかのいずれかの場合に得られる。プロダクトスコア50は、一端が100%一致し、50%重畳しているか、他端が79%一致し、100%重畳しているかのいずれかの場合に得られる。

【0241】

或いは、GCRECをコードするポリヌクレオチド配列を、ポリヌクレオチド配列が派生した組織源に関連して分析した。例えば或る完全長配列は、Incyte cDNA配列（実施例3を参照）と少なくとも一部は重畳するようにアセンブルされる。各cDNA配列は、ヒト組織から構築されたcDNAライブラリに由来する。各ヒト組織は、以下の生物/組織カテゴリー即ち心血管系、結合組織、消化器系、胎芽構造、内分泌系、外分泌腺、女性生殖器、男性生殖器、生殖細胞、血液及び免疫系、肝、筋骨格系、神経系、膵臓、呼吸器系、感覚器、皮膚、顎口腔系、非分類性/混合性または尿路の1つに分類される。各カテゴリーのライブラリ数を数えて、全カテゴリーの総ライブラリ数で除する。同様に、各ヒト組織は、以下の疾患/病状カテゴリー即ち癌、細胞系、発達、炎症、神経性、外傷、心血管、貯留 (pooled)、その他の1つに分類される。各カテゴリーのライブラリ数を数えて、全カテゴリーの総ライブラリ数で除する。演算結果の割合は、GCRECをコードするcDNAの組織特異発現または疾患特異発現を反映する。cDNA配列及びcDNAライブラリ/組織情報については、LIFESEQ GOLDデータベース (Incyte Genomics, Palo Alto CA) で見られる。

【0242】

8 ポリヌクレオチドをコードするGCRECの伸長

完全長のポリヌクレオチド配列もまた、完全長分子の適切な断片から設計したオリゴヌクレオチドプライマーを用いて該断片を伸長させて生成した。一方のプライマーは既知の断片の5'伸長を開始するべく合成し、他方のプライマーは既知の断片の3'伸長を開始するべく合成した。開始プライマーの設計は、長さが

約22～30ヌクレオチド、GC含有率が50%以上となり、約68～72の温度で標的配列にアニーリングするように、OLIGO 4.06ソフトウェア (National Biosciences) 或いは別の適切なプログラムを用いて、cDNAから設計した。ヘアピン構造及びプライマー-プライマー二量体を生ずるようなヌクレオチドの伸長は全て回避した。

【0243】

配列を伸長するために、選択されたヒトcDNAライブラリを用いた。2段階以上の伸長が必要または望ましい場合には、付加的プライマー或いはプライマーのネステッドセットを設計した。

【0244】

高忠実度の増幅が、当業者によく知られている方法を利用したPCR法によって得られた。PCRは、PTC-200 サーマルサイクラー (MJ Research, Inc.) を用いて96穴プレート内で行った。反応混合液には、DNA鋳型、各プライマー200 nmo lと、 Mg^{2+} 、 $(NH_4)_2SO_4$ 及び β -メルカプトエタノールを含む反応緩衝液と、Taq DNAポリメラーゼ (Amersham Pharmacia Biotech) と、ELONGASE酵素 (Life Technologies) と、Pfu DNAポリメラーゼ (Stratagene) が含まれていた。プライマー対PCI A、PCI Bに対して用いたパラメータは次の通りである。

ステップ1： 94 で3分間

ステップ2： 94 で15秒

ステップ3： 60 で1分間

ステップ4： 68 で2分間

ステップ5： ステップ2、3、4を20回繰り返す

ステップ6： 68 で5分間

ステップ7： 4 で保存

プライマー対T7、SK+に対しては、上記パラメータに代えて以下のパラメータを用いた。

ステップ1： 94 で3分間

ステップ2： 94 で15秒

ステップ3： 57 で1分間

ステップ4： 68 で2分間

ステップ5： ステップ2、3、4を20回繰り返す

ステップ6： 68 で5分間

ステップ7： 4 で保存

1X TEに溶解したPICOGREEN定量試薬(0.25%(v/v) PICOGREEN、Molecular Probes, Eugene OR) 100 μ lと、希釈していないPCR産物0.5 μ lとを不透明な蛍光光度計プレート(Coming Costar, Acton MA)の各穴に分配し、DNAを試薬と結合可能なようにさせることによって各穴内のDNA濃度の測定を行った。サンプルの蛍光を計測してDNAの濃度を定量するべくプレートをFluoroskan II (Lab systems Oy, Helsinki, Finland)でスキャンした。反応混合物のアリコート5~10 μ lを1%アガロースミニゲル上で電気泳動法によって解析し、どの反応が配列の伸長に成功したかを決定した。

【0245】

伸長させたヌクレオチドは、脱塩及び濃縮して384穴プレートに移し、CviI コレラウイルスエンドヌクレアーゼ(Molecular Biology Research, Madison WI)を用いて消化し、pUC 18ベクター(Amersham Pharmacia Biotech)への再連結反応前に音波処理またはせん断した。ショットガン・シーケンシングのために、消化したヌクレオチドを低濃度(0.6~0.8%)のアガロースゲル上で分離し、断片を切除し、寒天をAgar ACE(Promega)で消化した。伸長させたクローンをT4リガーゼ(New England Biolabs, Beverly MA)を用いてpUC 18ベクター(Amersham Pharmacia Biotech)に再連結し、Pfu DNAポリメラーゼ(Stratagene)で処理して制限部位の張出部(overhang)を満たし、コンピテント大腸菌細胞に形質移入した。形質移入した細胞を抗生物質含有培地上で選択し、個々のコロニーを選択してLB/2x carb液体培地の384穴プレート内において37で一晩培養した。

【0246】

細胞を溶解し、Taq DNAポリメラーゼ(Amersham Pharmacia Biotech)及びPfu DNAポリメラーゼ(Stratagene)を用いてPCRによってDNAを増幅した。その際用いたパラメータは次の通りである。

- ステップ1： 94 で3分間
ステップ2： 94 で15秒
ステップ3： 60 で1分間
ステップ4： 72 で2分間
ステップ5： ステップ2、3、4を29回繰り返す
ステップ6： 72 で5分間
ステップ7： 4 で保存

DNAは、上記のPICOGREEN試薬 (Molecular Probes) によって定量した。DNAの回収率が低いサンプルは、上記と同一の条件を用いて再増幅した。サンプルは20%ジメチルスルホキシド (1:2, v/v) で希釈し、DYENAMIC energy transfer sequencing primer及びDYENAMIC DIRECT kit (Amersham Pharmacia Biotech) またはABI PRISM BIGDYE Terminator cycle sequencing ready reaction kit (Applied Biosystems) を用いてシーケンシングした。

【0247】

同様に、上記手順を用いて完全長ヌクレオチド配列を検証し、或いはそのような伸長のために設計されたオリゴヌクレオチド及び適切なゲノムライブラリを用いて5'調節配列を得る。

【0248】

9 個々のハイブリダイゼーションプローブの標識及び使用

配列番号7乃至12から得たハイブリダイゼーションプローブを利用して、cDNA、ゲノムDNAまたはmRNAをスクリーニングする。約20塩基対からなるオリゴヌクレオチドの標識について特に記載するが、より大きなヌクレオチド断片に対しても事実上同一の手順が用いられる。オリゴヌクレオチドは、OLIGO 4.06ソフトウェア (National Biosciences) 等の最新ソフトウェアを用いて設計し、各オリゴマー50 pmolと、[γ - 32 P]アデノシン3リン酸 (Amersham Pharmacia Biotech) 250 μ Ciと、T4ポリヌクレオチドキナーゼ (DuPont NEN, Boston MA) を結合することにより標識する。標識したオリゴヌクレオチドは、SEPHADEX G-25 超細繊維分子サイズ排除デキストランビードカラム (Amersham Pharmacia Biotech) を用いて実質的に精製する。

Ase I、Bgl II、Eco RI、Pst I、XbaIまたはPvu II (DuPont NEN) のいずれか1つのエンドヌクレアーゼで消化されたヒトゲノムDNAの典型的な膜ベースのハイブリダイゼーション解析において、毎分 10^7 カウントの標識されたプローブを含むアリコットを用いる。

【0249】

各消化物から得たDNAは、0.7%アガロースゲル上で分画してナイロン膜 (Nytran Plus, Schleicher & Schuell, Durham NH) に移す。ハイブリダイゼーションは、40℃で16時間行う。非特異的シグナルを除去するため、例えば0.1Mクエン酸ナトリウム食塩水及び0.5%ドデシル硫酸ナトリウムに一致する条件下で、プロットを室温で順次洗浄する。オートラジオグラフィーまたはそれに代わるイメージング手段を用いてハイブリダイゼーションパターンを視覚化し、比較する。

【0250】

1.0 マイクロアレイ

マイクロアレイの表面上でアレイエレメントの連鎖または合成は、フォトリソグラフィ、圧電印刷 (インクジェット印刷、前出のBalteschweiler等を参照)、機械的マイクロスポッティング技術及びこれらから派生したものをを用いて達成することが可能である。上記各技術において基質は、均一且つ非多孔性の固体とするべきである (Schena (1999) 前出)。推奨する基質には、シリコン、シリカ、スライドガラス、ガラスチップ及びシリコンウエハがある。或いは、ドットプロット法またはスロットプロット法に類似のアレイを利用して、熱的、紫外線の、化学的または機械的結合手順を用いて基質の表面にエレメントを配置及び結合させてもよい。通常のアレイは、手作業で、または利用可能な方法や機械を用いて作製でき、任意の適正数のエレメントを有し得る (Schena, M. ら (1995) Science 270:467-470、Shalon, D. ら (1996) Genome Res. 6:639-645、Marshall, A. and J. Hodgson (1998) Nat. Biotechnol. 16:27-31.を参照)。

【0251】

完全長cDNA、発現遺伝子配列断片 (EST)、またはその断片またはオリゴマーは、マイクロアレイのエレメントを構成し得る。ハイブリダイゼーションに好適

な断片またはオリゴマーを、レーザGENEソフトウェア (DNASTAR) 等の本技術分野で公知のソフトウェアを用いて選択することが可能である。アレイエレメントは、生物学的サンプル中でポリヌクレオチドを用いてハイブリダイズされる。生物学的サンプル中のポリヌクレオチドは、検出を容易にするために蛍光標識またはその他の分子タグに接合される。ハイブリダイゼーション後、生物学的サンプルからハイブリダイズされていないヌクレオチドを除去し、蛍光スキャナを用いて各アレイエレメントにおいてハイブリダイゼーションを検出する。或いは、レーザ脱着及び質量スペクトロメトリを用いてもハイブリダイゼーションを検出し得る。マイクロアレイ上のエレメントにハイブリダイズする各ポリヌクレオチドの相補性の度合及び相対存在度は、算定し得る。一実施例におけるマイクロアレイの調整及び使用について、以下に詳述する。

【0252】

組織または細胞サンプルの準備

グアニジウムチオシアネート法を用いて組織サンプルから全RNAを単離し、オリゴ(dT)セルロース法を用いてポリ(A)⁺RNAを精製する。各ポリ(A)⁺RNAサンプルは、MLLV逆転写酵素、0.05 pg/μlのオリゴ(dT)プライマー(21mer)、1×第1鎖緩衝液、0.03 unit/μlのRNアーゼ阻害因子、500 μMのdATP、500 μMのdGTP、500 μMのdTTP、40 μMのdCTP、40 μMのdCTP-Cy3 (BDS) またはdCTP-Cy5 (Amersham Pharmacia Biotech) を用いて逆転写する。逆転写反応は、GEMBRIGHTキット (Incyte) を用いてポリ(A)⁺RNA含有の25体積ml内で行う。特異制御ポリ(A)⁺RNAは、370 で2時間インキュベートした後、in vitro転写により非コード酵母ゲノムDNAから合成する。各反応サンプル(1つはCy3、もう1つはCy5標識)は、2.5 mlの0.5 M水酸化ナトリウムで処理し、850 で20分間インキュベートし、反応を停止させてRNAを減成する。サンプルは、2つの連続するCHROMA SPIN 30ゲル濾過スピンカラム (CLONTECH Laboratories, Inc. (CLONTECH), Palo Alto CA) を用いて精製する。結合後、2つの反応サンプルは、1 mlのグリコーゲン(1 mg/ml)を用いて析出させたエタノール、60 mlの酢酸ナトリウム及び300 mlの100%エタノールである。サンプルは次に、SpeedVAC (Savant Instruments Inc., Holbrook NY) を用いて乾燥して仕上げ、14

μlの5 × SSC / 0.2 % SDS中で再懸濁する。

【0253】

マイクロアレイの準備

本発明の配列を用いて、アレイエレメントを生成する。各アレイエレメントは、クローン化cDNAインサートによりベクター含有細菌性細胞から増幅する。PCR増幅は、cDNAインサートの側面に位置するベクター配列に相補的なプライマーを用いる。30サイクルのPCRで1 ~ 2 ngの初期量から5 μgより大きい最終量までアレイエレメントを増幅する。増幅されたアレイエレメントは、SEPHACRYL-400 (Amersham Pharmacia Biotech) を用いて精製される。

【0254】

精製したアレイエレメントは、ポリマーコートされたスライドガラス上に固定する。顕微鏡スライドガラス (Corning) は、処理中及び処理後に大量の蒸留水洗液を用いて0.1 %のSDS及びアセトン中で超音波により洗浄する。スライドガラスは、4 %フッ化水素酸 (VWR Scientific Products Corporation (VWR), West Chester PA) 中でエッチングし、蒸留水中で広範囲にわたって洗浄し、95 %エタノール中で0.05 %アミノプロピルシラン (Sigma) を用いてコーティングする。コーティングしたスライドガラスは、110 °Cの天火で硬化させる。

【0255】

米国特許第5,807,522号で説明されている方法を用いて、コーティングしたガラス基板にアレイエレメントを付加する。該特許は、引用を以って本明細書の一部となす。平均濃度が100 ng/μlのアレイエレメントDNA 1 μlを高速ロボット装置により開口キャピラリープリントエレメントに充填する。装置はここで、スライド毎に約5 nlのアレイエレメントサンプルをデポジットする。

【0256】

マイクロアレイには、STRATALINKER UV架橋剤 (Stratagene) を用いてUV架橋する。マイクロアレイは、室温において0.2 % SDSで1度洗浄し、蒸留水で3度洗浄する。リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) (Tropix, Inc., Bedford MA) 中の0.2 % カゼイン中において60 °Cで30分間マイクロアレイをインキュベートした後、前に行ったように0.2 % SDS及び蒸留水で洗浄することにより、非特異

結合部位をブロックする。

【0257】

ハイブリダイゼーション

ハイブリダイゼーション反応は、 $5 \times \text{SSC}$ 、 0.2% SDSハイブリダイゼーション緩衝液中のCy3及びCy5標識したcDNA合成生成物を各 $0.2 \mu\text{g}$ 含む $9 \mu\text{l}$ のサンプル混合体を有する。サンプル混合体は、 65°C まで5分間加熱し、マイクロアレイ表面上で等分して 1.8 cm^2 のカバーガラスで覆う。アレイは、顕微鏡スライドより僅かに大きいキャビティを有する防水チェンバーに移行させる。チェンバーのコーナーに $140 \mu\text{l}$ の $5 \times \text{SSC}$ を加えることにより、チェンバー内部を湿度100%に保持する。アレイを含むチェンバーは、 60°C で約6.5時間インキュベートする。アレイは、第1洗浄緩衝液中($1 \times \text{SSC}$ 、 0.1% SDS)において45で10分間洗浄し、第2洗浄緩衝液中($0.1 \times \text{SSC}$)において45で10分間各々3度洗浄して乾燥させる。

【0258】

検出

レポーター標識ハイブリダイゼーション複合体は、Cy3の励起のためには 488 nm 、Cy3の励起のためには 632 nm でスペクトル線を生成し得るInnova 70混合ガス10 Wレーザ(Coherent, Inc., Santa Clara CA)を備えた顕微鏡で検出する。20×顕微鏡対物レンズ(Nikon, Inc., Melville NY)を用いて、アレイ上に励起レーザ光を集中させる。アレイを含むスライドを顕微鏡のコンピュータ制御X-Yステージに置き、対物レンズを通過してラスタスキャンする。本実施例で用いた $1.8 \text{ cm} \times 1.8 \text{ cm}$ のアレイは、 $20 \mu\text{m}$ の解像度でスキャンした。

【0259】

2つの異なるスキャンのうち、混合ガスマルチラインレーザは2つの蛍光体を連続的に励起する。放射された光は、2つの蛍光体に応じて波長に基づき2つの光電子増倍管検出器(PMT R1477, Hamamatsu Photonics Systems, Bridgewater NJ)に分割される。アレイと光電子増倍管間に設置された好適なフィルターを用いて、シグナルをフィルタリングする。用いる蛍光体の最大発光は、Cy3では 565 nm 、Cy5では 650 nm である。装置は両方の蛍光体からのスペクトルを同時

に記録し得るが、レーザ源において好適なフィルターを用いて各アレイを通常2度スキャンし、蛍光体1つにつき1度スキャンする。

【0260】

スキャンの感度は通常、既知濃度のサンプル混合体に添加されるcDNA制御種により生成されるシグナル強度を用いて較正する。アレイ上の特定の位置には相補的DNA配列が含まれ、その位置におけるシグナルの強度をハイブリダイジング種の重量比1:100,000に相関させる。異なる源(例えば試験及び制御細胞を表す)からの2つのサンプルを、各々異なる蛍光体で標識し、他と異なって発現した遺伝子を同定するために単一のアレイにハイブリダイズする場合には、2つの蛍光体を有する較正cDNAの標識サンプルにより較正し、ハイブリダイゼーション混合体に各々等量を加える。

【0261】

光電子増倍管の出力は、IBMコンパチブルPCコンピュータにインストールされた12ビットRTI-835Hアナログ-デジタル(A/D)変換ボード(Analog Devices, Inc., Norwood MA)を用いてデジタル化される。デジタル化されたデータは、青色(低シグナル)から赤色(高シグナル)までの擬似カラー範囲へのリニア20色変換を用いてシグナル強度がマッピングされたようなイメージとして表示される。データは、定量的にも分析される。2つの異なる蛍光体を同時に励起及び測定する場合には、各蛍光体の発光スペクトルを用いて、データは先ず蛍光体と蛍光体間の光学磁気プリンティング(発光スペクトルの重畳に起因する)に集められる。

【0262】

グリッドは蛍光シグナルイメージ上に重ねられ、それによって各スポットからのシグナルはグリッドの各エレメントに集められる。各エレメント内の蛍光シグナルは統合され、シグナルの平均強度に応じた数値が得られる。シグナル分析に用いるソフトウェアは、GEMTOOLS遺伝子発現分析プログラム(Incyte)である。

【0263】

1.1 相補的ポリヌクレオチド

GCRECをコードする配列或いはその任意の一部に対して相補的配列は、天然のG

GCRECの発現を検出し、低下させ、または阻害するために用いられる。約15～30塩基対を含むオリゴヌクレオチドの使用について記すが、これより小さな或いは大きな配列の断片の場合でも本質的に同じ方法を用いることができる。Oligo4.06ソフトウェア(National Biosciences)とGCRECをコードする配列とを用いて、適切なオリゴヌクレオチドを設計する。転写を阻害するためには、最も独特な5'配列から相補的オリゴヌクレオチドを設計し、これを用いてプロモーターがコーディング配列に結合するのを阻害する。翻訳を阻害するためには、GCRECをコードする転写物にリボソームが結合しないように相補的オリゴヌクレオチドをデザインする。

【0264】

1.2 GCRECの発現

GCRECの発現及び精製は、細菌またはウイルスをベースにした発現系を用いて行うことができる。細菌でGCRECを発現するために、抗生物質耐性及びcDNAの転写レベルを高める誘導性のプロモーターを含む好適なベクターにcDNAをサブクロニングする。このようなプロモーターには、lacオペレーター調節エレメントに関連するT5またはT7バクテリオファージプロモーター及びtrp-lac(tac)ハイブリッドプロモーターが含まれるが、これらに限定するものではない。組換えベクターを、BL21(DE3)等の好適な細菌宿主に形質転換する。抗生物質耐性をもつ細菌が、イソプロピル-Dチオガラクトピラノシド(IPTG)で誘導されるとGCRECを発現する。真核細胞でのGCRECの発現は、一般にバキュロウイルスとして知られているAutographica californica核多面性ウイルス(AcMNPV)を昆虫細胞株または哺乳動物細胞株に感染させて行う。バキュロウイルスの可欠ポリヘドリン遺伝子を、相同的組換え、或いは転移プラスミドの仲介に關与する細菌仲介遺伝子転移のどちらかによって、GCRECをコードするcDNAと置換する。ウイルスの感染力は維持され、強いポリヘドリンプロモーターによって高いレベルのcDNAの転写が行われる。組換えバキュロウイルスは、多くの場合はSpodoptera frugiperda(Sf9)昆虫細胞に感染に用いられるが、ヒト肝細胞の感染にも用いられることもある。後者の感染の場合は、バキュロウイルスの更なる遺伝的変更が必要になる。(Engelhard, E. K.ら(1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:3224-3227

、Sandig, V. ら (1996) Hum. Gene Ther. 7:1937-1945.等を参照)。

【0265】

殆どの発現系では、融合タンパク質としてGCRECを合成するのに例えばグルタチオンSトランスフェラーゼ (GST) またはペプチドエピトープ標識、例えばFLAGや6-Hisを用いる。これらを用いることにより、未精製細胞溶解物から組換え融合タンパク質の親和性ベースの精製を迅速に1ステップで行うことができる。GSTは日本住血吸虫からの26kDaの酵素であり、タンパク質の活性及び抗原性を維持した状態で、固定化グルタチオン上で融合タンパク質の精製を可能とする (Amersham Pharmacia Biotech)。精製後、GSTの部分を特定の開発部位においてGCRECからタンパク質分解的に切断することが可能である。FLAGは8アミノ酸のペプチドであり、市販されているモノクローナル及びポリクローナル抗FLAG抗体 (Eastman Kodak) を用いて免疫親和性精製を可能にする。6ヒスチジン残基が連続して伸長した6-Hisは、金属キレート樹脂 (QIAGEN) 上での精製を可能にする。タンパク質の発現及び精製の方法は、前出のAusubel (1995) 10章、16章に記載されている。これらの方法で精製したGCRECを直接用いて、適用可能な場合には実施例16、17及び18のアッセイを行うことができる。

【0266】

1.3 機能的アッセイ

GCREC機能は、哺乳動物細胞培養系において生理学的に高められたレベルでのGCRECをコードする配列の発現によって評価する。cDNAを、cDNAを高いレベルで発現する強いプロモーターを含む哺乳動物発現ベクターにサブクローニングする。選り抜きのベクターには、pCMV SPORTプラスミド (Life Technologies) 及びpCR3.1プラスミド (Invitrogen) が含まれ、どちらもサイトメガロウイルスプロモーターを有する。リポソーム製剤或いは電気穿孔法を用いて、5 ~ 10 μ gの組換えベクターをヒト細胞株、例えば内皮由来または造血由来の細胞株に一時的に形質移入する。更に、標識タンパク質をコードする配列を含む1 ~ 2 μ gのプラスミドを同時に形質移入する。標識タンパク質の発現により、形質移入細胞と非形質移入細胞を区別する手段が与えられる。また、標識タンパク質の発現によって、cDNAの組換えベクターからの発現を正確に予想できる。標識タンパク質は、

例えば緑色蛍光タンパク質 (GFP ; Clontech)、CD64またはCD64-GFP融合タンパク質から選択できる。自動化された、レーザー光学に基づく技術であるフローサイトメトリー (FCM) を用いて、GFPまたはCD64-GFPを発現する形質移入された細胞を同定し、その細胞のアポトーシス状態や他の細胞特性を評価する。FCMは、細胞死に先行するか或いは同時に発生する現象を診断する蛍光分子の取込を検出して計量する。このような現象として挙げられるのは、プロピジウムヨウ化物によるDNA染色によって計測される核DNA内容物の変化、プロモデオキシウリジンの取込量の低下によって計測されるDNA合成の下方調節、特異抗体との反応性によって計測される細胞表面及び細胞内におけるタンパク質の発現の変化、及び蛍光複合アネキシンVタンパク質の細胞表面への結合によって計測される原形質膜組成の変化とがある。フローサイトメトリー法については、Ormerod, M. G. (1994) Flow Cytometry Oxford, New York, NY.に記述がある。

【0267】

遺伝子発現におけるGCRECの影響は、GCRECをコードする配列とCD64またはCD64-GFPのいずれかが形質移入された高度に精製された細胞集団を用いて評価することができる。CD64またはCD64-GFPは、形質転換された細胞表面で発現し、ヒト免疫グロブリンG (IgG) の保存領域と結合する。形質転換細胞と非形質転換細胞は、ヒトIgGまたはCD64に対する抗体 (DYNAL, Lake Success, NY) で覆われた磁気ビーズを用いて有効に分離することができる。mRNAは、本技術分野で公知の方法で細胞から精製することができる。GCRECその他の目的の遺伝子をコードするmRNAの発現は、ノーザン分析或いはマイクロアレイ技術で分析することができる。

【0268】

1.4 GCREC特異抗体の産生

ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (PAGE ; Harrington, M.G. (1990) Methods Enzymol. 182:488-495等を参照) または他の精製技術を用いて実質上精製されたGCRECを用いて、標準プロトコルでウサギを免疫化して抗体を産出する。

【0269】

或いは、レーザーGENEソフトウェア (DNASTAR) を用いてGCRECアミノ酸配列を解析し、免疫抗原性の高い領域を決定する。そして対応するオリゴペプチドを合成

し、このオリゴペプチドを用いて当業者によく知られている方法で抗体を生成する。適切なエピトープ、例えばC末端付近或いは隣接する親水性領域にあるエピトープの選択については、当分野で公知である（前出のAusubel, 1995, 11章等を参照）。

【0270】

通常は、長さ約15残基のオリゴペプチドを、Fmocケミストリを用いるABI 431A ペプチドシンセサイザ（Applied Biosystems）を用いて合成し、N-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル（MBS）を用いた反応によってKLH（Sigma-Aldrich, St. Louis MO）に結合させて、免疫抗原性を高める（前出のAusubel, 1995 等を参照）。完全フロイントアジュバントにおいてオリゴペプチド-KLM複合体を用いてウサギを免疫化する。得られた抗血清の抗ペプチド活性及び抗GCREC活性を検査するには、ペプチドまたはGCRECを基質に結合し、1% BSAを用いてブロックし、ウサギ抗血清と反応させて洗浄し、さらに放射性ヨウ素で標識したヤギ抗ウサギIgGと反応させる。

【0271】

1.5 特異抗体を用いた天然のGCRECの精製

天然または組換えGCRECを、GCREC特異抗体を用いたイムノアフィニティークロマトグラフィにより実質的に精製する。イムノアフィニティークラムは、抗GCREC抗体を活性化クロマトグラフィ用樹脂、例えばCNBr活性化セファロース（Amersham Pharmacia Biotech）と共有結合させることにより構築する。結合後に、製造者の使用説明書に従って樹脂をブロックし、洗浄する。

【0272】

GCRECを含む培養液をイムノアフィニティークラムに通し、GCRECを優先的に吸着する条件下（例えば洗浄剤が存在する高イオン強度緩衝液）でカラムを洗浄する。抗体とGCRECの結合を破壊する条件（例えばpH 2～3の緩衝液、或いは尿素またはチオシアン酸塩イオン等の高濃度のカオトロップ剤）でカラムを溶出させ、GCRECを回収する。

【0273】

1.6 GCRECと相互作用する分子の同定

GCRECと相互作用する分子は、Gタンパク質などのシグナル伝達に関与する分子以外にもアゴニスト及びアンタゴニストを含み得る。GCRECまたは生物学的に活性であるGCREC断片を、 ^{125}I ボルトンハンター試薬で標識する (Bolton A.E. and W.M. Hunter (1973) *Biochem. J.* 133:529-539等を参照)。GCRECの断片には、例えば3つの細胞外ループのうち1若しくは複数のループ、細胞外N末端領域または第3細胞内ループがある。マルチウェルプレートの穴の中に予め配列しておいた候補分子を、標識したGCRECと共にインキュベートして洗浄し、標識したGCREC複合体を有する全ての穴をアッセイする。GCREC濃度を変えて得たデータを用いて、候補分子とのGCRECの数、親和性及び会合の値を計算する。

【0274】

或いは、GCRECと相互作用する分子は、Fields, S. 及び O. Song (1989) *Nature* 340:245-246 に記載されているような酵母2ハイブリッドシステムを用いて分析するか、またはMATCHMAKERシステム (Clontech) 等の2ハイブリッドシステムに基づく市販のキットを用いて分析する。

【0275】

GCRECはまた、ハイスループットな方法で酵母2ハイブリッドシステムを使用するPATHCALLINGプロセス (CuraGen Corp., New Haven CT) に用いて、遺伝子の2大ライブラリにコードされる遺伝子間の全ての相互作用を決定することができる (Nandabalan, K. ら (2000) 米国特許第6,057,101号)。

【0276】

潜在的GCRECアゴニストまたはアンタゴニストは、実施例17及び18に記載のアッセイを用いてGCREC受容体活性の活性化または阻害を試験し得る。候補分子は、既知のGPCRアゴニストまたはアンタゴニスト、ペプチドライブラリまたは組み合わせの化学ライブラリから選択し得る。

【0277】

GCRECとGタンパク質などの細胞内シグナル伝達分子の相互作用を検出する方法は、オーファンGタンパク質結合膜7回貫通受容体から得た内部セグメントまたは細胞質ドメインが、既知のGタンパク質結合膜7回貫通受容体の相似ドメインと交換され、Gタンパク質及びオーファン受容体ドメインに活性化された下流

シグナル伝達経路を同定するために用いられるという前提に基づく (Kobilka, B. K. ら (1988) Science 240:1310-1316)。相似融合においては、オーファン受容体のドメインが融合タンパク質の一部としてクローニングされ、結合アッセイで用いて特定のGタンパク質との相互作用を実証し得る。研究によれば、Gタンパク質結合膜7回貫通受容体の第3細胞内ループがGタンパク質相互作用及びシグナル伝達に重要であることが示されてきた (Conklin, B.R. ら (1993) Cell 73:631-641)。例えば、GCRECの第3細胞内ループに対応するDNA断片は、ポリメラーゼ連鎖反応法 (PCR) により増幅し、pGEX (Pharmacia Biotech) などの融合ベクターにサブクローニングし得る。構成体は誘導された適切な細菌性宿主に形質転換され、融合タンパク質はグルタチオンセファロース4B (Pharmacia Biotech) アフィニティークロマトグラフィーにより細胞溶解産物から精製する。

【0278】

in vitro結合アッセイの場合、Gタンパク質を含む細胞抽出物は、50mM Tris、pH7.8、1mM EGTA、5mMのMgCl₂、20mMのCHAPS、20%グリセロール、各10µgのアプロチニン及びロイペプチンと、20µlの50mMフッ化フェニルメチルスルフォニルで抽出することにより準備する。溶解産物は絶えず攪拌しながら氷上で45分間インキュベートし、23,000g、4℃で15分間遠心分離して上澄みを集める。750µgの細胞抽出物をグルタチオンSトランスフェラーゼ (GST) 融合タンパク質ビーズを用いて4℃で2時間インキュベートする。GSTビーズは、リン酸緩衝食塩水で5回洗浄する。結合Gサブユニットは、百日咳毒素またはコレラ毒素を用いた [³²P]ADPリボシル化により検出する。SDSサンプル緩衝液 (4.6% (w/v) SDS、10% (v/v) メルカプトエタノール、20% (w/v) グリセロール、95.2mM Tris-HCl、pH6.8、0.01% (w/v) ブロムフェノールブルー) を添加することにより反応を停止させる。 [³²P]ADP標識されたタンパク質は、10% SDS-PAGEゲルで分離し、オートラジオグラフを行う。ゲル中で分離したタンパク質はニトロセルロースペーパーに移し、プロット (blot) (5% 脱脂粉乳、50mMのTris-HCl (pH 8.0)、2mMのCaCl₂、80mMのNaCl、0.02%のNaN₃、及び0.2% ノニデットP-40) を用いて室温で1時間遮断し、Gサブタイプ選択的抗体 (1:500; Calbiochem-Novabiochem) で1.5時間インキュ

ベートする。3洗浄後に、プロットはホースラディッシュペルオキシダーゼ (HRP) 共役ヤギ抗ウサギ免疫グロブリン (1:2000, Cappel, Westchester PA) でインキュベートし、化学ルミネセンスベースのECL法 (Amersham Corp) で可視化する。

【0279】

1.7 GCREC活性の実証

GCREC活性に対するアッセイは、細胞表面におけるGCRECの発現を測定する。GCRECをコードするcDNAは、好適な哺乳動物細胞系に形質移入する。細胞表面タンパク質は、記載されているようにビオチンで標識する (de la Fuente, M.A. ら (1997) Blood 90:2398-2405)。GCREC特異抗体を用いて免疫沈降を実行し、ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) 及び免疫プロット技術を用いて免疫沈降サンプルを分析する。標識された免疫沈降と未標識免疫沈降の比は、細胞表面に発現したGCRECの量に比例する。

【0280】

或いは、GCREC活性のためのアッセイは、リガンド/受容体が仲介する細胞増殖の調節のための原型アッセイに基づく。このアッセイでは、スイスマウス3T3細胞におけるDNA合成の速度を測定する。当分野で公知の形質移入方法を用いて、GCRECをコードするポリヌクレオチドを含むプラスミドを静止状態の3T3培養細胞に加える。一過性に形質移入された細胞は次に、放射性DNA前駆分子である [³H]チミジンの存在下でインキュベートする。次に、培養した細胞にGCRECリガンドの変化する量を加える。 [³H]チミジンの酸沈殿可能DNAへの取り込みは、ラジオアイソトープカウンターを用いて適切な時間間隔で測定する。取り込み量は、新たに合成されたDNAの量に正比例する。少なくとも100倍のGCRECリガンド密度範囲に対する投与 - 反応の1次曲線は、受容体活性を示す。ミリリットル当りの活性の1単位は、50%の反応レベルを産出するGCRECの密度として画定され、100%であれば [³H]チミジンを酸沈殿可能DNAに最大限取り込むことを表す (McKay, I. and I. Leigh, eds. (1993) Growth Factors: A Practical Approach, Oxford University Press, New York NY, p.73)。

【0281】

或いは、GCREC活性のためのアッセイは、GPCRファミリータンパク質がGタンパク質活性化第2メッセンジャーシグナル伝達経路（例えばcAMP; Gauclin, P. ら (1998) J. Biol. Chem. 273:4990-4996）を調整する能力に基づく。当分野で既知の方法を用いて、完全長GCRECをコードするプラスミドを哺乳動物細胞系（例えばチャイニーズハムスター卵巣(CHO)またはヒト胎児腎臓(HEK-293)細胞系）に形質移入する。培地中の12穴トレイで形質移入された細胞を成長させ、培地を廃棄して、付着した細胞はPBSで軽く洗浄する。培地においてリガンド有りまたはリガンドなしで細胞を30分間インキュベートし、次に培地を除去し、細胞を1Mの過塩素酸で処理して溶解する。溶解産物中のcAMPレベルは、当分野で既知の方法を用いて放射免疫アッセイにより測定する。リガンドに曝された細胞から得た溶解産物中のcAMPレベルをリガンドなしのものと比較したときの変化は、形質移入された細胞に存在するGCRECの量に比例する。

【0282】

イノシトールリン酸レベルの変化を測定するためには、 1×10^5 細胞/穴を含む24穴プレートで細胞を成長させ、イノシトールを含まない培地及び $[^3\text{H}]$ ミオイノシトールを用いて2 μCi /穴で48時間インキュベートする。培地を除去し、10mMのLiClを含む緩衝液で細胞を洗浄し、その後リガンドを添加する。反応は、過塩素酸の添加により停止する。イノシトールリン酸は、Dowex AG1-X8 (Bio-Rad) 陰イオン交換樹脂及び液体シンチレーションにより計数された全ての標識されたイノシトールリン酸で抽出及び分離される。リガンドに曝された細胞から得た標識されたイノシトールリン酸のレベルをリガンドなしのものと比較したときの変化は、形質移入された細胞に存在するGCRECの量に比例する。

【0283】

1.8 GCRECリガンドの同定

GCRECは、CHO（チャイニーズハムスター卵巣）またはHEK（ヒト胎児腎臓）293などの真核細胞系において発現する。これらの細胞系は、GPCR発現過程が良好であり、発現したGCRECを下流エフェクターに機能的に結合させることができるような広範囲のGタンパク質を含む。候補リガンドの存在下で発現した受容体の活性化に対し、形質転換した細胞をアッセイする。活性は、cAMPまたは Ca^{2+} など

の細胞内第2メッセンジャーの変化により測定する。当分野で公知の標準的な方法を用いるか、活性化受容体によるタンパク質キナーゼCの刺激に反応して発光タンパク質（例えばホタルルシフェラーゼまたは緑色蛍光タンパク質）がプロモーターの転写調節下にあるようなレポーター遺伝子アッセイを用いて直接測定する（Milligan, C. ら (1996) Trends Pharmacol. Sci. 17:235-237）。アッセイ技術は、これら第2メッセンジャーシステムの両方に利用可能であり、アデニリルシクラーゼ活性化FlashPlate Assay（NEN Life Sciences Products）などのマルチウェルプレートフォーマットまたはFluo-4 AM（Molecular Probes）などの蛍光Ca²⁺ 指示薬でFLIPR蛍光定量的プレート読出しシステム（Molecular Devices）を併用して高処理読出しを可能にする。生理的関連性のある第2メッセンジャー経路が知られていない場合、GCRECは、ホスホリパーゼC及びCa²⁺ 可動化に關与する経路を介してGCRECのシグナル伝達を通すために、広範囲のGタンパク質と結合することが実証されているようなGタンパク質G_{15/16}と同時発現し得る（Offerrnanns, S. and M.I. Simon (1995) J. Biol. Chem. 270:15175-15180）。或いは、GCRECは内因性GPCRが不足しているような操作された酵母系に発現し、それによってGCREC活性化スクリーニングに対してバックグラウンドが存在しない利点を提供し得る。これらの酵母系は、ヒトGPCR及びGタンパク質を内因性酵母フェロモン受容体経路の対応する構成要素に対して置換する。シグナルに対する正常な酵母反応を選択的培地の正の成長またはレポーター遺伝子発現に変換するように、下流シグナル伝達経路も変更する（Broach, J.R. and J. Thorne (1996) Nature 384 (supp.):14-16）。既知のGPCRリガンド及びその他天然の生理活性分子を含む推定上のリガンドに対して受容体をスクリーニングする。組織、生物学的流体及び細胞上澄みから抽出した生物学的抽出物もスクリーニングする。

【0284】

当業者は、本発明の範囲及び精神から逸脱することなく本発明の記載した方法及びシステムの種々の改変を行い得る。本発明について説明するにあたり特定の好適実施例に関連して説明を行ったが、本発明の範囲が、そのような特定の実施例に不当に制限されるべきではないことを理解されたい。実際に、分子生物学ま

たは関連分野の専門家には明らかな、本明細書に記載されている本発明の実施方法の様々な改変は、特許請求の範囲内にあるものとする。

【0285】

(表の簡単な説明)

表1は、本発明の完全長ヌクレオチド配列及びポリペプチド配列の命名法の概略を示す。

【0286】

表2は、GenBank識別番号及び本発明のポリペプチドに最も近いGenBank相同体の注釈を示す。各ポリペプチドとそのGenBank相同体が一致する確率スコアも併せて示す。

【0287】

表3は、予測されるモチーフ及びドメインを含む本発明のポリヌクレオチド配列の構造的特徴を、ポリペプチドの分析に用いるための方法、アルゴリズム及び検索可能なデータベースと共に示す。

【0288】

表4は、本発明のポリヌクレオチド配列をアSEMBLするために用いたcDNA及びゲノムDNA断片を、ポリヌクレオチド配列の選択した断片と共に示す。

【0289】

表5は、本発明のポリヌクレオチドのための代表的なcDNAライブラリを示す。

【0290】

表6は、表5に示したcDNAライブラリの作製に用いた組織及びベクターを説明する付表である。

【0291】

表7は、GCRECの分析に用いたツール、プログラム、アルゴリズムを、適用可能な説明、引用文献及び閾値パラメータと共に示す。

【表1】

表 1

IncyteプロジェクトID	ポリペプチド SEQ ID NO	IncyteポリペプチドID	ポリヌクレオチド SEQ ID NO	IncyteポリヌクレオチドID
5628963	1	5628963CD1	7	5628963CBI
1453124	2	1453124CD1	8	1453124CBI
3226980	3	3226980CD1	9	3226980CBI
269898	4	269898CD1	10	269898CBI
4585651	5	4585651CD1	11	4585651CBI
7472063	6	7472063CD1	12	7472063CBI

【表 2】

表2

ポリペプチド SEQ ID NO	Incyte ポリペプチドID	GenBank ID NO:	確率スコア	GeneBank相同体
1	5628963CD1	g10442008	0	システイニルロイコトリエン受容体GSLT2 (ヒト) (Heise, C.E.ら (2000) J. Biol. Chem. 275:30531-30536)
2	1453124CD1	g5525078	1.00E-134	膜7回貫通受容体 (ドブネズミ) (Abe, J.ら (1999) J. Biol. Chem. 274:19957-19964)
3	3226980CD1	g992582	6.10E-82	Gタンパク質結合膜7回貫通受容体 (メダカ)
4	269898CD1	g11908211	1.00E-163	HOR 5' β 14 (ヒト) (Bulger, M.ら (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:14560-14565)
5	4585651CD1	g3420759	1.10E-25	推定上のGタンパク質結合受容体RA1c (ドブネズミ) (Ramang, K., Konzelmann, S., and Breer, H. (1998) Identification of a novel G-protein coupled receptor expressed in distinct brain regions and a defined olfactory zone. Recept. Channels 6:141-151)
6	7472063CD1	g1246534	2.70E-65	嗅覚受容体4 (ニワトリ) (Leibovici, M.ら (1996) Dev. Biol. 175:118-131)

【表3】

表3-1

SEQ ID NO	Incyte ポリペプチド ID	アミノ酸 残基	潜在的リン酸化部位	潜在的グリコシル化部位	サイン(signature)配列、 モチーフ、ドメイン	分析方法及び データベース
1	5628963CD1	346	T71 T344 S13 S15 S176 S186 S151 S241 T265 T273	N20 N26 N30 N181	シグナルペプチド: M1-G55 膜貫通ドメイン: R38-Y61, L198-Y221 膜7回貫通受容体 (ロドプシンファミリー): G55-Y305 Gタンパク質結合受容体サイン: S115-I166 Gタンパク質結合受容体: BL00237A: W104-P143 BL00237B: C210-Y221 BL00237C: V240-L266 BL00237D: N297-K313 ロドプシン様GPCRスーパーファミリー: PR00237A: F40-L64 PR00237B: V73-R94 PR00237C: L118-M140 PR00237D: S154-D175 PR00237E: N202-I225 PR00237F: A245-V269 PR00237G: L287-K313 ケモカイン受容体サイン: PR00657C: F87-Y97 PR00657D: S115-F128 PR00657G: F307-R321 Gタンパク質結合受容体: DM00013 P32249 25-324: R38-R321 Gタンパク質結合受容体: DM00013 P41231 27-322: E34-E310 Gタンパク質結合受容体: PD000009: K68-I171	SPScan HMMER HMMER-PFAM ProfileScan BLIMPS- BLOCKS BLIMPS- PRINTS BLIMPS- PRINTS BLAST-DOMO BLAST-DOMO BLAST- PRODOM

【表4】

SEQ ID NO:	Incyte ポリペプチドID	アミノ酸 残基	潜在的リン酸化部位	潜在的グリコシル化部位	サイン(signature)配列、モチーフ、ドメイン	分析方法及びデータベース
2	1453124CD1	910	T13 T30 T55 T104 S115 S219 S225 S266 S302 S369 T370 S376 S474 S514 S523 T773 S779 T810 T55 T155 S248 T284 S401 S425 T622 T726 S858 T862 S871	N139 N168 N205 N282 N310 N317 N329 N354 N368 N389 N410 N423 N437 N455 N512 N528 N553 N736 N739 N866	シグナルペプチド: MI-G19 シグナルペプチド: MI-G17 膜貫通ドメイン: L593-W611, M627-D648, L671-I687, L744-L764, K791-V812, V821-L840 ラトロフィリン(Latrophilin)/CL-I様GPSドメイン S530-T580 膜7回貫通受容体 (セクレチンファミリー): F582-L845 Gタンパク質結合受容体: BL00649B: F667-I712; BL00649C: C657-L682; BL00649D: A746-W770; BL00649E: L745-V774; BL00649F: I786-G807; BL00649G: A828-L853 cAMP型GPCRサイン: PR00247A: T589-W611 PR00247C: V661-I687 PR00247D: V701-A719 PR00247E: L744-L764 セクレチン様GPCRスーパーファミリー: PR00249A: W587-W611 PR00249C: A659-L682 PR00249E: L745-W770 PR00249F: V789-G809 PR00249G: H820-L841 ホルモン受容体EMRI前駆体: DM05221 I37225 347-738: C534-Q847 DM05221 P48960 347-738: C534-Q847 DM05221 A57172 465-886: E526-K878 Gタンパク質結合受容体ファミリー-2: DM00378 P34998 5-438: Q613-H888 Gタンパク質結合受容体: PD000752: V585-Q847	HMMER SPSCAN HMMER HMMER-PFAM HMMER-PFAM BLIMPS-BLOCKS BLIMPS-PRINTS BLIMPS-PRINTS BLAST-DOMO BLAST-DOMO BLAST-PRODOM

【表5】

表3-3

SEQ ID NO.	Incyte ポリペプチドID	アミノ酸 残基	潜在的リン酸化部位	潜在的 グリコシル化部位	サイン(signature)配列、 モチーフ、ドメイン	分析方法及び データベース
3	3226980CD1	451	S183 T247 S376 T251 S260 S402 S446	N12	膜貫通ドメイン: L117-N137, Q206-Y228, V288-F306 膜7回貫通受容体 (ロドプシンファミリー): G59-Y341 Gタンパク質結合受容体モチーフ: L128-V144 Gタンパク質結合受容体サイン: BL00237A: A108-P147 BL00237B: F217-Y228 BL00237C: F280-F306 BL00237D: C333-R349 Gタンパク質結合受容体サイン: F120-V166 ロドプシン様GPCRスーパーファミリー: PR00237A: V44-A68 PR00237B: K75-L96 PR00237C: S122-V144 PR00237D: L158-L179 PR00237E: V209-F232 PR00237F: A285-Y309 PR00237G: E323-R349 Gタンパク質結合受容体ファミリー: PD000009: V77-W184 Gタンパク質結合受容体: DM00013 P5046 20-335: V44-K354 Gタンパク質結合受容体: DM00013 P26255 31-358: L51-C358 Gタンパク質結合受容体: DM00013 P31368 20-336: V44-K354 Gタンパク質結合受容体: DM00013 JN0591 20-336: V44-K354	HMMER HMMER-PFAM MOTIFS BLIMPS- BLOCKS ProfileScan BLIMPS- PRINTS BLAST- PRODOM BLAST-DOMO BLAST-DOMO BLAST-DOMO BLAST-DOMO

【表6】

表 3-4

SEQ ID NO:	Incyte ポリペプチドID	アミノ酸 残基	潜在的リン酸化部位	潜在的グリコシル化部位	サイン(signature)配列、モチーフ、ドメイン	分析方法及びデータベース
4	269898CD1	524	S198 T204 S276 T386 S4 S174 T470	N400	標準ドメイン: V411-I430 膜7回貫通受容体(ロドプシンファミリー)サイン: G250-Y502 Gタンパク質結合受容体サイン: BL00237A: G299-P338, BL00237C: D441-S467, BL00237D: P494-R510 嗅覚受容体サイン: PR00245A: M268-K289, PR00245B: T386-W400, PR00245C: L447-I462 Gタンパク質受容体モチーフ: L319-I335 推定上のGタンパク質結合受容体: RALG (PDI70483): I454-L519 嗅覚受容体タンパク質: (PD000921): L375-I454 Gタンパク質結合受容体: DM00013 G45774 18-309: P227-H518 Gタンパク質結合受容体: DM00013 P34982 17-305: F234-L517 Gタンパク質結合受容体: DM00013 P23275 17-306: P227-L517 Gタンパク質結合受容体: DM00013 P23273 18-306: F240-L517 Znフィンガー, C3H4型(環状フィンガー)サイン: C43-C87 Znフィンガー, C3H4型(環状フィンガー)サイン: L120-V161 Znフィンガーサイン, C3H4型: BL00518: C58-C66 Znフィンガーサイン, C3H4型: I37-G94 Znフィンガーサイン, C3H4型: C58-I67	HMMER HMMER-PFAM BLIMPS-BLOCKS BLIMPS-PRINTS MOTIFS BLAST-PRODOM BLAST-PRODOM BLAST-PRODOM BLAST-DOMO BLAST-DOMO BLAST-DOMO BLAST-DOMO HMMER-PFAM HMMER-PFAM BLIMPS-BLOCKS ProfileScan MOTIFS

【表7】

表 3 - 5

SEQ ID NO:	Incyte ポリペプチドID	アミノ酸 残基	潜在的リン酸化部位	潜在的グリコシル化部位	サイン(signature)配列、モチーフ、ドメイン	分析方法及びデータベース
5	4585651CD1	112	S26 S102		<p>ロドプシン様(POR)スーパーファミリー PR00237F: A34-M58; PR00237G: I71-R97 (p<0.0039)</p> <p>Gタンパク質結合受容体ドメイン: BL00237D: P81-R97 (p<0.0036)</p> <p>嗅覚受容体サイン: PR00245C: F35-T50</p> <p>推定上のGタンパク質結合受容体 Ra1c: PDI70483: I42-R97</p> <p>Gタンパク質結合受容体: DM00013 P23275 I7-306; F2-I103</p> <p>シグナル切断: M1-S27</p> <p>膜貫通ドメイン: M1-L23</p> <p>膜7回貫通ドメイン受容体(ロドプシンファミリー): 7tm_1: L8-Y89</p> <p>可視色素(オプシン) 網膜結合部位: opsin.prf: C64-E112</p>	<p>BLIMPS-PRINTS</p> <p>BLIMPS-BLOCKS</p> <p>BLIMPS-PRINTS</p> <p>BLAST-PRODOM</p> <p>BLAST-DOMO</p> <p>SPScan</p> <p>HMMER</p> <p>HMMER-PFAM</p> <p>ProfileScan</p>

【表 8】

表 3 - 6

SEQ ID NO:	Incyte ポリペプチドID	アミノ酸 残基	潜在的リン酸化部位	潜在的 グリコシル化部位	サイン(signature)配列、 モチーフ、ドメイン	分析方法及び データベース
6	7472063CD1	305	T78 S10 S58		膜貫通ドメイン: I16-V38, V137-F155, V192-I219 膜7回貫通受容体(ロドプシンファミリー): G32-Y281 Gタンパク質結合受容体モチーフ: A101-I117 Gタンパク質結合受容体サイン: F94-G143 Gタンパク質結合受容体サイン: BL00237A: E81-P120, BL00237B: I198-Y209, BL00237D: T273-K289 嗅覚受容体サイン: PR00245A: M50-H71, PR00245B: F168-Q182, PR00245C: F229-G244, PR00245D: I265-L276, PR00245E: A282-L296 ロドプシン様GPCRスーパーファミリー: PR00237A: L17-H41, PR00237B: M50-H71, PR00237C: F95-I117, PR00237E: V190-V213, PR00237G: R263-K289 Gタンパク質結合受容体: DM00013 P30954 29-316: L17-L296 Gタンパク質結合受容体: DM00013 E23274 18-306: H15-L296 Gタンパク質結合受容体: DM00013 E23266 17-306: P12-L296 Gタンパク質結合受容体: DM00013 P30955 18-305: P9-L296 嗅覚Gタンパク質結合受容体: PD000921: L157-L236 嗅覚Gタンパク質結合受容体: PD149621: T237-R298	HMMER HMMER-PFAM MOTIFS ProfileScan BLIMPS- BLOCKS BLIMPS- PRINTS BLIMPS- PRINTS BLAST-DOMO BLAST-DOMO BLAST-DOMO BLAST-DOMO BLAST- PRODOM BLAST- PRODOM

【表9】

表 4

ポリヌクレオチド SEQ ID NO:	Incyte ポリヌクレオチド ID	配列長さ	選択断片	配列断片	5' 位置	3' 位置
7	5628963CB1	1625	143-229, 1-50, 435-1625	5628963H1 (PLACFER01)	1	264
				7163068F8 (PLACNOR01)	1024	1625
				FL324227_00001	137	1184
8	1453124CB1	3446	1304-1563, 1-804, 2029-2558	4862394T8 (PROSTUT09)	2777	3429
				955131R6 (KIDNNOT05)	1959	2484
				4862394T9 (PROSTUT09)	2972	3446
				70485837V1	18	619
				955131T6 (KIDNNOT05)	2416	3054
				60137393B1	1480	1871
				70491324V1	449	791
9	3226980CB1	1731	1-1731	70483085V1	736	1355
				7328527H1 (UTRCDIE01)	1851	2304
				2188518F6 (PROSNOT26)	1	435
				70485673V1	990	1452
				70484098V1	1242	1841
				FL118222_00001.edit	1	1731
				60214150U1	267	837
				60214151U1	1	468
				GNN.g6524217_026.3p.edit	757	1826
				71125928V1	495	1074
10	269898CB1	1826	1-266, 828-1826	4585651F6 (OVARNOT13)	1	561
				GNN.g6009916_000001.edit	1	922
11	4585651CB1	1074	1-77, 563-623			
12	7472063CB1	922	1-323, 356-922			

【表10】

表 5

ポリヌクレオチドSEQ ID NO :	IncyteプロジェクトID	代表的なライブラリ
7	5628963CBI	PLACNOR01
8	1453124CBI	PROSTIT09
10	269898CBI	FINT2NOT01
11	4585651CBI	OVARNOT13

【表 1 1】

【表 1 2】

ライブラリ	ベクター	ライブラリの説明
HNT2NOT01	PBLUESCRIPT	HNT2NOT01 ライブラリは、(関係付けられた神経性前駆体の性状特性を示すようなヒト奇形癌由来の) hNT2 株化細胞から単離した RNA を用いて Stratagene (STR937230) で作製した。
OVARNOT13	pINCY	OVARNOT13 ライブラリは、47 歳の白人女性から両側卵管卵巣摘出及び子宮内膜掻爬術の際に採取した左卵巣組織から単離した RNA を用いて作製した。関連する腫瘍は、病理学的には単一壁内平滑筋腫を示していた。子宮内膜は、分泌期にあった。患者は、子宮出血を示していた。患者の病歴には、高脂質血症及び良性高血圧症が含まれる。家族歴には、大腸癌、良性高血圧症、アテローム性冠動脈疾患及び乳癌が含まれる。
PLACNOR01	PCDNA2.1	無作為に初回抗原刺激を受けたこのライブラリは、2 人の異なるドナーからのプール cDNA を用いて作製した。cDNA は、妊娠 16 週で胎児死亡及び水頭症により死亡した白人胎児 (ドナー A) から採取した胎盤組織と、妊娠 18 週で胎児死亡により死亡した白人女胎児 (ドナー B) から採取した胎盤組織とから単離した mRNA を用いて産生した。ドナー A 患者の病歴には、頭 (3 回) 及び肩 (1 回) への臍帯巻絡が含まれる。血清学的には、抗 CMV に対しては陽性、残りは陰性であった。家族歴には、複数の妊娠及び出生と母体内での中絶が含まれる。ドナー B は、血清学的には陰性であった。
PROSTUT09	pINCY	PROSTUT09 ライブラリは、67 歳の白人男性から根治的前立腺切除、根治的胆嚢切除及び尿路変更の際に採取した前立腺腫瘍組織から単離した RNA を用いて作製した。病理学的には、Gleason グレード 3 の移行上皮癌を示していた。患者には、前立腺炎症性疾患が見られた。患者の病歴には、肺新生物及び良性高血圧症が含まれる。家族歴には、悪性乳房新生物、結核、脳血管障害、アテローム性冠動脈疾患及び肺癌が含まれる。

表 7-1

プログラム名	説明	引用文献	パラメーター 閾値
ABI FACTURA	核酸配列においてベクター配列を除去し、不明瞭な塩基をマスキングするプログラム	Applied Biosystems, Foster City, CA.	
ABI/PARACEL FDF	アミノ酸又は核酸配列の比較や注釈付けに有用な Fast Data Finder	Applied Biosystems, Foster City, CA.	ミスマッチ<50%
ABI AutoAssembler	核酸配列を構築するプログラム	Applied Biosystems, Foster City, CA.; Paracel inc., Pasadena, CA.	
BLAST	アミノ酸及び核酸配列の配列類似性検索に有用な Basic Local Alignment Search Tool. BLAST には、blastp 及び blastn, blastx, tblastn, tblastx の 5 つの機能がある。	Altschul, S.F.ら(1990) J. Mol. Biol.215:403-410; Altschul, S.F.ら(1997)Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402.	ESTs : 確率値=1.0E-8以下 完全長配列 : 確率値=1.0E-10以下
FASTA	照会配列と同種の配列のグループとの類似性を検索する Pearson 及び Lipman アルゴリズム。FASTA は、少なくとも 5 つの機能 fasta, tfasta, fastx, tfastx, ssearch からなる。	Pearson, W.R.及び D.J. Lipman (1988) Proc.Natl. Acad Sci. 85:2444-2448; Pearson, W.R.(1990) Methods Enzymol. 183: 63-98; Smith, T.F.及び M. S. Waterman (1981) Adv.Appl. Math. 2:482-489.	ESTs : fasta E 値=1.06E-6 Assembled ESTs : fasta 一致率=95%以上 一致長さ=200 塩基以上 fastx E 値=1.0E-8以下 完全長配列:fastx スコア=100以上
BLIMPS	或る配列を、BLOCKS 及び PRINTS データベースにおける配列と一致させて、遺伝子ファミリー及び配列相同性、構造的フィンガープリント領域を検索する BLocks IMPROVED Searcher	Itenikoff, S 及び J.G. Henikoff, Nucl. Acid Res.,19:6565-72, 1991. J.G. Henikoff 及び S.Henikoff (1996) Methods Enzymol. 266:88-105; Artwood, T.K.ら(1997) J. Chem. Inf.Cornput. Sci. 37: 417-424.	確率値=1.0E-3 以下
HMMER	PFAM 等の、タンパク質ファミリーコンセンサス配列の Hidden Markov Model に基づいたデータベースに対する問合せ配列を探すアルゴリズム	Krogh, A.ら(1994) J. Mol. Biol., 235:1501-1531; Sonnhammer, E.L.L.ら(1988) Nucleic Acids Res. 26:320-322.	PFAM ヒット:確率値=1.0E-3 以下 シグナルペプチドヒット:スコア=0 以上

【表 1 3】

【配列表】

プログラム名	説明	引用文献	パラメーター値
ProfileScan	Prosite で定義された配列パターンと一致するタンパク質配列における構造的及び配列モチーフを検索するアルゴリズム	Gribskov, M.ら(1988) CABIOS 4:61-66; Gribskovら(1989) Methods Enzymol. 183:146-159; Bairoch, A.ら(1997) Nucleic Acids Res. 25:217-221.	標準化された質のスコアは特定の Prosite モチーフのための GCG 指定された「高い」値 通常、スコア=1.4-2.1
Phred	高い感度及び確率で自動の配列のトレースを検査する塩基呼び出しアルゴリズム	Ewing, B.ら(1998) Genome Res. 8:175-185; Ewing, B.及び P. Green (1998) Genome Res. 8:186-194.	
Phrap	配列の相同性の検索及び DNA 配列の構築に有用であるような、Smith-Waterman アルゴリズムを効果的に利用したプログラムである SWAT 及び CrossMatch を含む Phrap Revised Assembly プログラム	Smith, T.F.及び M. S. Waterman (1981) Adv. Appl. Math. 2:482-489; Smith, T.F.及び M.S. Waterman (1981) J. Mol. Biol. 147:195-197; 並びに Green, P., University of Washington, Seattle, WA.	スコア=120 以上 一致長さ=56 以上
Consed	Phrap assemblies の編集及び観察用のグラフィックツール	Gordon, D.ら(1998) Genome Res. 8:195-202.	
SPScan	分泌シグナルペプチドの存在するかどうかタンパク質配列をスクリーンするウエイトマトリクス分析プログラム	Nielson, H.ら(1997) Protein Engineering 10: 1-6; Claverie, J.M. 及び S. Audic (1997) CABIOS 12: 431-439.	スコア=3.5 以上
TMAP	ウエイトマトリクスを用いて膜貫通セグメントをタンパク質配列上で被験し、配向を決定するプログラムである。	Persson, B. and P. Argos (1994) J. Mol. Biol. 237:182-192; Persson, B. and P. Argos (1996) Protein Sci. 5:363-371.	
TMHMMER	隠れマルコフモデル (HMM) を用いて膜貫通セグメントをタンパク質配列上で被験し、配向を決定するプログラム	Sonnhammer, E.L. et al. (1998) Proc. Sixth Intl. Conf. on Intelligent Systems for Mol. Biol., Glasgow et al., eds., The Am. Assoc. for Artificial Intelligence Press, Menlo Park, CA, pp. 175-182.	
Motifs	Prosites で定義されたものと一致するパターンに対してアミノ酸配列を検索するプログラム	Bairoch ら、前出; Wisconsin Package Program Manual, version 9, page M51-59, Genetics Computer Group, Madison, WI.	

<110> INCYTE GENOMICS, INC.
POLICKY, Jennifer L.
TRIBOULEY, Catherine M.
TANG, Y. Tom
BAUGHN, Mariah R.
GRAUL, Richard
KHAN, Farrah A.
NGUYEN, Danniell B.
PATTERSON, Chandra
LAL, Preeti
AU-YOUNG, Janice
YANG, Junming
HAFALIA, April
WALIA, Narinder K.
DAS, Debopriya

<120> G-PROTEIN COUPLED RECEPTORS

<130> PI-0072 PCT

<140> To Be Assigned
<141> Herewith

<150> 60/193,051; 60/195,155; 60/199,084; 60/200,551; 60/202,278
<151> 2000-03-29; 2000-04-06; 2000-04-20; 2000-04-28; 2000-05-05

<160> 12
<170> PERL Program

<210> 1
<211> 346
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<223> Incyte ID No: 5628963CD1

<400> 1
Met Glu Arg Lys Phe Met Ser Leu Gln Pro Ser Ile Ser Val Ser
1 5 10 15
Glu Met Glu Pro Asn Gly Thr Phe Ser Asn Asn Asn Ser Arg Asn
20 25 30
Cys Thr Ile Glu Asn Phe Lys Arg Glu Phe Phe Pro Ile Val Tyr
35 40 45
Leu Ile Ile Phe Phe Trp Gly Val Leu Gly Asn Gly Leu Ser Ile
50 55 60
Tyr Val Phe Leu Gln Pro Tyr Lys Lys Ser Thr Ser Val Asn Val
65 70 75
Phe Met Leu Asn Leu Ala Ile Ser Asp Leu Leu Phe Ile Ser Thr
80 85 90
Leu Pro Phe Arg Ala Asp Tyr Tyr Leu Arg Gly Ser Asn Trp Ile
95 100 105
Phe Gly Asp Leu Ala Cys Arg Ile Met Ser Tyr Ser Leu Tyr Val
110 115 120
Asn Met Tyr Ser Ser Ile Tyr Phe Leu Thr Val Leu Ser Val Val
125 130 135
Arg Phe Leu Ala Met Val His Pro Phe Arg Leu Leu His Val Thr
140 145 150
Ser Ile Arg Ser Ala Trp Ile Leu Cys Gly Ile Ile Trp Ile Leu
155 160 165
Ile Met Ala Ser Ser Ile Met Leu Leu Asp Ser Gly Ser Glu Gln
170 175 180
Asn Gly Ser Val Thr Ser Cys Leu Glu Leu Asn Leu Tyr Lys Ile
185 190 195
Ala Lys Leu Gln Thr Met Asn Tyr Ile Ala Leu Val Val Gly Cys
200 205 210

Leu Leu Pro Phe Phe Thr Leu Ser Ile Cys Tyr Leu Leu Ile Ile
 215 220 225
 Arg Val Leu Leu Lys Val Glu Val Pro Glu Ser Gly Leu Arg Val
 230 235 240
 Ser His Arg Lys Ala Leu Thr Thr Ile Ile Thr Leu Ile Ile
 245 250 255
 Phe Phe Leu Cys Phe Leu Pro Tyr His Thr Leu Arg Thr Val His
 260 265 270
 Leu Thr Thr Trp Lys Val Gly Leu Cys Lys Asp Arg Leu His Lys
 275 280 285
 Ala Leu Val Ile Thr Leu Ala Leu Ala Ala Ala Asn Ala Cys Phe
 290 295 300
 Asn Pro Leu Leu Tyr Tyr Phe Ala Gly Glu Asn Phe Lys Asp Arg
 305 310 315
 Leu Lys Ser Ala Leu Arg Lys Gly His Pro Gln Lys Ala Lys Thr
 320 325 330
 Lys Cys Val Phe Pro Val Ser Val Trp Leu Arg Lys Glu Thr Arg
 335 340 345
 Val

<210> 2
 <211> 910
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> Incyte ID No: 1453124CD1

<400> 2
 Met Lys Val Gly Val Leu Trp Leu Val Ser Phe Phe Thr Phe Thr
 1 5 10 15
 Asp Gly His Gly Gly Phe Leu Gly Lys Asn Asp Gly Ile Lys Thr
 20 25 30
 Lys Lys Glu Leu Ile Val Asn Lys Lys Lys His Leu Gly Pro Val
 35 40 45
 Glu Glu Tyr Gln Leu Leu Leu Gln Val Thr Tyr Arg Asp Ser Lys
 50 55 60
 Glu Lys Arg Asp Leu Arg Asn Phe Leu Lys Leu Leu Lys Pro Pro
 65 70 75
 Leu Leu Trp Ser His Gly Leu Ile Arg Ile Ile Arg Ala Lys Ala
 80 85 90
 Thr Thr Asp Cys Asn Ser Leu Asn Gly Val Leu Gln Cys Thr Cys
 95 100 105
 Glu Asp Ser Tyr Thr Trp Phe Pro Pro Ser Cys Leu Asp Pro Gln
 110 115 120
 Asn Cys Tyr Leu His Thr Ala Gly Ala Leu Pro Ser Cys Glu Cys
 125 130 135
 His Leu Asn Asn Leu Ser Gln Ser Val Asn Phe Cys Glu Arg Thr
 140 145 150
 Lys Ile Trp Gly Thr Phe Lys Ile Asn Glu Arg Phe Thr Asn Asp
 155 160 165
 Leu Leu Asn Ser Ser Ser Ala Ile Tyr Ser Lys Tyr Ala Asn Gly
 170 175 180
 Ile Glu Ile Gln Leu Lys Lys Ala Tyr Glu Arg Ile Lys Gly Phe
 185 190 195
 Glu Ser Val Gln Val Thr Gln Phe Arg Asn Gly Ser Ile Val Ala
 200 205 210
 Gly Tyr Glu Val Val Gly Ser Ser Ser Ala Ser Glu Leu Leu Ser
 215 220 225
 Ala Ile Glu His Val Ala Glu Lys Ala Lys Thr Ala Leu His Lys
 230 235 240
 Leu Phe Pro Leu Glu Asp Gly Ser Phe Arg Val Phe Gly Lys Ala
 245 250 255
 Gln Cys Asn Asp Ile Val Phe Gly Phe Gly Ser Lys Asp Asp Glu
 260 265 270

Tyr	Thr	Leu	Pro	Cys	Ser	Ser	Gly	Tyr	Arg	Gly	Asn	Ile	Thr	Ala
				275					280					285
Lys	Cys	Glu	Ser	Ser	Gly	Trp	Gln	Val	Ile	Arg	Glu	Thr	Cys	Val
				290					295					300
Leu	Ser	Leu	Leu	Glu	Leu	Asn	Lys	Asn	Phe	Ser	Met	Ile	Val	Val
				305					310					315
Gly	Asn	Ala	Thr	Glu	Ala	Ala	Val	Ser	Ser	Phe	Val	Gln	Asn	Leu
				320					325					330
Ser	Val	Ile	Ile	Arg	Gln	Asn	Pro	Ser	Thr	Thr	Val	Gly	Asn	Leu
				335					340					345
Ala	Ser	Val	Val	Ser	Ile	Leu	Ser	Asn	Ile	Ser	Ser	Leu	Ser	Leu
				350					355					360
Ala	Ser	His	Phe	Arg	Val	Ser	Asn	Ser	Thr	Met	Glu	Asp	Val	Ile
				365					370					375
Ser	Ile	Ala	Asp	Asn	Ile	Leu	Asn	Ser	Ala	Ser	Val	Thr	Asn	Trp
				380					385					390
Thr	Val	Leu	Leu	Arg	Glu	Glu	Lys	Tyr	Ala	Ser	Ser	Arg	Leu	Leu
				395					400					405
Glu	Thr	Leu	Glu	Asn	Ile	Ser	Thr	Leu	Val	Pro	Pro	Thr	Ala	Leu
				410					415					420
Pro	Leu	Asn	Phe	Ser	Arg	Lys	Phe	Ile	Asp	Trp	Lys	Gly	Ile	Pro
				425					430					435
Val	Asn	Lys	Ser	Gln	Leu	Lys	Arg	Gly	Tyr	Ser	Tyr	Gln	Ile	Lys
				440					445					450
Met	Cys	Pro	Gln	Asn	Thr	Ser	Ile	Pro	Ile	Arg	Gly	Arg	Val	Leu
				455					460					465
Ile	Gly	Ser	Asp	Gln	Phe	Gln	Arg	Ser	Leu	Pro	Glu	Thr	Ile	Ile
				470					475					480
Ser	Met	Ala	Ser	Leu	Thr	Leu	Gly	Asn	Ile	Leu	Pro	Val	Ser	Lys
				485					490					495
Asn	Gly	Asn	Ala	Gln	Val	Asn	Gly	Pro	Val	Ile	Ser	Thr	Val	Ile
				500					505					510
Gln	Asn	Tyr	Ser	Ile	Asn	Glu	Val	Phe	Leu	Phe	Phe	Ser	Lys	Ile
				515					520					525
Glu	Ser	Asn	Leu	Ser	Gln	Pro	His	Cys	Val	Phe	Trp	Asp	Phe	Ser
				530					535					540
His	Leu	Gln	Trp	Asn	Asp	Ala	Gly	Cys	His	Leu	Val	Asn	Glu	Thr
				545					550					555
Gln	Asp	Ile	Val	Thr	Cys	Gln	Cys	Thr	His	Leu	Thr	Ser	Phe	Ser
				560					565					570
Ile	Leu	Met	Ser	Pro	Phe	Val	Pro	Ser	Thr	Ile	Phe	Pro	Val	Val
				575					580					585
Lys	Trp	Ile	Thr	Tyr	Val	Gly	Leu	Gly	Ile	Ser	Ile	Gly	Ser	Leu
				590					595					600
Ile	Leu	Cys	Leu	Ile	Ile	Glu	Ala	Leu	Phe	Trp	Lys	Gln	Ile	Lys
				605					610					615
Lys	Ser	Gln	Thr	Ser	His	Thr	Arg	Arg	Ile	Cys	Met	Val	Asn	Ile
				620					625					630
Ala	Leu	Ser	Leu	Leu	Ile	Ala	Asp	Val	Trp	Phe	Ile	Val	Gly	Ala
				635					640					645
Thr	Val	Asp	Thr	Thr	Val	Asn	Pro	Ser	Gly	Val	Cys	Thr	Ala	Ala
				650					655					660
Val	Phe	Phe	Thr	His	Phe	Phe	Tyr	Leu	Ser	Leu	Phe	Phe	Trp	Met
				665					670					675
Leu	Met	Leu	Gly	Ile	Leu	Leu	Ala	Tyr	Arg	Ile	Ile	Leu	Val	Phe
				680					685					690
His	His	Met	Ala	Gln	His	Leu	Met	Met	Ala	Val	Gly	Phe	Cys	Leu
				695					700					705
Gly	Tyr	Gly	Cys	Pro	Leu	Ile	Ile	Ser	Val	Ile	Thr	Ile	Ala	Val
				710					715					720
Thr	Gln	Pro	Ser	Asn	Thr	Tyr	Lys	Arg	Lys	Asp	Val	Cys	Trp	Leu
				725					730					735
Asn	Trp	Ser	Asn	Gly	Ser	Lys	Pro	Leu	Leu	Ala	Phe	Val	Val	Pro
				740					745					750
Ala	Leu	Ala	Ile	Val	Ala	Val	Asn	Phe	Val	Val	Val	Leu	Leu	Val
				755					760					765
Leu	Thr	Lys	Leu	Trp	Arg	Pro	Thr	Val	Gly	Glu	Arg	Leu	Ser	Arg


```

                275                280                285
Ala Val Val Leu Leu Ala Val Gly Gly Gln Phe Leu Leu Cys Trp
                290                295                300
Leu Pro Tyr Phe Ser Phe His Leu Tyr Val Ala Leu Ser Ala Gln
                305                310                315
Pro Ile Ser Thr Gly Gln Val Glu Ser Val Val Thr Trp Ile Gly
                320                325                330
Tyr Phe Cys Phe Thr Ser Asn Pro Phe Phe Tyr Gly Cys Leu Asn
                335                340                345
Arg Gln Ile Arg Gly Glu Leu Ser Lys Gln Phe Val Cys Phe Phe
                350                355                360
Lys Pro Ala Pro Glu Glu Glu Leu Arg Leu Pro Ser Arg Glu Gly
                365                370                375
Ser Ile Glu Glu Asn Phe Leu Gln Phe Leu Gln Gly Thr Gly Cys
                380                385                390
Pro Ser Glu Ser Trp Val Ser Arg Pro Leu Pro Ser Pro Lys Gln
                395                400                405
Glu Pro Pro Ala Val Asp Phe Arg Ile Pro Gly Gln Ile Ala Glu
                410                415                420
Glu Thr Ser Glu Phe Leu Glu Gln Gln Leu Thr Ser Asp Ile Ile
                425                430                435
Met Ser Asp Ser Tyr Leu Arg Pro Ala Ala Ser Pro Arg Leu Glu
                440                445                450
Ser

```

```

<210> 4
<211> 524
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<223> Incyte ID No: 269898CD1

```

```

<400> 4
Met Cys Gly Ser Glu Arg Ile Leu Gln Ala Gly Asn Ile Leu Glu
  1      5      10      15
Ile Arg Val Gly Gln Ala Gly Ala Arg Arg Val Ala Thr Met Thr
  20      25      30
Ser Pro Val Leu Val Asp Ile Arg Glu Glu Val Thr Cys Pro Ile
  35      40      45
Cys Leu Glu Leu Leu Thr Glu Pro Leu Ser Ile Asp Cys Gly His
  50      55      60
Ser Phe Cys Gln Ala Cys Ile Thr Pro Asn Gly Arg Glu Ser Val
  65      70      75
Ile Gly Gln Glu Gly Glu Arg Ser Cys Pro Val Cys Gln Thr Ser
  80      85      90
Tyr Gln Pro Gly Asn Leu Arg Pro Asn Arg His Leu Ala Asn Ile
  95     100     105
Val Arg Arg Leu Arg Glu Val Val Leu Gly Pro Gly Lys Gln Leu
 110     115     120
Lys Ala Val Leu Cys Ala Asp His Gly Glu Lys Leu Gln Leu Phe
 125     130     135
Cys Gln Glu Asp Gly Lys Val Ile Cys Trp Leu Cys Glu Arg Ser
 140     145     150
Gln Glu His Arg Gly His His Thr Phe Leu Val Glu Glu Val Ala
 155     160     165
Gln Glu Tyr Gln Lys Phe Gln Glu Ser Leu Lys Lys Leu Lys Asn
 170     175     180
Glu Glu Gln Glu Ala Glu Lys Leu Thr Ala Phe Ile Arg Glu Lys
 185     190     195
Lys Thr Ser Trp Lys Ala Arg Glu Thr Phe Ser Glu Asp Val Leu
 200     205     210
Gly Gln Glu Ser Trp Gln Ser Thr Asn Ala Arg Glu Asn Ala Gly
 215     220     225
Ile Pro Gly Leu Glu Ala Ala His Phe Trp Ile Ala Ile Pro Phe

```

230 235 240
 Cys Ala Met Tyr Leu Val Ala Leu Val Gly Asn Ala Ala Leu Ile
 245 250 255
 Leu Val Ile Ala Met Asp Asn Ala Leu His Ala Pro Met Tyr Leu
 260 265 270
 Phe Leu Cys Leu Leu Ser Leu Thr Asp Leu Ala Leu Ser Ser Thr
 275 280 285
 Thr Val Pro Lys Met Leu Ala Ile Leu Trp Leu His Ala Gly Glu
 290 295 300
 Ile Ser Phe Gly Gly Cys Leu Ala Gln Met Phe Cys Val His Ser
 305 310 315
 Ile Tyr Ala Leu Glu Ser Ser Ile Leu Leu Ala Met Ala Phe Asp
 320 325 330
 Arg Tyr Val Ala Ile Cys Asn Pro Leu Arg Tyr Thr Thr Ile Leu
 335 340 345
 Asn His Ala Val Ile Gly Arg Ile Gly Phe Val Gly Leu Phe Arg
 350 355 360
 Ser Val Ala Ile Val Ser Pro Phe Ile Phe Leu Leu Arg Arg Leu
 365 370 375
 Pro Tyr Cys Gly His Arg Val Met Thr His Thr Tyr Cys Glu His
 380 385 390
 Met Gly Ile Ala Arg Leu Ala Cys Ala Asn Ile Thr Val Asn Ile
 395 400 405
 Val Tyr Gly Leu Thr Val Ala Leu Leu Ala Met Gly Leu Asp Ser
 410 415 420
 Ile Leu Ile Ala Ile Ser Tyr Gly Phe Ile Leu His Ala Val Phe
 425 430 435
 His Leu Pro Ser His Asp Ala Gln His Lys Ala Leu Ser Thr Cys
 440 445 450
 Gly Ser His Ile Gly Ile Ile Leu Val Phe Tyr Ile Pro Ala Phe
 455 460 465
 Phe Ser Phe Leu Thr His Arg Phe Gly His His Glu Val Pro Lys
 470 475 480
 His Val His Ile Phe Leu Ala Asn Leu Tyr Val Leu Val Pro Pro
 485 490 495
 Val Leu Asn Pro Ile Leu Tyr Gly Ala Arg Thr Lys Glu Ile Arg
 500 505 510
 Ser Arg Leu Leu Lys Leu Leu His Leu Gly Lys Thr Ser Ile
 515 520

<210> 5
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> Incyte ID No: 4585651CD1

<400> 5
 Met Phe Ile Gly Val Leu Asp Leu Phe Phe Ile Ile Leu Ser Tyr
 1 5 10 15
 Ile Phe Ile Leu Gln Ala Val Leu Gln Leu Ser Ser Gln Glu Ala
 20 25 30
 Arg Tyr Lys Ala Phe Gly Thr Cys Val Ser His Ile Gly Ala Ile
 35 40 45
 Leu Ala Phe Tyr Thr Pro Ser Val Ile Ser Ser Val Met His Arg
 50 55 60
 Val Ala Arg Cys Ala Ala Pro His Val His Ile Leu Leu Ala Asn
 65 70 75
 Phe Tyr Leu Leu Phe Pro Pro Met Val Asn Pro Ile Ile Tyr Gly
 80 85 90
 Val Lys Thr Lys Gln Ile Arg Asp Ser Leu Gly Ser Ile Pro Glu
 95 100 105
 Lys Gly Cys Val Asn Arg Glu
 110

<210> 6
 <211> 305
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> Incyte ID No: 7472063CD1

<400> 6
 Met Glu Phe Val Phe Leu Ala Tyr Pro Ser Cys Pro Glu Leu His
 1 5 10 15
 Ile Leu Ser Phe Leu Gly Val Ser Leu Val Tyr Gly Leu Ile Ile
 20 25 30
 Thr Gly Asn Ile Leu Ile Val Val Ser Ile His Thr Glu Thr Cys
 35 40 45
 Leu Cys Thr Ser Met Tyr Tyr Phe Leu Gly Ser Leu Ser Gly Ile
 50 55 60
 Glu Ile Cys Tyr Thr Ala Val Val Val Pro His Ile Leu Ala Asn
 65 70 75
 Thr Leu Thr Val Arg Glu Asp Ile Thr Leu Leu Gly Cys Ala Thr
 80 85 90
 Gln Met Ala Phe Phe Ile Ala Leu Gly Ser Ala Asp Cys Phe Leu
 95 100 105
 Leu Ala Ala Met Ala Tyr Asp Arg Tyr Val Ala Ile Cys His Pro
 110 115 120
 Leu Gln Tyr Pro Leu Leu Met Thr Leu Thr Leu Cys Val His Leu
 125 130 135
 Val Val Ala Ser Val Ile Ser Gly Leu Phe Leu Ser Leu Gln Leu
 140 145 150
 Val Ala Phe Ile Phe Ser Leu Pro Phe Cys Gln Ala Gln Gly Ile
 155 160 165
 Glu His Phe Phe Cys Asp Val Pro Pro Val Met His Val Val Cys
 170 175 180
 Ala Gln Ser His Ile His Glu Gln Ser Val Leu Val Ala Ala Ile
 185 190 195
 Leu Ala Ile Ala Val Pro Phe Phe Leu Ile Thr Thr Ser Tyr Thr
 200 205 210
 Phe Ile Val Ala Ala Leu Leu Lys Ile His Ser Ala Ala Gly Arg
 215 220 225
 His Arg Ala Phe Ser Thr Cys Ser Ser His Leu Thr Val Val Leu
 230 235 240
 Leu Gln Tyr Gly Cys Cys Ala Phe Met Tyr Leu Cys Pro Ser Ser
 245 250 255
 Ser Tyr Asn Pro Lys Gln Asp Arg Phe Ile Ser Leu Val Tyr Thr
 260 265 270
 Leu Gly Thr Pro Leu Leu Asn Pro Leu Ile Tyr Ala Leu Arg Asn
 275 280 285
 Ser Glu Met Lys Gly Ala Val Gly Arg Val Leu Thr Arg Asn Cys
 290 295 300
 Leu Ser Gln Asn Ser
 305

<210> 7
 <211> 1625
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> Incyte ID No: 5628963CB1

<400> 7
 ggcagcagaa gccagggcag ctgaaagaca gagaccttca gggaaaacta ggttccaaga 60
 tggctgaata ggaagagctc cagtctgcag atcccagtggt gagcaacgtg gaagacgggt 120
 gatttctgca ttccaactg agcatggaga gaaaatttat gtccttgcaa ccatccatet 180
 ccgtatcaga aatggaacca aatggcacct tcagcaataa caacagcagg aactgcacaa 240

```

ttgaaaactt caagagagaa tttttcccaa ttgtatatct gataaatatt ttctgggggag 300
tccttgggaaa tgggttgtcc atatatgttt tcctgcagcc ttataagaag tccacatctg 360
tgaacgttttt catgctaaat ctggccattt cagatctcct gttcataaagc acgcttcctc 420
tcagggtctga ctattatctt agaggctcca attggatatt tggagacctg gcctgcagga 480
ttatgtotta ttccctgtat gtcaacatgt acagcagtat ttatttctctg accgtgttga 540
gtgttgtgcg tttcctggca atggttcacc cctttcgget totgcatgtc accagcatca 600
ggagtgcctg gatcctctgt gggatcataat ggatccctat catggcttcc tcaataatgc 660
tcctggacag tggctctgag cagaacggca gtgtcacatc atgottagag ctgaatctct 720
ataaaaattgc taagctgcag accatgaact atattgcctt ggtggtgggc tgctgtctgc 780
catttttcac actcagcatc tgttatctgc tgatcattcg ggttctgtta aaagtggagg 840
tcccagaatc ggggctgagg gtttctcaca ggaaggcact gaccaccatc atcatcaact 900
tgatcatctt cttcttgtgt ttctgcctc atcacacact gaggaccgtc cacttgacga 960
catggaaaagt ggggttatgc aaagacagac tgcataaagc tttggttato acactggcct 1020
tggcagcagc caatgcctgc ttoactctc tgctctatta ctttgcctggg gagaatttta 1080
aggacagact aaagtctgca ctcagaaaag gccatccaca gaaggcaaaag acaaagtgtg 1140
ttttccctgt tagtgtgtgg ttgagaaaag aaacaagagt ataaggagct cttagatgag 1200
acctgttctt gtatccttgt gtccatcttc attcaactcat agtctccaaa tgactttgtta 1260
tgttacatca ctcccacaaa atgttgattc ttaatattta gttgaccatt acttttgtta 1320
ataagacctt cttcaaaaat tttattcagt gtattttcag ttgttgagtc ttaatgaggg 1380
atacaggagg aaaaaatcct actagagtc tgtgggttga aatatcagac tgggaaaaaaa 1440
tgcaaaagcac attggatcct acttttcttc agatattgaa ccagatctct gcccctcag 1500
gctttctaaa ttcttcaaaa gagccacaac ttcccagct tctccagctc cctgtctctc 1560
ttcaatccct tgagatatag ccaactaacg acgctactgg aagcctttcc agcacaatgg 1620
eggcc

```

<210> 8

<211> 3446

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<223> Incyte ID No: 1453124CB1

<400> 8

```

cagtgagcct gtgttcatgc cagtgagctg ctgtggctca gatactgata ctttctttcc 60
aaacagcata agaagtgatt gagccacaag tatactgaag gaagggtccc ctcgagtgtg 120
ggtgtgaaga gataaatcac cagtcacaga ctatgcaccc gactgctgct gttcagctca 180
ggggaaatga aagttygagt gctgtggctc gtttctttct tcaccttccac tgacggcccac 240
ggtggcttcc tggggaaaaa tgatggcacc aaaacaaaaa aagaactcat tgtgaataag 300
aaaaaacatc tagggccagt cgaagaatat cagctgctgc ttcaggtgac ctatagagac 360
tccaaggaga aaagagactt gagaaaatct ctgaagctct tgaagcctcc attattatgg 420
tcacatgggg taattagaat tctcagagca aaggctacca cagactgcaa cagcctgaat 480
ggagtccctg agtgtacctg tgaagacagc tacacctggt ttctctccc atgccttgat 540
ccccagaact gctaccttca cacggctgga gcactcccaa gctgtgaatg tcatctcaac 600
aacctcagcc agagtgtcaa tttctgtgag agaacaaaga tttggggcac tttcaaaat 660
aatgaaaggt ttacaaatga ccttttgaat tcatcttctg ctatatactc caaataatgca 720
aatggaattg aaattcaact taaaaaagca tatgaaagaa ttaaagggtt tgagtcgggt 780
caggtcacc aatctcga aaatggagc atgttgccg agaaggctaa gacagcctt 900
cacaagctgt ttccattaga agacggctct ttcagagtg tgggaaaagc ccagtgtaat 960
gacatgtct ttggattgg gtccaaggat gatgaatata cctgctctg cagcagtggc 1020
tacaggggaa acatcacagc caagtgtgag tctctgggt ggcaggtcat cagggagact 1080
tgtgtgctct ctctgcttga agaactgaac agaatttca gtatgattgt aggcaatgcc 1140
actagggcag ctgtgtcatc ctctgtgcaa aatctttctg tcatcattcg gcaaaaacca 1200
tcaaccacag tggggaatct gcttccggtg gtgtogattc tgagcaatat ttcactctctg 1260
tcaactggcca gccatttcag ggtgtccaat tcaacaatgg aggatgtcat cagtatagct 1320
gacaatatcc ttaattcagc ctcaagtaacc aactggacag tcttactgcg ggaagaaaag 1380
tatgccagct cacggttact agagacatta gaaaacatca gcactctggt gcctccgaca 1440
gctcttctc tgaattttc tcggaaatc attgactgga aagggattcc agtgaacaaa 1500
agccaactca agaggggtta cagctatcag attaaaatgt gtcccacaaa tacatctatt 1560
cccacagag gccctgtgtt aattgggtca gaccaattcc agagatccct tccagaaact 1620
attatcagca tggcctcggt gactctgggg aacattctac ccgtttccaa aatggaat 1680
gctcaggtca atggacctgt gatatccacg gttattcaaa actattccat aatgaaagt 1740
ttcctatatt tttccaagat agagtcaaac ctgagccagc ctcaattggt gttttgggt 1800
ttcagtcatt tgcagtggaa cgatgcaggc tgccacctag tgaatgaaac tcaagacac 1860
gtgacgtgcc aatgtactca cttgacctcc ttctccatat tgatgtcacc ttttgtcccc 1920

```

tctacaatct	tccccgttgt	aaaatggatc	acctatgtgg	gactgggtat	ctccattgga	1980
agtctcattt	tatgcctgat	catcgaggct	ttgttttggg	agcagattaa	aaaagccaa	2040
acctctcaca	cacgtcgtat	ttgcatggtg	aacatagccc	tgccctctt	gatttgctgat	2100
gtctggttta	ttgttggtag	cacagtggac	accacgggtga	acccttctgg	agtctgcaca	2160
gctgctgtgt	tctttacaca	cttcttttac	ctctctttgt	tcttctggat	gctcatgctt	2220
ggcatcctgc	tggtctaccg	gatcctctc	gtgttccatc	acatggccca	gcatttgatg	2280
atggctgttg	gattttgcct	gggttatggg	tgccctctca	ttatatctgt	cattaccatt	2340
gctgtcacgc	aacctagcaa	tacctacaaa	aggaaagatg	tggttggct	taactggctc	2400
aatggaagca	aaccactcct	ggcttttgtt	gtccctgcac	tggtatgtgt	ggctgtgac	2460
ttcgttgtgg	tgctgctagt	tctcacaagg	ctctggaggc	cgactgttgg	ggaaagactg	2520
agtcgggatg	acaaggccac	catcatccgc	gtggggaaga	gcctcctcat	tctgacctc	2580
ctgctagggc	tcacctgggg	ctttggaata	ggaacaatag	tggaacagca	gaatctggct	2640
tggcatgtta	tttttgcctt	actcaatgca	ttccagggat	tttttatctt	atgctttgga	2700
atactcttgg	acagtaagct	cgacaactt	ctgttcaaca	agttgtctgc	cttaagtct	2760
tgyaagcaaa	cagaaaagca	aaactcatca	gatttatctg	ccaaacccaa	attctcaag	2820
cctttcaacc	cactgcaaaa	caaaggccat	tatgcatttt	ctcactctgg	agattcctcc	2880
gacaacatca	tgctaactca	gtttgtctca	aatgaataag	gcaaggaaac	ataaaatcaa	2940
gaaaaaattt	ccagaacaac	ttgacattta	gagacaaatg	tcaatgaaga	aattatgctc	3000
agtattcgat	cgggttttct	gatttagggg	tctgggaata	aaacaagaat	gtctcagtg	3060
cttcattact	gctccctttt	gtcttcaatt	aaatgaaaag	aagatttatt	tccatgtgat	3120
ttgattcaaa	gaaagtgtct	cataaatgca	gaagagttag	ttttgttggg	aatcgtgtca	3180
gttgtaccct	gaccataaaa	tatggtttct	attttcataa	aacagcatta	ttcacatggc	3240
atttccaata	atctggattg	aaggaaagaa	attttatgaa	atagctttag	ataaattaat	3300
aggccacggt	cattttcttg	tcaaaaagtt	actgggtggg	ggatgggtgg	aaaaagttat	3360
tagtgcaaat	ttctagaga	aaaaaccatt	tctctttcaa	attttccagt	tgaattttat	3420
gttcgctttt	gcttcttagg	ttcata				3446

<210> 9
 <211> 1731
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> misc_feature
 <223> Incyte ID No: 3226980CB1

<400> 9						
agttctggaa	agggtagaag	ggtatggaga	acaagaatgg	cagaaaggag	atggaaaaag	60
aagagggtgaa	ggccattccg	aaagcggagt	gttgagtggg	tcaggctcct	gcacctctca	120
cgctcctctg	ttcttagcag	tcaccaaggc	agacctgca	gctacctccg	gccagaaaag	180
ggatgagctc	ctgactcttc	agctgcctgg	cctggcgctc	tgtaacgcaga	caaacctgcc	240
caagaggctc	cagtgggagg	tgccccctac	gaaaccagga	agcctgggcc	tggtctcgcc	300
atcccagggt	cgctggacta	ggatggggga	tgggcctgtg	acaggaggta	ccctgggtgc	360
ctcttttcgg	ccccatggag	tccctaccca	tccccagtc	atcagggaac	tcttccactt	420
tggtggagggt	ccctcaaaac	ccagggtcct	ctactgccag	tggtgtccc	gaggtggggc	480
tacgggatgt	tgcttcggaa	tctgtggccc	tcttcttcat	gctcctgctg	gacttgactg	540
ctgtggctgg	caatgccgct	gtgatggccc	tgatcgccaa	gacgctgcc	ctccgaaaat	600
ttgtcttctg	cttccacctc	tgctgtgtgg	acctgctggc	tgccctgacc	ctcatgcccc	660
tggtccatgt	ctccagctct	gcccctcttt	accacgccct	ccttggggag	gtggcctgcc	720
gocctactct	gtttctgagc	gtgtgctttg	tcagcctggc	catcctctcg	gtgtcagcca	780
tcaatgtgga	gcgctaacta	tacgtagtcc	accccatgcg	ctacgagggt	cgcatgacgc	840
tggtggctgt	ggcctctgtg	ctgggtgggt	tgtgggtgaa	ggccttggcc	atggctctctg	900
tgccagtggt	gggaagggtc	tccctggagg	aaggagctcc	cagtgtccc	ccaggctgtt	960
cactccagtg	gagccacagt	gcctactgcc	agctttttgt	gggtgtcttt	gctgtccttt	1020
actttctgtt	gccctgtctc	ctcactcttg	tggtctactg	cagcatgttc	cgagtggccc	1080
gcgtggctgc	catgcagcac	gggcccctgc	ccaggtggat	ggagacacc	cggcaacctg	1140
ccgaatctct	cagcagccgc	tcacagatgg	tcaccagctc	gggggcccc	cagaccacc	1200
cacaccggac	gtttggggga	gggaaagcag	cagtggttct	cctggctgtg	gggggacagt	1260
toctgctctg	ttggttgccc	tacttctctt	tcacctcta	tgttgccctg	agtgtctcagc	1320
ccatttcaac	tgggcagggtg	gagagtgtgg	tcacctggat	tggtactttt	tgcttacttt	1380
ccaaaccttt	cttctatgga	tgtctcaacc	ggcagatccg	gggggagctc	agcaagcagt	1440
ttgtctgctt	cttcaagcca	gctccagagg	aggagctgag	gctgcttagc	cggtggggct	1500
ccattgagga	gaacttctctg	cagttctctc	aggggactgg	ctgtccttct	gagtcctggg	1560
tttcccagcc	ctcaccagc	cccaagcagg	agccacctgc	tggtgacttt	cgaatcccag	1620
gccagatagc	tgaggagacc	tctgagtctc	tgagcagca	actcaccagc	gacatcatca	1680
tgctcagacag	ctacctccgt	cctgcgcct	cacctggct	ggagtcatga	t	1731

<210> 10
 <211> 1826
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> Incyte ID No: 269898CB1

<400> 10
 cggagatgag ccttccgcaa actcctgacc tgtgggtccg tccgttcaac ggccaaaggg 60
 tggcggagga gggatcccct gcctttctcg gaacggaacg gagcagagtc atgctgtggt 120
 gagtttagat aaaagccgag tgagcgcgct ctgttccctt agattagttt aaggtgcctt 180
 ggattgtctt gaagagcttt gaccacctga tattgcttac atctggaact tcttggtctc 240
 tcattcccca gatgtgctgg tcagagagga ttctacaggg aggaaacatc ttgaaatca 300
 gggttgggca ggcaggagcc aggagagtag ctacaatgac ttaccagta ctggtggaca 360
 tacgagaaga ggtgacctgc cctatctgcc tggagctcct aacagaaccc ctgagcatag 420
 actgtggcca cagcttctgc caagcctgca tcacacaaa tggcagggaa tcagtgtattg 480
 gtcaagaagg ggaagaagc tgccctgtgt gccagaccag ctaccagcca gggaacctgc 540
 ggcctaactc gcatctggcc aacatagtga ggcggctcag agaggtagtg ttgggccctg 600
 ggaagcagct gaaagcagtt ctttgtgcag accatggaga aaaactgcag ctctctgtc 660
 aggaggatgg gaaggtcatt tgctggcttt gtgagcggtc tcaggagcac cgtggtcacc 720
 acacgttctt ctgggaggag gttgcccagg agtaccagaa gtttcaggag tctctaaaaga 780
 agctgaagaa cgaggagcag gaagetgaga agctaacagc ttttatcaga gagaagaaga 840
 catcctggaa gccaagggag acttttctcg aagatgtcct ggggcaggaa tcatggcaga 900
 gtacaagtgc aagggaatat gcaggatcc cagggctgga ggctgcccac ttctggattg 960
 ccatcccttt ctgtgccatg tatctttagt cactggttgg aaatgctgcc ctcatcctgg 1020
 tcattgccat ggacaatgct ctatctgcac ctatgtacct ctctctctgc ctctctctac 1080
 tcacagacct ggcctctcag tctaccactg tgcccagat gctggccatt ttgtggctcc 1140
 gctctggtag gatttctttt ggtggatgcc tggcccagat gttttgtgtc cattctatct 1200
 atgctctgga gtctctgatt ctacttgcca tggccttga taggtatgtg gctatctgta 1260
 acccattaag gtatacaacc atttctcaacc atgctgtcat aggcagaatt ggctttgttg 1320
 ggctattccg tagtgtggct attgtctccc ccttcatctt ctgtctgagg cgaactccct 1380
 actgtgtgca cctgtctcat acacacacat actgtgagca tatgggcatc gcccgactgg 1440
 cctgtgcaaa catcactgtc aatattgtct atgggctaac tgtggctctg ctggccattg 1500
 gactggatcc cattctcatt gccatttctt atggctttat cctccatgca gtctttcacc 1560
 ttccatctca tgatgccag cacaaagctc tgagtacctg tggctcccac attggcatca 1620
 tctgtgtttt ctacatccct gccttcttct ccttctctac ccaccgcttt ggtcaccacg 1680
 aagtcccmaa ccatgtgac acttctctgg ctaatctcta tgtgtgtgtg cctctgtac 1740
 tcaatectat tctctatgga gctagaacca aggagattcg gagtgcgact ctaaaactgc 1800
 ttcacctggg gaagacttca atatga 1826

<210> 11
 <211> 1074
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> Incyte ID No: 4585651CB1

<400> 11
 gcccgtctgt actgtgaaca catggctgtg gtcaggctgg ctgtgggaac actagcttca 60
 acaatatcta tggcattgct gtggccatgt ttattggagt gttggatcta ttctttatca 120
 tctatcttta tatctttatc cttcaggcag ttctacaact ctctctcag gaggcccgct 180
 acaaagcatt tgggacatgt gtctctcaca taggtgcat cttagccttc tacacacct 240
 cagtcactct ttcagtcatg caccgtgtgg ccgctgtgct tgcgccacac gtccacattc 300
 tctctgcca tttctatctg ctcttcccac ccatggctca tcccatcacc tacggcgcta 360
 agaccaagca gatccgtgac agtcttggga gtattccoga gaaaggatgt gtgaatagag 420
 agtgaggaaat aagtggaaaa agagtggggc acagtgaatg ctgtagtggg ccagggctgt 480
 gctgagagta gatgggtgct agactccacg ttttagttct tctttgtatt atggaaagaa 540
 taaatgatgt cctgaagctc agtgccaaca gtctgttttag aatttggggg tctttgccct 600
 ctggtagcct ctggattgaa cctggtgact gtgctgtctc ctcacagagc cctgactcct 660
 gtcagtaaac ttgacagagt cttgaccctc cggcctcatg gtgactttgc tgaaggacac 720
 aaagatgctt ccaagttcat ttgcctaaga gaagactgtg aaaatctgaa tttccatctc 780
 tgacttgttg gaaatttggg gaattatcca ctacagattc cgagtttaga cctctactcc 840
 atccagtgca ggagttctgc tacattctaa cagttgaacc ctgactcta cctaaacact 900

```

gtcagtgctg gtgcacatgc atcctttagg cctatttatt ccaagtgaga cagctctgct 960
tgttagaagg ttattttcttc aactaagcca gtctgtatcc ttgacttct ttttacctcc 1020
tcatectcat ggctattcca tctcattaaa tactttgaag aaaaaaaaaa aaaa 1074

```

```

<210> 12
<211> 922
<212> DNA
<213> Homo sapiens

```

```

<220>
<221> misc_feature
<223> Incyte ID No: 7472063CB1

```

```

<400> 12
atggaatttg tgttctggc ctatccctcc tgcccagaac tgcattattct gtcttctctt 60
ggggtcagcc tggtttatgg tttgatcacc actgggaaca ttctcattgt ggtgtccatt 120
cacacagaaa cctgtctatg cacatccatg tactatttcc tgggcagcct ttctgggatt 180
gaaatatgct acaactgcagt ggtggtgccc catatcctgg ccaacaccct tacagtcaga 240
gaagacatca ctctcctggg ctgtgccacc cagatggcct tcttcattgc actgggcagt 300
gctgattgct tctcttggc tgccatggcc tatgaccgct atgtggocat ttgccaccg 360
ttgcagtacc ctctcctcat gacattgact ctttgtgtcc acttggttgt ggcacagtc 420
atcagtggtc tgttctgtc cttacaactg gtggccttca tcttctctct gccattctgc 480
caggctcagg gcattgagca cttcttttgt gatgtgccac cagtcatgca tgttgtttgt 540
gctcagagtc acattcatga gcagtcagtg ctggtggcag ccatactagc cattgctgtg 600
cctttcttcc tcataccacc ctctacacc ttcatagtgg ctgctctgct caagatccac 660
tcggctgctg gccgccaccg ggcttctctc acctgctctt cccacctcac tgtggtgctg 720
ctgcagtatg gctgctgtgc cttcatgtac ctgtgcccc a gctccagcta caaccacaag 780
caagatcggt tcactctact ggtgtacaca ttgggaaccc cactgctcaa cccacttatc 840
tatgcctga ggaacagtga gatgaaaggg gccgtaggga gagttcttac caggaaactgc 900
ctttcccaga acagctagga aa 922

```

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		International Application No PCT/US 01/10436
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC 7	C07K14/705 C12Q1/68	C12N15/12 A61K38/17
	C12N5/10 G01N33/53	A01K67/027 A61K39/395
		C07K16/28 C07K1/22
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
IPC 7 C12N C07K A01K C12Q A61K G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
EPO-Internal, EMBL, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE EMBL [Online] 22 January 2000 (2000-01-22) DUNN, M.: "Human DNA sequence from clone RP11-108P5 on chromosome 13q14.12-21.1; contains the gene for cysteinyl leukotriene CysLT2 receptor." XP002187243 Accession AL137118 (nucleotides 103990-105030)	1-19, 22, 25-45, 51
P, X	--- DATABASE WPI Section Ch, Week 200125 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B04, AN 2001-244800 XP002187244 -& WO 01 19986 A (YAMANOUCI PHARM CO LTD) , 22 March 2001 (2001-03-22) SEQ ID NOS: 1 and 2	1-19, 22, 25-45, 51
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents:		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "&" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
14 January 2002		07.05.02
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer ALCONADA RODRIG., A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 01/10436**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Although claims 18, 32, 34 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. Claims Nos.: **19,20,23,24**
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-44 (partially), 45, 51 (complete)

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No. PCT/US 01/10436

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. Claims: 1-44 (partially) and 45 and 51 (complete)

A G-protein coupled receptor of SEQ ID NO:1 encoded by the polynucleotide of SEQ ID NO:7, host cells, transgenic organisms, method for recombinant expression, a method for detecting the GPCR of the invention, methods for treatment of a disease associated with decreased expression of the GPCR; method for screening of compounds that bind to the GPCR; method for screening of compounds that modulates the activity of the GPCR; method for screening for a compound that alters the expression of a target nucleotide; a method for assessing toxicity of a compound that result in an altered expression of the GPCR; diagnostic tests and antibodies.

2. Claims: 1-44 (partially) and 46 and 52 (complete)

As invention 1, but referred to the GPCR of SEQ ID NO:2 encoded by the polynucleotide of SEQ ID NO:8.

3. Claims: 1-44 (partially) and 47 and 53 (complete)

As invention 1, but referred to the GPCR of SEQ ID NO:3 encoded by the polynucleotide of SEQ ID NO:9.

4. Claims: 1-44 (partially) and 48 and 54 (complete)

As invention 1, but referred to the GPCR of SEQ ID NO:4 encoded by the polynucleotide of SEQ ID NO:10.

5. Claims: 1-44 (partially) and 49 and 55 (complete)

As invention 1, but referred to the GPCR of SEQ ID NO:5 encoded by the polynucleotide of SEQ ID NO:11.

6. Claims: 1-44 (partially) and 50 and 56 (complete)

As invention 1, but referred to the GPCR of SEQ ID NO:6 encoded by the polynucleotide of SEQ ID NO:12.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No. PCT/US 01/10436

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 19,20,23,24

Present claims 20, 21, 23 and 24 relate to a compositions and to their use in a method of treatment, wherein said compositions are defined by reference to a desirable characteristic or property, namely, that they have been identified by the screening method of claim 19 (for claims 20 and 21) and of claim 22 (for claims 23 and 24). The claims cover all compositions having this characteristic or property, whereas the application does not provides support within the meaning of Article 6 PCT neither disclosure within the meaning of Article 5 PCT for any of such compositions. In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible. Independent of the above reasoning, the claims also lack clarity (Article 6 PCT). An attempt is made to define the compositios by reference to a result to be achieved. Again, this lack of clarity in the present case is such as to render a meaningful search over the whole of the claimed scope impossible. Consequently, the search has not been carried out for those claims.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/US 01/10436

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0119986 A	22-03-2001	AU 7312100 A WO 0119986 A1	17-04-2001 22-03-2001

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マコ-ト' (参考)
A 6 1 P 1/14		A 6 1 P 1/18	4 C 0 8 4
1/16		3/04	4 H 0 4 5
1/18		3/10	
3/04		5/14	
3/10		7/00	
5/14		7/02	
7/00		7/04	
7/02		7/06	
7/04		9/00	
7/06		9/04	
9/00		9/10	
9/04			1 0 1
9/10		9/12	
	1 0 1	11/00	
9/12		11/06	
11/00		13/12	
11/06		17/02	
13/12		17/06	
17/02		19/02	
17/06		19/06	
19/02		19/10	
19/06		21/00	
19/10		21/04	
21/00		25/02	
21/04		25/08	
25/02		25/14	
25/08		25/16	
25/14		25/18	
25/16		25/20	
25/18		25/22	
25/20		25/28	
25/22		27/02	
25/28		29/00	1 0 1
27/02		31/04	
29/00	1 0 1	31/10	
31/04		31/12	
31/10		35/00	
31/12		35/02	
35/00		37/02	
35/02		37/08	
37/02		43/00	1 0 5
37/08			1 1 1
43/00	1 0 5	C 0 7 K 14/705	
	1 1 1	16/28	
C 0 7 K 14/705		C 1 2 N 1/15	
16/28		1/19	

- (72)発明者 グラール、リチャード
アメリカ合衆国カリフォルニア州94121・
サンフランシスコ・トゥエンティナインス
アベニュー 682
- (72)発明者 カーン、ファラ・エイ
アメリカ合衆国カリフォルニア州94040・
マウンテンビュー・#221・エスケラアベ
ニュー 333
- (72)発明者 ナエン、ダニエル・ビー
アメリカ合衆国カリフォルニア州95118・
サンノゼ・リッジウッドドライブ 1403
- (72)発明者 パターソン、チャンドラ
アメリカ合衆国カリフォルニア州94025・
メンロパーク・#1・シャーウッドウェイ
490
- (72)発明者 ラル、ブリーティ
アメリカ合衆国カリフォルニア州95056・
サンタクララ・ピーオーボックス 5142
- (72)発明者 オウ・ヤング、ジャニス・エル
アメリカ合衆国カリフォルニア州94005・
プリズベーン・ゴールデンイーグルレーン
233
- (72)発明者 ヤング、ジュンミング
アメリカ合衆国カリフォルニア州95129・
サンノゼ・パークレーン 7125
- (72)発明者 ハファリア、エープリル
アメリカ合衆国カリフォルニア州95054・
サンタクララ・コーレデプリマベータ
2227
- (72)発明者 ワラ、ナリンダー・ケイ
アメリカ合衆国カリフォルニア州94577・
サンレアンドロ・#205・デービスストリ
ート 890
- (72)発明者 ダス、デボプリバ
アメリカ合衆国カリフォルニア州94087・
サニーベイル・パーキントンアベニュー
1267

F ターム(参考) 2G045 AA34 AA35 AA40 BA11 BB50
DA12 DA13 DA14 DA36 FB02
FB03

4B024 AA01 AA11 BA44 BA61 BA63
CA04 DA01 DA02 DA05 DA06
DA11 EA04 GA01 HA08 HA11
HA12

4B063 QA01 QA18 QQ08 QQ42 QQ53
QR08 QR14 QR32 QR42 QR56
QR77

4B064 AG20 AG26 AG27 CA02 CA05
CA10 CA11 CA19 CC24 DA01
DA13

4B065 AA01X AA26X AA57X AA87X
AA93Y AB01 AB02 CA24
CA25 CA44 CA46

4C084 AA02 AA06 AA17 BA01 BA22
BA23 CA53 DC50 NA14 ZA022
ZA052 ZA062 ZA152 ZA162
ZA182 ZA202 ZA242 ZA332
ZA362 ZA402 ZA422 ZA452
ZA512 ZA552 ZA592 ZA662
ZA682 ZA702 ZA712 ZA722
ZA732 ZA752 ZA812 ZA892
ZA942 ZA962 ZA972 ZB052
ZB072 ZB112 ZB132 ZB152
ZB212 ZB262 ZB272 ZB332
ZB352 ZC022 ZC062 ZC312
ZC352

4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA09
CA40 DA50 DA75 DA76 EA20
EA50 FA74

專利名稱(譯)	G蛋白偶聯受體		
公開(公告)號	JP2003528633A	公開(公告)日	2003-09-30
申請號	JP2001571767	申請日	2001-03-29
[標]申請(專利權)人(譯)	洞察Genomics公司		
申請(專利權)人(譯)	洞察基因組公司		
[標]發明人	ポリッキージェニファーエル トリボレーキャサリーンエム タングトムワイ ボーグンマライアアール グラールリチャード カーンファラエイ ナエンダニエルビー パターソンチャンドラ ラルプリーティ オウヤングジャニスエル ヤングジュンミング ハファリアエープリル ワラナリンダーケイ ダスデポプリバ		
發明人	ポリッキー、ジェニファー・エル トリボレー、キャサリーン・エム タング、トム・ワイ ボーグン、マライア・アール グラール、リチャード カーン、ファラ・エイ ナエン、ダニエル・ビー パターソン、チャンドラ ラル、プリーティ オウ・ヤング、ジャニス・エル ヤング、ジュンミング ハファリア、エープリル ワラ、ナリンダー・ケイ ダス、デポプリバ		
IPC分類号	G01N33/50 A61K38/00 A61K45/00 A61P1/04 A61P1/12 A61P1/14 A61P1/16 A61P1/18 A61P3/04 A61P3/10 A61P5/14 A61P7/00 A61P7/02 A61P7/04 A61P7/06 A61P9/00 A61P9/04 A61P9/10 A61P9/ /12 A61P11/00 A61P11/06 A61P13/12 A61P17/02 A61P17/06 A61P19/02 A61P19/06 A61P19/10 A61P21/00 A61P21/04 A61P25/02 A61P25/08 A61P25/14 A61P25/16 A61P25/18 A61P25/20 A61P25/ /22 A61P25/28 A61P27/02 A61P29/00 A61P31/04 A61P31/10 A61P31/12 A61P35/00 A61P35/02 A61P37/02 A61P37/08 A61P43/00 C07K14/705 C07K16/28 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12N15/12 C12P21/02 C12P21/08 C12Q1/02 C12Q1/68 C12S3/14 G01N33/15 G01N33/ /53 G01N33/566		
CPC分類号	A61K38/00 A61P1/04 A61P1/12 A61P1/14 A61P1/16 A61P1/18 A61P3/04 A61P11/00 A61P11/06 A61P13/12 A61P17/02 A61P17/06 A61P19/02 A61P19/06 A61P19/10 A61P21/00 A61P21/04 A61P25/ /02 A61P25/08 A61P25/14 A61P25/16 A61P25/18 A61P25/20 A61P25/22 A61P25/28 A61P27/02 A61P29/00 A61P31/04 A61P31/10 A61P31/12 A61P35/00 A61P35/02 C07K14/705		
FI分類号	A61K45/00 A61P1/04 A61P1/12 A61P1/14 A61P1/16 A61P1/18 A61P3/04 A61P3/10 A61P5/14 A61P7/ /00 A61P7/02 A61P7/04 A61P7/06 A61P9/00 A61P9/04 A61P9/10 A61P9/10.101 A61P9/12 A61P11/00		

A61P11/06 A61P13/12 A61P17/02 A61P17/06 A61P19/02 A61P19/06 A61P19/10 A61P21/00 A61P21/04 A61P25/02 A61P25/08 A61P25/14 A61P25/16 A61P25/18 A61P25/20 A61P25/22 A61P25/28 A61P27/02 A61P29/00.101 A61P31/04 A61P31/10 A61P31/12 A61P35/00 A61P35/02 A61P37/02 A61P37/08 A61P43/00.105 A61P43/00.111 C07K14/705 C07K16/28 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02.C C12P21/08 C12Q1/02 C12Q1/68.A C12S3/14 G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566 C12N15/00.ZNA.A C12N5/00.A A61K37/02

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/BA44 4B024/BA61 4B024/BA63 4B024/CA04 4B024/DA01 4B024/DA02 4B024/DA05 4B024/DA06 4B024/DA11 4B024/EA04 4B024/GA01 4B024/HA08 4B024/HA11 4B024/HA12 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QQ08 4B063/QQ42 4B063/QQ53 4B063/QR08 4B063/QR14 4B063/QR32 4B063/QR42 4B063/QR56 4B063/QR77 4B064/AG20 4B064/AG26 4B064/AG27 4B064/CA02 4B064/CA05 4B064/CA10 4B064/CA11 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA01X 4B065/AA26X 4B065/AA57X 4B065/AA87X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AB02 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA06 4C084/AA17 4C084/BA01 4C084/BA22 4C084/BA23 4C084/CA53 4C084/DC50 4C084/NA14 4C084/ZA022 4C084/ZA052 4C084/ZA062 4C084/ZA152 4C084/ZA162 4C084/ZA182 4C084/ZA202 4C084/ZA242 4C084/ZA332 4C084/ZA362 4C084/ZA402 4C084/ZA422 4C084/ZA452 4C084/ZA512 4C084/ZA552 4C084/ZA592 4C084/ZA662 4C084/ZA682 4C084/ZA702 4C084/ZA712 4C084/ZA722 4C084/ZA732 4C084/ZA752 4C084/ZA812 4C084/ZA892 4C084/ZA942 4C084/ZA962 4C084/ZA972 4C084/ZB052 4C084/ZB072 4C084/ZB112 4C084/ZB132 4C084/ZB152 4C084/ZB212 4C084/ZB262 4C084/ZB272 4C084/ZB332 4C084/ZB352 4C084/ZC022 4C084/ZC062 4C084/ZC312 4C084/ZC352 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA09 4H045/CA40 4H045/DA50 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74

优先权

60/193051 2000-03-29 US
 60/195155 2000-04-06 US
 60/199084 2000-04-20 US
 60/200551 2000-04-28 US
 60/202278 2000-05-05 US

外部链接

Espacenet

摘要(译)

本发明提供了鉴定和编码GCREC的人G蛋白偶联受体 (GCREC) 和多核苷酸。 本发明还提供表达载体，宿主细胞，抗体，激动剂和拮抗剂。此外，本发明提供了一种用于诊断，治疗或预防与GCREC表达有关的疾病的方法。

(120)

氨基酸位置	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 4	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 6
1-100
101-200
201-300
301-400
401-500
501-600
601-700
701-800
801-900
901-1000